



Universidad de Granada

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III
e Inmunología**

Programa de Doctorado en Inmunología

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS ORGANIZADORAS DE TEJIDO LINFOIDE EN AMÍGDALAS HUMANAS

**Memoria presentada por Alejandro Prados Martín para optar al
título de Doctor por la Universidad de Granada**

Granada, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Alejandro Prados Martín
D.L.: GR 2234-2013
ISBN: 978-84-9028-643-2



Universidad de Granada



Como Directores de la Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo nuestra dirección y se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones. Así mismo, el trabajo reúne todos los requisitos de contenido, teóricos y metodológicos para ser admitido a trámite, a su lectura y defensa pública, con el fin de obtener el referido Título de Doctor, y por lo tanto AUTORIZAMOS la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero.

Granada, a 25 de Febrero de 2013

Fdo.: Enrique F. García Olivares

Fdo.: Raquel Muñoz Fernández

SR. COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INMUNOLOGÍA

A mis padres,

*“Somos máquinas de supervivencia,
autómatas programados a ciegas
con el fin de perpetuar la existencia
de los egoístas genes que
albergamos en nuestras células.”*

Richard Dawkin

*“Aquello que cada uno de nosotros es,
en cada momento de su vida,
es la suma de sus elecciones previas.
El hombre es lo que decide ser.”*

Jean-Paul Sartre

AGRADECIMIENTOS

Ahora que llego al final de otra etapa, echo la vista atrás y veo ese largo camino recorrido en los últimos cinco años. Un camino con sus subidas y bajadas, y que por momentos se sintió interminable. Afortunadamente, lo recorrí en buena compañía, y hoy quiero agradecer el haber estado junto a mí brindándome vuestro apoyo en los momentos más duros, por compartir los buenos y por haberme permitido crecer como investigador y como ser humano.

En primer lugar tengo que agradecer a Enrique la oportunidad que me dio para incorporarme a su grupo y poder conseguir esta gran tesis. Quiero agradecer, también, el apoyo recibido durante estos años y tu capacidad para motivarme cuando los experimentos más se resistían. Gracias.

A Raquel, por haber codirigido esta tesis y haberme enseñado todo lo necesario, desde lo más simple a lo más complejo, para poder trabajar en un laboratorio. Muchas gracias.

A Mari Carmen y Ana, por su ayuda con mis “dudas inmunológicas” y sus sugerencias para que los experimentos funcionaran. A Ignacio, por mostrarse incansable en su empeño por enseñarnos a exponer sin mirar a la pantalla. A José Antonio, cuya ayuda durante las prácticas y en la logística del laboratorio no tiene precio. A los cuatro, muchas gracias.

A mis compañeros del 244/235, por todo lo que he aprendido con vosotros y por los innumerables momentos vividos. Sin lugar a duda, habéis sido un pilar importante durante este tiempo y nunca olvidare nuestros días de congresos, las excursiones, vuestra visita a Ámsterdam, los desayunos en la mesa de la esquina o nuestras divertidas catas de vinos. A todos muchas, gracias.

A Reina y a todos los miembros de su laboratorio, por la paciencia que tuvisteis conmigo y por haberme ayudado en todo cuanto necesite. Dank je well!

A mis amigos de la carrera y a todos los que sin tener el título nos aguantáis cuando monopolizamos la conversación. Como alguno de vosotros dijo alguna vez, es verdad que no habéis participado directamente en el desarrollo de esta tesis, sin embargo, me habéis abierto la mente hacia otros campos de investigación que poco tienen que ver con mi trabajo, desde la ciencia más aplicada hasta la investigación en letras o arte. Del mismo modo, me habéis hecho disfrutar con vuestra compañía en esos numerosos viajes y cenas. Entre todos vosotros tengo que agradecer, especialmente, a Paula J. el apoyo y la amistad que me ha dado en los últimos 10 años. A todos vosotros, muchas gracias.

A mis amigos de toda la vida, todos esos hueveros de nacimiento o adopción, con los que me hice mayor y aprendí que el lugar importa poco cuando se está en buena compañía. En mi siempre quedarán todas esas aventuras que vivimos, recorriendo cortijos, confeccionando el R25 de Alonso, filosofando en la “recta”, de chupitos por la “Roxy”, tirando petardos o rellenando listas de Pokemons mientras el tiempo se paraba a las ocho menos diez. En definitiva, gracias por seguir ahí.

Quiero agradecer el apoyo de toda mi familia: a mis abuelas, a mis tíos y primos. Sin lugar a duda, vosotros habéis marcado en gran medida la persona que hoy en día soy, con todos esos chotos que nos hemos comido y las sobremesas que pasamos discutiendo de política. Gracias por estar junto a mí.

También tengo que agradecer a esa persona que desde el día en que mi madre lo trajo al mundo se empeñó en desarrollar, con mucho esmero, mi santa paciencia. Sin duda lo hiciste por mi bien, para que llegado el día, la ciencia no acabara frustrándome. Gracias Jaime.

A mi madre, esa luchadora nata que me ha apoyado siempre en todas mis decisiones, dándome alas para que hiciera lo que yo quisiese, aunque a veces no le terminaran de convencer. Gracias por todo.

Y por último, quiero agradecer a la persona que, con su esfuerzo y dedicación, cuando aún era un pésimo estudiante, hizo posible el que hoy yo esté

aquí. Además, por tu culpa me convertí en un autómeta para hacer preguntas extrañas, cosa que al final me resulto realmente útil para hacer ciencia. Por eso y por haberlo dado todo por su familia, le dedico esta tesis a mi padre.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
SUMMARY	1
RESUMEN	5
ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN	13
1. Los Órganos Linfoides Secundarios: Estructura y Funciones	15
1.1. <i>Los Ganglios Linfáticos</i>	17
1.2. <i>El Bazo</i>	18
1.3. <i>El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas</i>	20
2. Microdominios de los Órganos Linfoides Secundarios	22
2.1. <i>Zona Linfoide T</i>	23
2.2. <i>Zona B: Los Folículos Linfoides</i>	24
3. Poblaciones Estromales en los Órganos Linfoides Secundarios	30
3.1. <i>Las Células Reticulares Fibroblásticas</i>	32
3.2. <i>Las Células Dendríticas Foliculares</i>	35
3.3. <i>Las Células Reticulares Marginales</i>	40
4. Desarrollo Embrionario de los Órganos Linfoides Secundarios	41
4.1. <i>Diferenciación de las Células Reticulares Marginales</i>	46
4.2. <i>Diferenciación de las Células Dendríticas Foliculares</i>	47
4.3. <i>Diferenciación de las Células Reticulares Fibroblásticas</i>	48
5. Remodelación de los Órganos Linfoides Secundarios	49
6. Los Órganos Linfoides Terciarios	50
OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS	59

1. Muestras.....	61
2. Aislamiento y Cultivo de Células Estromales.....	61
3. Aislamiento de DSC Frescas.....	63
4. Aislamiento de Linfocitos	63
5. Análisis de Expresión mediante Citometría de Flujo	63
6. Anticuerpos Monoclonales.....	64
7. Análisis de Expresión Génica	64
8. Obtención de Clones de Células Estromales de Amígdala	65
9. Diferenciación Mesenquimal de Células Estromales	66
9.1. <i>Diferenciación Adipogénica</i>	<i>66</i>
9.2. <i>Diferenciación Condrogénica.....</i>	<i>66</i>
9.3. <i>Diferenciación Osteogénica</i>	<i>66</i>
9.4. <i>Diferenciación Endotelial</i>	<i>67</i>
10. Citoquímica.....	67
10.1. <i>Tinción con Cristal Violeta.....</i>	<i>67</i>
10.2. <i>Tinción con Oil Red O</i>	<i>67</i>
10.3. <i>Tinción con Alizarin Red S</i>	<i>68</i>
10.4. <i>Tinción con Safranina.....</i>	<i>68</i>
11. Inmunofluorescencia	68
12. Tratamiento de Cultivos de Células Estromales	69
13. Análisis de la Adhesión de Linfocitos	69
14. Análisis de Células en Sub-G1	69
15. Análisis de Proliferación Celular mediante CFDA-SE	70
16. Western-Blot	70
17. Analisis de Sobrenadantes de Cultivo	71
18. Análisis Estadístico.....	71

RESULTADOS	73
1. Caracterización Fenotípica y Funcional de las Células Estromales de Amígdala.....	75
1.1. <i>Aislamiento de Células Estromales de Amígdala</i>	<i>75</i>
1.2. <i>Las TSC presentan un fenotipo similar a las células LTo</i>	<i>77</i>
1.3. <i>Clones obtenidos a partir de líneas de TSC mantienen un fenotipo similar al de las células LTo.....</i>	<i>79</i>
1.4. <i>Comparación del fenotipo de las TSC con otras Células Estromales.....</i>	<i>81</i>
1.5. <i>Las TSC expresan marcadores asociados con Pericitos y Células Madre .</i>	<i>83</i>
1.6. <i>Las TSC tienen capacidad de diferenciación mesenquimal</i>	<i>85</i>
1.7. <i>Localización de las TSC en secciones de Amígdala.....</i>	<i>89</i>
1.8. <i>Las TSC producen factores angiogénicos.</i>	<i>91</i>
1.9. <i>Las TSC son capaces de retener linfocitos B y T en su superficie</i>	<i>93</i>
1.10. <i>Las TSC rescatan de la apoptosis a linfocitos B y T</i>	<i>96</i>
2. Estudio de la capacidad de diferenciación de las Células Estromales de Amígdala.....	97
2.1. <i>Papel de la LT_{α1β2} y el TNF en la diferenciación de las TSC</i>	<i>97</i>
2.2. <i>Papel del Ácido Retinoico, el Anti-CD40, la IL-17 y la IL-21 en la diferenciación de las TSC.....</i>	<i>102</i>
2.3. <i>Efecto de la LT_{α1β2} y el TNF sobre los Fibroblastos de Prepucio.....</i>	<i>105</i>
3. Análisis de la Expresión de HLA-G por las Células Estromales de Amígdala	106
4. Estudio de las Características Funcionales y Fenotípicas Compartidas por las Células Dendríticas Foliculares y las Células Estromales Deciduales.....	108
4.1. <i>Las DSC muestran características distintivas de FDC.....</i>	<i>109</i>
4.2. <i>Tratamiento de DSC, FDC y MSC con TNF y LT_{α1β2}.....</i>	<i>112</i>
4.3. <i>Efecto de DSC, FDC y MSC en la apoptosis de linfocitos B</i>	<i>113</i>

4.4. *Decidualización de DSC y FDC con progesterona y cAMP* 114

DISCUSIÓN **117**

1. **Precusores estromales similares a las células organizadoras de tejido linfóide murinas pueden ser localizados en torno a los vasos sanguíneos de amígdalas humanas**..... 119

2. **La $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF potencian la expresión de marcadores asociados con las células organizadoras de tejido linfóide** 126

3. **Las Células Dendríticas Foliculares y las Células Deciduales Estromales comparten Características Fenotípicas y Funcionales** 128

CONCLUSIONS **133**

BIBLIOGRAFÍA **137**

PUBLICACIONES **165**

SUMMARY

Secondary lymphoid organs (SLOs) originate during embryonic development through a close interaction between lymphoid tissue inducer cells (LTi cells) and lymphoid tissue organizers cells (LTo cells). This interaction results in the proliferation and maturation of both cell types, and the expansion of the SLO germinal primordium. Subsequently, B and T lymphocytes arrive to the primordium, the lymphoid microdomains are organized and LTo cells differentiate into Follicular Dendritic Cells (FDC), Marginal Reticular Cells (MRC) or Fibroblastic Reticular Cells (FRC), depending on the region of SLO.

In this thesis, we obtain cell lines of tonsil stromal cells (TSC) and, for the first time in humans adult SLOs, we identified a cell population with a phenotype similar to murine LTo cells (Podoplanin⁺, CCL19⁺, CCL21⁺, CXCL13⁺, TRANCE⁺, ICAM-1⁺, VCAM-1⁺ and IL-7⁺), and, like LTo cells, they can also adhere and rescue from apoptosis to lymphoid cells. Moreover, these cell lines express mesenchymal stem cells (MSC) markers (CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD271⁺, c-Kit⁺, Nestin⁺, NAGOG⁺, STRO-1⁺, and OCT-3/4⁺) and they can be differentiate into other mesenchymal lineage cell types.

Furthermore, a perivascular origin of TSC is proposed, since they express markers associated to pericytes (α SMA⁺, CD146⁺, MFG-E8⁺, PDGFR β ⁺ and VWF⁺) and angiogenic factors mRNA (Angiopoietin-1⁺, HGF⁺, PGF⁺ and VEGF⁺). We also study tonsil cryosections by confocal microscopy and we identified α SMA⁺, MFG-E8⁺ and CD146⁺ cells around blood vessels.

On the other hand, we evaluated the effect of factors involved in the SLOs stromal cells differentiation on TSC. We show that LT α β 2 and TNF produce a decrease in PDGFR β expression and in cell proliferation, while characteristics associated to LTo cells are enhanced (CCL19, TRANCE and adhesion molecules are upregulated, and the ability to adhere lymphocytes increases), but we found no evidence of differentiation into any of the three adult stromal cell types. In order to induce FDC differentiation, the TSC were treated with retinoic acid, anti-CD40, IL-17 and IL-21, alone or in combination with LT α β 2 and TNF, although none of these treatments induced CD21 or CD35, typical markers of FDC.

Finally, the relationship between FDC and decidual stromal cells (DSC) was also studied. They are two types of stromal cells apparently distant and distinct, but they have many properties in common: both cell types share the expression of antigens, exhibit hematopoietic cell support activity and cell contractility. Their antigen phenotype and hematopoietic cell support activity also relate these cells with mesenchymal stem cells (MSC). In this work we analyze these relationships by studying distinctive characteristics of each cell type in the other two cell types. Like MSC, FDC and DSC show fibroblast morphology in culture and express markers associated to MSC (CD10, CD29 or CD73). However, DSC and FDC exhibited characteristics not observed in MSC: DSC expressed FDC-associated antigens CD14, CD21 and CD23, BAFF, a distinctive FDC molecule, and secreted CXCL13, a cytokine characteristic of FDC. Moreover, DSC lines but not MSC lines inhibited the spontaneous apoptosis of B lymphocytes, a typical functional activity attribute of FDC. FDC, like DSC, but in contrast to MSC, under the effect of progesterone and cAMP (factors involve in the differentiation of DSC) change their fibroblastic morphology to a rounder shape and secrete prolactin. According to that, it can be suggested that the DSC and the FDC share a common precursor in MSC, and this precursor acquires new capacities in the peripheral tissues.

RESUMEN

Los Órganos Linfoides Secundarios (SLOs, secondary lymphoid organs) se originan durante el desarrollo embrionario a través de la interacción entre las células inductoras de tejido linfoide (LTi, lymphoid tissue inducer) y las células organizadoras de tejido linfoide (LTo, lymphoid tissue organizer). Dicha interacción determina un ciclo de retroalimentación positiva en el que las células LTi y LTo se estimulan mutuamente, permitiendo la expansión del primordio germinal del SLO. Posteriormente, con la llegada de los linfocitos B y T, se produce la organización de los microdominios linfoides y la diferenciación terminal de las células LTo hasta Células Dendríticas Foliculares (FDC, follicular dendritic cells), Células Reticulares Marginales (MRC, marginal reticular cells) o Células Reticulares Fibroblásticas (FRC, fibroblastic reticular cells), dependiendo de la región del SLO.

En esta tesis doctoral, se demuestra, por primera vez en SLOs adultos humanos, la existencia de una población celular con un fenotipo similar al de las células LTo de ratón (Podoplanina⁺, CCL19⁺, CCL21⁺, CXCL13⁺, TRANCE⁺, ICAM-1⁺, VCAM-1⁺, IL-7⁺) a través de la obtención de líneas de células estromales de amígdalas (TSC, tonsil stromal cells). Al igual que las células LTo de ratón, estas líneas también son capaces de adherir y rescatar de la apoptosis a células linfoides. Las TSC, además, muestran características asociadas con las células madre mesenquimales (MSC, mesenchymal stem cells), como su fenotipo (CD10⁺, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD271⁺, c-Kit⁺, Nestina⁺, NAGOG⁺, STRO-1⁺, y OCT-3/4⁺) o su capacidad para diferenciarse en otros tipos celulares del linaje mesenquimal.

Por otro lado, se propone un origen perivascular de las TSC, pues éstas expresan marcadores asociados a pericitos (α SMA⁺, CD146⁺, MFG-E8⁺, PDGFR β ⁺ y VWF⁺) y, mediante el estudio de criosecciones de amígdala por microscopía confocal, se identifican en torno a los vasos sanguíneos células α SMA⁺, MFG-E8⁺ y CD146⁺. Además, en las líneas celulares, se detecta la expresión de ARNm de factores angiogénicos (Angiopoyetina-1⁺, HGF⁺, PGF⁺ y VEGF⁺).

A continuación, se evalúa el efecto sobre las TSC de distintos factores implicados en la diferenciación de las células estromales de los SLOs. Así, se muestra como la LT $\alpha_{1\beta 2}$ y el TNF producen una disminución en la expresión del

marcador de pericitos PDGFR β y en la proliferación celular, mientras las características asociadas con las células LTo se ven potenciadas (aumenta la producción de CCL19 y TRANCE, la expresión de moléculas de adhesión y la capacidad de retener linfocitos); sin embargo, no se observa ningún indicio de diferenciación en alguno de los tres tipos celulares adultos. Además, con la intención de inducir la diferenciación hasta FDC, las TSC se tratan con ácido retinoico, anti-CD40, IL-17 e IL-21, solos o en combinación con LT $\alpha_1\beta_2$ y TNF, aunque ninguno de estos tratamientos consigue inducir la expresión de CD21 ó CD35, marcadores característicos ambos de FDC.

Finalmente, se profundiza en la relación existente entre las FDC y las células estromales deciduales (DSC, decidual stromal cells), dos tipos celulares aparentemente distantes y distintos que comparten la expresión de ciertos marcadores antigénicos, tienen capacidad contráctil y regulan la función de células de origen hematopoyético, propiedades que, además, las relacionan con las MSC. Así, se observa que las FDC y las DSC muestran, en cultivo, una morfología fibroblástica y expresan marcadores antigénicos asociados con MSC (CD10, CD29 ó CD73); sin embargo, estos dos tipos celulares presentan características no observadas en MSC, como la expresión de los marcadores asociados a FDC: CD14, CD21, CD23, BAFF y CXCL13. Además, las líneas de DSC, pero no las MSC, inhiben la apoptosis espontánea de linfocitos B, una capacidad tradicionalmente atribuida a las FDC. Por su parte, las FDC, pero no las MSC, pueden diferenciarse in vitro bajo la presencia de progesterona y cAMP, factores involucrados en la diferenciación (decidualización) de las DSC. En estas condiciones, la morfología de las DSC y FDC cambia de fibroblástica a redondeada y secretan prolactina. Todo esto sugiere que las DSC y las FDC comparten un precursor común, las MSC, que adquiriría capacidades distintas en cada uno de los tejidos.

ABREVIATURAS

α SMA: Actina de Musculo Liso α (*α Smooth Muscle Actin*)

APC: Célula Presentadora de Antígeno (*Antigen Presenting Cell*)

cAMP: Adenosín Monofosfato-3',5' cíclico (*3'-5' cyclic Adenosine Monophosphate*)

BAFF: Factor activador de células B (*B-cell activating factor*)

BM-MSc: Células Estromales Mesenquimales de Médula Ósea (*Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells*)

Célula LTi: Célula Inductora de Tejido Linfoide (*Lymphoid-Tissue induzer cell*)

Célula LTo: Célula Organizadora de Tejido Linfoide (*Lymphoid-Tissue organizer cell*)

Célula Tfh: Célula T colaboradora folicular (*Follicular helper T cell*)

DC: Célula Dendrítica (*Dendritic Cell*)

DSC: Células Estromales Deciduales (*Decidual Stromal cells*)

FDC: Células Dendríticas Foliculares (*Follicular Dendritic Cells*)

FF: Fibroblastos de Prepucio (*Foreskin Fibroblast*)

FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico (*Fibroblastic Growth Factor*)

FRC: Células Fibroblásticas Reticulares (*Fibroblastic Reticular Cells*)

HEV: Venulas de Endotelio Alto (*High Endothelial Venules*)

HGF: Factor de Crecimiento de Hepatocitos (*Hepatocytes Growth Factor*)

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa

IFN: Interferón

IL: Interleucina

LN: Ganglio Linfático (*Lymphatic Node*)

LT: Linfotoxina

MALT: Tejido Linfoide Asociado a Mucosas (*Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*)

MFG-E8: Factor de Crecimiento Epidermico de los Globulos de Grasa de la Leche 8 (*Milk Fat Globule Epidermal growth factor 8*)

MHC: Complejo Principal de Histocompatibilidad (*Mayor Histocompatibility Complex*)

MRC: Células Reticulares Marginales (*Marginal Reticular Cells*)

MSC: Células Estromales Mesenquimales (*Mesenchymal Stromal Cells*)

p-MHC: Peptido unido a MHC

PALS: Vaina Linfoide Periarteriolar (*Periarteriolar Lymphatic Sheath*)

PDGFR β : Receptor β del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor β*)

PGF: Factor de Crecimiento Placentario (*Placental Growth Factor*)

PRL: Prolactina

RA: Ácido Retinoico (*Retinoic Acid*)

S1P: Esfingosina-1-Fosfato (*Sphingosine-1-Phosphate*)

SCS: Seno Subcapsular (*Subcapsular Sinus*)

SD: Desviación Estándar (*Standard Deviation*)

SLO: Órgano Linfoide Secundario (*Secondary Lymphoid Organs*)

TLO: Órgano Linfoide Terciario (*Tertiary Lymphoid Organs*)

TRANCE: Citocina inducida por Activación Relacionada con el TNF (*TNF-Related Activation-induced cytokine*)

TNF: Factor de Necrosis Tumoral (*Tumoral Necrotic Factor*)

TSC: Células Estromales de Amígdala (*Tonsil Stromal Cells*)

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (*Vascular Endothelial Growth*)

VWF: Factor de Von Willebrand (*Von Willebrand Factor*)

INTRODUCCIÓN

El sistema inmunitario adaptativo de los vertebrados se basa en la generación aleatoria de un vasto repertorio de receptores linfocíticos, expresados de forma clonal. La aparición de este sistema determinó la evolución de tejidos y órganos especializados, los cuales, en base a un criterio funcional, pueden ser divididos en dos categorías principales: primarios y secundarios. En los **Órganos Linfoides Primarios**, como la medula ósea de mamíferos o el timo, tiene lugar la formación del repertorio primario de linfocitos; en cambio, los **Órganos Linfoides Secundarios** son responsables de la coordinación de la respuesta inmunitaria, siendo el lugar en el que las células linfoides se disponen, a la espera de entrar en contacto con su antígeno específico. Además, durante los procesos inflamatorios, pueden aparecer tejidos linfoides funcionalmente equivalentes a los secundarios, siendo estos denominados **Órganos Linfoides Terciarios** (Boehm et al. 2012, Hofmann et al. 2010).

1. LOS ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS: ESTRUCTURA Y FUNCIONES

Los Órganos Linfoides Secundarios (SLOs, secondary lymphoid organs) constituyen una red diversa y compleja de tejidos anatómicamente diferentes, que actúan como filtros, atrapando y concentrando antígenos. De este modo, los SLOs facilitan la interacción entre las células inmunitarias y los microorganismos, brindando todos los factores requeridos para la iniciación de una respuesta inmunitaria efectiva.

Cuando un patógeno atraviesa las barreras físicas del cuerpo, éste intenta dispersarse a través del hospedador, buscando lugares en los que poder sobrevivir y multiplicarse. Así, la primera función de los SLOs consiste en evitar la dispersión de los patógenos, para ello estos tejidos cuentan con macrófagos estratégicamente localizados (Junt et al. 2007) y con la producción de mediadores innatos, como interferones de tipo I (Cervantes-Barragan et al. 2007), que ayudan a mantener el patógeno controlado, mientras se activa la respuesta inmunitaria adaptativa.

Al mismo tiempo que se intenta limitar la dispersión de los patógenos, los SLOs aumentan la probabilidad de que los pocos linfocitos específicos del patógeno, no más de 2.000 en todo el cuerpo (Blattman et al. 2002, Moon et al. 2007), puedan ser activados. Es por este motivo que los linfocitos T y B circulan continuamente entre los distintos SLOs, para de esta forma aumentar las probabilidades de encontrar a su antígeno (von Andrian and Mempel 2003). Además, la entrada de un patógeno, por efecto de mecanismos innatos, promueve una rápida acumulación de linfocitos en los SLOs infectados. Esta redistribución se debe a la producción de quimiocinas por las células endoteliales (Soderberg et al. 2005, Webster et al. 2006) y a la reducción de la capacidad de los linfocitos para abandonar los SLOs, debido a que los interferones (IFN) de tipo I disminuyen la sensibilidad a los lisofosfolípidos Esfingosina-1-fosfato (S1P, Sphingosine-1-Phosphate), presentes en los vasos linfáticos aferentes (Cyster and Schwab 2012).

Por otro lado, la llegada de DCs y antígenos procedentes de la periferia, permite la activación de los linfocitos, induciendo la respuesta inmunitaria adaptativa (Cavanagh and Von Andrian 2002). Durante esta etapa, los SLOs proveerán los factores necesarios para la supervivencia y diferenciación de los linfocitos hacia células efectoras o de memoria, así como los factores implicados en la maduración de la afinidad de los linfocitos B (Turley et al. 2010). Finalmente, a través de estos mecanismos, los SLOs consiguen activar linfocitos T colaboradores (Th) que producen citocinas, linfocitos T citotóxicos que pueden lisar células infectadas y linfocitos B que producen anticuerpos con una elevada afinidad.

Dado que los patógenos pueden dispersarse a través del hospedador por distintas vías, los vertebrados han desarrollado diferentes tipos de SLOs. Así, en los mamíferos encontramos tres tipos de SLOs: los ganglios linfáticos destinados a analizar la linfa; el bazo que actúa como filtro de la sangre; y los tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT, Mucosa-Associated Lymphoid Tissue).

1.1. Los Ganglios Linfáticos

Los ganglios linfáticos (LN, Lymphatic Node) son estructuras recubiertas por una cápsula proteica, que se encuentran localizados en los puntos de unión de los vasos linfáticos, esto les permite detectar antígenos procedentes del líquido intersticial (Willard-Mack 2006).

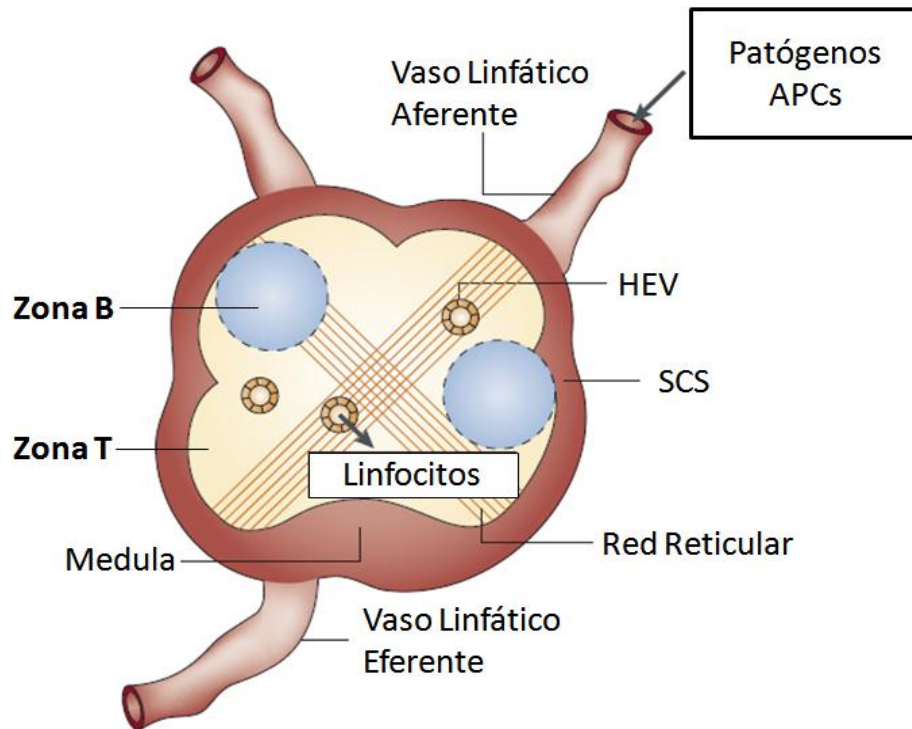


Figura 1 Representación esquemática de un ganglio linfático. Imagen tomada y modificado de Junt et al. 2007.

Desde en un punto de vista histológico, los LN pueden dividirse en tres regiones concéntricas: corteza, paracorteza y medula, cada una de las cuales soporta un microambiente distinto (Fig. 1). En la zona más externa, la **corteza**, se concentran linfocitos B formando agregados denominados folículos linfoides. Esta zona se encuentra justo debajo de la cápsula y en ella también encontramos un gran número de macrófagos, células Th foliculares y células estromales. Bajo la corteza, se halla la **paracorteza** constituida fundamentalmente por linfocitos T y células dendríticas, dispuestos sobre una red fibrosa, producida por las células

reticulares fibroblásticas. Finalmente, en la zona más central del LN, con una menor densidad celular, se encuentra la **médula**, en la que existe una gran cantidad de células plasmáticas que producen anticuerpos activamente (Junt et al. 2008, Willard-Mack 2006).

La llegada de los linfocitos a los LNs ocurre a través de las vénulas del endotelio alto (HEV, High Endothelial Venules), las cuales se encuentran localizadas en una región conocida como anillo cortical (Katakai et al. 2004b) y se caracterizan por la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, como por ejemplo CD62P o CCL21. Una vez en el interior de los LNs, los linfocitos migran hacia su área linfoide correspondiente, siendo guiados por células estromales (Bajenoff et al. 2006).

Por otro lado, La llegada de los antígenos hasta los LN ocurre a través de los vasos linfáticos aferentes, siendo la linfa vertida en el seno subcapsular (SCS, Subcapsular Sinus), espacio comprendido entre la cápsula y la corteza (Szakal et al. 1983). Para impedir la dispersión de los patógenos por el interior del parénquima, en el suelo del SCS, existe una línea de macrófagos y células estromales, que capturan antígenos, partículas y células apoptóticas, y limita el paso de moléculas hacia la corteza en base a su tamaño (Sainte-Marie and Peng 1982). Dicha restricción en el acceso de las partículas protege a los linfocitos de una serie de sustancias que puede resultar especialmente adversas para la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, durante las infecciones microbianas, esta barrera es importante al impedir que productos microbianos, como el LPS, perturben los procesos inmunitarios (Gretz et al. 2000).

1.2.El Bazo

El bazo se encuentra localizado en la cavidad abdominal, bajo el diafragma, y su función principal es la de actuar como filtro de la sangre, siendo clave en la detección y eliminación de patógenos sanguíneos (Mebius and Kraal 2005). Este órgano se encuentra dividido en dos compartimentos, la pulpa blanca y la pulpa roja, separadas ambas por una región difusa conocida como zona marginal (Fig. 2).

La **pulpa roja** está constituida por una compleja red de senos venosos, donde tiene lugar la filtración de la sangre y la eliminación de los glóbulos rojos envejecidos, jugando por ello un importante papel en el reciclado del hierro. La pulpa roja, además, tiene un importante papel inmunológico, pues en ella residen abundantes células plasmáticas que producen anticuerpos, así como macrófagos que fagocitan restos celulares y patógenos (MacLennan et al. 2003, Mebius and Kraal 2005).

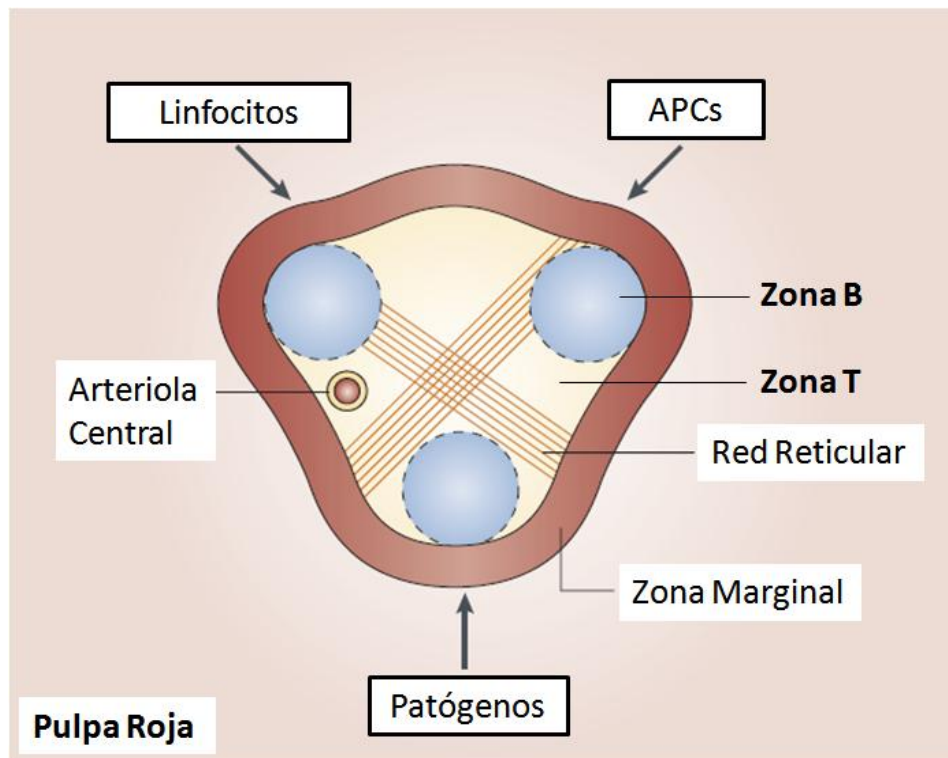


Figura 2 Representación esquemática de la pulpa blanca del bazo. Imagen tomada y modificado de Junt et al. 2007.

La **pulpa blanca** es el lugar en el que se encuentran los linfocitos, existiendo una región rica en células T y otra en células B. Los linfocitos T se disponen en la vaina linfática periarteriolar (PALS, periarteriolar lymphatic sheath), localizada esta en torno a las ramas de la arteria esplénica y recubriendo a los folículos linfoides, lugar en el que se acumulan las células B (Fig. 2). La segregación de los linfocitos en estas dos áreas se debe, como en el resto de SLOs, a la existencia de células

estromales que producen quimiocinas que atraen a un tipo u otro de linfocitos (Ngo et al. 1999).

La **zona marginal** es una importante zona de paso para los linfocitos que salen del torrente sanguíneo y que se dirigen hacia la pulpa blanca, siendo este desplazamiento un proceso activo, probablemente similar a la trans migración que ocurre a nivel de las HEV en los LNs, aunque las interacciones moleculares exactas no son totalmente comprendidas (Cyster and Goodnow 1995). A través de esta región se produce, también, la entrada de los antígenos, pues es aquí donde desemboca la arteria esplénica. Del mismo modo que ocurre a nivel del SCS de los LNs, los macrófagos que residen en la zona marginal, junto con otras células no hematopoyéticas, impiden la dispersión de moléculas hacia la pulpa blanca (Nolte et al. 2003).

En cuanto a la forma en la que los linfocitos abandonan el bazo, se conocen pocos detalles, aunque se piensa que las células T activadas podrían salir de la pulpa blanca a través de canales existentes en la zona marginal y entrar en el torrente sanguíneo a través de los senos venosos. No obstante, otra posibilidad es que los linfocitos salgan del bazo través de la red de vasos linfáticos eferentes que se forma en torno a las arteriolas centrales (Pellas and Weiss 1990).

1.3.El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

Las mucosas que recubren los tractos respiratorio, gastrointestinal y urogenital son áreas especialmente expuestas al contacto con microorganismos, por este motivo, en estas localizaciones existen una extensa red de tejidos linfoides organizados en los que se acumulan, aproximadamente, la mitad de los linfocitos del organismo. En conjunto, estas estructuras reciben el nombre de **tejido linfoide asociado a mucosas**, incluyéndose dentro de este grupo el tejido linfoide bronquial (BALT, Broncus Associated Lymphoid Tissues), el tejido linfoide gástrico (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissues), el anillo de Waldeyer (constituido por las amígdalas palatinas y lingual, y las adenoides) o las placas de Peyer (Junt et al. 2008).

Desde un punto de vista estructural, el MALT varía desde grupos laxos de células linfoides en la lámina propia de las vellosidades intestinales, hasta estructuras bien organizadas como las placas de Peyer, constituidos por la agregación de 30 a 40 folículos linfoides a nivel del intestino delgado.

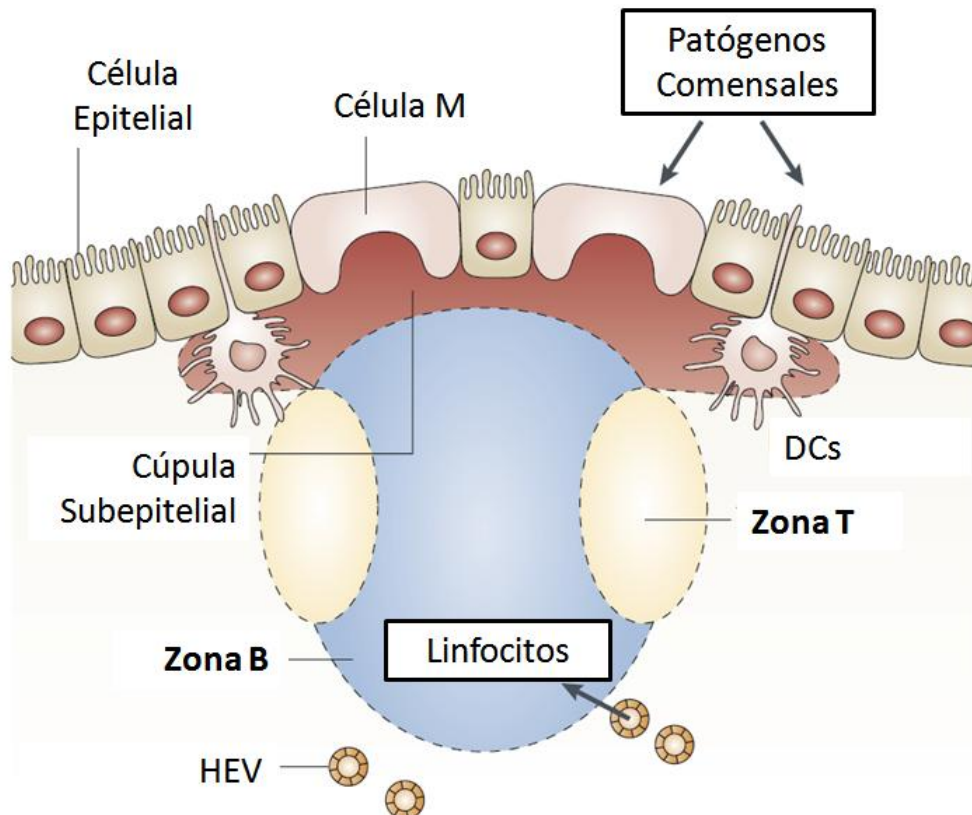


Figura 3 Representación esquemática de una placa de Peyer. Imagen tomada y modificado de Junt et al. 2007.

Estos tejidos linfoides se encuentran limitados hacia el exterior por una capa de células epiteliales que actúa como primera línea de defensa, impidiendo la entrada de microorganismos. Inmersos en esta capa, además de una gran cantidad de linfocitos intraepiteliales, aparece un tipo de célula epitelial especializada en el transporte de antígenos desde el exterior hacia el tejido linfóide subyacente, denominadas células M. Estas células presentan una morfología aplanada, carecen de microvellosidades y cuentan con una profunda invaginación en la membrana basolateral, donde se vierten antígenos y se alojan linfocitos y macrófagos (Pickard

and Chervonsky 2010), por lo que las células M juegan un papel relevante en la activación de la respuesta inmunitaria en los MALT.

Bajo las células epiteliales se encuentra la lámina propia, en la cual existe una gran cantidad de células plasmáticas. Dichas células efectoras se caracterizan por la producción y secreción de inmunoglobulina A, que es vertida al exterior a través de las células epiteliales, jugando un papel importante en el control de la flora bacteriana que reside sobre los epitelios (Kiyono and Fukuyama 2004, Macpherson et al. 2012).

A nivel de la mucosa, y en algunos casos en la submucosa, aparecen grandes agregados de células B (folículos), rodeados por abundantes células T que forman las regiones interfoliculares. En estos SLOs, de forma similar a lo que ocurre en los LNs, los linfocitos entran a través de las HEVs y, a continuación, migran a través del órgano, siendo guiados por las células estromales residentes en el SLO. Finalmente, los linfocitos abandonan este tejido a través de los vasos linfáticos eferentes (Junt et al. 2008, Kiyono and Fukuyama 2004).

2. MICRODOMINIOS DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

A pesar de las grandes diferencias estructurales de los SLOs descritos en el apartado anterior, debidas en gran parte a la forma en la que captan los antígenos, su microanatomía es bastante similar cuando no existe infección. De forma simplificada, podemos identificar dos zonas diferentes en estos órganos: una en la que se acumulan y activan los linfocitos B (zona linfoide B o folículos); y otra en la que lo hacen los linfocitos T (zona linfoide T) (Junt et al. 2008). La existencia de estas dos zonas fue apreciada incluso antes de la caracterización de los linfocitos T y B, siendo en ese momento definidas en base a su dependencia o independencia del timo (Parrott et al. 1966).

2.1. Zona Linfoide T

La vaina linfoide periarteriolar del bazo, la paracorteza de los ganglios linfáticos y la zona interfolicular de las placas de Peyer son conocidas de forma general como zona linfoide T. Esta región está constituida, principalmente, por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que migran activamente sobre células estromales, siendo la zona T, el lugar donde estos linfocitos encuentran su antígeno específico (Bajenoff et al. 2006, Junt et al. 2008).

Los linfocitos T vírgenes recorren rápidamente y de forma aleatoria los SLOs durante aproximadamente 24 horas, tiempo que puede extenderse de 3 a 4 días si son expuestos a su antígeno específico (Miller et al. 2002). Durante esta migración, los linfocitos T establecen contactos con las células dendríticas a través del TCR, lo que permite, en el caso de encontrar su antígeno, la activación de la célula, produciéndose expansión clonal y diferenciación hacia células T memoria y efectoras (von Andrian and Mempel 2003).

En ausencia de antígenos, las células T se desplazan a una velocidad media de entre 11-14 $\mu\text{m}/\text{min}$, realizando contactos cortos y aleatorios con multitud de DCs, en los que no se disminuye la velocidad ni se movilizan señales de calcio (Wei et al. 2007). Tal es la velocidad de los linfocitos T que las DC pueden llegar a contactar con entre 500 y 5000 células T distintas en una hora, maximizándose las oportunidades de encontrar su antígeno específico (Bousso and Robey 2003, Miller et al. 2004b).

El ratio de contactos entre células T y DC en ausencia de antígenos no es solamente resultado del azar, pues las células T CD8⁺ tienden a encontrar más frecuentemente DC que han establecido interacciones con otras células T, debido a la producción de CCL3 y CCL4 en las zonas donde se forman los conjugados T-DC (Castellino et al. 2006, Hugues et al. 2007).

En presencia de antígenos, las células dendríticas, procedentes de la periferia, llegan a los ganglios linfáticos al cabo de entre 12 y 18 horas tras la exposición al antígeno, expresando elevados niveles de MHC de clase II y moléculas

coestimuladoras que permiten la activación de los linfocitos T (Garcia et al. 2007). Además, existe una segunda vía de presentación de antígenos mediada por DC residentes en los SLOs, las cuales se encuentran ancladas sobre la red estromal, presentando una baja motilidad y localizándose en torno a los vasos sanguíneos (Garcia et al. 2007). Así, la administración periférica de un antígeno soluble puede producir la activación de linfocitos T, mucho antes de que algún DC procedente de la periferia sea detectada en los SLOs. La existencia de estas dos poblaciones de DC, origina dos oleadas de presentación de antígenos, que probablemente inducen respuestas diferentes en las células T (Itano and Jenkins 2003, von Andrian and Mempel 2003).

Independientemente del tipo célula DC, los linfocitos van a empezar a establecer contactos con estas células presentadoras de antígenos, los cuales serán rápidos y sin movilización de calcio en los casos de células T no específica para el antígeno que porta (Mempel et al. 2004, Miller et al. 2004a). En el caso de que un linfocito T encuentre una DC con su antígeno específico, inicialmente, se establecen interacciones transitorias, durante unas 8 horas, entre ambas células y, sólo después de esta fase inicial de interacciones dinámicas, se producen contactos estables que duran más de 1 hora y que inducen una robusta activación de las células T (Hugues et al. 2007, Miller et al. 2004a).

2.2.Zona B: Los Folículos Linfoides

En los mamíferos, la mayor parte de linfocitos B se encuentran concentrados en el interior de los SLOs, formando estructuras conocidas como folículos linfoides. Estas agrupaciones de células B se encuentran localizadas de forma adyacente al lugar de entrada de los antígenos: bajo el seno subcapsular en los LN, junto al seno marginal en el bazo o bajo las células M en el tejido linfoide asociado a mucosas (Cyster 2010, Cyster et al. 2000).

Aunque todos los folículos se encuentran constituidos principalmente por linfocitos B, en función del estado de activación de estas células, los folículos pueden ser de dos tipos: primarios o secundarios. Los **folículos linfoides primarios**

contienen células quiescentes, fundamentalmente linfocitos B vírgenes, que migran a gran velocidad en busca de su antígeno específico. Los **folículos linfoides secundarios**, por su parte, contiene linfocitos B activados, que se hayan formando una estructura conocida como centro germinal (GC, germinal center), lugar este en el que ocurren los procesos de cambio de isotipo y maduración de la afinidad, a través de la supervivencia y expansión selectiva de clones de células B con mutaciones somáticas (Cyster et al. 2000).

Folículos Linfoides Primarios. Las células B vírgenes se encuentran en constante recirculación a través del cuerpo y van a llegar hasta la zona T de los SLOs atraídas por las quimiocinas CXCL13, CCL19 y CCL21 (Luther et al. 2002). Desde esta región, los linfocitos B migran hacia los folículos linfoides primarios, atraídos por CXCL13 y otras moléculas quimioatrayentes, como los oxisteroles presentes en la superficie de las células estromales (Gatto et al. 2009, Muller et al. 2003, Okada et al. 2002). Los estudios de imagen bifotónica han demostrado que estas células B foliculares presentan una elevada motilidad, moviéndose aleatoriamente por los folículos a una velocidad de 6 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Miller et al. 2002). Al cabo de un día, si estas células no encuentran su antígeno, vuelven a la circulación dirigiéndose hacia otros SLOs (Miller et al. 2002).

Activación de las Células B. Cuando los linfocitos B, en su migración a través del folículo, encuentran su antígeno específico, éstos disminuyen temporalmente su velocidad a la mitad (Okada et al. 2005), de forma similar a lo que ocurre cuando las células T son activadas (Mempel et al. 2004). Al cabo de unas horas tras la activación, los linfocitos B comienzan a desplazarse nuevamente, pero en esta ocasión siguen un patrón dirigido, migrando hacia el límite o borde B:T (Cyster 2010). Este cambio en el patrón de migración se debe a un incremento en la expresión de CCR7, cuyos ligandos (CCL19 y CCL21) son expresados por las células estromales de la zona T (Reif et al. 2002).

Hasta el borde B:T también llegan linfocitos T activados, debido a que estas células experimentan una reducción en la expresión de CCR7 y a que comienzan a expresar CXCR5, siendo su ligando (CXCL13) expresado por las células estromales

de los folículos (Ansel et al. 1999, Haynes et al. 2007, Randolph et al. 1999). En este proceso, las células dendríticas también juegan un papel importante, pues se acumulan en el borde B:T y producen quimiocinas, como la CCL22, que atraen a los linfocitos T recién activados (Bystry et al. 2001, Tang and Cyster 1999).

Una vez que ambos tipos de linfocitos se encuentran en el borde B:T, las células B compiten por los linfocitos Th, de modo que solo aquellas células B con una afinidad mayor por el antígeno serán capaces de captar linfocitos Th, y por lo tanto serán las únicas que podrán dar lugar a un centro germinal (Victoria and Nussenzweig 2012). En este proceso juega un papel fundamental los niveles de MHC unido a péptido (p-MHC) que presentan las células B en su superficie, lo que a su vez depende de la afinidad del BCR por el antígeno. Así, los linfocitos B con una mayor afinidad, presentan una mayor cantidad de p-MHC, lo que determina la formación de un conjugado estable con linfocitos T, que pueden durar hasta una hora. En cambio, si la célula T reconoce un antígeno distinto, esta unión dura menos de 10 minutos, sugiriendo que el escaneo inicial del complejo MHC-péptido se concluye durante este periodo (Okada and Cyster 2006).

Folículos Linfoides Secundarios. Aquellas células B que establecen sinapsis estables con los linfocitos Th experimentan un descenso en el receptor del fosfolípido S1P y en el receptor de oxisteroles EBI2, lo que determina la migración de los linfocitos B hacia el centro del folículo, donde existe una menor expresión de estas moléculas (Hannedouche et al. 2011, Liu C. et al. 2011, Pereira et al. 2009). Así, las células B migran al centro de los folículos primarios y, al cabo de 6 días tras la inmunización primaria, comienzan a proliferar y a diferenciarse, originando focos que incrementan rápidamente su tamaño, apareciendo, finalmente, los centros germinales maduros (Victoria and Nussenzweig 2012).

Centros Germinales. En los centros germinales maduros se pueden distinguir dos compartimentos, denominados zona clara y zona oscura (Fig. 4), en base a su apariencia histológica bajo el microscopio óptico (Victoria and Nussenzweig 2012).

La **zona oscura** está localizada cerca de la zona T y se encuentra constituida, casi en su totalidad, por células B, denominadas **centroblastos**. Dichos linfocitos presentan una elevada expresión de CXCR4, lo que determina que sean mantenidos en la zona oscura, debido a la mayor expresión de CXCL12 en estas áreas (Allen D. C. et al. 2004). Los centroblastos presentan un gran tamaño y una baja expresión de inmunoglobulinas de membrana, están en continua proliferación y expresan AID (activation-induced deaminase), enzima clave para los procesos de hipermutación somática y de cambio de clase (Muramatsu et al. 2000). Debido a los procesos mediados por la AID una gran cantidad de centroblastos van a morir por apoptosis, debido a la acumulación de daño en el ADN o a la aparición de mutaciones que impiden la expresión del BCR (Victoria and Nussenzweig 2012).

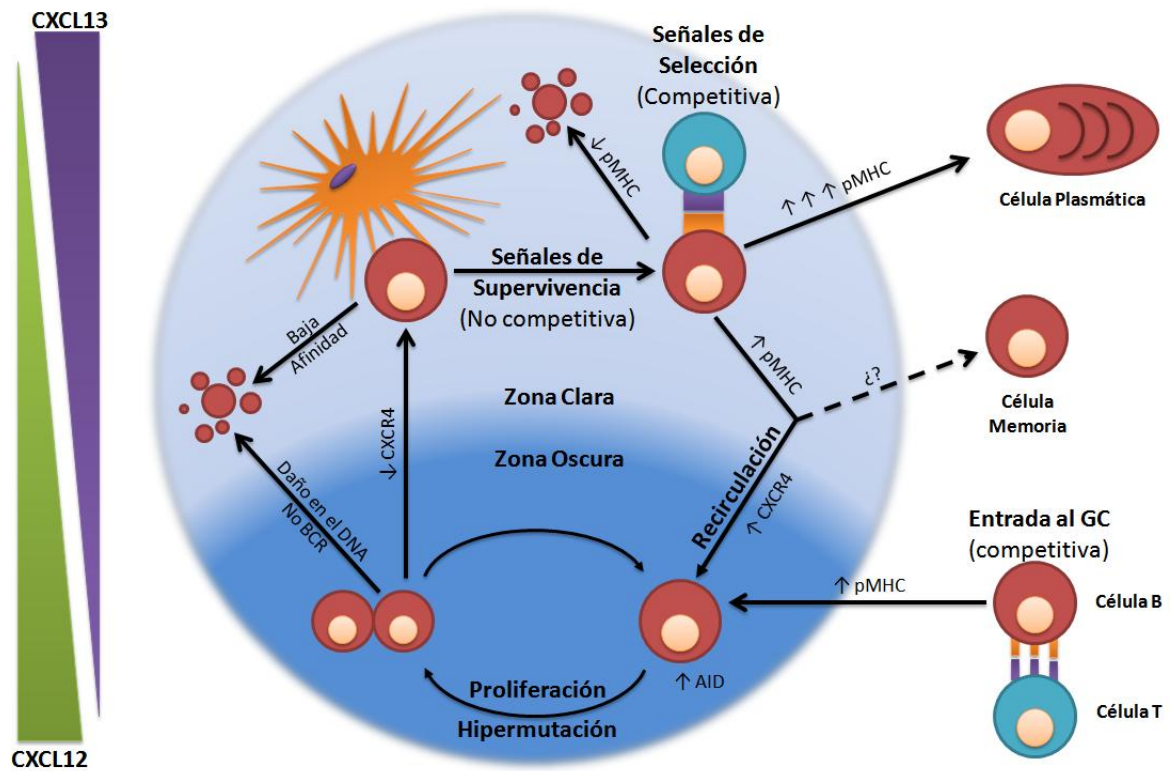


Figura 4 Representación esquemática de los procesos que ocurren en el interior de los Centros Germinales. Imagen modificado a partir de Victoria y Nussenzweig, 2012.

Tras el ciclo de división/mutación, los centroblastos supervivientes aumentan la expresión de CXCR5 y disminuyen la de CXCR4, siendo atraídos hacia la zona clara, debido a los elevados niveles de CXCL13 que existen en esta región (Beltman et al. 2011, Victora et al. 2010). En la salida de la zona oscura también parecen jugar un papel importante CCR6, Ebi2 y S1P3 (Victora and Nussenzweig 2012).

La **zona clara**, localizada en el polo distal, es el lugar donde se produce la selección de los linfocitos con una mayor afinidad por el antígeno. Esta región está constituida por linfocitos B, conocidos como **centrocitos**, y por una extensa red de células dendríticas foliculares, que retienen en su superficie antígenos intactos, necesarios para la selección de los linfocitos B (Cyster et al. 2000, Mandel et al. 1980). En esta zona, también existe una población de células B IgD⁺ en constante movimiento a través del GC; células T, la mayoría de las cuales son CD4⁺CXCR5⁺, siendo conocidas como células T colaboradoras foliculares (Tfh); un pequeño número de células dendríticas; y macrófagos (Allen C. D. and Cyster 2008, Fazilleau et al. 2009, Lindquist et al. 2004, Schwickert et al. 2007).

Los centrocitos son células muy susceptibles de morir por apoptosis debido a la gran expresión de receptores de muerte y a la pérdida de moléculas antiapoptóticas (Liu Y. J. et al. 1991, Yoshino et al. 1994), por lo que su supervivencia depende de la obtención de factores antiapoptóticos y proliferativos (Park et al. 2004). Es por este motivo que los centrocitos necesitan competir entre ellos por la obtención de dichas señales, de modo que aquellos con una menor afinidad por el antígeno mueren por apoptosis, lo que determina el aumento en la afinidad tras sucesivas inmunizaciones (Rajewsky 1996, Victora and Nussenzweig 2012).

Los centrocitos reciben señales de supervivencia al interactuar con los inmunocomplejos retenidos sobre las células estromales de la zona clara, de modo que aquellas células con escasa afinidad entran en apoptosis al no recibir estas señales (Tarlinton and Smith 2000).

Los últimos estudios parecen demostrar que no se establece una competencia directa por los antígenos retenidos sobre las células estromales, sino que el factor limitante en la selección son las células Tfh (Victoria et al. 2010). Estos linfocitos producen factores imprescindibles para el desarrollo del centro germinal como la IL-21 (Linterman et al. 2010, Zotos et al. 2010) o CD40L (Foy et al. 1994), de hecho el tamaño de los GC está relacionado con la disponibilidad de células Tfh (Rolf et al. 2010). Según los últimos datos, la selección de las células B parece ocurrir a través de los niveles de p-MHC expresado en su superficie, de modo que aquellas células B con una mayor expresión de p-MHC establecen sinapsis de mayor duración con células T, facilitándoles estas los factores de supervivencia (Depoil et al. 2005, Victoria and Nussenzweig 2012).

Finalmente, las células que consiguen interactuar con las Tfh pueden seguir tres caminos: volver a la zona oscura, como consecuencia de un aumento en la expresión de CXCR4, y comenzar un nuevo ciclo de proliferación/mutación determinando un mayor aumento en la afinidad (Kepler and Perelson 1993, Oprea and Perelson 1997); salir del CG como plasmoblastos (precursores de las células plasmáticas) (Shapiro-Shelef and Calame 2005); o bien salir como células B memoria, las cuales ante una nueva exposición al antígeno, rápidamente se diferenciarán hacia células plasmáticas (Pape et al. 2011). No está claro el proceso por el cual una célula B sigue alguno de estos caminos; los datos disponibles, parecen indicar que las células B del centro germinal con una mayor afinidad (aquellas con una mayor cantidad de pMHC) tienden a diferenciarse hacia células B plasmáticas mientras aquellas que presentan una afinidad menos alta se diferencian hacia células memoria o vuelven a la zona oscura del centro germinal (Depoil et al. 2005, Victoria and Nussenzweig 2012).

3. POBLACIONES ESTROMALES EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Los estudios realizados sobre los SLOs, tradicionalmente, se han centrado en el estudio de las células de origen hematopoyético (caracterizadas por la expresión de CD45), gracias a los cuales hoy conocemos con bastante detalle los mecanismos por los que los linfocitos B y T son activados. Sin embargo, la mayoría de inmunólogos han ignorado, durante mucho tiempo, el compartimento CD45⁻ (Fig. 5A), involucrado en la organización y compartimentación de los SLOs, así como en la regulación de la respuesta inmunitaria. Este grupo de células muestra una enorme heterogeneidad, lo que junto con la falta de marcadores específicos, ha dificultado los avances en el conocimiento de estas células. Además, la gran mayoría de los marcadores que a continuación se describen, solo han sido identificados en ratón, siendo los datos en humanos aún escasos, por lo que en este trabajo se asume, en algunos casos, un fenotipo similar entre las células murinas y las humanas.

En el estudio de las células no hematopoyéticas, una combinación especialmente útil de marcadores de superficie fue introducida por Link y colaboradores, quienes, basándose en la expresión de CD31 y podoplanina (Gp38) (Fig. 5B), consiguieron diferenciar cuatro poblaciones diferentes dentro de los ganglios linfáticos de ratón. Así, pudieron diferenciar las **Células Endoteliales Sanguíneas (BEC)** como células CD31+GP38⁻, las **Células Endoteliales Linfáticas (LEC)** como CD31+Gp38⁺ y las **Células Estromales** que fueron CD31-Gp38⁺ (Fig. 5B) (Link et al. 2007). Sin embargo, esta clasificación aún se muestra incompleta pues las células CD45-CD31-Gp38⁻ constituyen una mezcla de poblaciones pobremente caracterizadas, de las cuales solo algunas han sido identificadas. El estudio de estas células se ve complicado, especialmente, por la dificultad para obtener suspensiones unicelulares, debido a los fuertes contactos establecidos entre las distintas células (Sukumar et al. 2006a), así como por la sensibilidad de ciertos marcadores de superficie a la acción de proteasas, como la dispasa, usadas en algunos protocolos de digestión (Roosendaal and Mebius 2010).

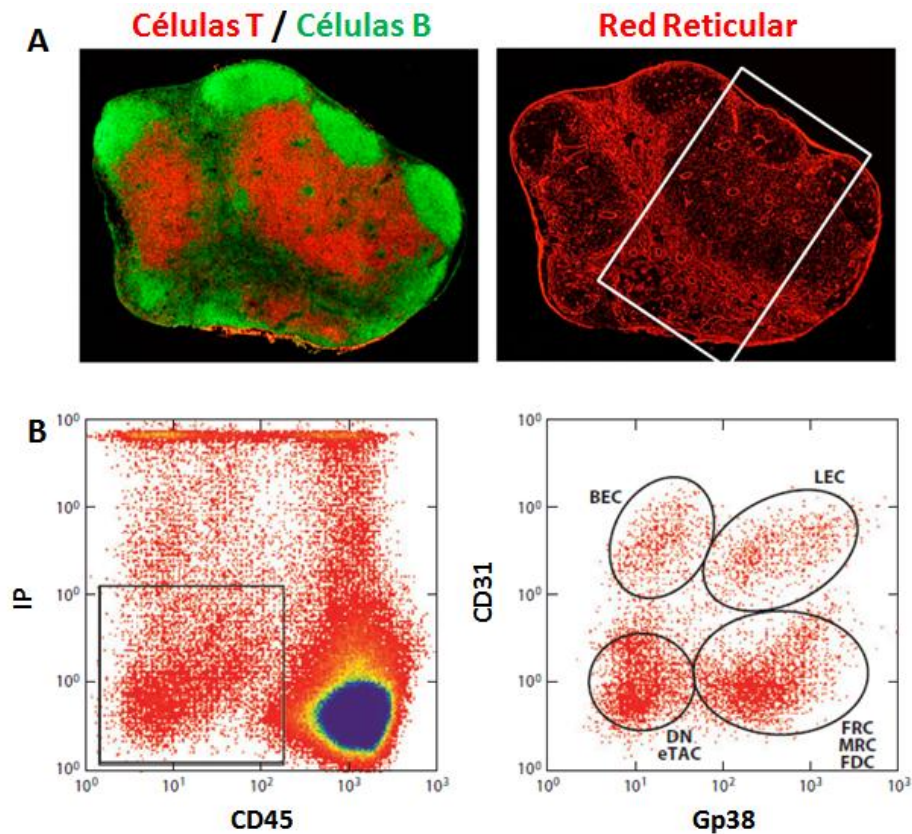


Figura 5 Identificación de células no hematopoyéticas mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo. A) Secciones consecutivas de un LN de ratón teñido con anticuerpos frente a CD3 (células T), B220 (células B) y ER-TR7 (red reticular). Imágenes tomadas de Katakai et al., 2004. B) Análisis mediante citometría de flujo de células de LN obtenidas por digestión con colagenasa. Las células vivas (IP⁻, Ioduro de Propidio negativas) CD45⁻, pueden ser divididas en cuatro poblaciones en base a CD31 y Gp38. Imagen tomada de Roozendaal and Mebius, 2010.

Las **células estromales** de los SLOs son, a su vez, un grupo heterogéneo de células, a las que tan solo se les atribuyó, inicialmente, un simple papel en el soporte estructural de los SLOs, pues estas células producen importantes proteínas de la matriz extracelular como laminina, colágeno o fibrinógeno, ignorando su capacidad para afectar al desarrollo de la respuesta inmunitaria. Actualmente, existen abundantes trabajos que demuestran que estas células son responsables de la migración de los linfocitos hacia los SLOs y determinan su segregación en las distintas zonas linfoides (Forster et al. 1996, Forster et al. 1999, Gunn et al. 1998a); presentan antígenos a los linfocitos, producen señales coestimuladoras y expresan

moléculas inhibitorias, regulando la respuesta inmunitaria e induciendo anergia en células autoreactivas, una función previamente atribuida al timo (Fletcher et al. 2010, Gardner et al. 2008, Hammerschmidt et al. 2008, Lee J. W. et al. 2007, Lukacs-Kornek et al. 2011).

Además, estas células de origen no hematopoyético pueden ser divididas en tres categorías diferentes basándonos, principalmente, en su localización dentro del SLOs. De este modo, encontramos en la zona T las **Células Reticulares Fibroblástica (FRC)**, en la zona B las **Células Dendríticas Foliculares (FDC)**, y las **Células Reticulares Marginales (MRC)** localizadas en la región más periférica, justo bajo la zona de entrada de los antígenos (Buettner et al. 2010).

3.1.Las Células Reticulares Fibroblásticas

Gran parte de los estudios sobre las células estromales de los SLOs se han focalizado en la caracterización de las Células Reticulares Fibroblásticas y las fibras que producen. Los primeros estudios sobre estas células se llevaron a cabo a partir de los años 60 y en ellos se analizaron sus características ultraestructurales (Clark 1963, Tykocinski et al. 1983). En estos estudios ya se identificó la red reticular formada por las FRC y se asumió una función esencialmente estructural, describiendo a las FRC como células miofibroblásticas que intervendrían en el control del tamaño del órgano durante los procesos inmunitarios (Tykocinski et al. 1983). Sin embargo, no sería hasta algunos años después cuando se comprendió la importancia real de estas células, al demostrarse su capacidad para transportar antígenos hacia las HEVs, a través de la red de la red reticular (Gretz et al. 2000), su implicación en la segregación de los linfocitos (Gunn et al. 1998b) y su papel inmunorregulador (Link et al. 2007, Lukacs-Kornek et al. 2011).

Fenotipo. A pesar de que no se han identificado marcadores realmente específicos, en ratón las FRC se caracterizan por la expresión de Gp38, ERTR-7, desmina, alfa-SM-actina (Sixt et al. 2005) y moléculas de adhesión como ICAM-1 o VCAM-1 (Cupedo et al. 2004a).

Las FRC también han sido identificadas como una importante fuente de quimiocinas, tales como CXCL12, CXCL16, CCL19 y CCL21 (Hara et al. 2006, Luther et al. 2000, Umemoto et al. 2012). Estas quimiocinas son responsables de la migración de linfocitos y DCs a través de las áreas T y participan en la segregación de los linfocitos en las distintas áreas linfoides (Bajenoff et al. 2006, Gunn et al. 1998b, Hara et al. 2006, Umemoto et al. 2012).

Red Reticular. La propiedad más estudiada de las FRC ha sido su capacidad para formar la red de conductos que atraviesa toda la zona T. Esta red conecta físicamente la zona subcapsular de los LN y la zona marginal del bazo con las paredes de los vasos sanguíneos (Anderson and Shaw 1993). Sin embargo, la red reticular aún no ha sido descrita en los MALTs.

La red de conductos se encuentra rellena por una gran cantidad de proteínas fibrilares producidas por las propias FRC. Estas proteínas se organizan dando lugar a tres regiones concéntricas: (1) región central, rica en fibras paralelas de colágeno I y III, zona por la cual las quimiocinas y los antígenos son transportados; (2) a continuación, aparece una región microfibrilar formada por fibrilina 1 y 2, que podría actuar como filtro y/o contribuir a la estabilidad y elasticidad de los conductos; y (3) finalmente, en contacto con las FRC, aparece una región que presenta una estructura similar a la de la membrana basal, formada por colágeno tipo IV, perlecan, nidogen 1, laminina 8 y 10, y fibronectina (Hayakawa et al. 1990, Kaldjian et al. 2001, Karttunen et al. 1989, Sixt et al. 2005). Todas estas fibras son envueltas a su vez por las FRC, dando lugar a un compartimento aislado de los microdominios linfoides por el que transitan distintas moléculas.

A través de la red reticular circulan solamente moléculas de pequeño tamaño, como citocinas y algunos antígenos (Gretz et al. 2000); sin embargo, las moléculas con un peso molecular superior a 70 KDa, como el LPS, son excluidas de los conductos, de modo que no aparecen en la corteza de los LNs, sino que se acumulan en el seno subcapsular, donde pueden ser atrapadas por macrófagos o drenar hacia los vasos linfáticos aferentes (Gretz et al. 2000, Nolte et al. 2003).

Esta red, también, tiene una gran importancia en el transporte de quimiocinas. En su interior, se han identificado quimiocinas producidas localmente, como CCL19, CCL21 y CXCL13 (Baekkevold et al. 2001, Nolte et al. 2003), y otras precedentes de los tejidos periféricos inflamados, como CCL2 (Palframan et al. 2001). Estas quimiocinas actúan a nivel del lumen de las HEVs, controlando el reclutamiento de linfocitos y otras células inmunitarias, como monocitos (Nolte et al. 2003, Palframan et al. 2001).

A pesar de que las FRC producen y envuelven las fibras reticulares, no toda la superficie de dichas fibras aparece cubierta por estas células estromales, si no que el 10% está ocupada por DCs, especialmente en las regiones cercanas a las HEVs. Estas DCs se encuentran en contacto directo con las moléculas que circulan por los conductos, siendo capaces de tomar antígenos y procesarlos (Sixt et al. 2005). No obstante, las DCs maduras, procedentes de la periferia, rara vez se asocian a la red reticular, pues de acuerdo a su función, estas células no requieren acceder a los antígenos que llegan a través de la red (Bajenoff et al. 2006, Sixt et al. 2005).

Capacidad Inmunorreguladora. Las FRC no solo actúan como simples plataformas de migración, sino que también producen factores de supervivencia para los linfocitos T, como la IL-7 o la propia CCL19 (Link et al. 2007). En el caso de la IL-7, se ha sugerido su implicación en el control sistémico del número de células T vírgenes, al competir estos linfocitos por tales señales a nivel de los SLOs (Marrack and Kappler 2004, Surh and Sprent 2005).

Por otro lado, las FRC tienen un importante papel inhibitor durante la respuesta inmunitaria. Estas células expresan la oxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y producen oxido nítrico de forma paralela a la activación de las células T, para lo que requieren del contacto directo con estos linfocitos activados, los cuales aumentan la expresión de NOS2 a través de la producción de IFN- γ y del factor de necrosis tumoral (TNF). De este modo, la expresión de NOS2 por las FRC y las LECs, regulan el tamaño de la población de células T activadas (Lukacs-Kornek et al. 2011).

Las FRC, además, cooperan con las DCs en la modulación del “homing” de los linfocitos T hacia los SLOs (Hammerschmidt et al. 2008, Molenaar et al. 2009). Así, se ha demostrado que las FRC de los LN mesentéricos, pero no las de los periféricos, inducen la producción de la integrina- $\alpha 4\beta 7$ y de CCR9 en los linfocitos T activados en dichos ganglios, lo que promueve la recirculación por estos SLOs (Hammerschmidt et al. 2008).

Finalmente, las FRC junto con las DCs y los linfocitos, son responsables de la proliferación de las células endoteliales vasculares y linfáticas a través de la producción de VEGF (Angeli et al. 2006, Chyou et al. 2011, Chyou et al. 2008, Webster et al. 2006). La producción de este factor durante los procesos inflamatorios, fomenta la llegada de APCs desde los tejidos, y de linfocitos desde el torrente sanguíneo.

3.2.Las Células Dendríticas Foliculares

El estudio de las Células Dendríticas Foliculares también comienza a mediados de los años 60, cuando se identificó, en el interior de los SLOs, un peculiar tipo celular que poseía procesos filiformes, y que era capaz de capturar y de retener antígenos en su superficie (Mitchell and Abbot 1965). Desde entonces, los estudios sobre la biología de las FDC han avanzado lentamente debido, por un lado, a la dificultad de obtener suspensiones unicelulares de FDCs, pues son realmente difíciles de desligar de la matriz extracelular y, además, se encuentran fuertemente asociadas a las células B (Sukumar et al. 2006a); y por otro lado, debido a la falta de marcadores específicos de FDC y de sus precursores (Allen C. D. and Cyster 2008).

A pesar de todo, las FDC son generalmente distinguidas del resto de células estromales por la elevada expresión de los **receptores del complemento 1 (CD35) y 2 (CD21)** (Roozendaal and Carroll 2007) y, actualmente, se les han adjudicado tres funciones principales: organizar la arquitectura de los folículos linfoides; capturar y retener antígenos en forma de inmunocomplejos; y regular los procesos de activación y diferenciación de las células B.

Fenotipo. Las células dendríticas foliculares presentan una enorme variabilidad, existiendo notables diferencias entre las FDC que residen en los folículos linfoides primarios y las que se encuentran en los secundarios. En los folículos primarios las FDC se localizan en la región central, mientras que en los secundarios, estas células se extienden hacia el seno subcapsular llegando a ser contiguas a las MRC. Además, en los GCs las FDC muestran una distribución polarizada, con procesos más densos en la zona clara que en la oscura (Allen C. D. and Cyster 2008, El Shikh and Pitzalis 2012).

En cuanto a los marcadores expresados por estas células existen importantes diferencias, como ocurre por ejemplo con los marcadores FDC-M1 (también conocido como Mfge8), FDC-M2 o la proteína priónica (PrP), considerados marcadores de FDC y que aparecen mucho más elevados en la zona clara que en la zona oscura o que en los folículos primarios (Allen C. D. and Cyster 2008). Las FDC de la zona clara también expresan una mayor cantidad de moléculas implicadas en la retención de inmunocomplejos, como los receptores de inmunoglobulinas de baja afinidad CD23 y el CD32 (Qin et al. 2000, Sukumar et al. 2006b), y moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 o MAdCAM-1 (Balogh et al. 2002, Maeda et al. 1995, Szabo et al. 1997).

Ante la imposibilidad de obtener grandes cantidades de FDC puras que permitan el fenotipado de las distintas subpoblaciones, en los últimos años, se ha llevado a cabo un interesante abordaje en la identificación de potenciales marcadores, a través de lo que los autores denominan “substracción in silico” (Huber et al. 2005, Wilke et al. 2010). Esta técnica consiste en aislar redes de FDC CD21⁺ mediante microdissección laser y, en paralelo, aislar células B foliculares mediante “sorting”. A partir de estas muestras, se obtuvieron los perfiles de expresión y se substrajo numéricamente el transcriptoma de las células B. Mediante estos estudios se han encontrado un total de 575 transcriptos expresados por las FDC, de los cuales los que presentaron una mayor expresión son CXCL13, Clusterina y Mfge8, todos ellos descritos previamente. Además, casi el 90% de estos genes son expresados por las células estromales de ratones SCID (los

cuales carecen de FDC maduras) lo que sugiere que las FDC se desarrollarían a partir de dichas células estromales, produciéndose tan solo pequeñas modificaciones en el perfil de expresión génica (Wilke et al. 2010).

Expresión de quimiocinas y función organizadora. Una de las funciones mejor establecidas de las FDC es su capacidad para organizar los folículos linfoides, gracias a la producción de CXCL13, una quimiocina crítica para la migración de las células B hacia los folículos (Forster et al. 1996, Gunn et al. 1998a) y requerida para la migración de los centroblastos desde la zona oscura hacia la zona clara del centro germinal (Allen D. C. et al. 2004). De hecho, se ha comprobado que células B que carecen del receptor de CXCL13 pueden entrar en la pulpa blanca, sin embargo, estos linfocitos se sitúan en una posición errónea e inducen la formación de FDC en lugares atípicos, como los espacios periarteriolares (Voigt et al. 2000). Las FDC, además, guían a los linfocitos B a través de los folículos primarios y los centros germinales, de modo que estas células recorren la superficie de las propias FDC, así como de las DCs y de los macrófagos en busca de antígenos, siendo este movimiento dependiente, al menos en parte, de CXCL13 (Allen C. D. et al. 2007, Bajenoff et al. 2006).

Otra quimiocina importante en la organización de los folículos linfoides es CXCL12, cuya producción corre a cargo principalmente de las FDC de la zona oscura. Esta quimiocina juega un papel crucial en la compartimentación de los centros germinales (Allen D. C. et al. 2004); de hecho, la posición de las células B en la zona oscura, como ya se ha descrito anteriormente, depende de la expresión de CXCR4, el receptor de CXCL12 (Allen D. C. et al. 2004).

Presentación de Inmunocomplejos. Otro de los papeles principales asumidos por las FDC es el de presentar antígenos, en forma de inmunocomplejos, a los linfocitos B (El Shikh et al. 2010). Los inmunocomplejos están constituidos por antígenos recubiertos de anticuerpos y/o proteínas del sistema del complemento, los cuales se forman poco después de la exposición al patógeno, siendo rápidamente transportados y depositados sobre las FDCs, proceso en el que

intervienen los linfocitos B (Phan et al. 2007) y las DC (Martinez-Pomares et al. 1996, Szakal et al. 1983).

En el interior de los GC, los inmunocomplejos presentados por las FDC constituyen un depósito de antígenos por el cual las células B van a competir durante el proceso de maduración de la afinidad. Un gran número de estudios “in vitro” han mostrado que los inmunocomplejos localizados sobre las FDC tienen un gran efecto estimulador (Tew et al. 2001) y pueden inducir la expresión de la enzima AID (Aydar et al. 2005). Además, los inmunocomplejos pueden ser retenidos por las FDC durante largos periodos de tiempo, por lo que se ha propuesto que estos depósitos podrían estar involucrados en el mantenimiento de las células B memoria (Tew et al. 1997). Sin embargo, estas funciones han sido difíciles de testar in vivo y es un tema de gran debate (Haberman and Shlomchik 2003, Kosco-Vilbois 2003). Por ello, son necesarios estudios adicionales para poder establecer el papel de los inmunocomplejos en la iniciación de la respuesta de las células B, la función en el centro germinal o la memoria inmunológica

Producción de factores tróficos. Además de presentar inmunocomplejos a los linfocitos B, las FDC producen abundantes moléculas coestimuladoras que regulan la respuesta inmunitaria de las células B. Entre las moléculas producidas se encuentra BAFF, factor involucrado en la inhibición de la apoptosis de los linfocitos B, en la respuesta de células B T-independientes y en el cambio de isotipo (Schneider 2005). Otros factores son, la IL-6, implicada en el desarrollo del centro germinal y en la producción de IgG (Wu et al. 2009); la IL-7, la IL-15 y los ligandos de Notch (Delta-like1 y Jagged1), todos ellos inhiben la apoptosis de los linfocitos B y potencian su proliferación (Kroncke et al. 1996, Park et al. 2004, Yoon et al. 2009). Además, recientemente, las FDC han sido descritas como productoras de prostaglandinas (Cho W. et al. 2011), factores que regulan la reacción del centro germinal, afectando a la expresión de CD54, CD80 y CD86 en las células B, lo que aumentan su capacidad para presentar antígenos (Kim J. et al. 2012).

Finalmente, las FDC también pueden regular la activación y el cambio de isotipo de los linfocitos B de forma indirecta, a través de las células Thf. Así, las FDC

mediante la producción de BAFF, IL-6 e IL-15 son capaces de inducir la producción de IL-4, IL-5, INF γ y TNF α , factores implicados en los procesos mencionados anteriormente (El Shikh and Pitzalis 2012).

Relación de las FDC con las Células Estromales Deciduales. A pesar de tratarse de dos tipos celulares aparentemente distintos y distantes, varios estudios han demostrado la existencia de una relación fenotípica entre las células dendríticas foliculares y las células estromales deciduales (DSC, Decidual Stromal Cells)(Montes et al. 1996, Munoz-Fernandez et al. 2006).

Las DSC son el componente celular más abundante de la decidua humana, tejido que constituye el componente materno de la placenta, encontrándose en contacto directo con el trofoblasto. Este tejido se forma a partir del endometrio, tras la implantación del blastocisto, mediante un proceso conocido como reacción decidual, a través del cual aumenta el número de arterias espirales y el tamaño en las células del endometrio, acumulándose en ellas una gran cantidad de nutrientes. Además, la decidua actúa como una importante fuente de factores de crecimiento y citoquinas que controlaran los procesos de proliferación, diferenciación e invasión del trofoblasto, y tiene un importante papel inmunorregulador (Ramathal et al. 2010). El origen de estas células estromales se encuentran en precursores fibroblásticos localizados en torno a los vasos sanguíneos, los cuales proliferan y bajo el efecto de la progesterona y otras hormonas, se diferencian en DSC, a través de un proceso denominado decidualización (Richards et al. 1995).

Las DSC maduras tienen una morfología redondeada y, debido al elevado contenido en gránulos de glucógeno (Krebhiel 1937) y a su capacidad de secretar prolactina (PRL) (Riddick and Kusmik 1977), inicialmente se les asignó un simple papel nutricional y endocrino durante el embarazo. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que las DSC, además, presentan importantes funciones inmunitarias. Así, las células estromales deciduales producen citocinas (Dudley et al. 1993, Iwabe et al. 2000, Montes et al. 1995), tienen actividad fagocítica (Ruiz et al. 1997), son capaces de presentar antígenos (Olivares et al.

1997) y rescatan de la apoptosis a linfocitos T y NK deciduales (Blanco et al. 2009) para lo que expresan moléculas relacionadas con el sistema inmunitario.

En trabajos previos, se observó que las DSC y las FDC comparten la expresión de marcadores mesenquimales, tienen actividad contráctil y carecen de CD45 (García-Pacheco et al. 2001, Montes et al. 1995, Muñoz-Fernández et al. 2006, Oliver et al. 1999). Además, las DSC expresan numerosos marcadores asociados con las FDC como DCR-1, CNA.42 o HJ2 (Montes et al. 1996, Muñoz-Fernández et al. 2006).

3.3.Las Células Reticulares Marginales

Las Células Reticulares Marginales constituyen la tercera población de células estromales de los SLOs, habiendo sido descritas hace tan solo unos años (Katakai et al. 2008), aunque en el bazo se documentó su existencia ya en los años noventa (Kraal et al. 1995), denominándose entonces como células de revestimiento del seno. Estas células han sido descritas en todos los SLOs de ratón, pudiendo ser identificadas ya en el momento del nacimiento, sin embargo, aun no se disponen de resultados sobre la existencia de MRC en humanos (Katakai et al. 2008).

Fenotipo. Esta población celular constituye una fina capa, localizada en la zona subcapsular de los LNs, en la zona marginal del bazo y en la región subepitelial de los MALTs. Las MRC de ratón se caracterizan por la expresión de algunos marcadores propios de FDC como BP-3, CXCL-13, MAdCAM-1, VCAM-1 o ICAM-1; aunque carecen de otros marcadores como CD21, CD35, PrP o CD32 (Katakai 2012). Además, estas células expresan elevados niveles de TRANCE, una citocina de la familia del TNF (Katakai et al. 2008, Knoop et al. 2009), y de IL-7 (Repass et al. 2009).

Funciones. Actualmente, las funciones inmunológicas de estas células no han sido identificadas, sin embargo, por su posición se ha propuesto que estas células podrían influir en los macrófagos CD169⁺ que aparecen localizados en las

zonas marginales (Katakai 2012). Las MRC también podrían afectar al desarrollo de las células M de los MALTs, pues estas células requieren para su desarrollo de TRANCE (Knoop et al. 2009). Además, la expresión de CXCL13 sugiere que las MRC pueden controlar la migración de las células B, guiándolas hacia las zonas marginales, donde pueden captar antígenos liberados directamente por los macrófagos de esta región (Katakai 2012).

Finalmente, debido al parecido fenotípico, las MRC han sido propuestas como las homólogas, en el adulto, de las células organizadoras de tejido linfoide, células estromales que aparecen durante el desarrollo embrionario de los SLOs y que, tras la llegada de los linfocitos, se diferencian en FDC, FRC y MRC (Katakai et al. 2008, Koning et al. Sometido). Esto hace pensar que, quizá, las MRC puedan representar una fuente de células estromales, que bajo ciertas condiciones podrían diferenciarse en FDC y FRC.

4. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

La formación de los órganos linfoides secundarios ocurre durante el desarrollo embrionario y depende de la correcta interacción entre células de origen mesenquimal y hematopoyético. Aunque es un proceso extremadamente complejo, en el que cada SLO requiere de señales específicas, actualmente, se ha conseguido identificar un programa común de desarrollo en ratón. En dicho programa se han establecido varias etapas, de las cuales las primeras son las que determinan la posición, ocurriendo de forma diferente en cada tipo de SLO (van de Pavert and Mebius 2010); sin embargo, después de este evento inicial, los mecanismos de embriogénesis convergen.

Según el modelo actual (Fig. 6), las señales que inician la formación de los SLOs son producidas por neuronas. Dichas señales, inducen la producción de quimiocinas, como CXCL13, CCL19 o CCL21, por las células estromales circundantes, atrayendo hasta este lugar células de origen hematopoyético (van de Pavert and Mebius 2010). De este modo, se forman agregados celulares, constituidos por las

células de origen hematopoyético recién llegadas y las MSC circundantes, que a partir de este momento reciben el nombre de **células organizadoras de tejido linfoide (células LTo)** (Honda et al. 2001, Mebius 2003). Así, se origina una estructura primitiva y definitiva que, posteriormente, dará lugar al SLO.

Entre las moléculas que podrían estar involucradas en esta primera etapa, se encuentra el **ácido retinoico** (RA, retinoic acid). Este derivado de la vitamina A juega un papel fundamental en el desarrollo de los LNs periféricos, siendo esencial para la inducción de **CXCL13** (van de Pavert et al. 2009). Además, se ha visto que fibras nerviosas cercanas al sitio de formación de los ganglios expresan RALDH2 (enzima que cataliza una de las etapas de oxidación de la vitamina A hasta RA), lo que hace pensar que estas células inducirían la producción de CXCL13 a través del RA (van de Pavert et al. 2009). Así, este modelo propone que la formación de los LNs periféricos ocurre en los lugares de liberación de RA, sin embargo, este metabolito está implicado en multitud de procesos embrionarios y, como consecuencia, se expresa en diferentes lugares, es por ello que este modelo no puede explicar por qué los LNs solo se desarrollan en ciertos lugares específicos (van de Pavert and Mebius 2010).

Entre los factores inducidos en esta primera etapa, la quimiocina CXCL13 parece ser imprescindible para la formación de los agregados celulares que más tarde darán lugar a los LNs periféricos (Ansel et al. 2000, Luther et al. 2003), aunque en el proceso son importantes también otras quimiocinas, como CCL19 y CCL21 (Luther et al. 2003, Ohl et al. 2003). En el caso de los LNs mesentéricos, su desarrollo puede ocurrir en ausencia de las quimiocinas anteriormente expuestas, por lo que probablemente existen otras adicionales (Luther et al. 2003, Ohl et al. 2003); no obstante, la producción de estas otras quimiocinas también debe depender del RA, pues en ausencia de RALDH2 la formación de LNs mesentéricos falla (van de Pavert et al. 2009). En el caso del MALT, parece que las quimiocinas o señales que median la etapa inicial de reclutamiento podrían ser las mismas que las involucradas en la formación de los LNs mesentéricos, pues estos órganos también

pueden formarse en ausencia de CXCL13, CCL19 y CCL21 (Fukuyama et al. 2006, Rangel-Moreno et al. 2005).

Independientemente del origen y la naturaleza de las primeras señales que inducen la formación de los SLOs, hasta las regiones donde se originarán dichos órganos van a llegar células de origen hematopoyético conocidas como **células inductoras de Tejido Linfoide** (LTi, Lymphoid-Tissue inducer) (Withers et al. 2007). Estas células derivan de precursores $CD45^+KIT^{mid}IL-7R_{\alpha}^+CD3^-CD4^-$ que pueden ser aisladas del hígado fetal de ratón y que, además, son capaces de generar linfocitos B, T, NK y células dendríticas (Mebius et al. 2001). Las células LTi humanas son similares a las de ratón, ambas se caracterizan por la ausencia de marcadores de linaje y por la expresión de ID2, ROR γ t y IL-7R $_{\alpha}$, además, las células LTi de ratón, pero no las humanas, expresan CD4 (Cupedo et al. 2009).

Una vez que las células LTi comienzan a ser reclutadas y a formar agregados, estas células van a activarse a través de un mecanismo en el que parece estar involucrado la molécula TRANCE y su receptor. Las células LTi expresan ambas moléculas, de modo que se ha propuesto que la acumulación de estas células produciría una activación en trans (Vondenhoff et al. 2009).

Al activarse, las células LTi comienzan a expresar en sus membranas **linfotoxina $\alpha_1\beta_2$ (LT $_{\alpha_1\beta_2}$)**, otro miembro de la familia del TNF esencial para la formación de los SLOs. A través de esta citocina las células LTi interaccionarían con las células LTo, potenciándose la expresión de moléculas quimioatrayentes (CXCL13, CCL19 y CCL21), moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1 y MAdCAM-1), citocinas (TRANCE e IL-7) y factores angiogénicos. De este modo, la LT $_{\alpha_1\beta_2}$ completa la diferenciación de las células mesenquimales hasta células LTo, lo que permite atraer a un mayor número de células LTi que son eficientemente retenidas en los agregados. De hecho, si las moléculas de adhesión no son inducidas, como ocurre en los ratones deficientes en LT $_{\alpha}$, estos agregados se deshacen y no se forman LNs (Vondenhoff et al. 2009, Yoshida et al. 2002). Además, el aumento en la expresión de TRANCE e IL-7 potencian la activación y proliferación de las células LTi, lo que a su vez induce una mayor expresión de LT $_{\alpha_1\beta_2}$, produciéndose de este modo un ciclo

de retroalimentación positiva, que conlleva a la expansión del primordio del SLO (Yoshida et al. 2002).

La señalización a través del receptor de la $LT_{\alpha1\beta2}$ ($LT\beta R$) también determinará la producción de factores implicados en la formación de vasos sanguíneos y linfáticos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor)-C, el VEGF-D, el factor de crecimiento fibroblástico (FGF, Fibroblastic Growth Factor)-2 y el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, Hepatocytes Growth Factor). De este modo, las células LTo promueven la proliferación de las células endoteliales, permitiendo la conexión del primordio con los vasos sanguíneos y linfáticos que también se encuentran en desarrollo (Vondenhoff et al. 2009).

En el caso de las placas de Peyer, la $LT_{\alpha1\beta2}$, al menos en los primeros momentos del desarrollo, no es producida por las células LTi, si no por un tipo adicional de célula de origen hematopoyético, caracterizada por el fenotipo $CD45^+IL-7R\alpha^+CD4^+CD3^-CD11c^+RET^+$ y que se encuentra distribuida a lo largo del tubo digestivo, de forma aleatoria, antes de empezar el proceso de organogénesis. Estas células, posteriormente, se concentran en los lugares en los que se originaran las placas de Peyer, activándose a través del receptor RET y comenzando a expresar $LT_{\alpha1\beta2}$. Mediante esta citocina, se consigue activar las MSC de la zona, las cuales empiezan a producir factores que atraen y retienen a las células LTi, continuando estas células el proceso de organogénesis (Veiga-Fernandes et al. 2007).

Finalmente, hasta las regiones de formación de los SLOs comienzan a llegar linfocitos T y B, que producen un aumento del tamaño y la reorganización del primordio, determinando la expansión y diferenciación de las células LTo en las subpoblaciones estromales características de los SLOs adultos (Fig. 6), originándose los microdominios B y T (Cupedo et al. 2004b, Koning J. J. and Mebius 2012).

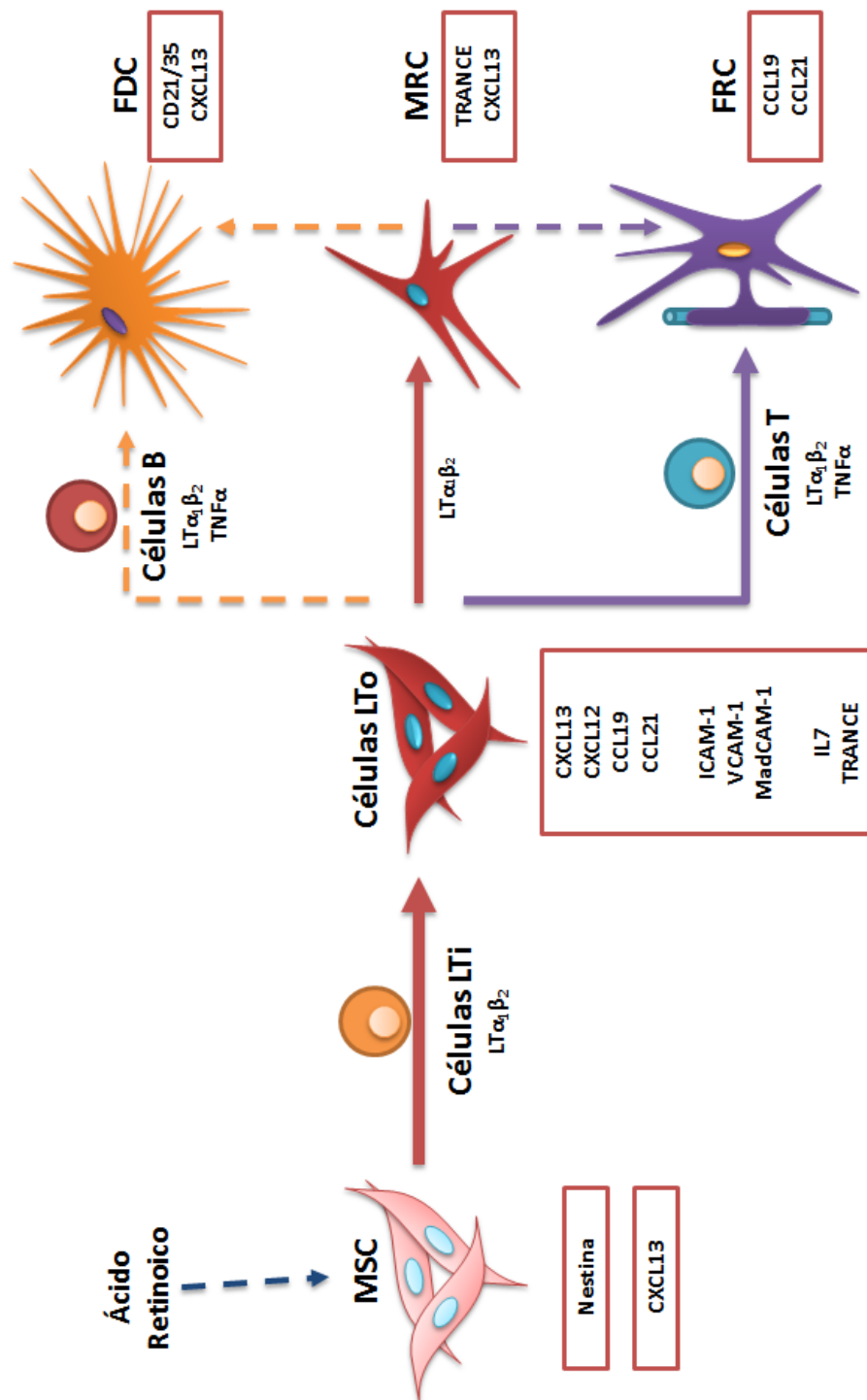


Figura 6 Representación esquemática de las posibles vías de diferenciación de las células estromales de los SLOs. Las flechas continuas indican vías de diferenciación bien establecidas, mientras que las discontinuas necesitan ser verificadas experimentalmente.

La importancia de la llegada de los linfocitos hasta los primordios de los SLOs se pone de manifiesto en ratones que carecen de linfocitos ($Rag2^{-/-}IL2rg^{-/-}$), en ellos, las células LT_i presentan una reducida expresión de LT _{$\alpha\beta$ 2} y los primordios acaban desapareciendo por la ausencia de linfocitos (Coles et al. 2006, Luther et al. 2003). Sin embargo, la transferencia de células T o células NK1.1, pero no las células B, durante la primera semana después del nacimiento, evita la desaparición del primordio (Coles et al. 2006), lo que pone de manifiesto la importancia de los linfocitos maduros en la organogénesis de los LNs murinos.

4.1.Diferenciación de las Células Reticulares Marginales

Durante la expansión del primordio, las células LTo proliferan hacia la periferia y, tras la acumulación de los linfocitos T y B, estas células acaban siendo confinadas a las regiones más periféricas, convirtiéndose en la capa de MRC (Katakai et al. 2008). Además, en base a su relación con las células LTo, se ha sugerido que estas células podrían tener la capacidad para diferenciarse en FDC y en FRC (Katakai 2012, Krautler et al. 2012), aunque actualmente no existen datos sólidos que demuestren esta posibilidad.

Las MRC son detectadas en LNs murinos desde el momento del nacimiento, antes incluso de que lleguen los linfocitos T y B. Además, estas células pueden ser identificadas en ratones deficientes en linfocitos ($Rag1^{-/-}$), lo que indica que estos linfocitos no intervienen en el programa de desarrollo de las MRC (Katakai et al. 2008). No obstante, los requerimientos de las MRC aún deben ser identificados, aunque ya se sabe que el mantenimiento de esta población estromal depende de un estímulo continuo a través de LT β R, pues su bloqueo induce su desaparición en el bazo, mientras en los ganglios se produce la pérdida de expresión de CXCL13 y MAdCAM-1, aunque persisten células que expresan TRANCE en esta localización (Katakai 2012, Krautler et al. 2012) . Puesto que las MRC se encuentran en contacto directo con células LT_i, que expresan LT _{$\alpha\beta$ 2}, éstas células son unas buenas candidatas para mantener la diferenciación de las MRC, así como la expresión de CXCL13 y MAdCAM-1 (Cupedo et al. 2004b). A pesar de todo, la contribución las

células LT_i después del nacimiento en el mantenimiento de las células estromales es una incógnita.

4.2. Diferenciación de las Células Dendríticas Foliculares

La formación de los folículos linfoides se inicia antes de que los linfocitos B comiencen a llegar a los SLOs (Hashi et al. 2001, White et al. 2007), por efecto de las células LT_i (Cupedo et al. 2004b). Posteriormente, cuando las células B comienzan a abandonar la medula ósea, estos linfocitos se acumulan en las regiones más periféricas de los SLOs, siendo responsables del intenso proceso de remodelación de la red estromal (Bajenoff and Germain 2009).

A pesar de que la formación de los folículos no requiere de células B, la maduración de las FDC si depende de dichos linfocitos (Cyster et al. 2000). Las FDC comienzan a aparecer, en ratones, al cabo de 7 días tras el nacimiento, siendo necesarios en este proceso, tanto la LT _{$\alpha\beta\gamma$} (implicada también en su supervivencia y mantenimiento) como el TNF (De Togni et al. 1994, Le Hir et al. 1995).

Los linfocitos B son la fuente principal de TNF y LT _{$\alpha\beta\gamma$} en los folículos, aunque también se ha documentado la participación de las células T (Endres et al. 1999, Tumanov A. V. et al. 2003). La estimulación de las células B, a través de CXCR5, aumenta la expresión de LT _{$\alpha\beta\gamma$} en estas células, activando a las FDC y aumentando la secreción de CXCL13, lo que origina un bucle de retroalimentación positiva, importante en el desarrollo y mantenimiento de los folículos (Ansel et al. 2000). Este bucle se rompe en los centros germinales, donde la expresión de LT _{$\alpha\beta\gamma$} es independiente de CXCL13.

La estimulación de los receptores de TNF α y LT _{$\alpha\beta\gamma$} produce la activación de las vías de señalización clásica y alternativa de NF κ B, un factor de transcripción implicado en multitud de procesos de diferenciación (Bonizzi and Karin 2004). Estudios in vivo han revelado que ratones deficientes en la vía clásica presentan redes normales de FDC, mientras los deficientes en la vía alternativa (p52^{-/-} o RelB^{-/-}) carecen de células MAdCAM-1⁺ o FDC-M1⁺ en los folículos (Matsumoto et al. 1997,

Poljak et al. 1999). La alteración en la vía alternativa también produce defectos en la expresión de CXCL13, coincidiendo los defectos de los ratones CXCL13^{-/-} con los deficientes en p52 o en RelB (Ansel et al. 2000). En todos estos ratones deficientes en alguna vía de señalización, se observa la existencia de una completa superposición entre mutaciones que afectan al desarrollo de FDC y MRC (Pasparakis et al. 2000), por lo que se piensa que ambos tipos celulares son parte de una vía común de diferenciación, dependiente de TNF y LT_{α1β2}.

Otras muchas moléculas, además de las señales dependientes de los receptores de TNF y LT_{α1β2}, deben de estar implicadas en el proceso de diferenciación de las FDC, aunque actualmente se desconocen la mayor parte de ellas, lo que ha impedido conseguir la diferenciación in vitro de estas células. Estas otras señales deben de proceder de los linfocitos activados o ser resultado de los cambios producidos durante la respuesta inmunitaria. Entre ellas se ha descrito el papel de los inmunocomplejos, a través de FcRIIb, lo cuales inducen un aumento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en las zonas claras de los folículos linfoides (Allen C. D. and Cyster 2008). Otros estudios, han identificado el CD40, la IL-4 y el INF-γ, como inductores potenciales del CD23 en las FDC (Sukumar et al. 2006b).

4.3. Diferenciación de las Células Reticulares Fibroblásticas

La diferenciación de las FRC tampoco está bien caracterizada, aunque existen evidencias que demuestran que las células T CD4⁺, así como la señalización combinada a través de TNFR1 y LTβR, serian responsables de la diferenciación de las células LTo hasta FRC. Así, las células Th son capaces de inducir in vitro la expresión de componentes de la matriz extracelular de la zona T (Katakai et al. 2004a). No obstante, al menos en el bazo, el desarrollo de la zona T depende de la LT_{α1β2} producida por las células B (Ngo et al. 1999). Indistintamente del origen, el TNF y la LT_{α1β2} inducen la expresión, en las células estromales de la zona T, de quimiocinas como CCL21, marcadores como BP3, ERTR-7 y podoplanina e influyen en el desarrollo de la red de conductos del bazo (Ngo et al. 1999, van de Pavert and Mebius 2010).

5. REMODELACIÓN DE LOS ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS

Si bien las interacciones entre las células estromales y las células hematopoyéticas juegan un papel imprescindible en el desarrollo de los SLOs, estas mismas interacciones participan en el mantenimiento, remodelación y regeneración de la arquitectura de los SLO (Roosendaal and Mebius 2010).

Durante los procesos inflamatorios, los SLOs sufren un aumento de tamaño debido, en su mayor parte, a la migración y proliferación de linfocitos. Del mismo modo, el compartimento estromal debe aumentar para poder alojar al creciente número de linfocitos, aunque existen grandes incógnitas sobre el origen y la plasticidad de las células que lo permiten (Katakai et al. 2004a). Se ha propuesto que las MRC, debido a su relación con las células LTo, podría actuar como fuente de células estromales, permitiendo la expansión de las redes de FRC y FDC (Katakai et al. 2008); sin embargo, aún no existen datos que apoyen esta hipótesis. Según los últimos resultados publicados, la fuente de células estromales en los SLOs adultos se encontraría en torno a los vasos sanguíneos (Krautler et al. 2012), lugar en el que reside un grupo de células conocido como **pericitos**. Estas células se identifican, fundamentalmente, por su localización (apareciendo en contacto directo con las células endoteliales de la microvasculatura) y por la expresión de marcadores como CD146, PDGFR β o NG2 (Covas et al. 2008). Los pericitos, además, han sido propuestos como los homólogos, in situ, de las **Células Madre Mesenquimales** (MSC, Mesenchymal Stem Cells) (Crisan et al. 2008).

Las MSC, inicialmente, fueron identificadas en medula ósea y se caracterizan por su capacidad de adherirse al plástico, proliferar extensamente, y diferenciarse hacia distintos tipos celulares del linaje mesenquimal, bajo condiciones apropiadas de cultivo (Friedenstein et al. 1974, Pittenger et al. 1999). Posteriormente, se ha encontrado que estas células se encuentran virtualmente en todos los tejidos del cuerpo (da Silva Meirelles et al. 2006) y tienen un potente efecto inmunosupresor (Uccelli et al. 2008). Además, se ha demostrado el potencial de los pericitos en la regeneración de tejidos, siendo capaces de diferenciarse en adipocitos, osteoblastos, condroblastos, fibroblastos, células miogénicas y

odontoblastos (Crisan et al. 2008), lo que sugiere que también podrían originar FDC y FRC en los SLOs, a través de los factores producidos por los linfocitos activados. Además, las MSC aparecen en sangre periférica durante procesos inflamatorios (da Silva Meirelles et al. 2006), por lo que, quizás, en estas condiciones las MSC podrían llegar a los SLOs a través de los vasos sanguíneos, favoreciendo el desarrollo del compartimento estromal (da Silva Meirelles et al. 2006, Koning J. J. and Mebius 2012).

Las MSC probablemente jueguen un importante papel no sólo durante el aumento del tamaño de los SLOs, sino también en la recuperación de la integridad estructural tras ciertos procesos inflamatorios, pues su microanatomía puede ser destruida por los efectos citopáticos de los microorganismos o por procesos inmunopatológicos durante respuestas inmunitarias crónicas y/o agudas (Junt et al. 2008). En estos casos, también es necesaria una fuente de células estromales que permita el desarrollo de nuevas redes de FDC y FRC. Esto ocurre, por ejemplo, cuando las FRC son infectadas por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, Lymphocytic Choriomeningitis Virus) que produce una completa destrucción de la red de reticular, acompañada por la desintegración de la pulpa blanca del bazo (Mueller et al. 2007), lo que ocasiona una pérdida de la inmunocompetencia transitoria (Odermatt et al. 1991, Scandella et al. 2008). Una vez que el virus ha sido eliminado, la microanatomía de los SLOs va a ser regenerada, a través de la proliferación de las células estromales, en un proceso dependiente de las células LT_i y de la señalización mediada por LT β R, de una manera similar a lo que ocurre durante la embriogénesis (Scandella et al. 2008).

6. LOS ÓRGANOS LINFOIDES TERCIARIOS

Durante los procesos de inflamación crónica, en los que existe una extravasación continuada de leucocitos y una fuente persistente de antígenos, se produce el desarrollo de estructuras linfoides en lugares ectópicos, que reciben el nombre de **Órganos Linfoides Terciarios (TLO, Tertiary Lymphoid Organs)**. Estas condiciones ocurren durante infecciones, rechazos de trasplantes o en

enfermedades autoinmunitarias y las estructuras que se forman suelen denominarse en base a su localización anatómica, como por ejemplo, el tejido linfoide inducible asociado a los bronquios (iBALT, inducible bronchus-associated lymphoid tissue) o el tejido linfoide asociado a la vasculatura (VALT, vascular-associated lymphoid tissue) (Neyt et al. 2012).

Los TLOs tienen una estructura similar a los secundarios, presentando grandes folículos linfoides y zonas de linfocitos T, produciéndose en ellas la activación de linfocitos T y B vírgenes. El principal componente de estos órganos son las células B, las cuales se acumulan sobre una red de FDC y, a través de la expresión de AID, se produce cambio de clase y maduración de la afinidad. Además, en estos lugares se forman células B memoria y plasmáticas que aparecen en las inmediaciones de los TLOs, produciendo anticuerpos (Perros et al. 2012). Por otro lado, en las zonas T se puede identificar HEVs, por las que entran los linfocitos, así como FRC, que forman la característica red estromal y guían la migración de los linfocitos T. Además, entre las FRC y los linfocitos aparecen DCs activadas que estimulan a los linfocitos T, favoreciendo su diferenciación hasta células efectoras (Halle et al. 2009).

TLOs en Infecciones Crónicas. Durante los procesos infectivos, los TLOs tienen un efecto protector, pues se forman en los sitios de infección, ayudando a eliminar y neutralizar patógenos al facilitar la generación de células plasmáticas que producen anticuerpos específicos (Junt et al. 2008). Un ejemplo de estos TLOs, se encuentra en el Tejido Linfoide Asociado a los Bronquios formado en el pulmón tras una infección con el virus de la gripe (Neyt et al. 2012). A pesar del claro beneficio que supone el desarrollo de estas estructuras, existen infecciones que no producen TLOs, mientras que otras si lo hacen, el motivo por el cual esto ocurre es desconocido.

TLOs en Inmunopatologías. La presencia de TLOS en enfermedades autoinmunitarias y en rechazo de trasplantes ha sugerido que estos órganos son importantes sitios de inducción de linfocitos T autorreactivos y de producción de autoanticuerpos, que contribuyen a la progresión de la patología. Así, los TLOs

pueden ser encontradas en pacientes con aterosclerosis, artritis reumatoide o, con tiroiditis autoinmune, los cuales presentan células B productoras de autoanticuerpos en estos órganos (Armengol et al. 2001, Rangel-Moreno et al. 2006, Serafini et al. 2004).

Desarrollo de los TLOs. La formación de los TLOs tiene lugar mediante un proceso conocido como neogénesis linfoide, bastante similar a lo que ocurre durante el desarrollo embrionario de los SLOs. De este modo, durante una inflamación crónica, se produce un aumento gradual de células plasmáticas y linfocitos en la región, lo que induce la formación de vasos linfáticos, mientras que los vasos sanguíneos adquieren características de HEVs, permitiendo la extravasación de una mayor cantidad de linfocitos, que se organizan en distintas áreas linfoides, produciéndose la diferenciación de células estromales perivasculares en FDC y FRC (Krautler et al. 2012, Neyt et al. 2012). En cuanto a la formación de MRC, Katakai y colaboradores observaron que estas células no aparecen en TLOs en estómago, lo que podría sugerir que la formación de estas células está limitada a cierto periodo de tiempo durante el desarrollo durante el tiempo (Katakai et al. 2003). Sin embargo, estructuras linfoides terciarias inducidas después de infección por gripe, origina un patrón de células CXCL13 que no se superpone completamente con la red de FDC, pudiendo sugerir la presencia de MRCs (Moyron-Quiroz et al. 2004).

Este proceso depende de citocinas expresadas durante el desarrollo embrionario e involucradas en la homeostasis de los SLOs, como son $LT_{\alpha1\beta2}$, IL-7, CCL19, CCL21 o CXCL13 (van de Pavert and Mebius 2010). El hecho de que los mismos factores sean necesarios para el desarrollo de ambos tejidos, hace pensar que quizás los TLOs inducidos durante procesos inflamatorios podrían haber sido los precursores evolutivos de los SLOs (Neyt et al. 2012).

En contraste con el desarrollo de los SLOs, durante el desarrollo de los TLOs la necesidad de células LTi es controvertida, pues ratones que carecen de estas células son capaces de desarrollar BALT o, en modelos de colitis, aparecen TLOS en el intestino (Marinkovic et al. 2006, Rangel-Moreno et al. 2011). No obstante, la

simple inyección de células LTi en la piel induce la formación de tejido linfoide terciario (Link et al. 2011). A pesar de no estar clara la necesidad de células LTi, la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ si es necesaria para la inducción de TLOs (Furtado et al. 2007), de modo que en modelos en los que las células LTi son prescindibles, otras células que expresan esta citocina, como las células B, T o DCs, podrían ser las responsables de inducir la diferenciación de las células estromales e iniciar la formación de los TLOs.

OBJETIVOS

Las células estromales de los órganos linfoides secundarios (SLOs) y sus precursores están pobremente caracterizadas en humanos, por ello el *primer objetivo* de esta tesis doctoral es el **Aislamiento y caracterización de células estromales humanas obtenidas de amígdalas.**

En ratón, los precursores de las células estromales de los SLOs han sido localizados en torno a los vasos sanguíneos, habiéndose descrito algunos de sus marcadores. Así, el *segundo objetivo* consiste en la **Localización de los precursores de las células estromales de los SLOs en criosecciones de amígdalas humanas.**

Los experimentos con ratones transgénicos han mostrado la implicación de una gran cantidad de factores en la diferenciación de las células estromales de los SLOs, por lo que el *tercer objetivo* es **Analizar el efecto in vitro de distintos factores sobre la diferenciación de las células estromales de amígdala.**

En estudios previos, se demostró que las Células Estromales Deciduales (DSC) expresaron algunos marcadores característicos de las Células Foliculares Dendríticas (FDC), por ello el *cuarto objetivo* de esta tesis doctoral consiste en el **Estudio de las características funcionales y fenotípicas distintivas compartidas por DSC y FDC.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Las **muestras de amígdala** fueron obtenidas de pacientes de entre 3 y 10 años con amigdalitis crónica, en completa remisión antes de la intervención. Las muestras procedieron del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y del Hospital Universitario San Cecilio (Granada).

Las **muestras de medula ósea** fueron obtenidas a partir de aspirados sobrantes de donantes hematológicamente normales del Hospital de Baza.

Las **muestras de prepucio** procedieron de pacientes adultos operados de fimosis en el Hospital Universitario San Cecilio (Granada).

Las **muestras de decidua** fueron obtenidas de mujeres sanas de entre 20 y 30 años, que se sometieron a interrupciones voluntarias del embarazo durante el primer trimestre (6–11 semanas). Excluimos a mujeres que recibían medicación o que presentaban enfermedades infecciosas, autoinmunes u otras enfermedades sistémicas. Ninguno de los abortos fue inducido farmacológicamente. Estas muestras fueron obtenidas mediante legrados practicados en la Clínica “El Sur” en Málaga o de la Clínica “Ginegranada” en Granada.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético y de Investigación del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y por el Comité Ético de la Universidad de Granada. Además, se obtuvo el consentimiento informado de cada paciente, y en el caso de los menores de edad, se obtuvo el consentimiento informado de los padres o tutores de cada paciente.

2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ESTROMALES

Para la obtención de células estromales de amígdala, decidua y prepucio, el tejido fue lavado con PBS (Gibco, California, USA) y troceado utilizando un bisturí. A continuación, se añadió una solución de colagenasa tipo V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 5mg/ml, incubándose a 37°C durante 2 horas en el caso de las amígdalas y el prepucio, y durante 30 minutos en el de la decidua.

Tras este tiempo, la suspensión fue agitada, filtrada y centrifugada a 400g durante 5 minutos. El botón de células fue resuspendido en PBS y centrifugado sobre Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) durante 20 minutos a 600g. Las células mononucleares fueron recogidas de la interfase, lavadas con PBS, y resuspendidas, finalmente, en medio de cultivo.

Para la obtención de células estromales de medula ósea, la sangre procedente de aspirados fue directamente diluida con PBS y centrifugada sobre Ficoll-Histopaque. Al igual que en los casos anteriores, las células fueron recogidas de la interfase, lavadas con PBS y resuspendidas en medio de cultivo.

En todos los casos, las células mononucleares fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, tiempo en el que las células estromales se adhirieron al frasco de cultivo. Transcurrido dicho periodo de tiempo, las células presentes en el sobrenadante fueron descartadas, mientras que las adheridas fueron mantenidas en cultivo, cambiándose el medio dos veces por semana. Al cabo de una o dos semanas, las células adherentes tuvieron una morfología uniforme de aspecto fibroblástico y cubrieron la superficie del frasco de cultivo, siendo expandidas a otros frascos tras ser despegadas con Tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich). Las células fueron usadas en experimentos a partir del segundo pase y fueron mantenidas en cultivo durante dos meses.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de células estromales procedentes de la amígdala, prepucio y medula ósea fue EMEM (Eagle's Minimal Esencial Medium, Lonza, Allendale, NJ, USA) suplementado con un 3% de suero bovino fetal (FBS, Gibco), 2mM de Glutamina, 100 UI/ml de Penicilina, 100 UI/ml de Estreptomicina y 0,25µg/ml de Anfotericina (Sigma-Aldrich); mientras que para la obtención de DSC y FDC, las células procedentes de la disgregación de la decidua y la amígdala, respectivamente, se cultivaron en medio Opti-MEM (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado con un 3% de FBS, 100 UI/ml de Penicilina, 100 UI/ml de Estreptomicina y 0,25µg/ml de Anfotericina.

3. AISLAMIENTO DE DSC FRESCAS

Para obtener suspensiones frescas de DSC, se utilizó el protocolo descrito por Montes et al. (1996). Así, la decidua fue lavada en PBS y desmenuzada con un bisturí, en un pequeño volumen de PBS. A continuación, se añadió una solución de colagenasa tipo V a 5mg/ml, incubándose a 37°C durante 30 minutos. Esta suspensión fue centrifugada a 650g durante 30 minutos sobre un gradiente discontinuo de Percoll (Sigma-Aldrich). Finalmente, las células fueron recogidas de la interfase 20/30% y lavadas con PBS.

4. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS

La obtención de linfocitos, para el co-cultivo con células estromales, se realizó a partir del sobrenadante de las preparaciones de amígdala. Los linfocitos, tras ser recogidos y lavados con PBS, fueron teñidos de forma separada con anti-CD20 (Biolegends, San Diego, CA, USA) para la obtención de linfocitos B, o con anti-CD3 (Biolegends) para linfocitos T. A continuación, se utilizó un anticuerpo secundario unido a bolitas magnéticas (goat anti-mouse IgG Microbeads, Miltenyi Biotec, GmbH, Alemania) y las células fueron separadas tras pasar por columnas (Miltenyi Biotec).

La pureza de los linfocitos fue determinada por citometría de flujo, siendo siempre superior al 95%.

5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las células estromales fueron despegadas del frasco de cultivo mediante el tratamiento con Tripsina-EDTA a 37°C durante 3 minutos. La reacción fue detenida añadiendo un 20% de FBS. Las células fueron centrifugadas, el sobrenadante descartado y el pellet resuspendido en PBS a una concentración 10^6 células/ml y suplementado con un 4% de suero AB humano.

Para marcajes de superficie, 100 μ L de la suspensión celular fue incubada con el apropiado anticuerpo durante 30 min a 4°C en oscuridad. Las células fueron

lavadas, resuspendidas en 200µL de PBS, e inmediatamente analizadas en un citómetro de flujo FACScan o FACSCalibur (Becton Dickinson). El porcentaje de células que fueron positivas se calculó por comparación con el apropiado control de isotipo.

Para marcajes intracitoplasmáticos, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min a 4°C y permeabilizadas con PBS saponina frío al 0.05% (MERCK, Darmstadt, Germany) antes de añadir el anticuerpo monoclonal (mAb).

6. ANTICUERPOS MONOCLONALES

Los mAbs usados en este estudio fueron: CD3-FITC, CD10-PE, CD19-FITC, CD21-PE, CD29-APC, CD31-FITC, CD34-FITC, CD35-FITC, CD-44, CD45-PE, CD54-FITC, CD56-APC, CD73-PE, CD106-PE, CD140b, CD146, CD271-FITC, c-kit-PE, gp38-Alexa Fluor 647, TRANCE-PE (Biolegends), CD29-APC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), OCT-3/4-FITC (eBioscience), BAFF-FITC, CCL19-PE, CXCL12-APC, CXCL13-APC, MadCAM-1-APC, MFG-E8-PE, STRO-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN), αSM-actina-FITC, αSM-actina-Cy3 (Sigma-Aldrich), FVW, FLK-1, HLA-G clon MEM-G/9 y MEM-G/1 (Abcam). Los controles de isotipo utilizados fueron IgG1-FITC/PE/APC de ratón, IgG2-FITC/PE/APC de ratón y IgG-Alexa647 de rata (Biolegends). El anticuerpo secundario utilizado en los marcajes indirectos fue una anti-IgG de ratón hecha en cabra y marcada con Alexa Fluor 488.

7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA

Los análisis de expresión génica de las células estromales se llevaron a cabo mediante PCR cuantitativa y no cuantitativa. En ambos casos, se procedió a extraer el ARN total de las células usando Trizol (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) y el ADN complementario (cDNA) fue sintetizado usando cebadores Oligo-dT t y MVRT (Invitrogen) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

La PCR no cuantitativa fue realizada en un termociclador (2720 Thermal Cycler Geneamp, Applied Biosystems) usando un volumen total de 20 μ l, que contenía cDNA (el equivalente a 100ng de ARN), 200nM deoxy-NTPs, 800nm de cada cebador y 0,5U de polimerasa GoTaq (Biotools). Tras la incubación a 95°C durante 3 minutos, se llevaron a cabo 35 ciclos consistentes en 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 45 segundos and 72°C durante 45 segundos. Los productos de PCR fueron separados en base a su tamaño en geles de agarosa (Merck, Darmstadt, Germany) teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich), incluyéndose un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Biotools).

La PCR cuantitativa fue realizada en un termociclador (7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems) usando un volumen total de 10 μ l que contenía cDNA, 300nM de cada primer y SYBR green mastermix (Roche Basel, Switzerland). Para la corrección de la eficiencia de los primers, se generó una curva estándar para cada par de cebadores utilizando cDNA de amígdala. El factor de normalización fue obtenido a partir de la media geométrica de la expresión de dos genes relativamente estables (GADPH y HAMPSY).

8. OBTENCIÓN DE CLONES DE CÉLULAS ESTROMALES DE AMÍGDALA

A partir de las líneas de células estromales de amígdala se obtuvieron clones mediante dilución seriada en placas de 96 pocillos. Al cabo de 24 horas tras dispensarse las células en las placas, se revisaron los pocillos y se seleccionaron aquellos en los que solo existía una célula, incubándolas durante dos semanas en medio EMEM suplementado con un 10% de FBS, 2mM de Glutamina, 100 UI/ml de Penicilina, 100 UI/ml de Estreptomicina y 0,25 μ g/ml de Anfotericina. Transcurrido dicho periodo de tiempo, las células que habían formado colonias fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 12 pocillos, siendo ya cultivadas en medio EMEM suplementado con un 3% de FBS. Una vez obtenido un número suficiente de células, se procedió a estudiar la expresión de marcadores mediante PCR y citometría de flujo.

9. DIFERENCIACIÓN MESENQUIMAL DE CÉLULAS ESTROMALES

9.1. Diferenciación Adipogénica

Para la diferenciación adipogénica usamos el método descrito por Schutze et al. (Schutze et al. 2005) con algunas modificaciones. Brevemente, las células estromales fueron sembradas en placas de seis pocillos a una densidad de 2×10^3 células/cm² y crecidas hasta un 100% de confluencia en medio de cultivo. A continuación, las células se incubaron durante 4 días en medio de inducción de adipogénesis (medio Opti-MEM suplementado con un 3% FBS, Estreptomicina 100 UI/ml, Anfotericina 0,25 µg/ml, dexametasona 1 µM, 3-isobutyl-1-metilxantina 100 µM, indometacina 0.1 mM y insulina 10 µg/ml) y 3 días en medio de mantenimiento de adipogénesis (medio Opti-MEM suplementado con un 3% de FBS, Estreptomicina 100 UI/ml, Anfotericina 0,25 µg/ml y insulina 10 µg/ml). Este proceso se repitió durante tres semanas.

9.2. Diferenciación Condrogénica

Para la diferenciación condrogénica, nosotros seguimos el método descrito por Schutze et al. (Schutze et al. 2005). Brevemente, 25×10^4 células fueron centrifugadas en tubos cónicos de 15 ml y mantenidas durante 3 semanas en medio Opti-MEM suplementado con 100 UI/ml de Estreptomicina, 0,25 µg/ml de Anfotericina, 0,15 mM de ácido ascórbico y 10 ng/ml de TGF-β (Sigma-Aldrich). La mitad del medio de diferenciación fue sustituido cada 3 o 4 días.

9.3. Diferenciación Osteogénica

La diferenciación osteogénica fue lograda usando el método descrito por Jaiswal et al. (Jaiswal et al. 1997), que consistió en sembrar las células a una densidad de 2×10^3 células/cm² y crecerlas hasta el 100% de confluencia. Después, las células estromales fueron cultivadas en EMEM suplementado con un 3% de FBS, 2 mM de Glutamina, 100 UI/ml de Penicilina, 100 UI/ml de Estreptomicina,

0,25µg/ml de Amfotericina, 0,1 mM de ácido ascórbico, 100 nM de dexametasona y 10nM glicerol-P (Sigma-Aldrich) durante tres semanas.

9.4. Diferenciación Endotelial

Para comprobar la capacidad de las TSC para diferenciarse en células endoteliales nosotros seguimos el protocolo descrito por Zhang y colaboradores (Zhang et al. 2009). Así, se procedió a cultivar las TSC en medio EMEM con un 3% de suero, como control, o en medio de crecimiento endotelial 2 (EGM-2, endotelial growth media-2; Lonza) que contenía VEGF, hFGF-b, EGF, factor de crecimiento tipo insulina – 1, heparina, ácido ascórbico y un 10% de FBS. Las células fueron mantenidas en estas condiciones durante tres semanas, cambiándose el medio cada 3 ó 4 días.

10. CITOQUÍMICA

10.1. Tinción con Cristal Violeta

Células frescas o cultivadas durante al menos dos semanas, fueron sembradas en placas de 6 pocillos hasta que alcanzaron una confluencia del 80%. Entonces, fueron fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 5 minutos y teñidas con cristal violeta al 0.05% durante media hora. Después de lavar, las células fueron observadas bajo el microscopio invertido

10.2. Tinción con Oil Red O

Células mantenidas en EMEM o en medio adipogénico durante tres semanas, fueron lavadas dos veces con PBS, fijadas con PFA al 4% y teñidas con Oil red O (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas y visualizadas bajo el microscopio invertido para detectar la presencia de vesículas de grasa.

10.3. Tinción con Alizarin Red S

Células cultivadas durante 21 días en EMEM o en medio osteogénico fueron fijadas con etanol al 70% y teñidas durante 15 minutos con Alizarin red S (Sigma Aldrich) al 2% y pH 4.2 Finalmente, las células fueron lavadas y visualizadas bajo el microscopio invertido para detectar la presencia de depósitos de calcio.

10.4. Tinción con Safranina

Los botones de células incubados durante 3 semanas en medio condrogénico, fueron fijados con PFA al 4%, lavados con PBS e incluidos en OCT. A continuación fueron cortados en un criostato y teñidos con Safranina (Sigma Aldrich) para detectar la formación de proteoglicanos.

11. INMUNOFLUORESCENCIA

Las muestras de amígdala y de prepucio recién obtenidas fueron fijadas con PFA al 4% durante 24 horas. A continuación, las muestras fueron lavadas con PBS, criopreservadas en una solución de sucrosa durante 24 horas e incluidas en OCT Tissue-Tek (Sakura, The Netherlands). A partir de los bloques de OCT, se obtuvieron secciones de 6µm de grosor en un criostato Leica CM1510S, que fueron fijadas con acetona gélida durante 10 minutos y secadas al aire. Las secciones fueron incubadas con anticuerpos primarios durante 24 horas a 4°C, seguido por una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario marcado con AlexFluor-488 o AlexaFluor-594 (invitrogen), en el caso de marcajes indirectos. Finalmente, las secciones fueron embebidas en medio de montaje (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) y analizadas en un microscopio confocal Nikon A1.

12. TRATAMIENTO DE CULTIVOS DE CÉLULAS ESTROMALES

Las líneas estromales fueron estimuladas durante 72 horas con los siguientes factores: TNF α (10ng/ml), LT $\alpha_1\beta_2$ (10ng/ml), Acido Retinoico (1 μ M), IL-17 (10 ng/ml) (Abcam), IL-21 (25ng/ml) y anti-CD40 (1 μ g/ml) (eBioscience).

Para inducir decidualización, las líneas de DSC y FDC fueron tratadas con 300nM de progesterona y 500mM de cAMP (Sigma-Aldrich) durante 15 días.

13. ANÁLISIS DE LA ADHESIÓN DE LINFOCITOS

Linfocitos sin purificar, obtenidos del sobrenadante de las preparaciones de amígdala, fueron incubados durante dos horas con células estromales, a una proporción 10:1. A continuación, las células no unidas fueron eliminadas lavando 3 veces con PBS, mientras que las células adheridas fueron recogidas mediante tripsinización y teñidas con anti-CD45 (PE) y anti-CD3 o anti-CD19 (FITC). La mezcla de células obtenidas fue analizada en un FACSCalibur y los resultados expresados como el número de células CD3 ó CD19 positivas por millón de células CD45 negativas.

14. ANÁLISIS DE CÉLULAS EN SUB-G1

Para el estudio de la apoptosis tanto en células estromales como en linfocitos se realizó un análisis de células Sub-G1, siguiendo el método descrito por Gong et al. (Gong et al. 1994). Brevemente, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con etanol frío al 70% durante 5 minutos. A continuación, se volvió a lavar, centrifugando a 3500 rpm durante 2 minutos, y las células fueron resuspendidas en una solución de extracción de ADN (0,2M NaHPO₄, 0,1M Acido Cítrico, pH 7,8), incubando durante 10 minutos a 37°C. Finalmente, se tiñó el ADN con yoduro de propidio (40ug/ml) mientras se trataba con RNasa (100ug/ml) (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. El análisis cuantitativo de las células sub-G1 fue realizado en un citómetro FACScan.

15. ANÁLISIS DE PROLIFERACIÓN CELULAR MEDIANTE CFDA-SE

Para el estudio de la proliferación celular, las células fueron incubados con CFDA-SE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) a una concentración de 5 μ M durante 5 minutos, a 37°C en oscuridad. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con 20 ml de PBS suplementado con un 20% de FBS y centrifugando a 400xg durante 5 minutos. Antes de la última centrifugación, las células fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C.

Las células fueron sembradas en placas y al cabo de 72 horas, fueron recogidas, lavadas y analizadas en un citometro FACSCalibur.

16. WESTERN-BLOT

Las células estromales fueron lavadas con PBS y despegadas de las placas de cultivo con un raspador. Tras centrifugar, las células fueron resuspendidas en tampón de lisis, se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método Bradford (Sigma-Aldrich) y se añadió el tampón de carga sin agente reductor, a cada muestra. Finalmente las muestras fueron sonicadas y divididas en dos, añadiéndose a una de ellas DTT (Sigma-Aldrich) como agente reductor.

Las proteínas se separaron en base a su tamaño mediante SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA) mediante transferencia semiseca, empleando el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad, California, USA). A continuación, la membrana se incubó, durante 1 hora, con una solución de bloqueó, que contenía un 5% de leche en polvo. Después, se lavó la membrana con PBS tween al 0.1% y se incubó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal frente a la proteína de interés, diluido previamente en PBS tween con leche en polvo al 1%. Tras la incubación, se lavo la membrana y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) marcado con peroxidasa de rábano (GE Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) preparado en solución de bloqueo. Finalmente, la membrana se reveló mediante

quimioluminiscencia, empleando el reactivo ECL (GE Amersham Biosciences) y el sistema de análisis de imagen LAS-4000 mini Fujifilm.

17. ANALISIS DE SOBRENADANTES DE CULTIVO

La concentración de CXCL13 en sobrenadantes de DSC, FDC o MSC fue determinada mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; R&D Systems). Del mismo modo, la concentración de prolactina en sobrenadantes de DSC, FDC y MSC tratadas con progesterona y cAMP fue determinada mediante ELISA (Roche, Basel, Switzerland).

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron analizados mediante el test de la t de Student, no pareado. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos; $p < 0,05-0,01^*$, $p 0,01-0,001^{**}$, $p < 0,001^{***}$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE AMIGDALA

1.1. Aislamiento de Células Estromales de Amígdala

Con el objeto de caracterizar *in vitro* las células estromales de los SLOs humanos y sus precursores, se utilizaron muestras de amígdala procedentes de pacientes con amigdalitis crónica. Estas muestras fueron disgregadas e incubadas con colagenasa V, obteniéndose una suspensión celular que fue sembrada en frascos de cultivo y mantenida en medio EMEM suplementado con un 3% de FBS. Al cabo de 24 horas, en las preparaciones se pudo observar una pequeña proporción de células adheridas al frasco (Fig. 7A) que fueron capaces de proliferar, formando colonias de fibroblastos al cabo de 3 ó 4 días. Estas células se expandieron hasta cubrir la superficie del frasco, momento en el que fueron despegadas con tripsina y expandidas.

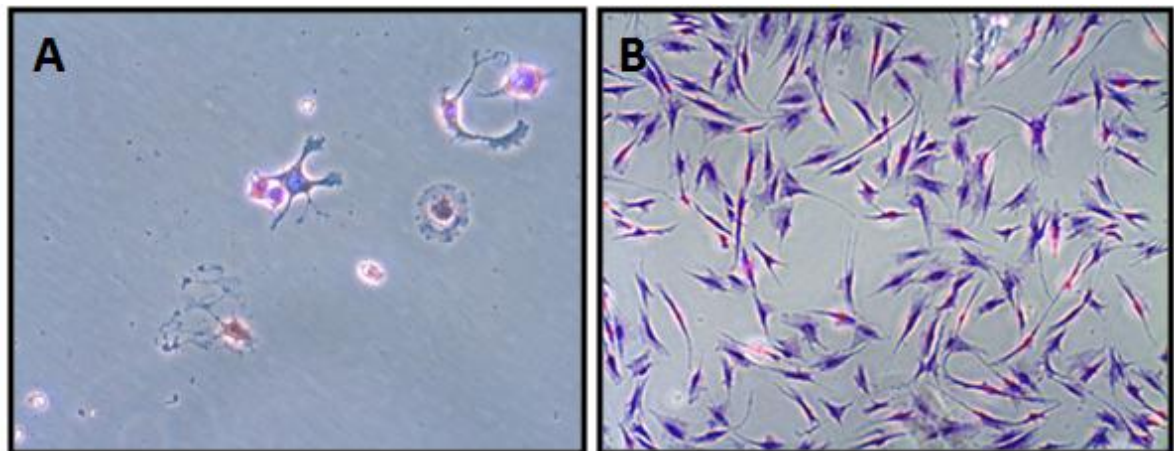


Figura 7 Morfología de las células estromales obtenidas de amígdala. Las células procedentes de las preparaciones de amígdala fueron cultivadas, mostrándose a las 24 horas de la siembra (A) y tras dos semanas de cultivo (B) en medio EMEM al 3% de FBS y teñidas con cristal violeta.

Después de dos semanas de cultivo, las células no adherentes habían sido eliminadas con los sucesivos cambios de medio y las adherentes, por su parte, habían formado una población uniforme con una morfología fibroblástica (Fig. 7B). Los análisis de citometría de flujo confirmaron la existencia de una población

homogénea, en la que no existió contaminación por leucocitos o por células endoteliales (CD45 y CD31 negativas, respectivamente; Fig. 8) y donde todas las células expresaron los marcadores mesenquimales α SM-actina, CD10, CD29, CD44 y CD73 (Fig. 8). Además, se detectó la expresión de podoplanina, un marcador tradicionalmente asociado con las células estromales de los tejidos linfoides secundarios (Fig. 8). Esta población celular mantenida en cultivo fue denominada como Células Estromales de Amígdala (TSC, Tonsil Stromal Cells), término utilizado previamente por(Cho K. A. et al. 2012)).

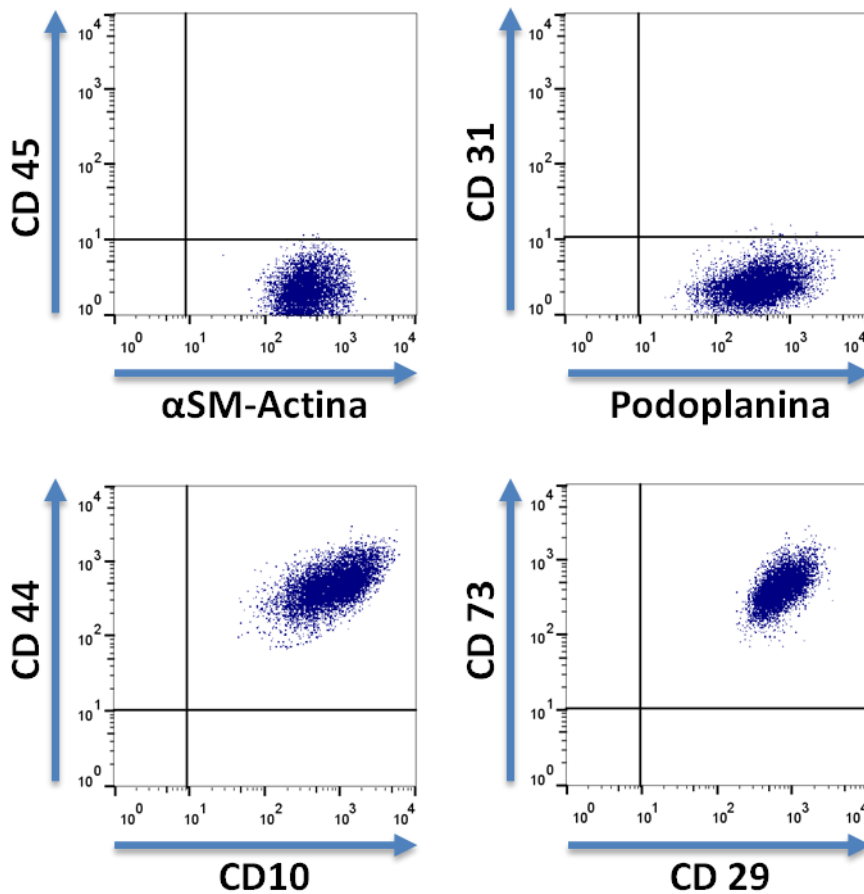


Figura 8. Caracterización fenotípica de las Células Estromales de Amígdala. Mediante citometría de flujo, se muestra la existencia de una población homogénea, caracterizada por la expresión de α SM-actina, podoplanina, CD10, CD29, CD44 y CD73, y la ausencia de CD31 y CD45. La figura muestra un fenotipo representativo de los cinco realizados con diferentes líneas celulares.

1.2. Las TSC presentan un fenotipo similar a las células LTo

Establecidas las líneas de células estromales de amígdala, se decidió estudiar la relación existente entre estas células y las principales poblaciones estromales descritas en los órganos linfoides secundarios adultos. Para ello, se seleccionaron marcadores característicos de cada una de las poblaciones, a partir de los estudios llevados a cabo en ratón, y se determinó su expresión en las TSC. Así, en la figura 9 se muestra, mediante PCR, como dichas células mantenidas en cultivo son negativas para CD35 (marcador de FDC) y positivas para CXCL13 (marcador de FDC y MRC), TRANCE (marcador de MRC), CCL19 y CCL21 (marcadores de FRC).

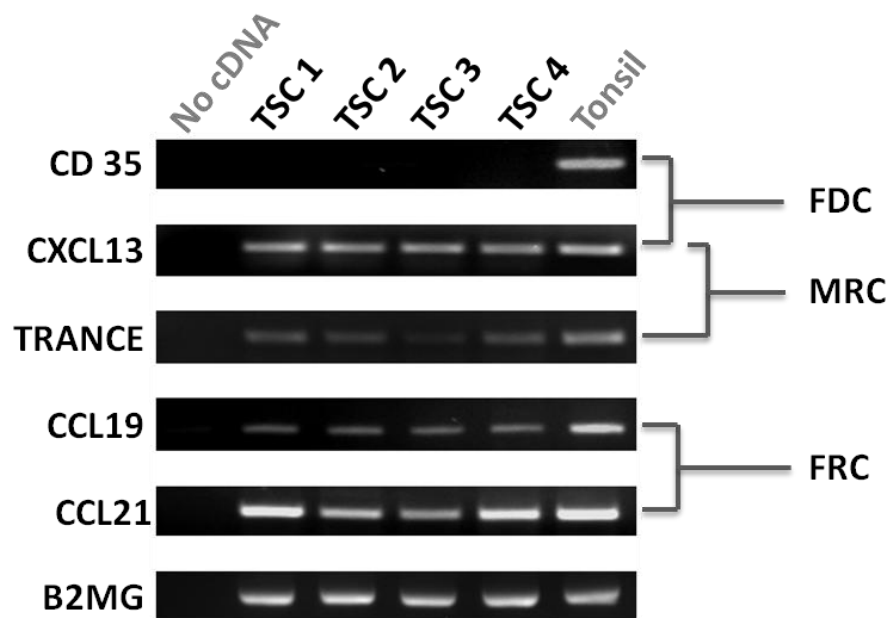


Figura 9. Expresión de marcadores asociados a FDC, FRC y MRC. Mediante PCR, se determinó la expresión de CD35, CXCL13, TRANCE, CCL19 y CCL21 en 4 líneas de TSC. La β 2MG fue utilizada como control positivo.

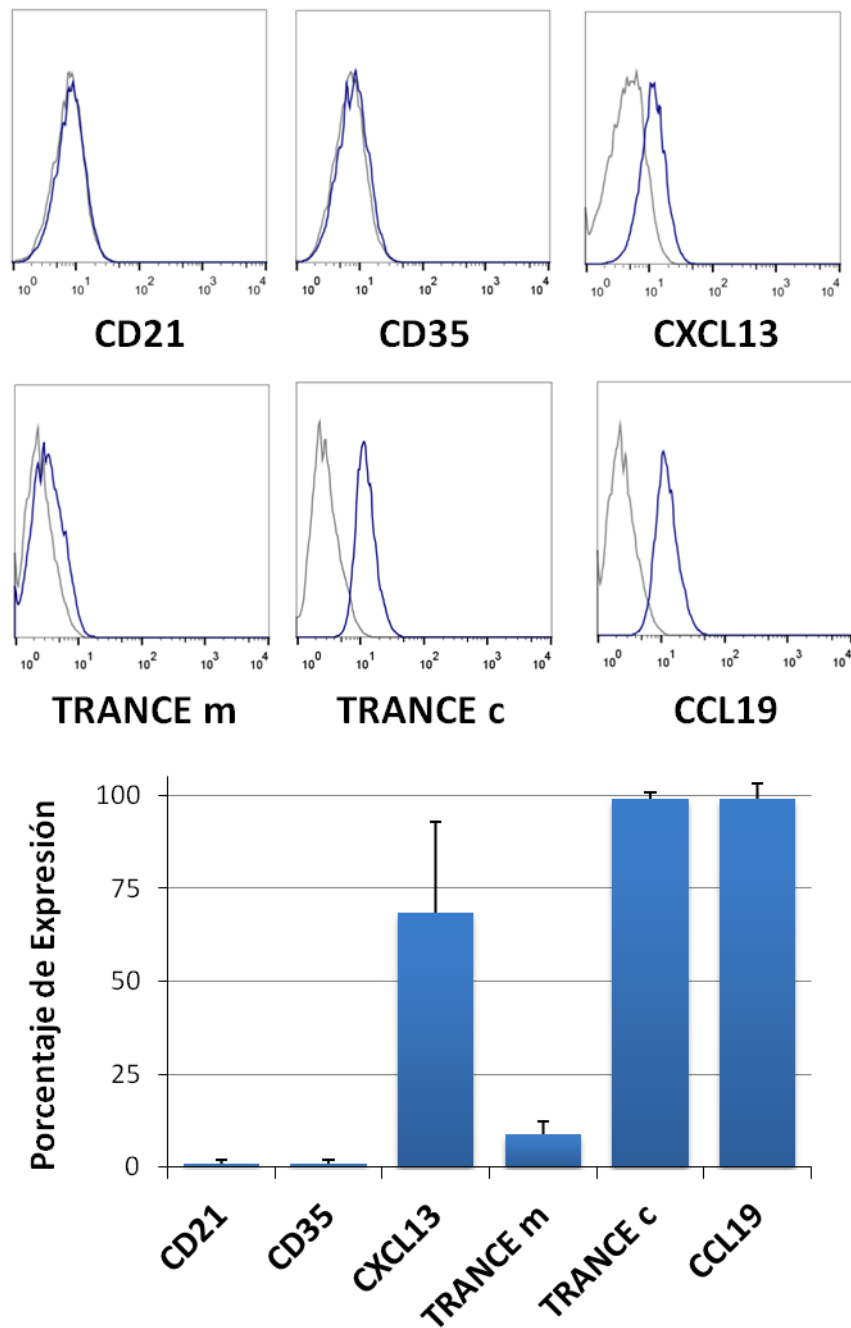


Figura 10. Análisis de expresión de marcadores asociados a FDC, FRC y MRC mediante citometría de flujo. La expresión de CD21, CD35, CXCL13, TRANCE en membrana (m) y citoplasmático (c), y CCL19 fue determinada, mostrándose histogramas representativos de cada uno de los marcadores. Además, se representa el valor medio obtenido a partir del estudio de cinco líneas celulares. La barra de error muestra la SD de la media. Control de isotipo (—); mAb (—).

El fenotipo obtenido mediante PCR parecía indicar que las líneas estromales se encuentran constituidas por una mezcla de MRC y de FRC, por ello se procedió a analizar el fenotipo mediante citometría de flujo. A través de esta técnica, se confirmó la ausencia de los marcadores de FDC CD21 y CD35, así como la expresión de CXCL13 por gran parte de las TSC. Sin embargo, al contrario de lo esperado, se encontró que la práctica totalidad de las células expresan CCL19 y TRANCE a nivel citoplasmático (Fig. 10), lo que demostró que los cultivos de TSC no están constituidos por una mezcla de FRC y MRC, sino una única población que presentan un fenotipo similar al de las células LTo de ratón, caracterizadas por la expresión de CXCL13, TRANCE, CCL19 y CCL21, entre otras moléculas.

1.3. Clones obtenidos a partir de líneas de TSC mantienen un fenotipo similar al de las células LTo.

Para excluir la posibilidad de una mezcla de células, también se aislaron colonias de TSC formadas a partir de una única célula, mediante dilución límite en placas de 96 pocillos. Los clones obtenidos fueron expandidos hasta obtener un número suficiente de células que permitiera su estudio mediante citometría de flujo.

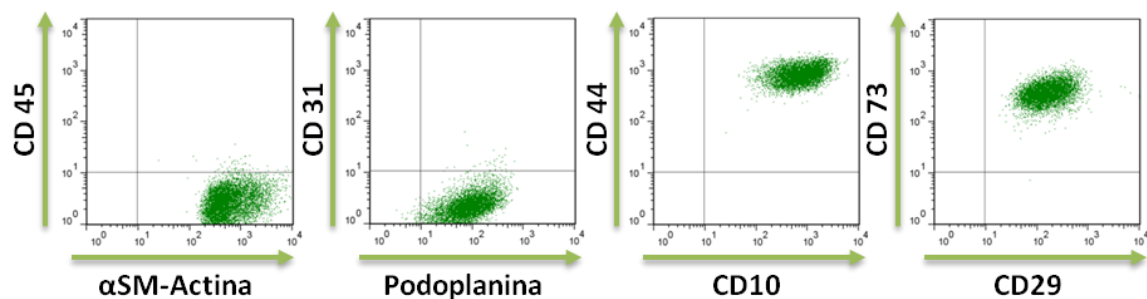


Figura 11. Caracterización fenotípica de clones de TSC. Los clones de TSC obtenidos mediante dilución límite mostraron, mediante citometría de flujo, expresión de α SMA, CD10, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73 y podoplanina, mostrando una población homogénea. La figura muestra un fenotipo representativo, de los cinco clones analizados.

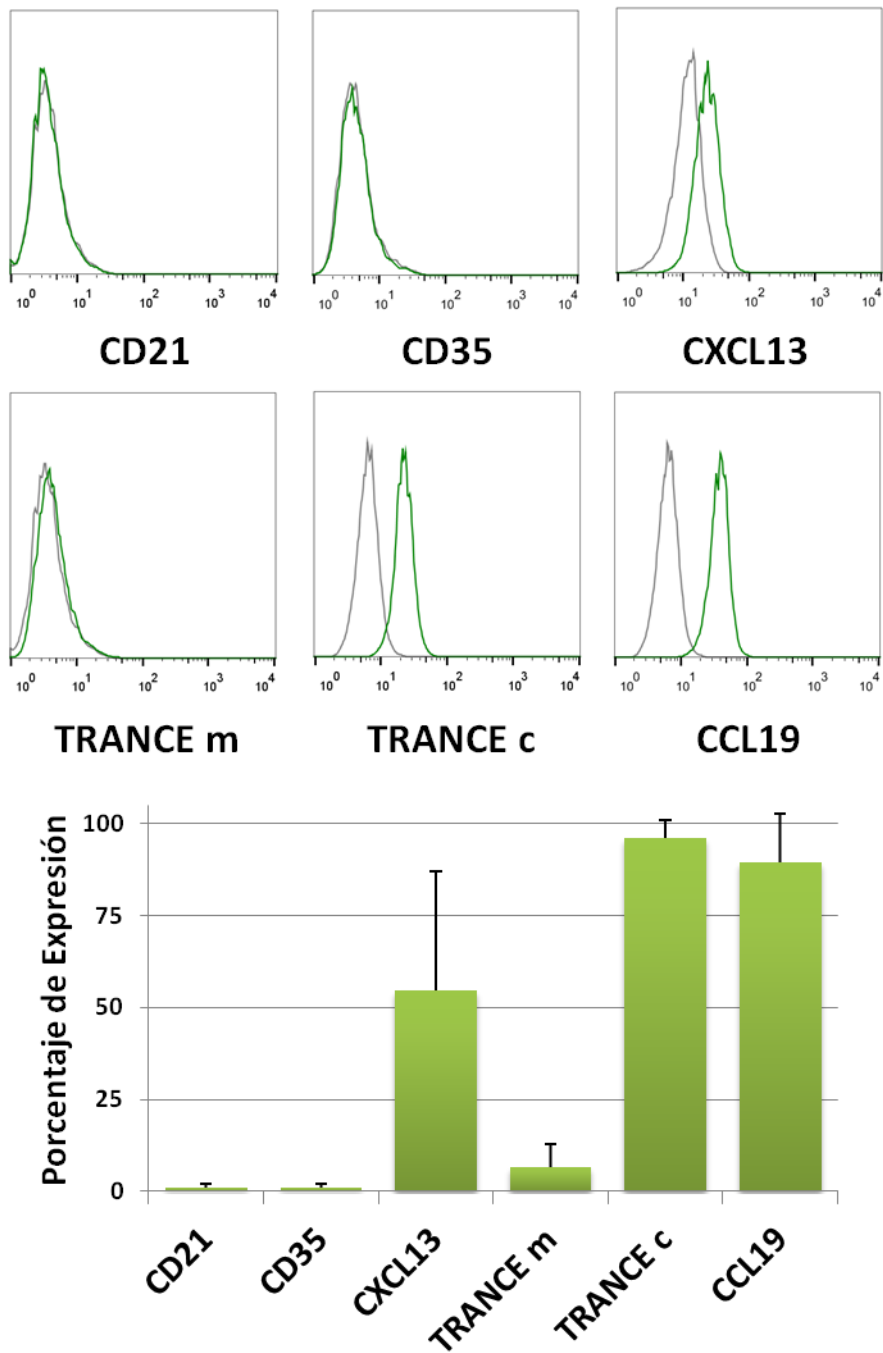


Figura 12. Expresión de marcadores asociados a FDC, FRC y MRC por los clones de TSC. Mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de CD21, CD35, CXCL13, TRANCE en membrana y citoplasmático, y CCL19, mostrándose histogramas representativos de cada uno de los marcadores. Además, se representa el valor medio obtenido a partir del análisis de cinco clones. La barra de error muestra la SD de la media. Control de isotipo (—); mAb (—).

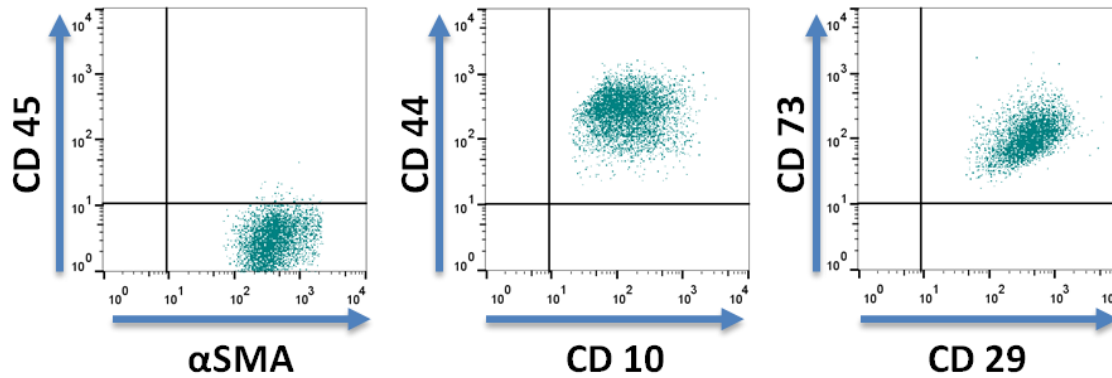
El análisis de los clones mostró un fenotipo idéntico al de las líneas parentales, pues no se detectó expresión de marcadores del linaje hematopoyético (CD45-) o endotelial (CD31-), y los marcadores estromales mostraron una población homogénea donde todas las células fueron positivas para α SMA, CD10, CD29, CD31, CD44, CD45, CD73 y podoplanina (Fig. 11). Del mismo modo, el patrón de expresión de marcadores asociados con las distintas poblaciones estromales fue idéntico al de las líneas originarias, encontrándose una expresión cercana al 100% de TRANCE y CCL19. Por su parte, CD21 y CD35 no fueron detectados (Fig. 12) y la expresión de CXCL13 fue positiva aunque variable, al igual que ocurre con las líneas de TSC no clonadas (Fig. 10 y 12).

1.4. Comparación del fenotipo de las TSC con otras Células Estromales

La presencia de células estromales con un fenotipo similar al de las células LTo en las amígdalas, llevó a considerar si este fenotipo sería característico de las TSC o si, por el contrario, se encontraría en cualquier otra célula estromal aislada en las mismas condiciones, independientemente del órgano de origen. Para comprobar esta hipótesis, se aislaron fibroblastos de prepucio (FF, foreskin fibroblast) y células estromales mesenquimales de médula ósea (BM-MSC, bone marrow mesenchymal stromal cell), manteniéndolas en las mismas condiciones que las TSC.

Al igual que en las preparaciones de amígdala, las células procedentes de la digestión con colagenasa V del prepucio o de los aspirados de médula ósea fueron sembradas en frascos de cultivo, observándose, al cabo de 24 horas, una pequeña proporción de células adherentes, que proliferó y formó colonias de fibroblastos. Tras dos semanas de cultivo, se pudo observar una población uniforme de células adherentes con morfología fibroblástica y un fenotipo estromal, similar a las TSC, donde todas las células expresaron de forma homogénea α SMA, CD10, CD29, CD44 y CD73, y no existió contaminación por leucocitos o células endoteliales (Fig. 13).

A) BM-MSC



B) FF

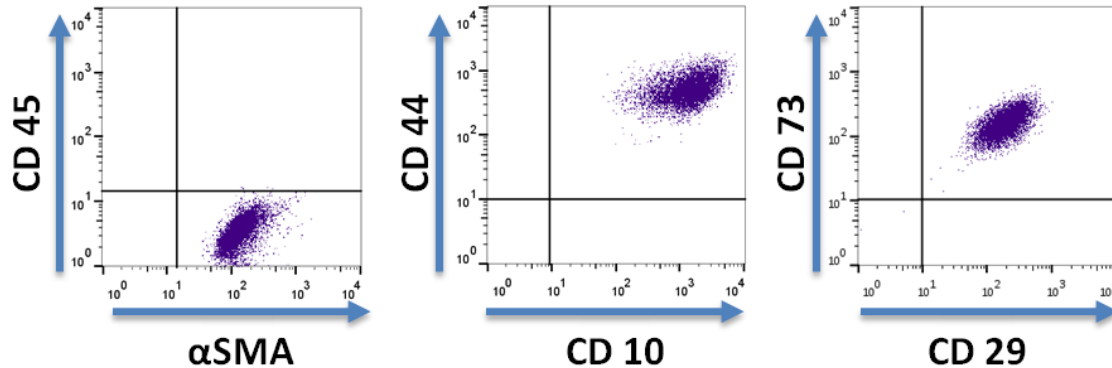


Figura 13. Caracterización fenotípica de BM-MSC y de FF. Mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de α SMA, CD10, CD29, CD44, CD45 y CD73 en BM-MSC (A) y en FF (B), mostrando un fenotipo homogéneo e idéntico al de las células estromales de amígdala. La figura muestra un fenotipo representativo, de los cuatro realizados con diferentes líneas celulares.

A pesar de compartir la expresión de antígenos mesenquimales, el patrón de los marcadores asociados con las células LTo fue distinto al descrito en las TSC. En el caso de los fibroblastos de prepucio, estas células carecían de los marcadores CD35, CXCL13 y CCL19, pero expresaron TRANCE y CCL21 (Fig. 14). Por su parte, las BM-MSC solo mostraron expresión de CCL21 (Fig. 14). Estos resultados demuestran que si bien algunos marcadores asociados con las células LTo pueden ser identificados en distintos tipos de células estromales, las únicas que mostraron todos los marcadores asociados con las TSC fueron las TSC.

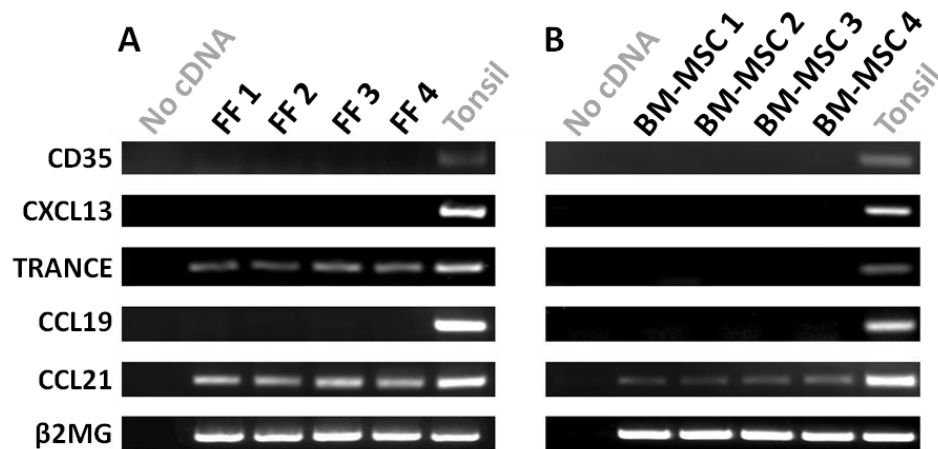


Figura 14. Expresión de marcadores asociados a FDC, FRC y MRC por las BM-MSC y los FF. Mediante PCR, se determino la expresión de CD35, CXCL13, TRANCE, CCL19 y CCL21 en 4 líneas de MSC (A) y de FF (B). La β 2MG fue utilizada como control positivo.

1.5. Las TSC expresan marcadores asociados con Pericitos y Células Madre

Los resultados mostrados anteriormente indican que las TSC son el resultado de la proliferación in vitro de células con un fenotipo similar a las células LTo y, además, sugieren que las TSC podrían actuar como precursores estromales. En ratón, se sabe que la fuente de células estromales de los SLOs adultos se encuentra en torno a los vasos sanguíneos, presentando un fenotipo similar al de pericitos y MSC (Koning et al. Sometido, Krautler et al. 2012). Por ello, se procedió a estudiar la expresión de distintos marcadores asociados con los precursores estromales de ratón, así como otros asociados con células perivasculares.

De este modo, se comprobó que las TSC expresan MFG-E8 y PDGFR β (Fig. 15 A y B), marcadores asociados con el precursor de FDC (Krautler et al. 2012); así como Nestina (Fig. 15D), marcador relacionado por Koning y colaboradores (sometido) con el precursor común de FDC, FRC y MRC. Además, las TSC también expresan otros marcadores característicos de pericitos como CD146 o el factor de Von Willenbrand (VWF, Von Willebrand Factor) (Fig. 15 A y B).

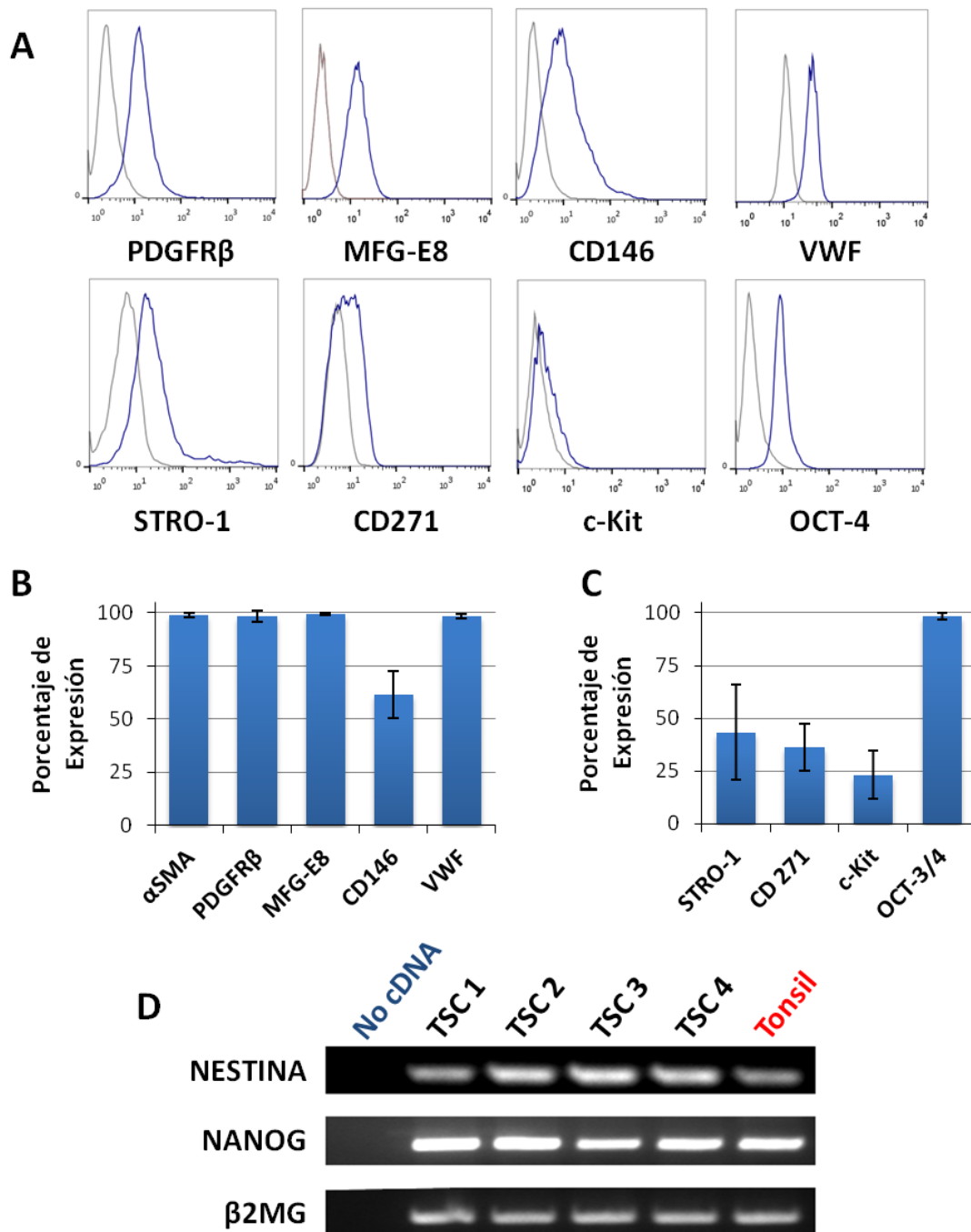


Figura 15. Expresión de marcadores asociados con pericitos y células madre. Mediante citometría de flujo, se determinó la expresión de PDGFR β , MFG-E8, CD146, VWF, CD271, c-Kit, STRO-1 y OCT-3/4 (A). Representación de la media de expresión de marcadores asociados a pericitos (B) y a células madre (C), obtenido del análisis de 5 líneas. La barra de error muestra la SD de la media. Mediante PCR se muestra la expresión de Nestina y NANOG (D). La β 2MG fue utilizada como control positivo. Control de isotipo (—); mAb (—).

Los pericitos, como se describió anteriormente, han sido propuestos como los homólogos in situ de las MSC (Crisan et al. 2008), por lo que también se estudió la expresión de marcadores tradicionalmente asociados con estas células, como CD271, c-kit o STRO-1, observándose que una cierta proporción de TSC los expresaron (Fig. 15 A y C). Finalmente, se observó que las TSC también expresaron marcadores característicos de Células Madre Embrionarias como OCT3/4 y NANOG (Fig. 15).

1.6. Las TSC tienen capacidad de diferenciación mesenquimal

La expresión, por parte de las TSC, de marcadores asociados con las MSC llevó a considerar la posibilidad de que estas células conservaran la capacidad de diferenciarse en otros tipos celulares del linaje mesenquimal. En consecuencia, se utilizaron medios descritos en la bibliografía para inducir la diferenciación de las TSC en adipocitos, condrocitos y osteocitos.

La diferenciación adipogénica fue inducida en las TSC mediante el tratamiento con 1-metil-3-isobutilxantina, dexametasona, insulina, e indometacina, lo que determinó la acumulación de vesículas lipídicas en el interior de las células (Fig. 16B). Éstas, además, aumentaron la expresión del receptor activador de la proliferación de peroxisomas $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$, peroxisome proliferation-activated receptor $\gamma 2$) y la proteína de unión a ácidos grasos aP2, marcadores característicos de adipocitos (Fig. 17).

Para la inducción de la diferenciación condrogénica las células estromales fueron centrifugadas, formando una micromasa que fue incubada en medio de cultivo OPTI-MEM suplementado con TGF- β , ácido ascórbico y dexametasona. Bajo estas condiciones, la masa celular dio lugar a una esfera de gran consistencia, que presentaba una matriz extracelular rica en proteoglicanos (Fig. 16D). Además, las células comenzaron a expresar colágeno tipo II y IX (Fig. 17), marcadores típicos del cartílago articular.

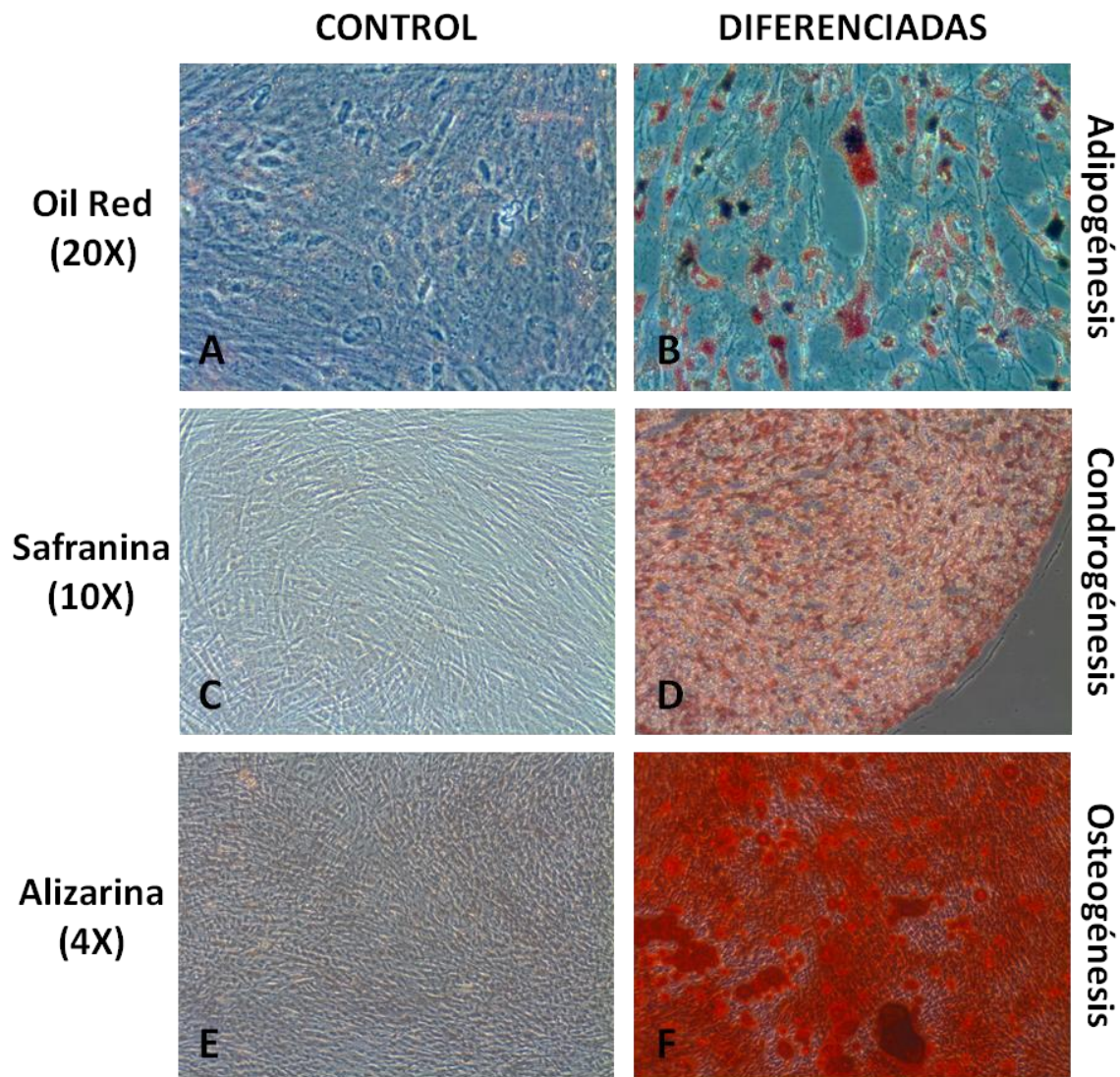


Figura 16 Diferenciación mesenquimal de las células aisladas de amígdala. La capacidad de diferenciación de las TSC en varios linajes fue estudiada “in vitro”, mediante el uso de medios adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos. La adipogénesis se comprobó mediante la acumulación de vesículas lipídicas, teñidas con oil red O (B). La capacidad condrogénica se demostró por la capacidad de acumular proteoglicanos en la matriz extracelular, teñidos con safranina (D). La osteogénesis fue puesta de manifiesto a través de la acumulación de calcio en la matriz extracelular, teñido mediante el uso de alizarina (F). Tales cambios no fueron evidentes en las células mantenidas con el medio de crecimiento (A,C,E). La figura muestra un experimento representativo, de los cinco realizados con diferentes líneas celulares.

Por último, las TSC fueron diferenciadas en osteocitos, bajo la acción del β -glicerol fosfato, la dexametasona y el ácido áscorbico, lo que determinó la formación de densos agregados celulares que produjeron una matriz extracelular en la que se depositaron grandes cantidades de calcio (Fig. 16 F). Mediante PCR, además, se comprobó el incremento en la expresión de fosfatasa alcalina y osteocalcina (Fig. 17).

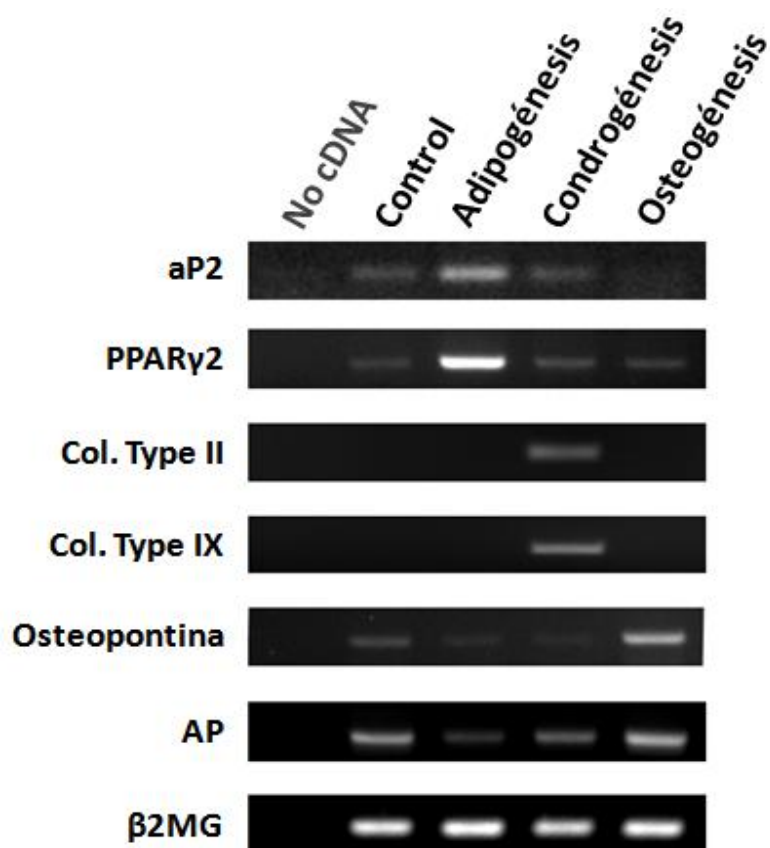


Figura 17. Análisis de expresión de marcadores asociados a adipocitos, condrocitos y osteoblastos. La capacidad de diferenciación fue confirmada mediante PCR de genes asociados a adipocitos (PPAR γ 2 y aP2), condrocitos (colágeno tipo II y IX) y osteocitos (osteopontina y fosfatasa alcalina). Las células mantenidas en medio adipogénico experimentaron un aumento en la expresión de PPAR γ 2 y aP2, mientras que las que se cultivaron en condiciones condrogénicas comenzaron a expresar colágeno tipo II y IX. Finalmente, las células diferenciadas en osteocitos aumentaron la expresión de osteopontina y fosfatasa alcalina. La β 2MG fue utilizada como control de carga. La figura muestra un experimento representativo, de los cinco realizados con diferentes líneas celulares.

Para confirmar la hipótesis de la existencia de una única célula estromal con capacidad para diferenciarse en los tres tipos celulares expuestos, tres de los clones de TSC fueron diferenciados en adipocitos, condrocitos y osteocitos (Fig. 18), observándose la misma capacidad que las líneas originales. No obstante, en la diferenciación adipogénica se pudo observar un menor número de células con vesículas lipídicas.

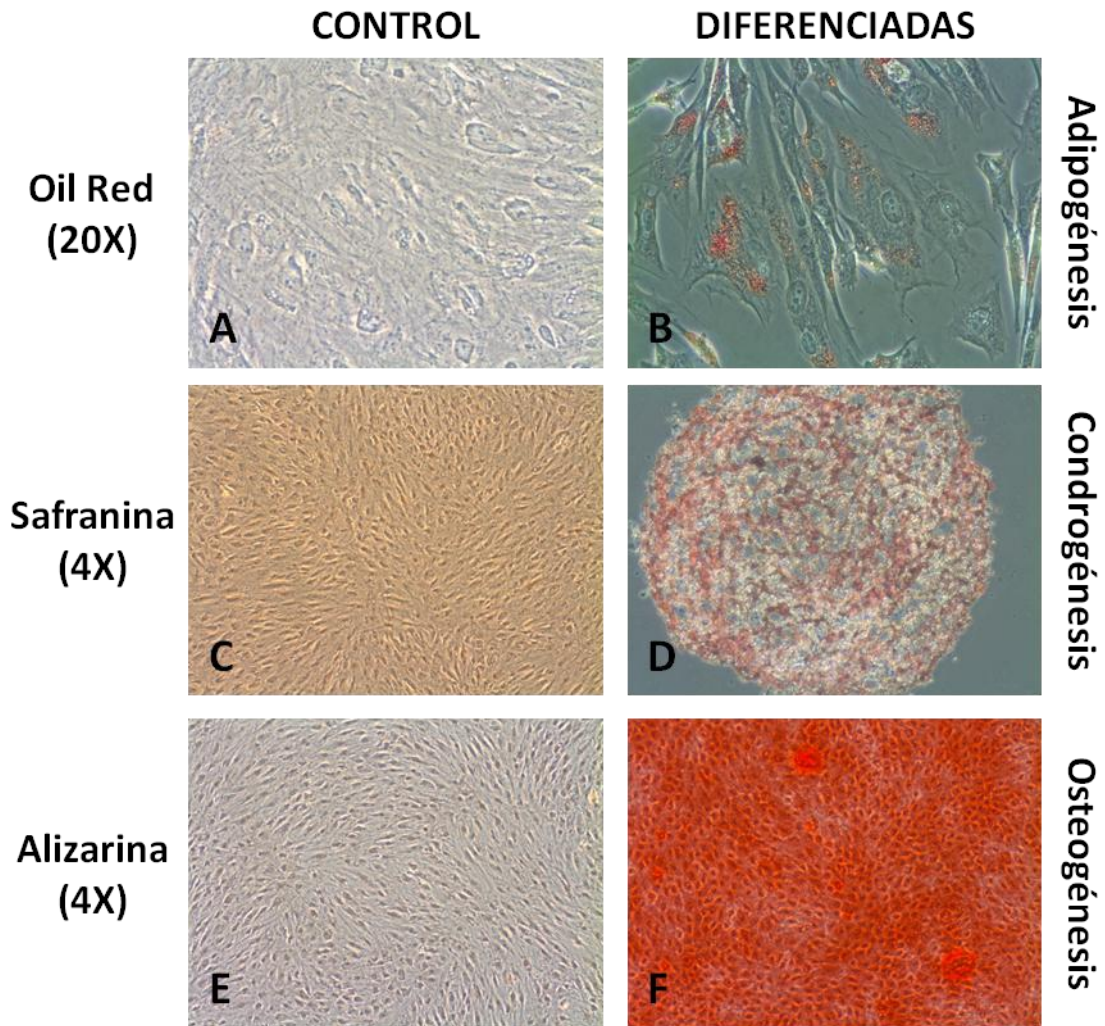


Figura 18. Diferenciación mesenquimal del clon TSC 142-3. Tres de los clones obtenidos fueron mantenidos en los distintos medios de diferenciación para evaluar su capacidad adipogénica, condrogénica y osteogénica. La respuesta fue similar a la de las líneas celulares de partida, acumulándose vesículas lipídicas (B), proteoglicanos (D) o calcio (F) en función del medio de diferenciación utilizado. Tales cambios no fueron evidentes en las células mantenidas con el medio de crecimiento (A,C,E).

1.7. Localización de las TSC en secciones de Amígdala

La localización de los precursores de las células estromales de los SLOs aún no ha sido identificada en humanos, aunque los estudios en ratón sugieren que podrían ocupar una posición perivascular (Koning et al. Sometido, Krautler et al. 2012). No obstante, los resultados presentados anteriormente indican que las TSC son el resultado de la proliferación “in vitro” de un precursor estromal con un fenotipo similar a los precursores descritos en ratón. Teniendo en cuenta todo ello, se decidió estudiar la localización de las TSC en el interior de la amígdala, para ello se utilizaron marcadores expresados por las células cultivadas.

En primer lugar, se procedió al estudio de la expresión de podoplanina y α SMA en criosecciones de amígdala, dos antígenos estromales fuertemente expresados por las TSC (Fig. 8). En el caso de la podoplanina, se pudo observar el patrón estromal característico de este antígeno, siendo expresado tanto por las FRC en las zonas interfoliculares, como por las FDC en los folículos, donde co-localizó con el CD35 (Fig. 19 A y B). Por otro lado, en las secciones teñidas con α SMA se pudo observar que este marcador es expresado por las FRC pero no por las FDC, apareciendo las segundas como simples positivas para CD35 (Fig. 19 B y C). A pesar de ello, en el interior de los folículos, se detectaron células perivasculares que expresaron α SMA, pero que carecían de CD35 (Fig. 19D).

A continuación, se decidió estudiar la localización de marcadores asociados con los precursores estromales y expresados por las TSC. Así, se comprobó que tanto el CD146 como el MFG-E8 son expresados en el interior de los folículos (Fig. 20 B y E), dando un patrón estromal similar al CD35. Además, ambos marcadores co-localizan con células perivasculares α SMA⁺ en las zonas interfoliculares (Fig. 20 C y F), mientras que en el interior de los folículos sólo ocurre con el CD146 (Fig. 20 B y E). De este modo, demostramos la existencia de células perivasculares con un fenotipo similar al de las TSC.

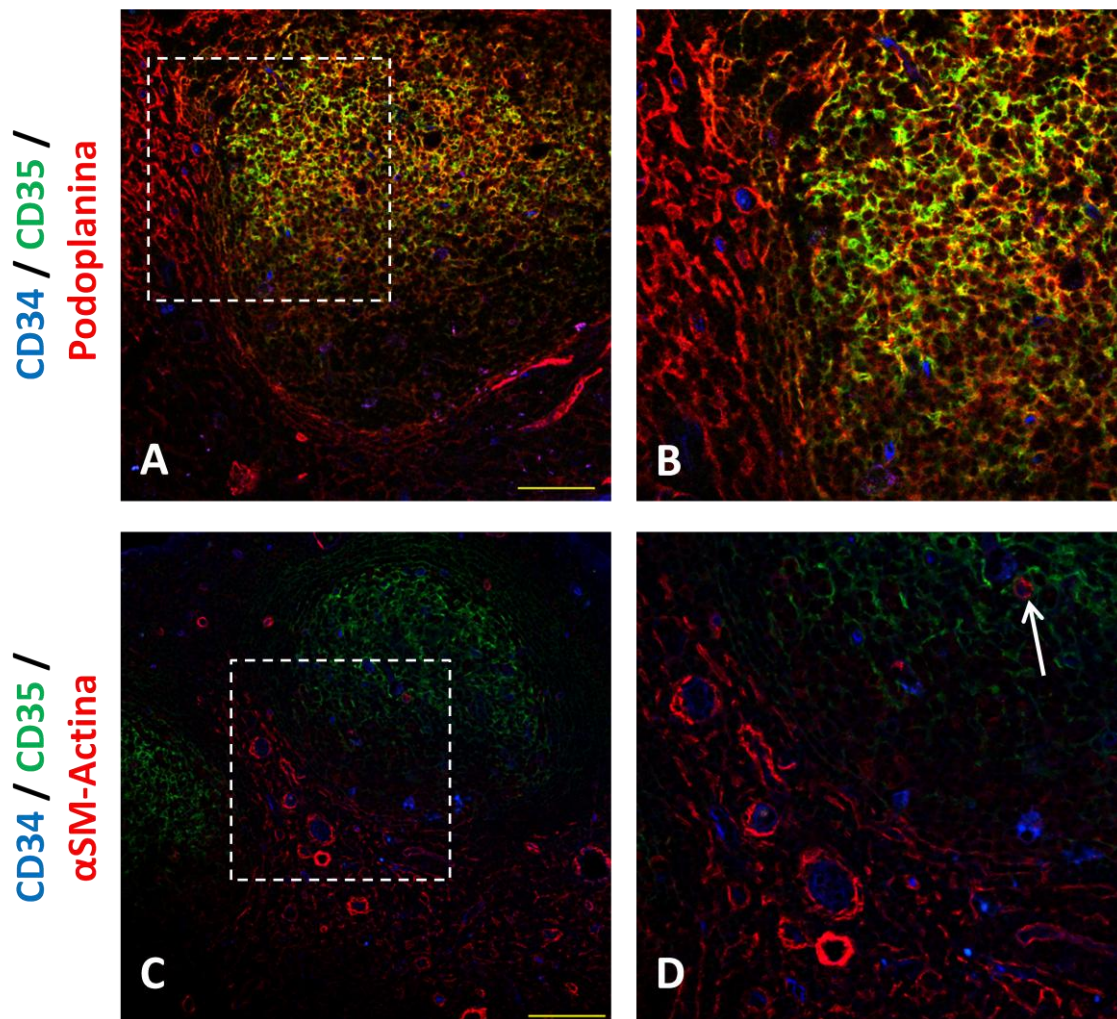


Figura 19. Expresión de Podoplanina y α SM-actina en criosecciones de amígdala. Mediante microscopía confocal, se muestran las distintas poblaciones estromales en base a la expresión de podoplanina (A y B, en rojo), α SM-actina (C y D, en rojo) y CD35 (en verde), y de células endoteliales a través de CD34 (en azul) (barra: 100 μ m). Las imágenes B y D son aumentos de los recuadros de las figuras A y C, respectivamente. La flecha muestra una célula perivascular α SM-actina⁺. El experimento fue repetido con tres amígdalas de distintos pacientes.

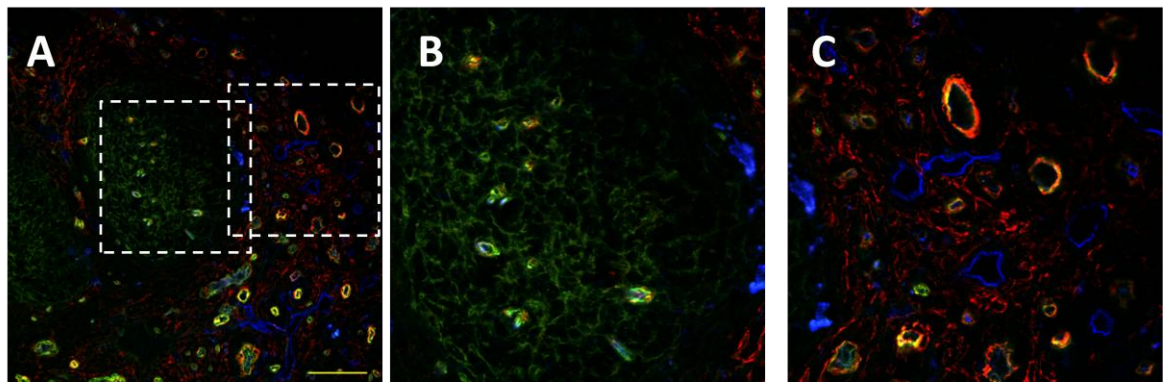
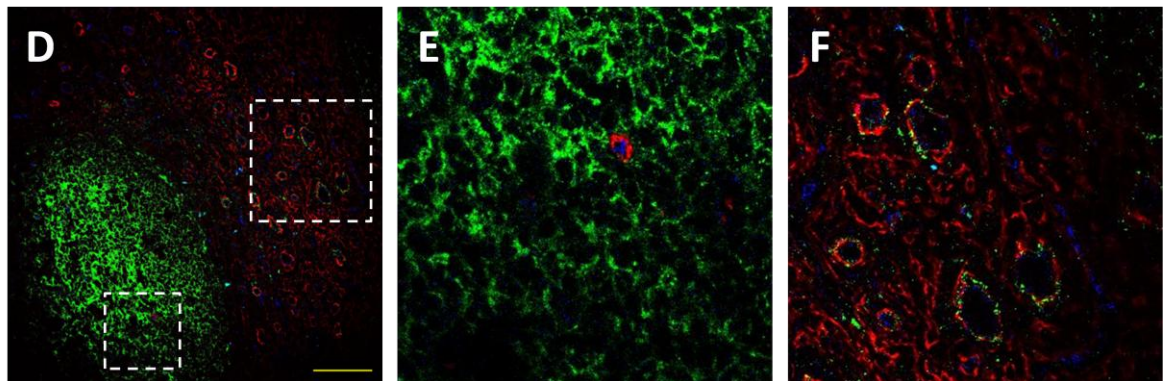
CD34 / CD146 / α SM-ActinaCD34 / MFG-E8 / α SM-Actina

Figura 20. CD146 y MFG-E8 son expresados por las FDC y por células perivasculares. Secciones de amígdala fueron teñidas con anticuerpos que reconocen CD146 (A-C, en verde), MFG-E8 (D-E en verde), α SM-actina (A-C, en rojo), podoplanina (D-E, en rojo) y CD34 (en azul). La imagen B y E son aumentos digitales de la zona folicular de la imagen A, mientras C y E son aumentos digitales de las zonas interfolliculares de A y D, respectivamente. El experimento fue repetido con tres amígdalas de distinto pacientes. Barra: 100 μ m.

1.8. Las TSC producen factores angiogénicos.

La regeneración y mantenimiento de los vasos sanguíneos depende de la proliferación de un precursor endotelial localizado en las paredes de los vasos sanguíneos (Zengin et al. 2006). Además, en experimentos recientes, se ha podido comprobar que MSC derivadas de medula ósea pueden ser diferenciadas, “in vitro”, en células endoteliales (Janeczek Portalska et al. 2012). Así pues, dado que

las TSC, en base a su fenotipo, podrían ocupar una posición perivascular y que, al igual que las MSC, presentan una gran plasticidad, se decidió estudiar si estas células podrían diferenciarse en células endoteliales. Para comprobar esta hipótesis, se utilizó el protocolo descrito por Zhang y colaboradores, cultivando las TSC en medio EGM-2 durante tres semanas y analizando, al cabo de este tiempo, la expresión de marcadores endoteliales. Mediante citometría de flujo, se muestra como el medio EGM-2 fue incapaz de inducir la diferenciación endotelial en las TSC, debido a que la expresión de los marcadores asociados al endotelio, CD31, CD34, CD62P o VEGFR-2 fue negativa (Fig. 21); tan solo se pudo apreciar un incremento en la proliferación de las TSC, posiblemente debido a la mayor proporción de FBS de este medio.

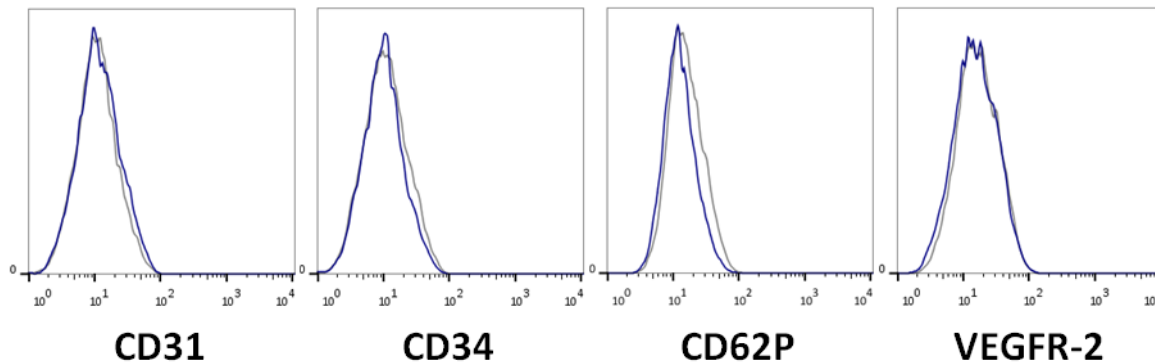


Figura 21. El medio EGM-2 no induce la expresión de marcadores endoteliales en las TSC. La capacidad de diferenciación endotelial de las TSC fue estudiada “in vitro”, por ello lo que estas células fueron mantenidas durante 3 semanas en un medio de diferenciación endotelial (EGM-2). Finalmente, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CD31, CD34, CD62P o VEGFR-2 en estas células. El experimento fue repetido seis veces con distintas líneas celulares. Control de isotipo (—); mAb (—).

A pesar de que las TSC parecen no mostrar capacidad de diferenciación endotelial, se decidió estudiar si estas células podrían expresar factores implicados en la angiogénesis, como ocurre con otras células estromales o con los pericitos (Gaengel et al. 2009, Zhang et al. 2009). Mediante PCR se comprobó que, efectivamente, las TSC expresan ARNm de factores implicados en la proliferación y diferenciación de las células endoteliales como la angiopoyetina-1 (AP-1), el factor

de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2, Fibroblastic Growth Factor 2), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, Hepatocytes Growth Factor), el factor de crecimiento placentario (PGF, Placental Growth Factor) o el VEGF (Fig. 22). La expresión de todos estos factores, además, apoya el origen perivascular de las TSC.

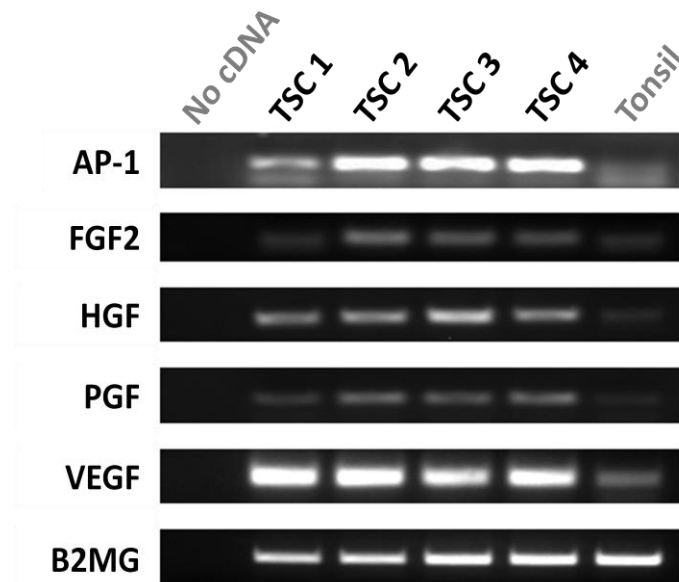


Figura 22. Expresión de factores angiogénicos por las TSC. Mediante PCR, se estudió la expresión de ARNm de AP-1, FGF2, HGF, PGF y VEGF. La β 2MG fue utilizada como control positivo.

1.9. Las TSC son capaces de retener linfocitos B y T en su superficie

La localización de las TSC y la producción de quimiocinas (Fig. 8 y 9) sugieren que estas células podrían jugar un papel importante en el reclutamiento de linfocitos que migran desde el torrente sanguíneo hacia los SLOs. Además, las células estromales de los SLOs, así como las células LTo, se caracterizan por una elevada expresión de moléculas de adhesión que permiten la retención de linfocitos sobre sus superficies. Por este motivo, se decidió estudiar si las líneas de TSC expresan moléculas de adhesión, comprobándose que parte de ellas expresan ICAM-1, NCAM-1 y VCAM-1 (Fig. 23), así como la β -integrina CD29 (Fig. 8).

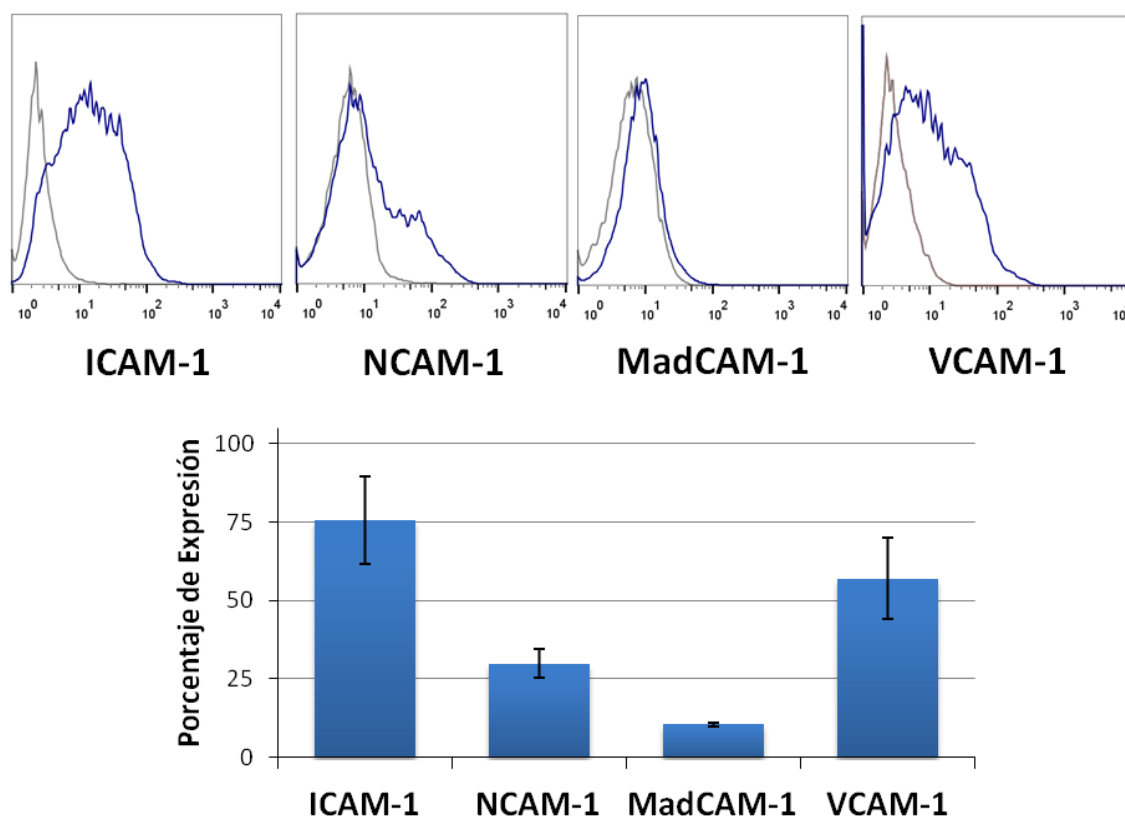


Figura 23. Expresión de moléculas de adhesión por las TSC. A) Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de ICAM-1, MadCAM-1, NCAM-1 y VCAM-1, mostrándose un histograma representativo de cada uno de los marcadores. Además, se representa el valor medio obtenido a partir del estudio de cinco líneas celulares distintas. La barra de error muestra la SD de la media. Control de isotipo (—); mAb (—).

Estudios “in vitro” han demostrado que las moléculas de adhesión, como ICAM-1 y VCAM-1, facilitan la activación y evitan la muerte por apoptosis de linfocitos al ser retenidos sobre células estromales (Allen C. D. and Cyster 2008), por lo que se analizó la capacidad de las TSC para adherir linfocitos en su superficie. Con este fin, sobre las TSC se añadieron leucocitos de amígdala y, al cabo de dos horas, las células no adheridas se descartaron y las que se unieron fueron recolectadas usando tripsina, siendo cuantificadas en base a la expresión de CD45. Este experimento permitió comprobar que las TSC son capaces de retener en su superficie leucocitos (Fig. 24 A y B), siendo la mayor parte de ellos linfocitos T y B (Fig. 24 C), aunque algún otro tipo celular debió unirse, pues en algunos experimentos la suma del porcentaje de linfocitos T y B fue inferior al 100%.

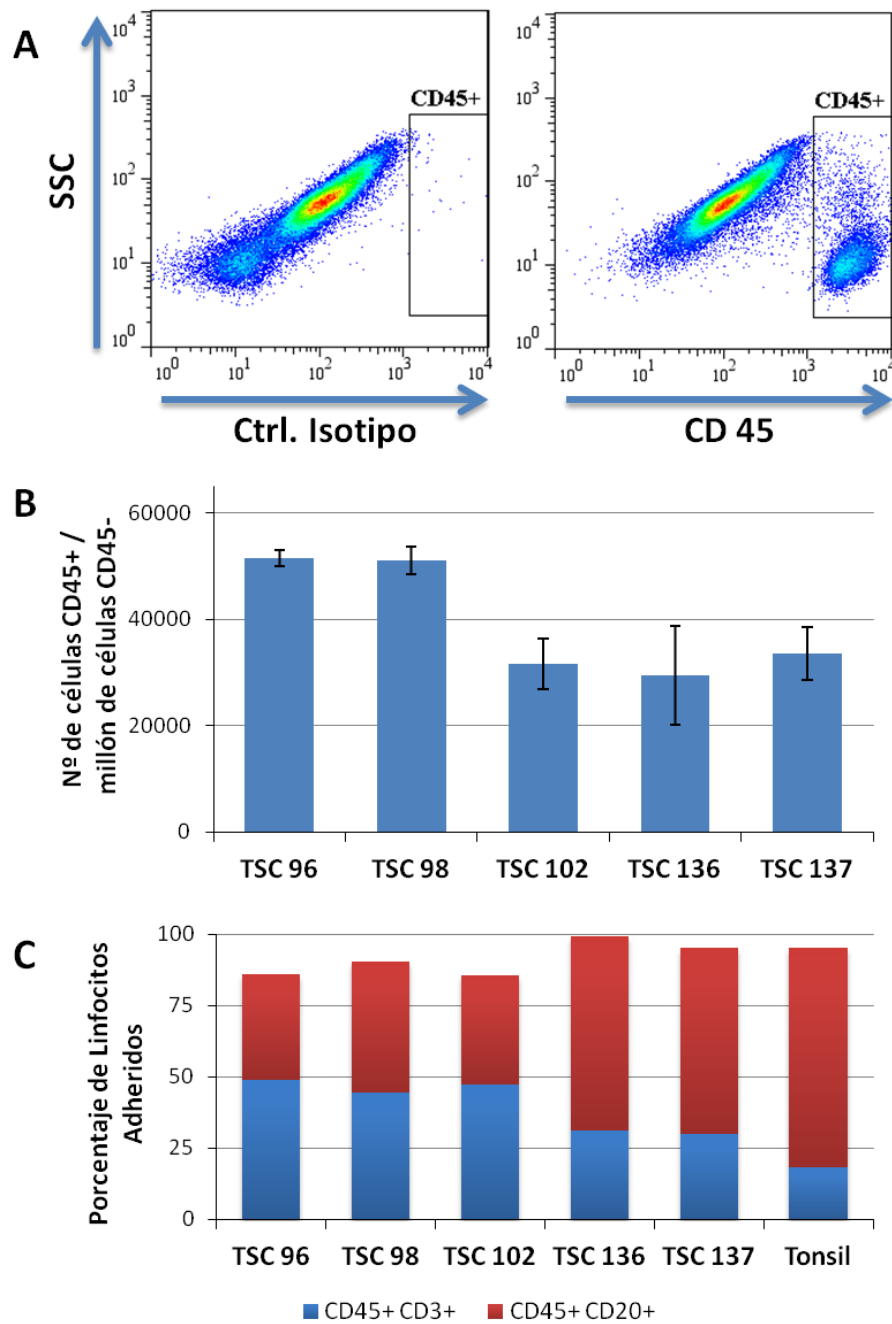


Figura 24. Retención de linfocitos sobre las TSC. Leucocitos de amígdala fueron incubados durante dos horas con TSC. Al cabo de este tiempo, las células sin unir fueron eliminadas y las células adheridas recolectadas usando tripsina y cuantificadas en base a CD45 mediante citometría de flujo (A). Se muestra el número de células CD45+ retenidas por millón de TSC, definidas como CD45-, en 5 líneas diferentes (B) y la proporción de células CD3+ y CD20+ dentro de la población CD45+ (C). La barra de error muestra la SD de la media.

1.10. Las TSC rescatan de la apoptosis a linfocitos B y T

Las células estromales de los SLOs son conocidas por controlar la supervivencia y proliferación de los linfocitos a través de distintos factores (Gorelik et al. 2003, Huang and Luther 2012, Park et al. 2004). En este sentido, se decidió evaluar si las TSC podrían influir también en la supervivencia de los linfocitos, comprobándose, mediante PCR, que estas células expresan el factor anti-apoptóticos BAFF, y las interleucinas IL-7 e IL-15 (Fig. 25).

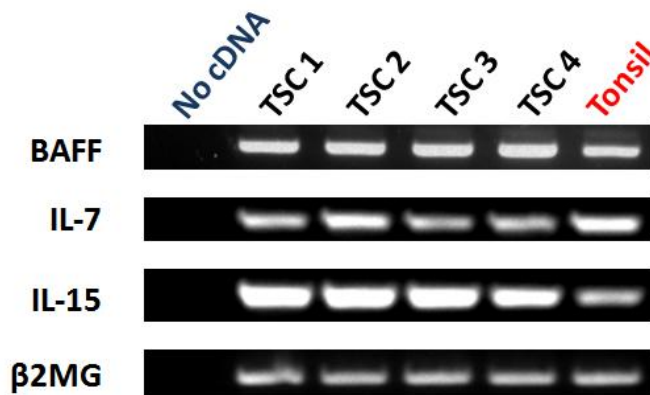


Figura 25. Las TSC expresan el ARNm de factores anti-apoptóticos. Mediante PCR, se analizó la expresión de BAFF, IL-7 e IL-15 en 4 líneas de TSC. La β2MG fue utilizada como control positivo.

Dada la elevada expresión de factores anti-apoptóticos, se procedió a estudiar si las TSC serían capaces de inhibir la apoptosis espontánea de linfocitos obtenidos de amígdalas. Para ello, linfocitos B y T de amígdala, de forma independiente, fueron cultivados durante 3 días en presencia de TSC, de sus sobrenadantes o de medio fresco. Transcurrido este tiempo, se analizó el porcentaje de células sub-G1, pudiéndose comprobar que las TSC reducen significativamente el número de linfocitos B y T apoptóticos (Fig. 26), especialmente cuando los linfocitos están en contacto con las células estromales (Fig. 26, p-valor<0.001), aunque su sobrenadante también mostró tener esta capacidad (Fig. 27, p-valor< 0.05).

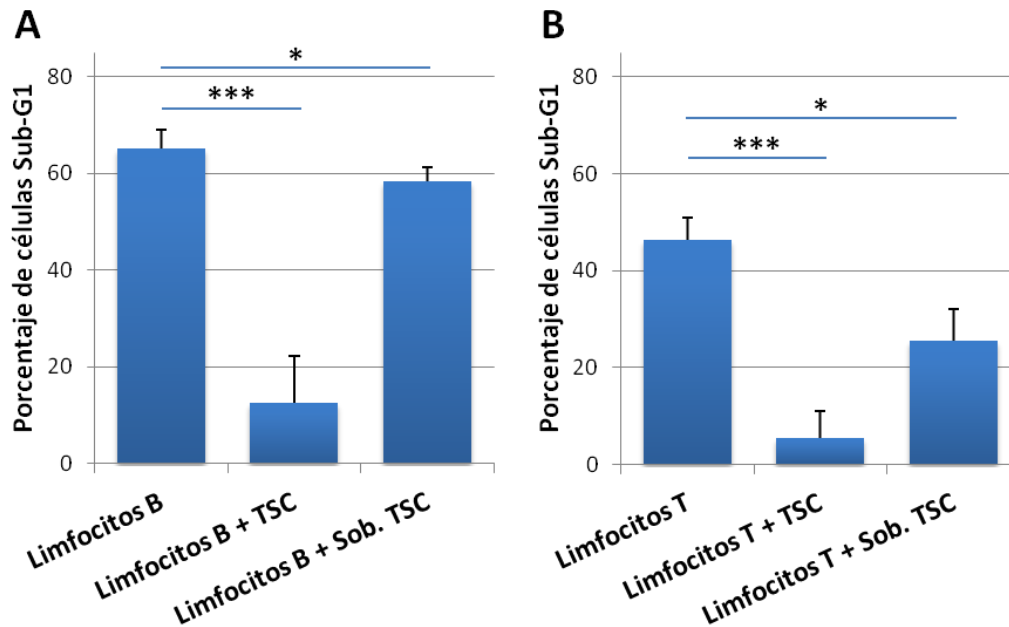


Figura 26. TSC protegen de la apoptosis espontanea a linfocitos B y T. Linfocitos B (A) y T (B) purificados a partir de preparaciones de amígdala, fueron incubados solos, con TSC o con sobrenadante de éstas durante tres días. El porcentaje de linfocitos apoptóticos fue determinado, mediante citometría de flujo, analizando la fase Sub-G1 del ciclo celular. Los gráficos muestran la media de los resultados obtenidos a partir de cinco experimentos independientes. La barra de error muestra la SD de la media *p<0,05, ***p<0,001.

2. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS ESTROMALES DE AMÍGDALA

2.1. Papel de la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF en la diferenciación de las TSC

El origen de las células estromales de los SLOs adultos en ratón, como ya se ha expuesto anteriormente, se encuentra en precursores perivasculares (Krautler et al. 2012), los cuales, durante procesos inflamatorios, proliferarían y se diferenciarían en FDC, FRC o MRC, permitiendo la expansión del estroma. Si esta hipótesis es correcta, las TSC, como posibles precursores estromales, deberían de ser capaces de diferenciarse “in vitro” en las distintas poblaciones. Sin embargo, actualmente, la comprobación de esta hipótesis es difícil, pues se desconocen la mayoría de factores implicados en estos procesos. A pesar de ello, se sabe que la

LT $_{\alpha1\beta2}$ y el TNF tienen un papel central en los procesos de diferenciación y mantenimiento del estroma de los SLOs. En base a todo esto, se procedió a estudiar el efecto de la LT $_{\alpha1\beta2}$ y el TNF sobre las TSC.

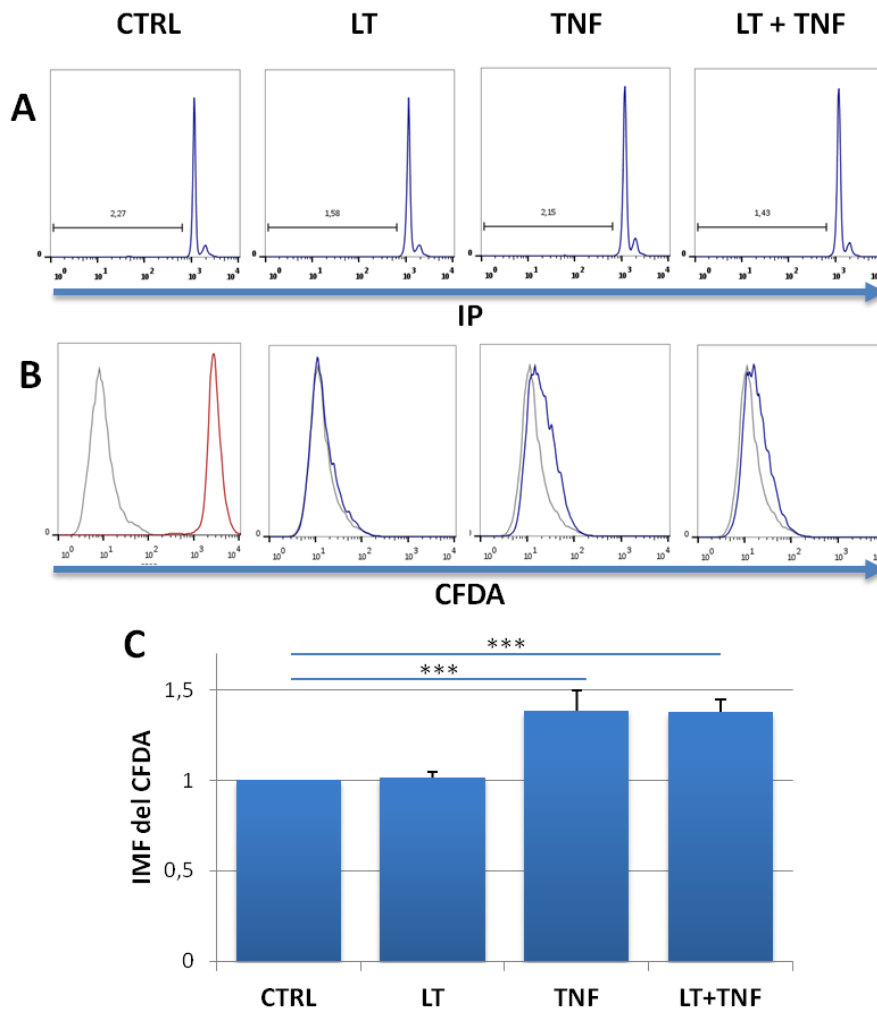


Figura 27. La LT $_{\alpha1\beta2}$ y el TNF no afectan a la supervivencia de las TSC, pero el TNF disminuye la proliferación. A) Ciclo celular obtenido mediante citometría de flujo de las TSC mantenidas en cultivo durante 3 días con medio control, LT, TNF, o con LT y TNF. El experimento fue repetido tres veces. B) Determinación, mediante citometría de flujo, de la fluorescencia de TSC marcadas con CFDA-SE tras la tinción (línea roja) y al cabo de tres días, tanto en las células control (línea gris) como en las tratadas con citocinas (línea azul). C) Representación del valor medio del incremento de la mediana de fluorescencia (IMF), al cabo de tres días, de células teñidas con CFDA-SE y tratadas con citocinas, respecto a las células control. La barra de error muestra la SD de la media. El experimento fue repetido cinco veces. ***p<0,001.

En primer lugar, se estudió si estas citocinas podrían tener algún efecto tóxico o inductor de apoptosis, para lo que se analizó el ciclo celular de TSC mantenidas con medio o tratadas con LT, TNF o la combinación de ambas, observándose que dichos tratamientos no afectan a su supervivencia, siendo el porcentaje de células sub-G1 prácticamente nulo (Fig. 27 A). Además, se estudió si podrían afectar a la tasa de proliferación de las TSC, para lo que estas células fueron teñidas con la sonda fluorescente CFDA-SE y se cultivaron durante 3 días en presencia o ausencia de las citocinas. Finalmente, se analizó la pérdida de fluorescencia y se pudo comprobar que si bien la $LT_{\alpha1\beta2}$ no afecta a la proliferación de las TSC (Fig. 27 B y C), el TNF disminuye significativamente la proliferación de estas células (Fig. 27 C, p-valor<0.001).

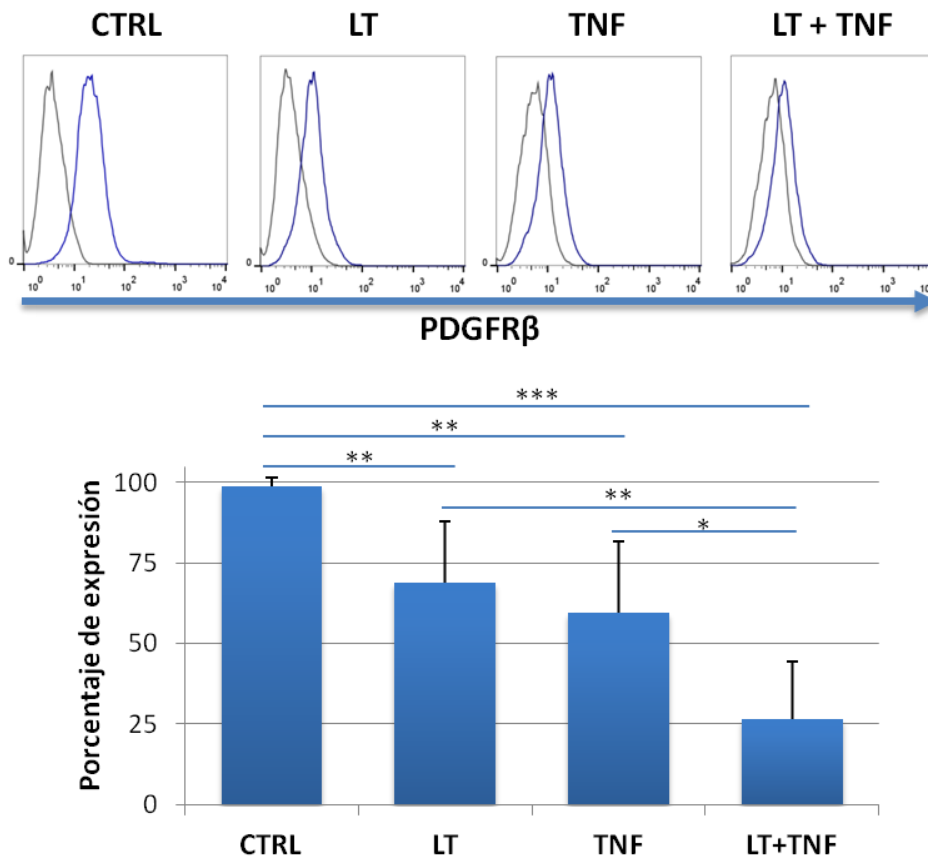


Figura 28. La $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF disminuyen la expresión de PDGFR β en las TSC. Análisis, mediante citometría de flujo, de la expresión de PDGFR β en células control y mantenidas 72 horas con LT, TNF o LT y TNF. En el gráfico se representa el valor medio de expresión obtenido a partir de cinco experimentos. La barra de error muestra la SD de la media. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

A continuación, se procedió a estudiar los cambios fenotípicos producidos por la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF sobre las TSC. Así, se pudo observar una disminución, estadísticamente significativa, en la proporción de células positivas para el marcador de pericitos $PDGFR\beta$ (p -valor <0.01 , Fig. 28), apareciendo un efecto sinérgico entre ambas citocinas.

Mediante PCR cuantitativa, se estudio el efecto de la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF sobre la expresión de los marcadores CD35, CXCL13, TRANCE, CCL19 y CCL21, de los cuales, tan solo variaron su expresión TRANCE y CCL19 (Fig. 29). En el caso de CCL19, se vio un efecto sinérgico entre la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF, siendo el TNF el principal responsable del aumento de expresión (Fig. 29).

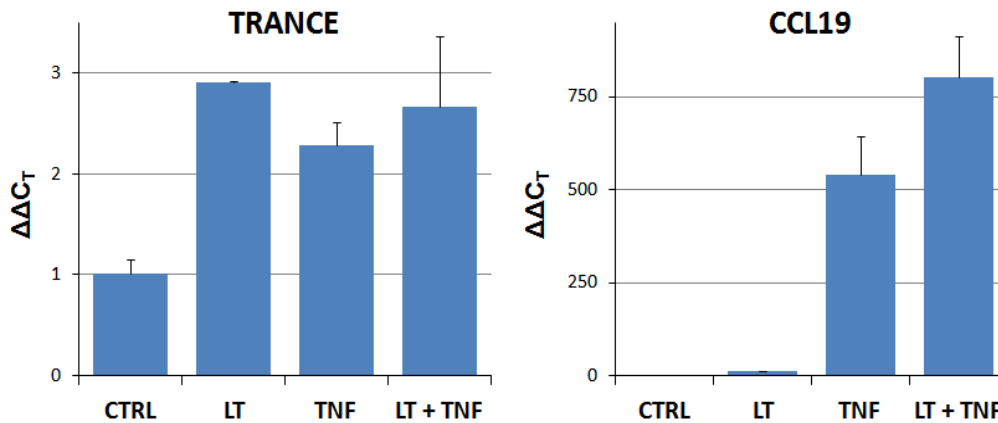


Figura 29. La $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF aumentan la expresión de TRANCE y CCL19. Mediante PCR a tiempo real se cuantifico la expresión de TRANCE y CCL19 en TSC controles y tratadas con LT, TNF o ambas durante 72 horas. El factor de normalización fue obtenido a partir de la media geométrica de la expresión de GADPH y HAMPSY y todos los resultados fueron relativizados en base al control. La barra de error muestra la SD de la media de un experimento. Se muestran los resultados de un experimento de los tres realizados.

Finalmente, también se pudo observar un aumento, significativamente estadístico, en la expresión de ICAM-1, MadCAM-1 y VCAM-1 al ser tratadas las TSC tanto con $LT_{\alpha 1\beta 2}$ como con TNF (Fig. 30), aunque no se detecto ningún efecto sinérgico. El aumento en la expresión de moléculas de adhesión, además, vino acompañado de una mayor capacidad de la retención de linfocitos sobre la superficie de las TSC (Fig. 31).

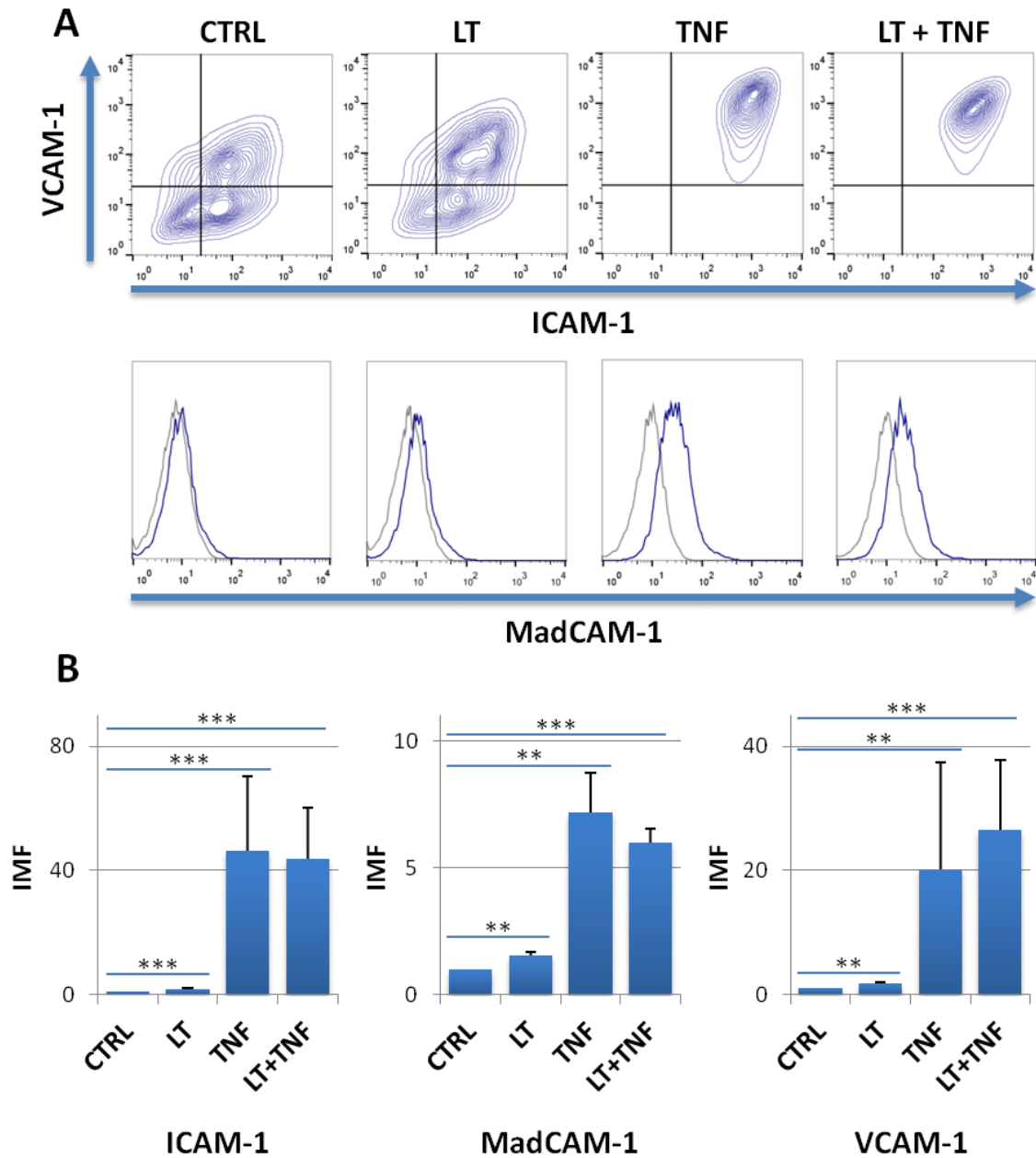


Figura 30. La $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF aumentan la expresión de moléculas de adhesión. A) Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión ICAM-1, MadCAM-1 y VCAM-1 en células control y células mantenidas 72 horas con LT, TNF o LT y TNF. B) En los gráficos se representa el valor medio del incremento de la mediana de fluorescencia (IMF) de los distintos tratamientos respecto a las células control. El experimento fue repetido cinco veces de forma independiente. La barra de error muestra la SD de la media. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

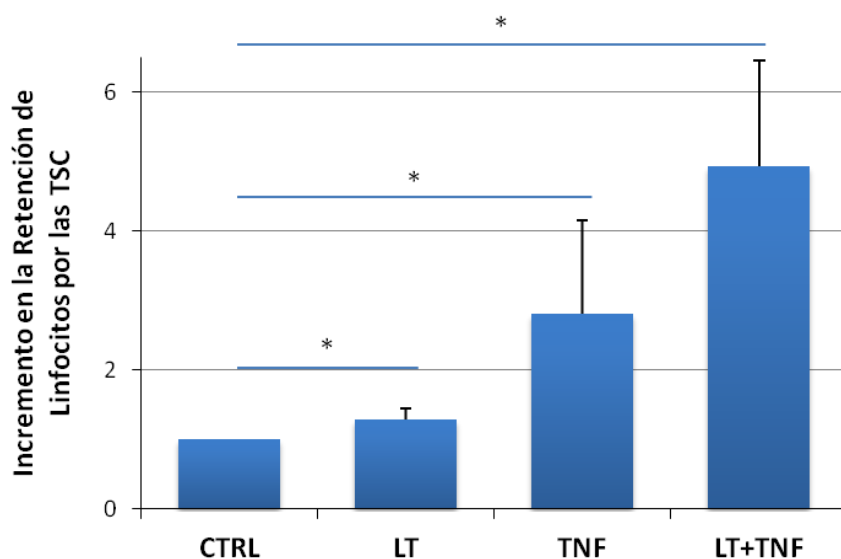


Figura 31. La $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF aumentan la adhesión de linfocitos a las TSC. Leucocitos de amígdala fueron incubados durante dos horas con TSC controles o pre-tratadas durante 72 horas con LT, TNF o ambas. Transcurrida la incubación, las células sin unir fueron eliminadas y las células adheridas se recolectaron usando tripsina y se cuantificó el número de células CD45+ retenidas por millón de células CD45- en cinco líneas diferentes. En el gráfico se representa el valor medio del incremento de la retención de linfocitos por las TSC en cada tratamiento. La barra de error muestra la SD de la media. La barra de error muestra la SD de la media. * $p < 0,05$.

2.2. Papel del Ácido Retinoico, el Anti-CD40, la IL-17 y la IL-21 en la diferenciación de las TSC.

Como se muestra en el apartado anterior la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ y el TNF potencian la expresión de marcadores asociados con las células LTo y un descenso en el marcador de pericitos PDGFR β ; sin embargo, no se detecta una polarización del fenotipo hacia alguna de las tres poblaciones estromales. En consecuencia, se decidió estudiar si otras moléculas podrían determinar la diferenciación de las TSC hacia FDC. Así, se seleccionaron moléculas implicadas en su desarrollo como el ácido retinoico (Suzuki et al. 2010), o factores como el CD40L, la IL17 y la IL21 producidos por las células Th foliculares (Ma et al. 2012, Sukumar et al. 2006b).

En primer lugar, se estudió la expresión de los receptores de estos factores, comprobándose, mediante PCR, que las TSC expresan el ARNm del IL17R, del IL21R

y del receptor de ácido retinoico β (RAR β) (Fig. 32). Además, mediante citometría de flujo se comprobó que estas células también expresan el receptor del CD40L (dato no mostrado).

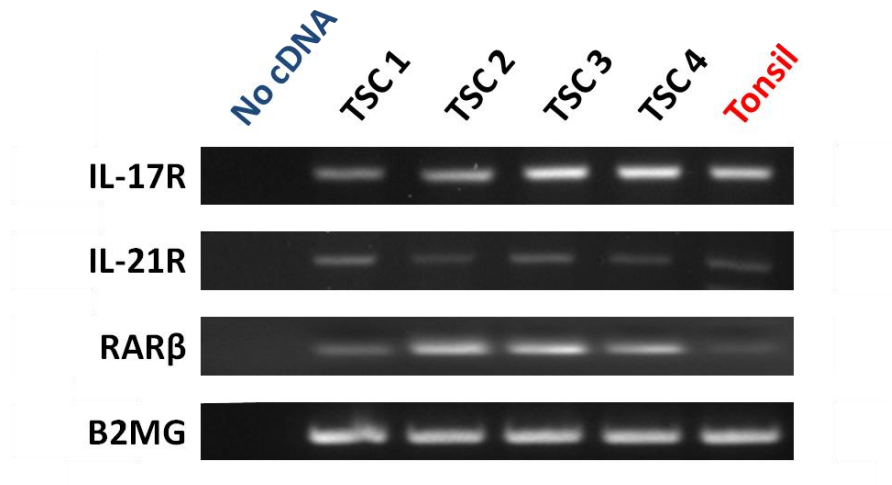


Figura 32. TSC expresan IL-17R, IL-21R y RAR β . Mediante PCR, se analizó la expresión de receptores de factores asociados con la diferenciación de las FDC en 4 líneas de TSC. La β 2MG fue utilizada como control positivo.

A continuación, dada la expresión de los receptores de IL-17, IL-21 y RA se procedió a tratar las células con estos factores, IL-17, IL-21, RA y anti-CD40, anticuerpo estimulante que reproduce el efecto del CD40L; sin embargo, tras 72 horas, ninguno de estos factores consiguió inducir los marcadores de FDC, CD21 ó CD35 (Fig.33). Finalmente, se decidió combinar los factores anteriores con LT $_{\alpha 1\beta 2}$ y TNF, por ser estos últimos imprescindibles en el desarrollo de las FDC, pero esta última combinación tampoco consiguió inducir los marcadores característicos (Fig. 34).

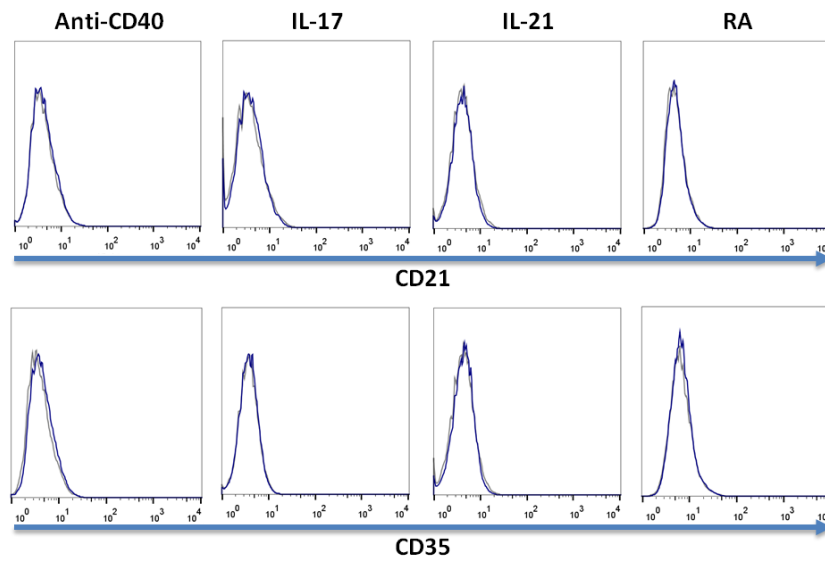


Figura 33. IL-17, IL-21, RA o Anti-CD40 no inducen la expresión de CD21 ni CD35. Las TSC fueron tratadas durante 72 horas con factores implicados en la diferenciación de las FDC y, al cabo de este tiempo, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CD21 y CD35. El experimento se realizó tres veces con distintas líneas celulares. Control de isotipo (—); mAb (—).

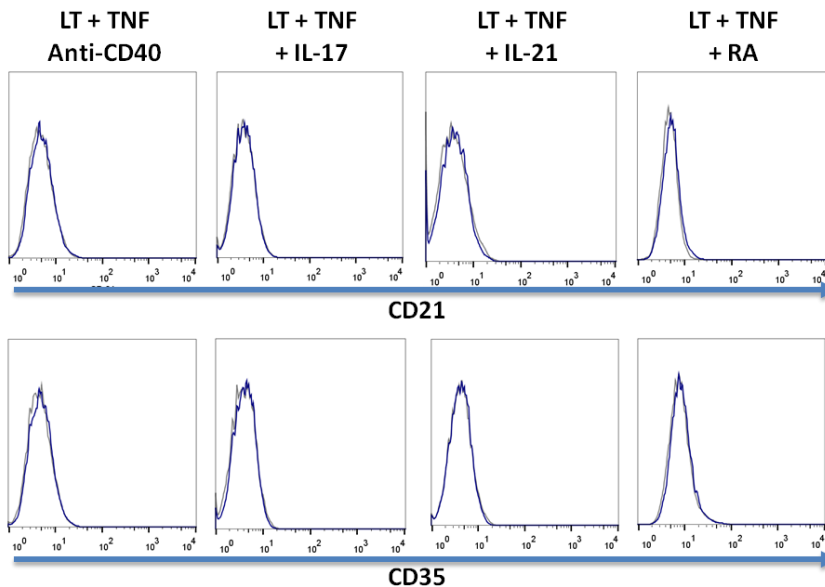


Figura 34. La combinación de IL-17, IL-21, RA o Anti-CD40 con $LT_{\alpha1\beta2}$ y TNF no induce expresión de CD21 ni CD35. Las TSC fueron tratadas durante 72 horas con factores implicados en la diferenciación de las FDC, junto con $LT_{\alpha1\beta2}$ y TNF y, al cabo de este tiempo, se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CD21 y CD35. El experimento fue repetido tres veces con distintas líneas celulares. Control de isotipo (—); mAb (—).

2.3. Efecto de la $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF sobre los Fibroblastos de Prepucio

La aparición de FDC y FRC en los TLOs parece ocurrir a partir de la diferenciación de células estromales perivasculares residentes en el propio tejido (Krautler et al. 2012). Este proceso depende de citocinas involucradas en el desarrollo de los SLOs, como son la $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF (van de Pavert and Mebius 2010). Por este motivo, se estudio si los fibroblastos de prepucio podrían adquirir un fenotipo tipo LTo al ser tratadas con dichas citocinas. Así, se comprobó mediante PCR que la $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF son capaces de producir un aumento en la expresión TRANCE, al igual que ocurre en el caso de las TSC, y determinaron la expresión de CCL19. Sin embargo, a pesar de que la similitud con las células LTo aumentó, los FF no expresaron CXCL13 (Fig. 35).

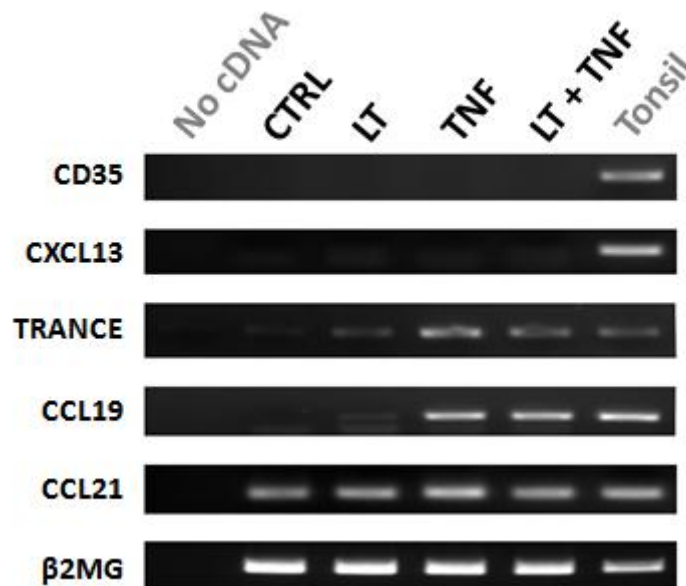


Figura 35. La $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF aumentan la expresión de TRANCE y CCL19 en Fibroblastos de Prepucio. Mediante PCR se analizó la expresión CD35, CXCL13 TRANCE, CCL19 y CCL21 en FF controles y tratados con LT, TNF o ambas durante 72 horas. Se muestran los resultados de un experimento de los tres realizados.

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HLA-G POR LAS CÉLULAS ESTROMALES DE AMÍGDALA

El HLA-G es un miembro del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, mayor histocompatibility complex) de clase I no clásica que se expresa en el trofoblasto (Kovats et al. 1990) y en distintos tipos de células estromales de tejidos adultos, como las MSC (Nasef et al. 2007) o las células deciduales estromales (Blanco et al. 2008). Al contrario que las moléculas de MHC de clase I clásicas, el HLA-G posee una potente actividad inmunosupresora, a través de la inhibición directa de células T, de la inducción células T reguladoras y de la modificación de la maduración de las APCs (Gonzalez et al. 2012). Otra importante diferencia con el resto de moléculas MHC-I es la existencia de 7 isoformas originadas mediante maduración alternativa del ARNm, así el transcrito primario es capaz de dar lugar a 4 isoformas de membrana (HLA-G1, G2, G3 y G4) y 3 solubles (HLA-G5, G6 y G7) (Carosella et al. 2008). Además, estas isoformas son capaces de formar puentes disulfuro entre ellas gracias a la existencia de dos residuos de cisteína, lo que origina dímeros y trímeros de HLA-G con una mayor actividad que los monómeros (Apps et al. 2007).

En este trabajo, se muestra como las TSC también son capaces de expresar HLA-G, aunque existe una gran variabilidad entre líneas celulares de distinto paciente, siendo algunas positivas y otras negativas. Mediante PCR, se comprobó que las TSC expresan ARNm de las isoformas HLA-G1 y HLA-G5 (Fig. 36 A) y por citometría de flujo se pudo detectar tanto en membrana como en el citosol, aunque la cantidad de HLA-G en el segundo compartimento siempre fue considerablemente mayor (Fig. 36 B). Finalmente, mediante western blot, se muestra como las TSC, al igual que las DSC y las células JEG-3, expresan dímeros de HLA-G de aproximadamente 80 KDa (Fig. 36 C). Estos dímeros, a pesar de haber utilizado potentes agentes reductores como el DTT, no pudieron ser reducidos en ningún momento.

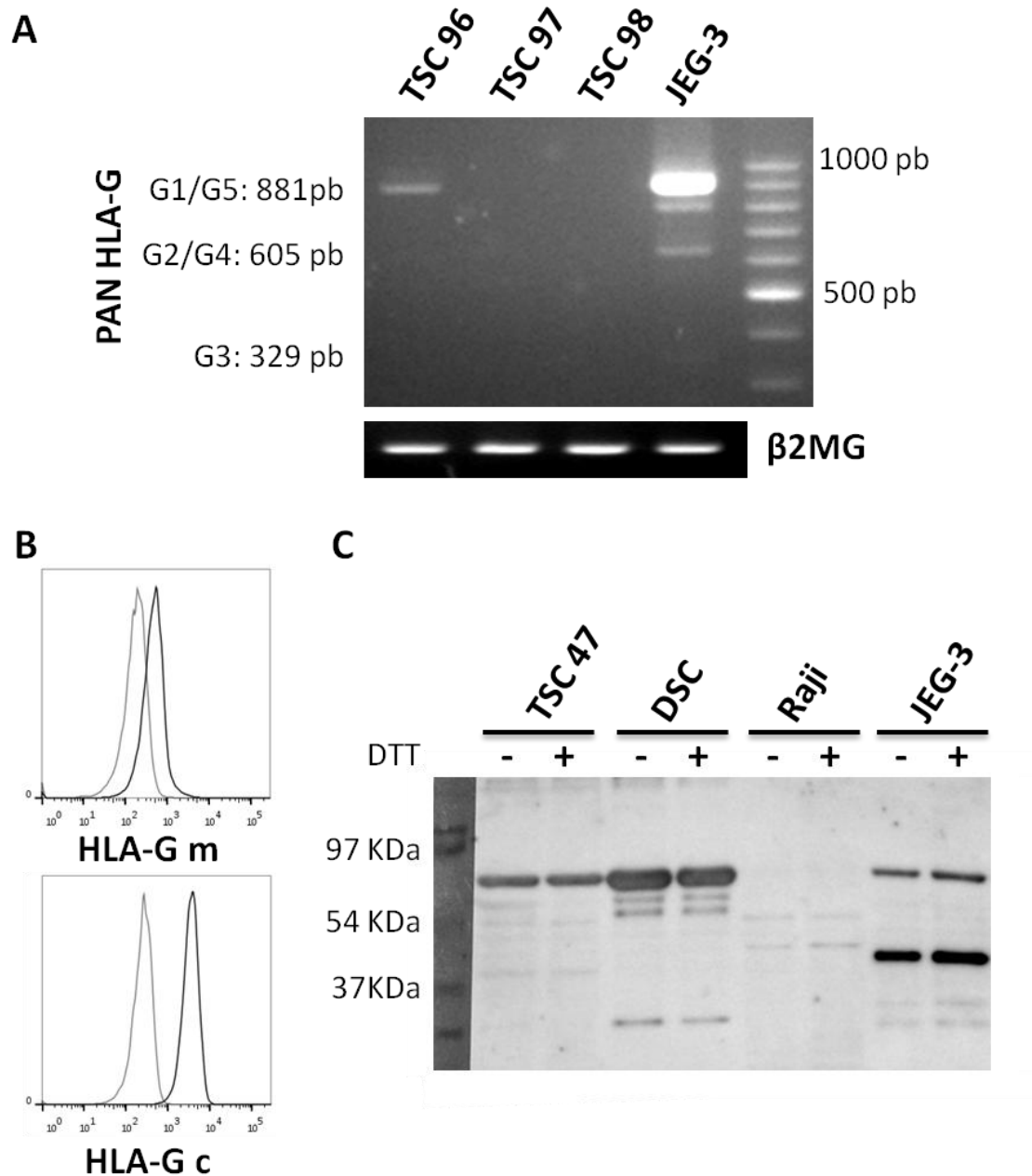


Figura 36. Las TSC expresan dímeros de HLA-G. A) Mediante PCR se analizó la expresión de las distintas isoformas de HLA-G, observándose que algunas líneas expresan la isoforma larga. B) Mediante citometría de flujo, se detectó expresión de proteína tanto en membrana (HLA-G m) como en el citoplasmas (HLA-G c) y (C) por western blot se observaron dímeros que no pudieron ser reducidos. Como controles de expresión se utilizaron las líneas Raji (control negativo), JEG-3 y DSC (controles positivos).

4. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES Y FENOTÍPICAS COMPARTIDAS POR LAS CÉLSULAS DENDRÍTICAS FOLICULARES Y LAS CÉLULAS ESTROMALES DECIDUALES

En estudios previos sobre la caracterización de las Células Estromales Deciduales, nuestro grupo de investigación mostró que estas células expresan antígenos característicos de las Células Dendríticas Foliculares (Montes et al. 1996) y, posteriormente, comprobó que ambos tipos celulares están estrechamente relacionados con las células madre mesenquimales (García-Pacheco et al. 2001, Muñoz-Fernández et al. 2006, Oliver et al. 1999). En esta tesis, se profundiza en la relación existente entre las FDC y las DSC, mediante el estudio de características distintivas de ambos tipos celulares, comparándolas, además, con las MSC.

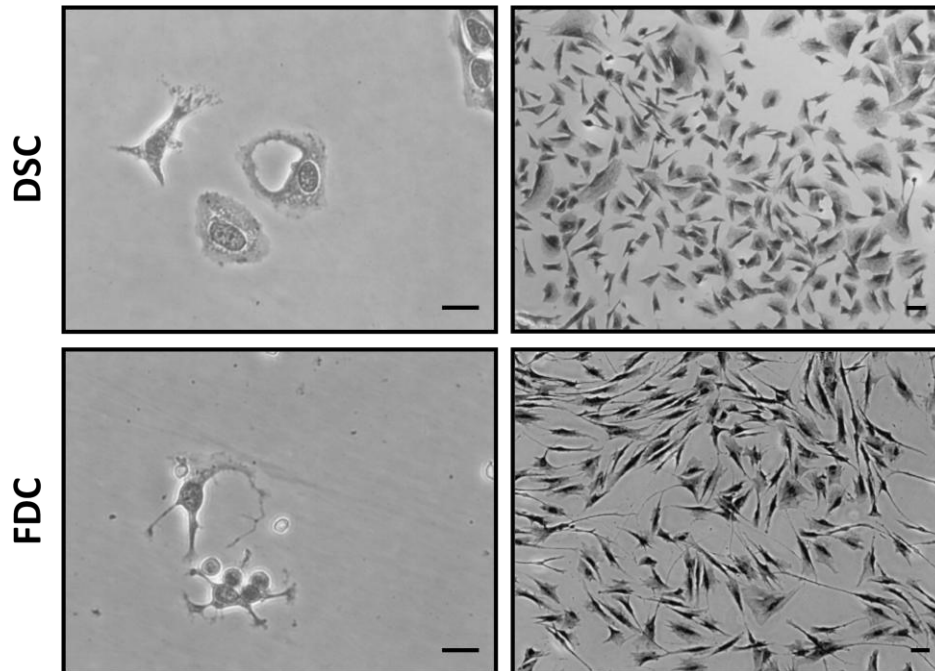


Figura 37. Morfología de las DSC y FDC en cultivo. Las DSC y FDC fueron observadas 24 horas después del aislamiento (izquierda) y tras dos semanas de cultivo células. Las FDC muestran una morfología dendrítica con células linfoides adheridas. Después de dos semanas de cultivo, las células no adherentes murieron en ambas preparaciones, y las DSC y las FDC mostraron una morfología fibroblástica uniforme (derecha). Barra: 100µm.

4.1. Las DSC muestran características distintivas de FDC

Para este estudio, se obtuvieron líneas celulares de DSC, FDC y MSC, manteniendo dichas células en medio de cultivo OPTI-MEM al 3% de FBS. Tras 24 horas de cultivo, en las preparaciones de decidua, aparecieron células adherentes poligonales y redondeadas, mientras en las de amígdala aparecieron células con morfología dendrítica, asociadas a células linfoides (Fig. 37 Izquierda). Después de una semana de cultivo, las células linfoides fueron eliminadas con los sucesivos cambios de medio, apareciendo una población uniforme de células adherentes con morfología fibroblástica (Fig. 37 Derecha).

En ambos tipos de líneas celulares, la gran mayoría de células fueron positivas para CD10, CD29 y CD73, y carecieron de CD45; una proporción de estas, también expresó CD14, CD21, CD23, ICAM-1 y BAFF, y secretaron CXCL-13 (Fig. 38 y 39).

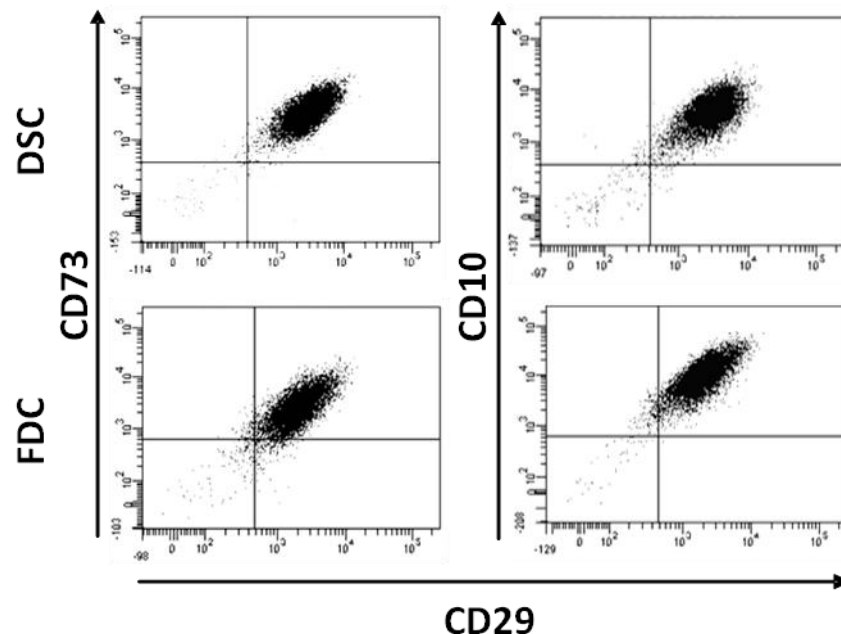


Figura 38. DSC y FDC expresan marcadores asociados a MSC. Mediante citometría de flujo, se muestra como la mayoría de las DSC y FDC son positivas para CD10, CD29 y CD73. Este experimento fue realizado tres veces.

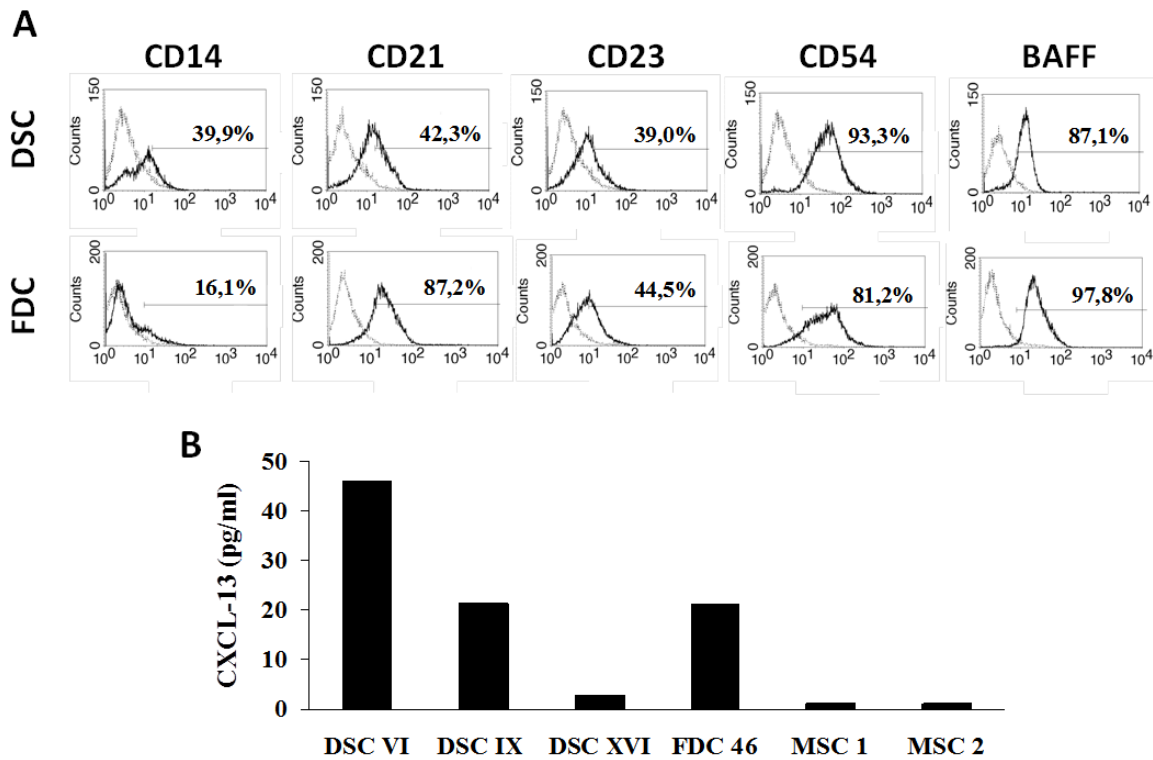


Figura 39. Expresión antigénica y secreción de CXCL13 por DSC y FDC. A) Mediante citometría de flujo, se muestra como parte de las DSC y FDC expresan CD14, CD21, CD23, CD54 y BAFF (intracelular). Control de isotipo (- - -); mAb (—). Los porcentajes muestran la proporción de células que expresan el antígeno. Este experimento fue realizado tres veces. B) Secreción de CXCL13 por diferentes líneas de DSC, FDC y MSC.

Para comprobar que las DSC expresan BAFF CXCL13 “in vivo”, se analizaron, mediante citometría de flujo, células deciduales de baja densidad obtenidas mediante un gradiente Percol y seleccionadas por la expresión de CD10. De este modo se demuestra la presencia células estromales deciduales capaces de expresar BAFF y CXCL13 (Fig. 40).

Finalmente, de forma comparativa, en la tabla 1 se muestra como las DSC, FDC y MSC expresan los antígenos asociados a células mesenquimales CD10, CD29, CD54, CD73, CD106 y carecen de CD45. Sin embargo, al contrario que las líneas de DSC y FDC, las de MSC no expresan CD14, CD21, CD23, BAFF o CXCL13.

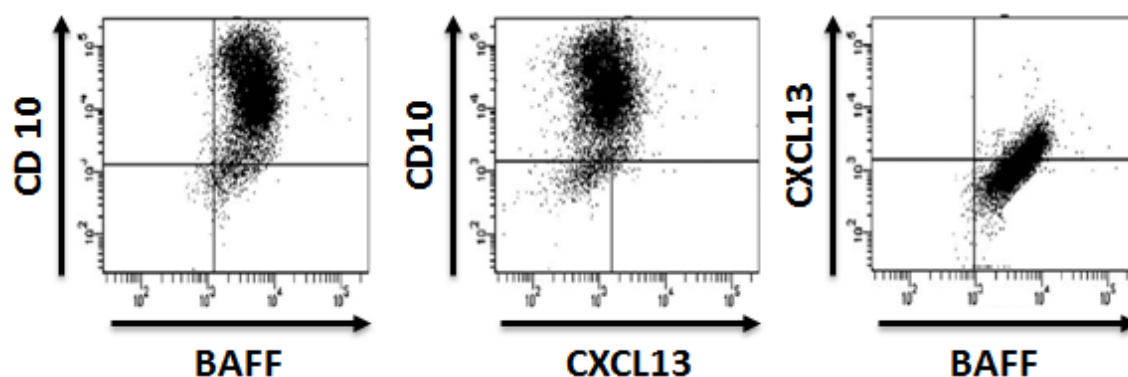


Figura 40. Expresión de BAFF y CXCL13 en DSC frescas. Las DSC frescas fueron aisladas mediante gradiente de percoll y seleccionadas en base a la expresión de CD10 durante el análisis. La mayoría de las DSC frescas CD10+ fueron positivas para BAFF, y una proporción de ellas también para CXCL13. Este experimento fue realizado tres veces de forma independiente.

Antígenos	DSC (n = 10)	FDC (n = 10)	MSC (n = 5)
CD10	+++	+++	+++
CD14	+/-	+	-
CD21	++	+++	-
CD23	++	++	-
CD29	+++	+++	+++
CD45	-	-	-
CD54	+++	+++	+
CD73	+++	+++	+++
CD106	+/-	+/-	+/-
BAFF	+++	+++	-
CXCL13	+++	+++	-

Tabla 1. Expresión antigénica de líneas de DSC, FDC y MSC. +++, 67-100% de células positivas; ++, 34-66 % de células positivas; +/-, algunas líneas positivas y otras negativas.

4.2. Tratamiento de DSC, FDC y MSC con TNF y $LT_{\alpha 1\beta 2}$

Previamente, ha sido demostrado que el TNF y la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ producen un incremento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en las FDC (Munoz-Fernandez et al. 2006). Como las FDC, las líneas de DSC y MSC tratadas con TNF y $LT_{\alpha 1\beta 2}$ también incrementan la expresión de estas moléculas de adhesión. CD54 y CD106 (Fig. 41).

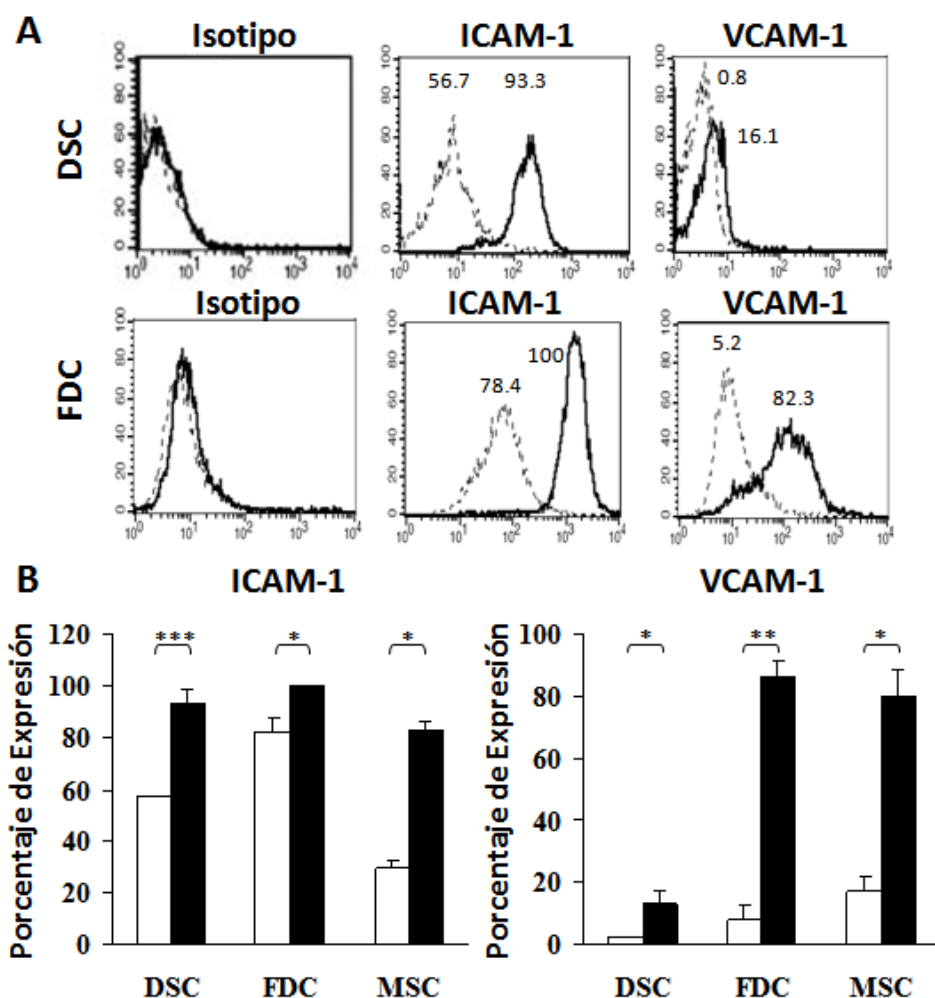


Figura 41. Tratamiento de líneas de DSC, FDC y MSC con TNF y $LT_{\alpha 1\beta 2}$. El TNF y la $LT_{\alpha 1\beta 2}$ incrementaron la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en líneas de DSC, FDC y MSC. A) Los porcentajes muestran la proporción de células que expresan el antígeno. Sin citocinas (- - -); con citocinas (—). B) Los gráficos representan el valor medio de expresión obtenido a partir del análisis de tres líneas. La barra de error muestra la SD de la media. Barras blancas: células sin tratar; barras negras: células tratadas con citocinas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.Efecto de DSC, FDC y MSC en la apoptosis de linfocitos B

En los centros germinales de los folículos linfoides secundarios, la función principal de las FDC es rescatar a los linfocitos B de la apoptosis, mediante señales dependientes de contacto celular (Lindhout et al. 1997). Como las FDC, las DSC (pero no las MSC) inhibieron la apoptosis espontanea de linfocitos B de amígdala (Fig. 42 A y B). Sin embargo, cuando las FDC y las DSC fueron co-cultivadas con linfocitos B en cámaras “Transwell”, los efectos antiapoptóticos sobre las células B desaparecieron (Fig. 42 C), demostrando que este efecto requiere del contacto entre las FDC o DSC y las células B (Fig. 42 C).

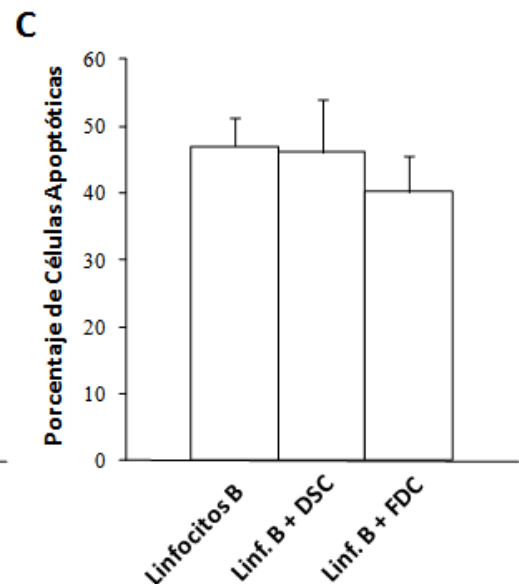
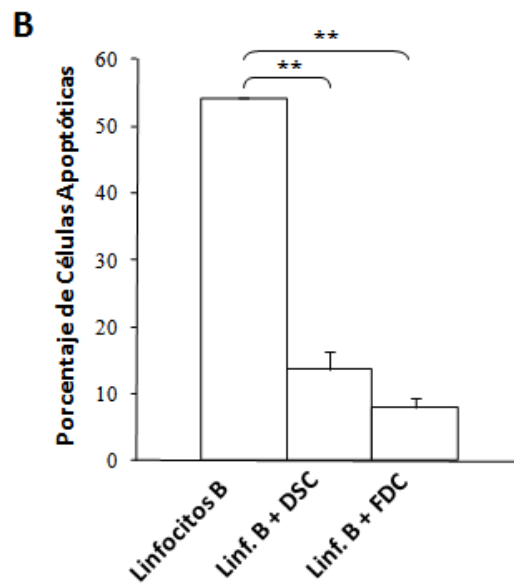
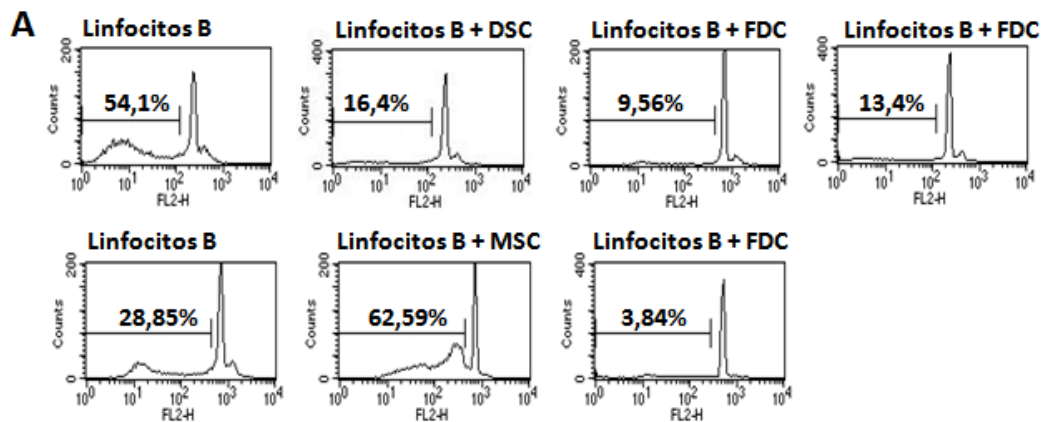


Figura 42. Las líneas de DSC y FDC, pero no las MSC, rescatan a los linfocitos B de la apoptosis espontánea. A) Mediante análisis de células sub-G1 por citometría de flujo, se determinó el porcentaje de linfocitos B de amígdala apoptóticos. Los linfocitos B fueron cultivados solos o con DSC, FDC o MSC. B) Las DSC y FDC significativamente disminuyeron la apoptosis espontánea de células B. C) El efecto protector de las DSC y FDC sobre la apoptosis de los linfocitos B desapareció en cultivos en cámaras "Transwell". Este experimento fue repetido tres veces de forma independiente. Las barras de error muestra la SD de la media. ** $p < 0,01$.

4.4. Decidualización de DSC y FDC con progesterona y cAMP

Durante el embarazo, la progesterona y otras hormonas inducen la decidualización de las DSC, lo que determina que estas células cambien su morfología, pasando a tener una forma redondeada, y secreten prolactina (Montes et al. 1995, Ruiz et al. 1997). Como en las DSC, la progesterona y el cAMP inducen un cambio en la morfología de las FDC y en la secreción de prolactina (PRL) (Fig. 43). Sin embargo, la concentración de PRL secretada por las FDC fue mucho más baja que la secretada por las DSC ($P < 0.0001$; Fig. 43 B). Por su parte, las líneas de MSC cultivadas con progesterona y cAMP no secretaron PRL (Fig. 43 B).

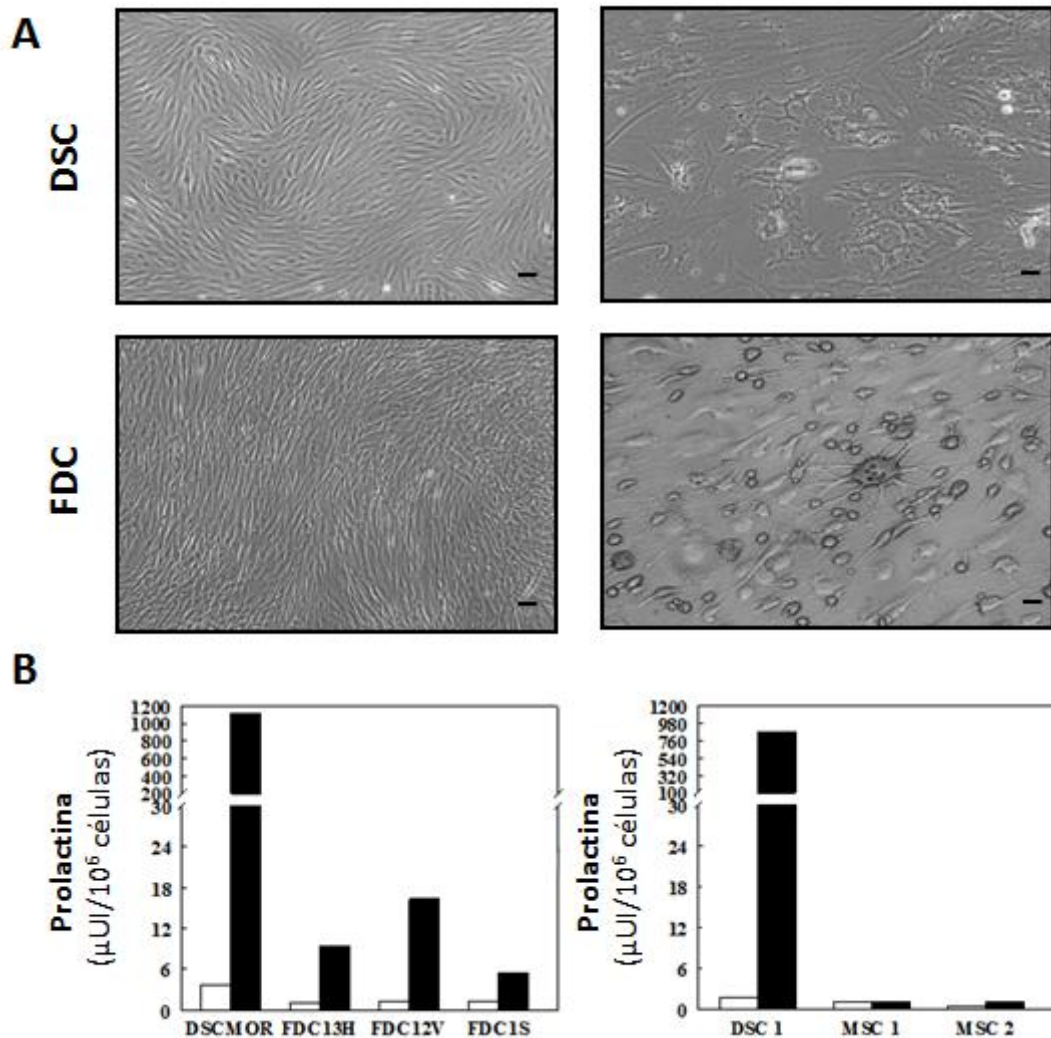


Figura 43. Secreción de prolactina (PRL) por líneas de DSC y FDC humanas. A) DSC y FDC fueron cultivadas sin (izquierda) y con progesterona y cAMP (derecha) durante dos semanas (Barra 100 μ m). Las DSC y FDC cambiaron su morfología de fibroblástica a redondeada/dendrítica en presencia de progesterona y cAMP. Este experimento fue repetido tres veces de forma independiente. B) Secreción de PRL por diferentes líneas de FDC, DSC y MSC (barras blancas, sin progesterona ni cAMP; barras negras, con progesterona y cAMP). Los sobrenadantes de las líneas MSC1 y MSC2 fueron analizados junto con los sobrenadantes de las DSC 1, siendo utilizadas estas como control positivo de decidualización. La secreción de PRL en cultivos con progesterona y cAMP fue significativamente mayor en DSC que en FDC (datos de dos líneas de DSC fueron comparados con los datos de tres líneas de FDC, p-valor<0.0001). Las MSC no secretaron PRL.

DISCUSIÓN

1. PRECURSORES ESTROMALES SIMILARES A LAS CÉLULAS ORGANIZADORAS DE TEJIDO LINFOIDE MURINAS PUEDEN SER LOCALIZADOS EN TORNO A LOS VASOS SANGUÍNEOS DE AMÍGDALAS HUMANAS

Durante el desarrollo embrionario, los órganos linfoides secundarios se originan a partir de la interacción directa entre las células LTo y LTi. Posteriormente, con la llegada de los linfocitos, las células LTo se diferencian en las distintas poblaciones estromales de los SLOs adultos y se organizan los microdominios linfoides. No obstante, los procesos de diferenciación en los SLOs no concluyen durante el desarrollo embrionario, pues estos órganos están sometidos a profundos cambios estructurales durante los procesos inflamatorios, entre los que se incluyen la expansión de las redes de FDC y FRC. Este incremento celular ha planteado distintas preguntas acerca del origen y la plasticidad de las células estromales de los SLOs. Por un lado, es probable que la expansión de este componente se deba a la proliferación de las propias células estromales, como resultado del aumento en el número de linfocitos activados, aunque por otro lado también es posible que precursores estromales, residentes en los SLOs o procedentes del torrente sanguíneo, contribuyan a la expansión de estas poblaciones.

Actualmente, se acepta que en la mayoría de los tejidos existe una población de MSC que intervienen en el mantenimiento de las células estromales, así como en los procesos de reparación tras un daño tisular (Covas et al. 2008, Feng et al. 2011). Varios trabajos previos en amígdalas palatinas humanas, han demostrado la existencia en este órgano de células tipo MSC, que mantienen la capacidad de diferenciarse hacia otros tipos celulares del linaje mesenquimal (Ame-Thomas et al. 2007, Janjanin et al. 2008). En esta tesis doctoral, conseguimos aislar una población celular equivalente a la de dichos trabajos, denominándola TSC, en un medio de cultivo con una baja proporción de FBS que evita la pérdida de ciertos marcadores antigénicos (Munoz-Fernandez et al. 2006), y demostramos su estrecha relación con las MSC. De hecho, las TSC cumplen los tres criterios mínimos

propuestos por la Sociedad de Terapia Celular para definir las MSC (Dominici et al. 2006): presentan una morfología fibroblástica (Fig. 7); expresan CD73, CD90 y CD105 (Tabla 2); carecen de CD45, CD19 y HLA-DR (Tabla 2); y pueden ser diferenciadas en adipocitos, condrocitos y osteocitos, capacidad observada tanto en las líneas celulares como en tres clones obtenidos a partir de las mismas (Fig. 16 - 18). Todas estas características demuestran que las TSC constituyen una población celular inmadura y con una gran plasticidad, lo que les permitiría actuar “in vivo” como fuente de células estromales para el mantenimiento y la reorganización de las redes de FDC, FRC y MRC.

Las TSC también muestran una elevada expresión de OCT-3/4 y Nanog (Tabla 2), dos factores de transcripción tradicionalmente asociados con células madre embrionarias (Loh et al. 2006). Recientemente, estos factores de transcripción también han sido identificados en MSC, donde participan en el mantenimiento del estado de inmadurez y en la capacidad de autorenovación (Tsai et al. 2012). Por tanto, la expresión de estos marcadores por parte de las TSC puede explicar su gran capacidad proliferativa y su plasticidad para diferenciarse hacia otros tipos celulares del linaje mesenquimal. Estas propiedades, a su vez, convierten a las amígdalas en una posible fuente de células tipo MSC con un gran potencial terapéutico, pudiendo ser utilizadas en terapias de regeneración de tejidos mesenquimales.

Las MSC también presentan un gran potencial terapéutico en enfermedades autoinmunitarias, gracias a sus propiedades inmunosupresoras. Así, las MSC son capaces de modificar los perfiles proinflamatorios tipo Th1 hacia perfiles anti-inflamatorios tipo Th2, pueden inhibir la citotoxicidad de las células NK, la aloproliferación de linfocitos T, inducen células reguladoras e influyen en la maduración de las APCs (English 2013). Estos efectos inmunosupresores son mediados por factores solubles, entre los que destaca el HLA-G (Nasef et al. 2007). En este trabajo mostramos como las TSC también pueden expresar HLA-G (Fig. 36), sugiriendo que estas células podrían jugar un papel importante en la modulación del sistema inmunitario a nivel de los SLOs, participando en los procesos de

tolerancia periférica y regulando la activación de los linfocitos durante los procesos inflamatorios. Además, se ha observado que linfocitos Th de amígdala estimulados con HLA-G varían la expresión de receptores de quimiocinas, lo que podría afectar a su patrón de migración dentro de los SLOs (Morandi et al. 2010); no obstante, en este trabajo, aunque se demuestra que este factor es expresado en amígdalas humanas, no se precisa qué tipo celular lo produce. Dada la expresión de HLA-G por las TSC “in vitro”, nosotros proponemos a esta población estromal como una de las posibles fuentes de HLA-G “in vivo”.

Antígenos	TSC	MSC
CD 10	+	+
CD 19	-	-
CD 29	+	+
CD 44	+	+
CD 45	-	-
CD 73	+	+
CD 90	+	+
CD 105	+	+
CD 146	+	+
CD 271	+	+
c-Kit	+	+
HLA-G	+	+
HLA-DR	-	-
Nestina	+	+
Nanog	+	+
OCT-3/4	+	+
PDGFR β	+	+
STRO-1	+	+

Tabla 2. Comparación de la expresión antigénica de líneas celulares de TSC y MSC.

A pesar de que las TSC comparten con las MSC numerosos marcadores antigénicos y pueden diferenciarse en otros tipos celulares del linaje mesenquimal (Tabla 2, Ame-Thomas et al. 2007, Janjanin et al. 2008), estas dos poblaciones muestran notables diferencias en cuanto a la expresión de marcadores asociados con las células estromales de los tejidos linfoides secundarios (Tabla 3, Fig. 23-26). Así, las TSC expresan CCL19, CCL21 y CXCL13, quimiocinas implicadas en el reclutamiento de linfocitos hacia los SLOs (Legler et al. 1998, Luther et al. 2000), o TRANCE, una citocina implicada en la activación de distintas células linfoides (Vondenhoff et al. 2009, Tabla 3). Estos factores comienzan a expresarse durante las primeras etapas del desarrollo embrionario de los SLOs, cuando las MSC, por efecto del RA y la $LT_{\alpha 1\beta 2}$, son diferenciadas en células LTo (van de Pavert et al. 2009). En este trabajo, además, mostramos como células estromales derivadas de prepucio y de medula ósea carecen de CCL19 y CXCL13, aunque expresan CCL21 y, en el caso de los FF, también expresan TRANCE (Tabla 3). En conjunto, todos estos resultados nos hacen pensar que si bien las TSC están íntimamente relacionadas con las MSC, el ambiente citocínico de los SLOs induce la expresión de marcadores característicos de dichos tejidos, que permiten la adaptación de estas células estromales a las necesidades del órgano.

El perfil de expresión de marcadores asociados con los SLOs, nos hizo pensar inicialmente que quizás las TSC estuvieran constituidas por una mezcla de distintos tipos de células estromales; sin embargo, la expresión de TRANCE (marcador de MRC) y CCL19 (marcador de FRC) en la práctica totalidad de las TSC (Fig. 10), así como el hallazgo de un fenotipo similar en clones obtenidos a partir de las líneas celulares (Fig. 12), nos llevo a descartar esta hipótesis. El perfil antigénico mostrado en la tabla 3, además, descarta cualquier tipo de célula estromal de los SLOs maduros, mientras que relaciona a las TSC directamente con las células organizadoras de tejido linfoide. No obstante, existen discrepancias con los resultados mostrados por Ame-Thomas y colaboradores (2007), quienes afirman no detectar CCL19 ni CXCL13 en MSC obtenidas de amígdala, aunque esto podría deberse al medio de cultivo utilizado, pues mantienen las células en medios con un

alto contenido de FBS, lo que puede inhibir la expresión de ciertos antígenos (García-Pacheco et al. 2001).

Antígenos	FDC	FRC	MRC	Células LTo	TSC	FF	BM- MSC
CD 31	-	-	-	-	-	-	-
Podoplanina	+	+	+	+	+	+	N.D.
α SMA	-	+	+	+	+	+	+
Nestina	-	-	-	+	+	+	+
CD35	+	-	-	-	-	-	-
CXCL13	+	-	+	+	+	-	-
TRANCE	-	-	+	+	+	+	-
CCL19	-	+	-	+	+	-	-
CCL21	-	+	-	+	+	+	+

Tabla 3. Comparación fenotípica de marcadores asociados a tejido linfóide en distintos tipos de células estromales. Los datos de expresión de FDC, FRC, MRC y células LTo fueron tomados de “van de Pavert y Mebius 2010” y hacen referencia a células murinas; mientras los de TSC, FF y BM-MSC fueron obtenidos por nuestro grupo a partir del estudio de líneas celulares humanas. N.D.: no determinado.

Las células LTo aparecen en las primeras etapas del desarrollo embrionario de los SLOs, originándose a partir de células tipo MSC caracterizadas por la expresión de Nestina⁺ (Koning et al. Sometido), un marcador también detectado en las TSC (Fig. 15 C). Este proceso depende de factores derivados de neuronas, como el RA, y de células LTi, como la LT $_{\alpha 1\beta 2}$, que inducen la expresión de quimiocinas, moléculas de adhesión y citocinas, permitiendo la expansión del primordio germinal a través del reclutamiento y proliferación de las células LTi. Si bien es cierto que en las últimas fases del desarrollo de los SLOs, las células LTo se diferencian en FDC, FRC y MRC (van de Pavert and Mebius 2010), nuestros resultados muestran como en amígdalas maduras existen células que, al igual que

las células LTo, expresan CCL19, CCL21, CXCL13 (Tabla 3, van de Pavert et al. 2009), ICAM-1, VCAM-1 (Fig. 23, Honda et al. 2001), retienen linfocitos (Fig. 24, van de Pavert and Mebius 2010), producen factores angiogénicos (Fig. 22), citocinas como la IL-7 y TRANCE e inhiben la apoptosis de células del linaje hematopoyético (Fig. 25, Vondenhoff et al. 2009, Yoshida et al. 2002). Basándonos en todos estos resultados, nosotros demostramos la existencia, en SLOs humanos adultos, de una población con un fenotipo y una funcionalidad similar a las células LTo, que podría actuar en el mantenimiento y expansión de las redes estromales. No obstante, a pesar de que estos resultados son claros, nosotros no podemos determinar cuál es el origen de estas células, pues podrían constituir una población sénil residente en el tejido, como propone Krautler y col. (2012), que derivaría directamente de las células LTo durante el desarrollo embrionario; o por otro lado, podrían originarse a partir de MSC circulantes de sangre periférica (Chong et al. 2012), las cuales migrarían hacia los SLOs y una vez allí, por efecto de las citocinas de los SLOs, comenzarían a expresar los marcadores típicos de las células LTo. Por ello, con el fin de esclarecer el origen de esta población estromal, son necesarios experimentos adicionales en este sentido.

Por otro lado, en este trabajo intentamos localizar el nicho en el que se localizan las TSC “in vivo”, para lo que estudiamos la expresión de marcadores asociados con las MSC en secciones de amígdala. La localización de las MSC en los tejidos fue identificada mucho tiempo después de haber sido caracterizadas “in vitro”, observándose que la localización de estas células coinciden con la de los pericitos (Crisan et al. 2008), una población celular que aparece rodeando a las células endoteliales de la microvasculatura, conocida desde hace bastante tiempo (Andreeva et al. 1998). Los pericitos se definen principalmente por su localización, así como por la expresión de marcadores como CD146, PDGFR β o α SMA, antígenos expresados también por las MSC (Crisan et al. 2008) y por las TSC (Tabla 3). A través del estudio de CD146 y α SMA en secciones de amígdala, mostramos como las únicas células positivas para ambos marcadores son células perivasculares, que pueden ser encontradas tanto en la zona folicular como en la interfolicular (Fig. 20). Así, dado que las TSC expresan sendos marcadores antigénicos, es posible que

se originen a partir de la proliferación “in vitro” de esta población de células perivasculares. Además, Koning y colaboradores (sometido), han demostrado la existencia de un precursor estromal perivascular similar a MSC en el interior de LNs de ratón, caracterizado por la expresión de Nestina y PDGFR β . Estos marcadores también son expresados por las TSC (Tabla 2), lo que nos lleva a pensar en la existencia de una población de precursores perivasculares similares en los SLOs de humanos y de ratón.

Krautler y colaboradores (2012), por su parte, han demostrado la existencia de un precursor perivascular de FDC en el bazo de ratón, caracterizado por la expresión de MFGE-8, α SMA y PDGFR β . Nosotros demostramos como las TSC presentan “in vitro” un fenotipo equivalente al de este precursor (Fig. 15), e identificamos células positivas para MFGE-8 y α SMA en torno a los vasos sanguíneos en secciones de amígdalas humanas. Es probable que, al igual que en ratón, estas células MFGE-8⁺ y α SMA⁺ actúen como precursores de FDC como demuestran Krautler y colaboradores (2012); no obstante, por su posición, estas células podrían actuar también como precursoras de FRC, para lo que deberían perder la expresión de MFGE-8.

Los resultados obtenidos a partir de secciones de amígdala, claramente, muestran la existencia de células perivasculares con un fenotipo similar al de las TSC y nos hace pensar que las células mantenidas en cultivo derivarían de ellas. El origen perivascular de estas células se apoya, también, en la expresión por parte de las TSC de ARNm de factores implicados en la formación de vasos sanguíneos como son la angiopoyetina-1, el FGF-2, el HGF, el PGF o el VEGF (Fig. 22). La producción de dichos factores sugieren, además, una estrecha relación entre las TSC y las células endoteliales, de modo que las primeras podrían contribuir a la homeostasis endotelial, mientras las segundas podrían actuar como fuente de PDGF (Armulik et al. 2011), factor con un importante papel en la proliferación y en el mantenimiento de la pluripotencialidad de células MSC (Ng et al. 2008), y cuyo receptor es expresado para las TSC.

En resumen, nuestros resultados demuestran la existencia, en torno a los vasos sanguíneos de amígdalas humanas, de precursores estromales con características fenotípicas y funcionales asociadas a las células LTo. Esta población celular muestra una gran capacidad proliferativa y plasticidad, lo que les permitiría participar en la expansión y mantenimiento de las redes estromales de los SLOs, así como en los procesos de remodelación endotelial, gracias a la producción de factores implicados en dicho proceso.

2. LA $LT_{\alpha1\beta2}$ Y EL TNF POTENCIAN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS CON LAS CÉLULAS ORGANIZADORAS DE TEJIDO LINFOIDE

La fisiología de los SLOs, como se ha discutido anteriormente, requiere de un precursor estromal que permita la expansión de la red estromal durante los procesos infecciosos, así como la reconstitución de la microanatomía tras procesos citopáticos (Mueller et al. 2007). Este precursor, que según nuestros datos ocuparía una posición perivascular en los SLOs humanos, debe proliferar y diferenciarse en FDC, FRC y MRC, bajo la influencia de factores producidos en los SLOs. En esta tesis doctoral evaluamos “in vitro” el efecto de distintos factores implicados en los procesos de diferenciación de las células estromales de los SLOs y demostramos como la $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF potencian la expresión de marcadores asociados con las células LTo.

Las TSC muestran una gran capacidad proliferativa “in vitro”, pudiendo ser mantenidas en cultivo durante varios meses. “In vivo” es probable que estas células se mantengan quiescentes bajo condiciones normales, gracias a la estrecha relación establecida con las células endoteliales (Armulik et al. 2011); sin embargo, ante una infección, se produce la activación de linfocitos T y B que comienzan a proliferar y a producir distintos tipos de citocinas, las cuales probablemente actúan directamente sobre los precursores perivascuales, activando a estas células e induciendo su proliferación y diferenciación. De este modo, las células precursoras

perderían los marcadores asociados con células perivasculares e inducirían la expresión de antígenos característicos de cada una de las poblaciones estromales.

Los linfocitos B y T son la principal fuente de $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF en los SLOs adultos, donde juegan un importante papel en el desarrollo y mantenimiento de dichos órganos (Tumanov A. et al. 2002, Tumanov A. V. et al. 2010). Aquí, nosotros mostramos como estas citocinas son capaces de comenzar la diferenciación de las TSC, pues producen una disminución en la expresión del PDGFR β (Fig. 28), marcador asociado con pericitos, y en la tasa de proliferación (Fig. 27). El efecto sobre la expresión de PDGFR β también ha sido encontrado en células estromales de bazo de ratón por Krautler y colaboradores (2012) y puede ser interpretado como la primera etapa de diferenciación de las células estromales de los SLOs.

La estimulación de las TSC con $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF produce, al mismo tiempo, un incremento en la expresión de numerosas moléculas asociadas con las células LTo. Así, observamos como se potencia la expresión de CCL19 (Fig. 29), una citocina implicada en el reclutamiento de linfocitos hacia los SLOs durante los procesos inflamatorios (Baekkevold et al. 2001), pudiendo tener las TSC un papel importante en este proceso. Además, aumenta la retención de linfocitos sobre las TSC (Fig. 31), lo que a su vez podría deberse a un incremento en la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, así como a la inducción de MadCAM-1 (Fig. 30), otra molécula asociada con las células LTo murinas.

El aumento en el contacto entre linfocitos y células estromales puede tener un efecto bidireccional sobre estas células. La producción de IL-7, IL-15 y BAFF por las TSC (Fig. 25), así como el aumento en la expresión de TRANCE (Fig. 25), pueden influir en la activación y proliferación de los linfocitos, los cuales a su vez producirían una mayor cantidad de $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF que potenciaría la diferenciación de las TSC, dando lugar a un ciclo de retroalimentación positiva similar al establecido durante el desarrollo embrionario entre las células LTo y las células LTi (van de Pavert and Mebius 2010).

A pesar de que detectamos un incremento en la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas, la $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF, al igual que ocurre en ratón (Krautler et al. 2012), no inducen un fenotipo asociado con alguna de las tres poblaciones estromales identificadas en los SLOs adultos. En el caso de la diferenciación hacia FDC, por ejemplo, debe inducirse la expresión de CD21 y CD35 e inhibirse la expresión de α SMA pues, como se observa en la figura 19, estas células carecen de esta proteína del citoesqueleto. Se ha sugerido que las señales necesarias para esta diferenciación deben derivar de los linfocitos, aunque aún no se han sido identificadas. Nosotros evaluamos el papel del RA, el anti-CD40, la IL-17 y la IL-21 en esta diferenciación, solos o en combinación con $LT_{\alpha1\beta2}$ y el TNF (Fig. 32 y 33); sin embargo, ninguno de estos tratamientos consiguió inducir la expresión de CD21 ó CD35. Es probable que la diferenciación de las FDC requiera de un contacto estrecho con los linfocitos, por lo que sería interesante estudiar, en el futuro, el efecto de linfocitos activados sobre el fenotipo de las TSC.

3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS FOLICULARES Y LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES COMPARTEN CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES

Hace más de una década, nuestro grupo de investigación fue capaz de aislar y mantener cultivos de DSC con una gran pureza, lo que permitió estudiar el fenotipo de esta población de células estromales, relacionándolas con las FDC a través de la expresión de marcadores característicos de este tipo celular, como son el CD21 o el DRC-1 (Montes et al. 1996). Posteriormente, se encontró que ambos tipos celulares estaban a su vez relacionados con las MSC (García-Pacheco et al. 2001, Muñoz-Fernández et al. 2006), sugiriéndose que DSC y FDC podrían derivar de un precursor estromal tipo MSC.

En el presente estudio confirmamos la estrecha relación existente entre DSC, FDC y MSC, pues las tres líneas expresan los antígenos asociados con MSC CD10, CD29, CD73, ICAM-1, VCAM-1 y STRO-1, y carecen de CD45 (Tabla 1, (Chamberlain et al. 2007). Además, mostramos como el TNF y la $LT_{\alpha1\beta2}$ son capaces

de incrementar la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en los tres tipos de celulares (Fig. 40). Las DSC y las FDC, sin embargo, comparte algunas características fenotípicas y funcionales que no fueron detectadas en las MSC, como es la capacidad de secretar PRL durante los cultivos con progesterona y cAMP (Fig. 43), siendo ésta una característica típica de las DSC (Montes et al. 1995, Tabanelli et al. 1992). Por otro lado, las DSC mostraron características típicas de FDC que no fueron detectadas en las MSC, como son la expresión de CD14, CD21, CD23, BAFF, CXCL13 (Fig. 39, Tabla 1) o la capacidad de rescatar linfocitos B de la apoptosis espontánea (Fig. 41) (Buettner et al. 2010, Lindhout et al. 1997, Park and Choi 2005). Además, en este trabajo confirmamos, como previamente ya se demostró (Kim H. S. et al. 1995), que la capacidad para inhibir la apoptosis de linfocitos B de amígdala requiere del contacto entre células B y FDC, al igual que ocurre en el caso de las DSC (Fig. 41 C).

Las células utilizadas en este apartado corresponden con formas más maduras que las usadas anteriormente, pues en las células obtenidas de amígdala se detecta la expresión de marcadores asociados con las FDC, como el CD21 (Fig. 39). Esto es debido a que las células son cultivadas en medio OPTI-MEM, el cual, a diferencia del medio EMEM, contiene insulina y transferrina. Las células, no obstante, no son totalmente maduras pues pueden sufrir diferenciación (incremento en la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, Fig. 40) por efecto de las citoquinas.

Las propiedades de las FDC detectadas en las líneas de DSC están íntimamente relacionadas con la fisiología de las células B (El Shikh et al. 2010), sin embargo, estos linfocitos no pueden ser detectados en la decidua humana bajo condiciones normales (Bulmer 1995), aunque bajo situaciones patológicas podrían tener un papel relevante, como en el desarrollo de linfomas uterinos de células B (Alvarez et al. 1997) o en infecciones durante el embarazo (Nhan-Chang et al. 2008), procesos en los que, además, las DSC podrían intervenir de forma decisiva. A pesar de todo, los efectos “in vitro” de las DSC sobre las células B pueden reflejar un efecto fisiológico sobre los propios linfocitos deciduales, dado que los factores producidos por las DSC afectan a diferentes tipos de células inmunitarias (Blanco et

al. 2009). Así, se han detectado elevados niveles de CXCL13 en la decidua y en el plasma de mujeres embarazadas (Nhan-Chang et al. 2008), y de acuerdo a nuestros resultados (Fig. 39), las DSC pueden contribuir a la secreción de esta quimiocina durante el embarazo. Además, CXCL13 es capaz de atraer linfocitos T reguladores (Lee BP et al. 2006), los cuales han sido detectados en la decidua humana y parece ser que desempeñan un papel clave en la respuesta inmunitaria materno-fetal (Leber et al. 2010). Es importante señalar que las DSC mostraron una capacidad variable para secretar CXCL13 (Fig. 39 B), aunque esto podría deberse a que las líneas de DSC, así como las de FDC y MSC, son células normales que no muestran la uniformidad característica de las líneas tumorales.

Por otro lado, BAFF, una citocina expresada por las FDC, participa en el rescate de la apoptosis de los linfocitos B en los folículos linfoides, y juega un importante papel en la modulación de la tolerancia y la homeostasis de las células B (Gorelik et al. 2003). En la decidua, al no existir células B, la secreción de BAFF por las DSC podría estar involucrada en la inducción de una respuesta inmunitaria tipo Th2 (Langat et al. 2008, Phillips et al. 2003), respuesta asociada con el embarazo normal (Saito et al. 2010), y en la inhibición de la apoptosis de células T y NK deciduales (Blanco et al. 2009, Mackay and Leung 2006). Interesantemente las células mesenquimales del trofoblasto son una importante fuente de BAFF, aunque como en la decidua, no hay células B en este tejido (Langat et al. 2008). BAFF también ha sido asociado con patologías ginecológicas y obstetricias relacionadas con el sistema inmunitario como son la endometriosis, donde se han detectado niveles elevados (Hever et al. 2007), o en el aborto recurrente espontaneo, apareciendo, en este caso, niveles reducidos de BAFF en la decidua y el trofoblasto (Guo et al. 2008).

Las DSC y las FDC también comparten el efecto del TNF y la $LT_{\alpha\beta 2}$ sobre las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, produciendo un aumento en su expresión, una propiedad que también se observa en las MSC (Fig. 41; Ren et al. 2010). Estas citocinas son factores que intervienen en la diferenciación de las FDC (Fu and Chaplin 1999) e incrementan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 “in vivo”,

los cuales, a su vez, están involucradas en las interacciones entre los linfocitos B y las FDC (Muñoz-Fernandez et al. 2008; Fig. 41). ICAM-1, además, juega un papel importante en la fisiología de las DSC, pues regula su interacción con las células NK deciduales (Vigano et al. 1994) y puede estar relacionado, junto con VCAM-1, con la actividad inmunosupresora de estas células y con el mantenimiento de la tolerancia materno-fetal (Blanco et al., 2008) como ocurre con las MSC (Ren et al. 2010).

Por otro lado, la diferenciación de las DSC (decidualización) tiene lugar durante la fase lútea del ciclo menstrual, o durante el embarazo si este tiene lugar. Las células estromales endometriales, células homologas de las DSC en el endometrio no gestante, bajo el efecto de la progesterona y otras hormonas se decidualizan, cambian su morfología hacia una forma redondeada y comienzan a expresar desmina y a secretar prolactina (Tabanelli et al., 1992; Montes et al., 1996; Fig. 43). Como las DSC, las FDC (pero no las MSC) también cambian su morfología hacia una forma redondeada y secretan prolactina (Fig. 43) bajo los efectos de la progesterona y el cAMP. La secreción local de prolactina puede modular la respuesta inmunitarias de la madre (Draca 1995) y, en el caso de la PRL producida por las FDC, puede modulara las funciones de las células B como resultado de los efectos hormonales durante el embarazo (Peeva et al. 2003). En este contexto, un estudio reciente muestra como las FDC están involucradas en la inducción de tolerancia a antígenos fetales durante el embarazo (McCloskey et al. 2011). Finalmente, dado que el embarazo regula la respuesta inmunitaria materna, es posible que las DSC y FDC estén involucradas en este mecanismo de homeostasis inmuno-endocrino.

Aunque ambos tipos celulares comparten varias características distintivas, también muestran importantes diferencias que nos impiden afirmar que FDC y DSC sean el mismo tipo celular. Por ejemplo, las FDC secretan una concentración de PRL significativamente más baja que la producida por las DSC (Fig 43 B). Por el contrario, lo que nuestros resultados sugieren es la existencia de un precursor común relacionado con las MSC. Esta hipótesis, además, está apoyada en el hecho

de que DSC y FDC pueden ser localizadas en sitios ectópicos en enfermedades mediadas por el sistema inmunitario (Hever et al. 2007, Lindhout et al. 1997). Así, bajo condiciones fisiológicas las células tipo MSC se diferenciarían hacia FDC en los SLOs o hacia DSC en el endometrio, adquiriendo nuevas propiedades fenotípicas y funcionales como la expresión de BAFF, PRL o CXCL13, o la capacidad para rescatar de la apoptosis a linfocitos B u otros linfocitos. En condiciones patológicas, bajo ciertos contextos citocínicos anormales, este precursor también podría dar lugar a estos dos tipos celulares en localizaciones ectópicas.

CONCLUSIONS

1. We have isolated human tonsil stromal cell lines with an antigen phenotype compatible with lymphoid-tissue organizers cells. These cells were located around blood vessels of tonsils.
2. $LT_{\alpha 1\beta 2}$ and TNF upregulate markers of LTo cells on TSC; however, other signals must be necessary for terminal FDC differentiation.
3. Follicular dendritic cells and decidual stromal cells show a similar antigen phenotype and functional characteristics, and share a common precursor in MSCs.

BIBLIOGRAFÍA

Allen CD, Cyster JG. 2008. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol* 20: 14-25.

Allen CD, Okada T, Cyster JG. 2007. Germinal-center organization and cellular dynamics. Pages 190-202. *Immunity*, vol. 27. United States.

Allen DC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG. 2004. Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* 5: 943-952.

Alvarez A, Ortiz J, Sacristán F. 1997. Large B-cell lymphoma of the uterine corpus: case report with immunohistochemical and molecular study. *Gynecol Oncol* 65: 534-538.

Ame-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, Guillaudeux T, Lamy T, Fest T, Tarte K. 2007. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood* 109: 693-702.

Anderson AO, Shaw S. 1993. T cell adhesion to endothelium: the FRC conduit system and other anatomic and molecular features which facilitate the adhesion cascade in lymph node. Pages 271-282. *Semin Immunol*, vol. 5. United States.

Andreeva ER, Pugach IM, Gordon D, Orekhov AN. 1998. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. Pages 127-135. *Tissue Cell*, vol. 30. Scotland.

Angeli V, Ginhoux F, Llodra J, Quemeneur L, Frenette PS, Skobe M, Jessberger R, Merad M, Randolph GJ. 2006. B cell-driven lymphangiogenesis in inflamed lymph nodes enhances dendritic cell mobilization. Pages 203-215. *Immunity*, vol. 24. United States.

Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, McHeyzer-Williams MG, Cyster JG. 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 190: 1123-1134.

Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Forster R, Sedgwick JD, Browning JL, Lipp M, Cyster JG. 2000. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* 406: 309-314.

Apps R, Gardner L, Sharkey AM, Holmes N, Moffett A. 2007. A homodimeric complex of HLA-G on normal trophoblast cells modulates antigen-presenting cells via LILRB1. *Eur J Immunol* 37: 1924-1937.

Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernandez-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T, Pujol-Borrell R. 2001. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol* 159: 861-873.

Armulik A, Genove G, Betsholtz C. 2011. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell* 21: 193-215.

Aydar Y, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. 2005. The influence of immune complex-bearing follicular dendritic cells on the IgM response, Ig class switching, and production of high affinity IgG. *J Immunol* 174: 5358-5366.

Baekkevold ES, Yamanaka T, Palframan RT, Carlsen HS, Reinholt FP, von Andrian UH, Brandtzaeg P, Haraldsen G. 2001. The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment. *J Exp Med* 193: 1105-1112.

Bajenoff M, Germain RN. 2009. B cell follicle development remodels the conduit system and allows soluble antigen delivery to follicular dendritic cells. *Blood*.

Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. Pages 989-1001. *Immunity*, vol. 25. United States.

Balogh P, Aydar Y, Tew JG, Szakal AK. 2002. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. *Anat Rec* 268: 160-168.

Beltman JB, Allen CD, Cyster JG, de Boer RJ. 2011. B cells within germinal centers migrate preferentially from dark to light zone. Pages 8755-8760. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108. United States.

Blanco O, Leno-Duran E, Morales JC, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. 2009. Human decidual stromal cells protect lymphocytes from apoptosis. *Placenta* 30: 677-685.

Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, Olivares EG. 2008. Human decidual stromal cells express HLA-G: Effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod* 23: 144-152.

Blattman JN, Antia R, Sourdive DJ, Wang X, Kaech SM, Murali-Krishna K, Altman JD, Ahmed R. 2002. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195: 657-664.

Boehm T, Hess I, Swann JB. 2012. Evolution of lymphoid tissues. Pages 315-321. *Trends Immunol*, vol. 33. England: 2012 Elsevier Ltd.

Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 25: 280-288.

Bousso P, Robey E. 2003. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. Pages 579-585. *Nat Immunol*, vol. 4. United States.

Buettner M, Pabst R, Bode U. 2010. Stromal cell heterogeneity in lymphoid organs. *Trends Immunol* 31: 80-86.

Bulmer JN. 1995. *Immune cells in decidua*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited.

Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. 2001. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. Pages 1126-1132. *Nat Immunol*, vol. 2. United States.

Carosella ED, Favier B, Rouas-Freiss N, Moreau P, Lemaoult J. 2008. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. Pages 4862-4870. *Blood*, vol. 111. United States.

Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. Pages 890-895. *Nature*, vol. 440. England.

Cavanagh LL, Von Andrian UH. 2002. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. Pages 448-462. *Immunol Cell Biol*, vol. 80. Australia.

Cervantes-Barragan L, Zust R, Weber F, Spiegel M, Lang KS, Akira S, Thiel V, Ludewig B. 2007. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. Pages 1131-1137. *Blood*, vol. 109. United States.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. 2007. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Pages 2739-2749. *Stem Cells*, vol. 25. United States.

Cho KA, Kim JY, Kim HS, Ryu KH, Woo SY. 2012. Tonsil-derived mesenchymal progenitor cells acquire a follicular dendritic cell phenotype under cytokine stimulation. Pages 211-214. *Cytokine*, vol. 59. United States: 2012 Elsevier Ltd.

Cho W, Kim J, Cho KB, Choe J. 2011. Production of prostaglandin e(2) and i(2) is coupled with cyclooxygenase-2 in human follicular dendritic cells. *Immune Netw* 11: 364-367.

Chong PP, Selvaratnam L, Abbas AA, Kamarul T. 2012. Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 30: 634-642.

Chyou S, Benahmed F, Chen J, Kumar V, Tian S, Lipp M, Lu TT. 2011. Coordinated regulation of lymph node vascular-stromal growth first by CD11c+ cells and then by T and B cells. Pages 5558-5567. *J Immunol*, vol. 187. United States.

Chyou S, Ekland EH, Carpenter AC, Tzeng TC, Tian S, Michaud M, Madri JA, Lu TT. 2008. Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. Pages 3887-3896. *J Immunol*, vol. 181. United States.

Clark SL. 1963. The reticulum of lymph nodes in mice studied with the electron microscope. *American Journal of Anatomy* 110: 217-257.

Coles MC, Veiga-Fernandes H, Foster KE, Norton T, Pagakis SN, Seddon B, Kioussis D. 2006. Role of T and NK cells and IL7/IL7r interactions during neonatal maturation of. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13457-13462.

Covas DT, et al. 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share. *Exp Hematol* 36: 642-654.

Crisan M, et al. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3: 301-313.

Cupedo T, Vondenhoff MF, Heeregrave EJ, De Weerd AE, Jansen W, Jackson DG, Kraal G, Mebius RE. 2004a. Presumptive lymph node organizers are differentially represented in

developing mesenteric and peripheral nodes. Pages 2968-2975. *J Immunol*, vol. 173. United States.

Cupedo T, Crellin NK, Papazian N, Rombouts EJ, Weijer K, Grogan JL, Fibbe WE, Cornelissen JJ, Spits H. 2009. Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors. *Nat Immunol* 10: 66-74.

Cupedo T, Lund FE, Ngo VN, Randall TD, Jansen W, Greuter MJ, de Waal-Malefyt R, Kraal G, Cyster JG, Mebius RE. 2004b. Initiation of cellular organization in lymph nodes is regulated by non-B cell-derived signals and is not dependent on CXC chemokine ligand 13. Pages 4889-4896. *J Immunol*, vol. 173. United States.

Cyster JG. 2010. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. Pages 989-996. *Nat Immunol*, vol. 11. United States.

Cyster JG, Goodnow CC. 1995. Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *J Exp Med* 182: 581-586.

Cyster JG, Schwab SR. 2012. Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 30: 69-94.

Cyster JG, Ansel KM, Reif K, Ekland EH, Hyman PL, Tang HL, Luther SA, Ngo VN. 2000. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 176: 181-193.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119: 2204-2213.

De Togni P, et al. 1994. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 264: 703-707.

Depoil D, Zaru R, Guiraud M, Chauveau A, Harriague J, Bismuth G, Utzny C, Muller S, Valitutti S. 2005. Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. Pages 185-194. *Immunity*, vol. 22. United States.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Pages 315-317. *Cytotherapy*, vol. 8. England.

Draca S. 1995. Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunol Cell Biol* 73: 481-483.

Dudley DJ, Trautman MS, Mitchell MD. 1993. Inflammatory mediators regulate interleukin-8 production by cultured gestational tissues: evidence for a cytokine network at the chorio-decidual interface. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 404-410.

El Shikh ME, Pitzalis C. 2012. Follicular dendritic cells in health and disease. *Front Immunol* 3: 292.

El Shikh ME, El Sayed RM, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. 2010. Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. *Trends Immunol* 31: 205-211.

Endres R, Alimzhanov MB, Plitz T, Futterer A, Kosco-Vilbois MH, Nedospasov SA, Rajewsky K, Pfeffer K. 1999. Mature follicular dendritic cell networks depend on expression of lymphotoxin beta receptor by radioresistant stromal cells and of lymphotoxin beta and tumor necrosis factor by B cells. *J Exp Med* 189: 159-168.

English K. 2013. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. Pages 19-26. *Immunol Cell Biol*, vol. 91. England.

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. Pages 324-335. *Immunity*, vol. 30. United States.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 6503-6508.

Fletcher AL, Lukacs-Kornek V, Reynoso ED, Pinner SE, Bellemare-Pelletier A, Curry MS, Collier AR, Boyd RL, Turley SJ. 2010. Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue. *J Exp Med* 207: 689-697.

Forster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. Pages 1037-1047. *Cell*, vol. 87. United States.

Foy TM, Laman JD, Ledbetter JA, Aruffo A, Claassen E, Noelle RJ. 1994. gp39-CD40 interactions are essential for germinal center formation and the development of B cell memory. *J Exp Med* 180: 157-163.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the. *Transplantation* 17: 331-340.

Fu YX, Chaplin DD. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 17: 399-433.

Fukuyama S, Nagatake T, Kim DY, Takamura K, Park EJ, Kaisho T, Tanaka N, Kurono Y, Kiyono H. 2006. Cutting edge: Uniqueness of lymphoid chemokine requirement for the initiation and. *J Immunol* 177: 4276-4280.

Furtado GC, Marinkovic T, Martin AP, Garin A, Hoch B, Hubner W, Chen BK, Genden E, Skobe M, Lira SA. 2007. Lymphotoxin beta receptor signaling is required for inflammatory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5026-5031.

Gaengel K, Genove G, Armulik A, Betsholtz C. 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 630-638.

Garcia Z, Pradelli E, Celli S, Beuneu H, Simon A, Bousso P. 2007. Competition for antigen determines the stability of T cell-dendritic cell interactions during clonal expansion. Pages 4553-4558. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104. United States.

Garcia-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. 2001. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 7: 1151-1157.

Gardner JM, et al. 2008. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321: 843-847.

Gatto D, Paus D, Basten A, Mackay CR, Brink R. 2009. Guidance of B cells by the orphan G protein-coupled receptor EB12 shapes humoral immune responses. Pages 259-269. *Immunity*, vol. 31. United States.

Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 218: 314-319.

Gonzalez A, Rebmann V, LeMaout J, Horn PA, Carosella ED, Alegre E. 2012. The immunosuppressive molecule HLA-G and its clinical implications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 49: 63-84.

Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. 2003. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. Pages 937-945. *J Exp Med*, vol. 198. United States.

Gretz JE, Norbury CC, Anderson AO, Proudfoot AE, Shaw S. 2000. Lymph-borne chemokines and other low molecular weight molecules reach high endothelial venules via specialized conduits while a functional barrier limits access to the lymphocyte microenvironments in lymph node cortex. *J Exp Med* 192: 1425-1440.

Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG, Williams LT. 1998a. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Burkitt's lymphoma receptor-1. *Nature* 391: 799-803.

Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. 1998b. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 258-263.

Guo W, Qu X, Yang M, Zhang W, Liang L, Shao Q, Kong B. 2008. Expression of BAFF in the trophoblast and decidua of normal early pregnant women and patients with recurrent spontaneous miscarriage. *Chin Med J (Engl)* 121: 309-315.

Haberman AM, Shlomchik MJ. 2003. Reassessing the function of immune-complex retention by follicular dendritic cells. Pages 757-764. *Nat Rev Immunol*, vol. 3. England.

Halle S, et al. 2009. Induced bronchus-associated lymphoid tissue serves as a general priming site for. *J Exp Med* 206: 2593-2601.

Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Forster R, Pabst O. 2008. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. Pages 2483-2490. *J Exp Med*, vol. 205. United States.

Hannedouche S, et al. 2011. Oxysterols direct immune cell migration via EB12. Pages 524-527. *Nature*, vol. 475. England.

Hara T, Katakai T, Lee JH, Nambu Y, Nakajima-Nagata N, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. 2006. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. Pages 301-311. *Int Immunol*, vol. 18. England.

Hashi H, Yoshida H, Honda K, Fraser S, Kubo H, Awane M, Takabayashi A, Nakano H, Yamaoka Y, Nishikawa S. 2001. Compartmentalization of Peyer's patch anlagen before lymphocyte entry. *J Immunol* 166: 3702-3709.

Hayakawa M, Kobayashi M, Hoshino T. 1990. Microfibrils: a constitutive component of reticular fibers in the mouse lymph node. *Cell Tissue Res* 262: 199-201.

Haynes NM, Allen CD, Lesley R, Ansel KM, Killeen N, Cyster JG. 2007. Role of CXCR5 and CCR7 in follicular Th cell positioning and appearance of a programmed cell death gene-1high germinal center-associated subpopulation. Pages 5099-5108. *J Immunol*, vol. 179. United States.

Hever A, et al. 2007. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12451-12456.

Hofmann J, Greter M, Du Pasquier L, Becher B. 2010. B-cells need a proper house, whereas T-cells are happy in a cave: the dependence of lymphocytes on secondary lymphoid tissues during evolution. Pages 144-153. *Trends Immunol*, vol. 31. England: 2010 Elsevier Ltd.

Honda K, et al. 2001. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 193: 621-630.

Huang HY, Luther SA. 2012. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol* 24: 175-189.

Huber C, Thielen C, Seeger H, Schwarz P, Montrasio F, Wilson MR, Heinen E, Fu YX, Miele G, Aguzzi A. 2005. Lymphotoxin-beta receptor-dependent genes in lymph node and follicular dendritic cell transcriptomes. *J Immunol* 174: 5526-5536.

Hugues S, Scholer A, Boissonnas A, Nussbaum A, Combadiere C, Amigorena S, Fetler L. 2007. Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8+ T cell help for CD8+ T cell responses. Pages 921-930. *Nat Immunol*, vol. 8. United States.

Itano AA, Jenkins MK. 2003. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. Pages 733-739. *Nat Immunol*, vol. 4. United States.

Iwabe T, Harada T, Tsudo T, Nagano Y, Yoshida S, Tanikawa M, Terakawa N. 2000. Tumor necrosis factor-alpha promotes proliferation of endometriotic stromal cells by inducing interleukin-8 gene and protein expression. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 824-829.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem. *J Cell Biochem* 64: 295-312.

Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J. 2012. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One* 7: e46842.

Janjanin S, Djouad F, Shanti RM, Baksh D, Gollapudi K, Prgomet D, Rackwitz L, Joshi AS, Tuan RS. 2008. Human palatine tonsil: a new potential tissue source of multipotent mesenchymal progenitor cells. Pages R83. *Arthritis Res Ther*, vol. 10. England.

Junt T, Scandella E, Ludewig B. 2008. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. Pages 764-775. *Nat Rev Immunol*, vol. 8. England.

Junt T, et al. 2007. Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. Pages 110-114. *Nature*, vol. 450. England.

Kaldjian EP, Gretz JE, Anderson AO, Shi Y, Shaw S. 2001. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. *Int Immunol* 13: 1243-1253.

Karttunen T, Sormunen R, Risteli L, Risteli J, Autio-Harminen H. 1989. Immunoelectron microscopic localization of laminin, type IV collagen, and type III pN-collagen in reticular fibers of human lymph nodes. *J Histochem Cytochem* 37: 279-286.

Katakai T. 2012. Marginal reticular cells: a stromal subset directly descended from the lymphoid tissue organizer. *Front Immunol* 3: 200.

Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. 2003. Th1-biased tertiary lymphoid tissue supported by CXC chemokine ligand. *J Immunol* 171: 4359-4368.

Katakai T, Hara T, Sugai M, Gonda H, Shimizu A. 2004a. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J Exp Med* 200: 783-795.

Katakai T, Hara T, Lee JH, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. 2004b. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 16: 1133-1142.

Katakai T, Suto H, Sugai M, Gonda H, Togawa A, Suematsu S, Ebisuno Y, Katagiri K, Kinashi T, Shimizu A. 2008. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. Pages 6189-6200. *J Immunol*, vol. 181. United States.

Kepler TB, Perelson AS. 1993. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. Pages 412-415. *Immunol Today*, vol. 14. England.

Kim HS, Zhang X, Klyushnenkova E, Choi YS. 1995. Stimulation of germinal center B lymphocyte proliferation by an FDC-like cell line, HK. *J Immunol* 155: 1101-1109.

Kim J, Kim YM, Jeoung DI, Choe J. 2012. Human follicular dendritic cells promote the APC capability of B cells by. *Cell Immunol* 273: 109-114.

Kiyono H, Fukuyama S. 2004. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol* 4: 699-710.

Knoop KA, Kumar N, Butler BR, Sakthivel SK, Taylor RT, Nochi T, Akiba H, Yagita H, Kiyono H, Williams IR. 2009. RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol* 183: 5738-5747.

Koning, Konijn T, Lakeman KA, O'Toole T, Michurina TV, Enikolopov G, Mebius RE. Sometido. The origin of lymph node stromal cells.

Koning JJ, Mebius RE. 2012. Interdependence of stromal and immune cells for lymph node function. *Trends Immunol* 33: 264-270.

Kosco-Vilbois MH. 2003. Are follicular dendritic cells really good for nothing? Pages 764-769. *Nat Rev Immunol*, vol. 3. England.

Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. 1990. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 248: 220-223.

Kraal G, Schornagel K, Streeter PR, Holzmann B, Butcher EC. 1995. Expression of the mucosal vascular addressin, MAdCAM-1, on sinus-lining cells in. *Am J Pathol* 147: 763-771.

Krautler NJ, et al. 2012. Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* 150: 194-206.

Krebhiel R. 1937. Cytochemical studies of the decidua reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol.Zool.* 10: 212-223.

Kroncke R, Loppnow H, Flad HD, Gerdes J. 1996. Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a. *Eur J Immunol* 26: 2541-2544.

Langat D, Wheaton D, Platt J, Sifers T, Hunt J. 2008. Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol* 172: 1303-1311.

Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois MH, Muller M, di Padova F, Moore M, Ryffel B, Eugster HP. 1995. Tumor necrosis factor receptor-1 signaling is required for differentiation of follicular dendritic cells, germinal center formation, and full antibody responses. *J Inflamm* 47: 76-80.

Leber A, Teles A, Zenclussen AC. 2010. Regulatory T cells and their role in pregnancy. Pages 445-459. *Am J Reprod Immunol*, vol. 63. Denmark.

Lee B, Chen W, Shi H, Der S, Förster R, Zhang L. 2006. CXCR5/CXCL13 interaction is important for double-negative regulatory T cell homing to cardiac allografts. *J Immunol* 176: 5276-5283.

Lee JW, Epardaud M, Sun J, Becker JE, Cheng AC, Yonekura AR, Heath JK, Turley SJ. 2007. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to. *Nat Immunol* 8: 181-190.

Legler D, Loetscher M, Roos R, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. 1998. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues, selectively attracts B lymphocytes via BLR1/CXCR5. *J Exp Med* 187: 655-660.

Lindhout E, Koopman G, Pals S, de Groot C. 1997. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol Today* 18: 573-577.

Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, Nussenzweig MC. 2004. Visualizing dendritic cell networks in vivo. Pages 1243-1250. *Nat Immunol*, vol. 5. United States.

Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H, Hinz B, Cyster JG, Luther SA. 2007. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. Pages 1255-1265. *Nat Immunol*, vol. 8. United States.

Link A, Hardie DL, Favre S, Britschgi MR, Adams DH, Sixt M, Cyster JG, Buckley CD, Luther SA. 2011. Association of T-zone reticular networks and conduits with ectopic lymphoid tissues in mice and humans. *Am J Pathol* 178: 1662-1675.

Linterman MA, Beaton L, Yu D, Ramiscal RR, Srivastava M, Hogan JJ, Verma NK, Smyth MJ, Rigby RJ, Vinuesa CG. 2010. IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. Pages 353-363. *J Exp Med*, vol. 207. United States.

Liu C, et al. 2011. Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. Pages 519-523. *Nature*, vol. 475. England.

Liu YJ, Mason DY, Johnson GD, Abbot S, Gregory CD, Hardie DL, Gordon J, MacLennan IC. 1991. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur J Immunol* 21: 1905-1910.

Loh YH, et al. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Pages 431-440. *Nat Genet*, vol. 38. United States.

Lukacs-Kornek V, Malhotra D, Fletcher AL, Acton SE, Elpek KG, Tayalia P, Collier AR, Turley SJ. 2011. Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes. Pages 1096-1104. *Nat Immunol*, vol. 12. United States.

Luther SA, Ansel KM, Cyster JG. 2003. Overlapping roles of CXCL13, interleukin 7 receptor alpha, and CCR7 ligands in. *J Exp Med* 197: 1191-1198.

Luther SA, Tang HL, Hyman PL, Farr AG, Cyster JG. 2000. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. Pages 12694-12699. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97. United States.

Luther SA, Bidgol A, Hargreaves DC, Schmidt A, Xu Y, Paniyadi J, Matloubian M, Cyster JG. 2002. Differing activities of homeostatic chemokines CCL19, CCL21, and CXCL12 in lymphocyte and dendritic cell recruitment and lymphoid neogenesis. *J Immunol* 169: 424-433.

Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. 2012. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. Pages 1241-1253. *J Exp Med*, vol. 209. United States.

Mackay F, Leung H. 2006. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18: 284-289.

MacLennan IC, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DM, Zuniga E, Cook MC, Vinuesa CG. 2003. Extrafollicular antibody responses. Pages 8-18. *Immunol Rev*, vol. 194. Denmark.

Macpherson AJ, Geuking MB, Slack E, Hapfelmeier S, McCoy KD. 2012. The habitat, double life, citizenship, and forgetfulness of IgA. *Immunol Rev* 245: 132-146.

Maeda K, Kosco-Vilbois MH, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. 1995. Expression of the intercellular adhesion molecule-1 on high endothelial venules and on non-lymphoid antigen handling cells: interdigitating cells, antigen transporting cells and follicular dendritic cells. *Cell Tissue Res* 279: 47-54.

Mandel TE, Phipps RP, Abbot A, Tew JG. 1980. The follicular dendritic cell: long term antigen retention during immunity. *Immunol Rev* 53: 29-59.

Marinkovic T, Garin A, Yokota Y, Fu YX, Ruddle NH, Furtado GC, Lira SA. 2006. Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J Clin Invest* 116: 2622-2632.

Marrack P, Kappler J. 2004. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 22: 765-787.

Martinez-Pomares L, Kosco-Vilbois M, Darley E, Tree P, Herren S, Bonnefoy JY, Gordon S. 1996. Fc chimeric protein containing the cysteine-rich domain of the murine mannose receptor binds to macrophages from splenic marginal zone and lymph node subcapsular sinus and to germinal centers. *J Exp Med* 184: 1927-1937.

Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Huang G, Kim J, Thomas DA, Nahm MH, Chaplin DD. 1997. Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med* 186: 1997-2004.

McCloskey ML, Curotto de Lafaille MA, Carroll MC, Erlebacher A. 2011. Acquisition and presentation of follicular dendritic cell-bound antigen by lymph node-resident dendritic cells. Pages 135-148. *J Exp Med*, vol. 208. United States.

Mebius RE. 2003. Organogenesis of lymphoid tissues. Pages 292-303. *Nat Rev Immunol*, vol. 3. England.

Mebius RE, Kraal G. 2005. Structure and function of the spleen. Pages 606-616. *Nat Rev Immunol*, vol. 5. England.

Mebius RE, Miyamoto T, Christensen J, Domen J, Cupedo T, Weissman IL, Akashi K. 2001. The fetal liver counterpart of adult common lymphoid progenitors gives rise to. *J Immunol* 166: 6593-6601.

Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. Pages 154-159. *Nature*, vol. 427. England.

Miller MJ, Wei SH, Parker I, Cahalan MD. 2002. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. Pages 1869-1873. *Science*, vol. 296. United States.

Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD. 2004a. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. Pages 847-856. *J Exp Med*, vol. 200. United States.

Miller MJ, Hejazi AS, Wei SH, Cahalan MD, Parker I. 2004b. T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. Pages 998-1003. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101. United States.

Mitchell J, Abbot A. 1965. Ultrastructure of the Antigen-retaining Reticulum of Lymph Node Follicles as shown by High-resolution Autoradiography. *Nature* 208: 500-502.

Molenaar R, et al. 2009. Lymph node stromal cells support dendritic cell-induced gut-homing of T cells. Pages 6395-6402. *J Immunol*, vol. 183. United States.

Montes MJ, Aleman P, Garcia-Tortosa C, Borja C, Ruiz C, Garcia-Olivares E. 1996. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 30: 53-66.

Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadia AC, Gonzalez-Gomez F, Ruiz C, Olivares EG. 1995. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 34: 188-194.

Moon JJ, Chu HH, Pepper M, McSorley SJ, Jameson SC, Kedl RM, Jenkins MK. 2007. Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. Pages 203-213. *Immunity*, vol. 27. United States.

Morandi F, Ferretti E, Bocca P, Prigione I, Raffaghello L, Pistoia V. 2010. A novel mechanism of soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of chemotaxis. *PLoS One* 5: e11763.

Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, Woodland DL, Lund FE, Randall TD. 2004. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory. *Nat Med* 10: 927-934.

Mueller SN, Hosiawa-Meagher KA, Konieczny BT, Sullivan BM, Bachmann MF, Locksley RM, Ahmed R, Matloubian M. 2007. Regulation of homeostatic chemokine expression and cell trafficking during immune responses. Pages 670-674. *Science*, vol. 317. United States.

Muller G, Hopken UE, Lipp M. 2003. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. Pages 117-135. *Immunol Rev*, vol. 195. Denmark.

Munoz-Fernandez R, Blanco FJ, Frecha C, Martin F, Kimatrai M, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. 2006. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 177: 280-289.

Muramatsu M, Kinoshita K, Fagarasan S, Yamada S, Shinkai Y, Honjo T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. Pages 553-563. *Cell*, vol. 102. United States.

Nasef A, et al. 2007. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. Pages 231-237. *Transplantation*, vol. 84. United States.

Neyt K, Perros F, GeurtsvanKessel CH, Hammad H, Lambrecht BN. 2012. Tertiary lymphoid organs in infection and autoimmunity. Pages 297-305. *Trends Immunol*, vol. 33. England: 2012 Elsevier Ltd.

Ng F, et al. 2008. PDGF, TGF-beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. Pages 295-307. *Blood*, vol. 112. United States.

Ngo VN, Korner H, Gunn MD, Schmidt KN, Riminton DS, Cooper MD, Browning JL, Sedgwick JD, Cyster JG. 1999. Lymphotoxin alpha/beta and tumor necrosis factor are required for stromal cell expression of homing chemokines in B and T cell areas of the spleen. *J Exp Med* 189: 403-412.

Nhan-Chang C, et al. 2008. A role for CXCL13 (BCA-1) in pregnancy and intra-amniotic infection/inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 21: 763-775.

Nolte MA, Belien JA, Schadee-Eestermans I, Jansen W, Unger WW, van Rooijen N, Kraal G, Mebius RE. 2003. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. Pages 505-512. *J Exp Med*, vol. 198. United States.

Odermatt B, Eppler M, Leist TP, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1991. Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 8252-8256.

Ohl L, Henning G, Krautwald S, Lipp M, Hardtke S, Bernhardt G, Pabst O, Forster R. 2003. Cooperating mechanisms of CXCR5 and CCR7 in development and organization of. *J Exp Med* 197: 1199-1204.

Okada T, Cyster JG. 2006. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. Pages 278-285. *Curr Opin Immunol*, vol. 18. England.

Okada T, Ngo VN, Ekland EH, Forster R, Lipp M, Littman DR, Cyster JG. 2002. Chemokine requirements for B cell entry to lymph nodes and Peyer's patches. *J Exp Med* 196: 65-75.

Okada T, Miller MJ, Parker I, Krummel MF, Neighbors M, Hartley SB, O'Garra A, Cahalan MD, Cyster JG. 2005. Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. Pages e150. *PLoS Biol*, vol. 3. United States.

Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. 1997. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 57: 609-615.

Oliver C, Cowdrey N, Abadia-Molina AC, Olivares EG. 1999. Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 45: 19-30.

Oprea M, Perelson AS. 1997. Somatic mutation leads to efficient affinity maturation when centrocytes recycle back to centroblasts. *J Immunol* 158: 5155-5162.

Palframan RT, et al. 2001. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med* 194: 1361-1373.

Pape KA, Taylor JJ, Maul RW, Gearhart PJ, Jenkins MK. 2011. Different B cell populations mediate early and late memory during an endogenous immune response. Pages 1203-1207. *Science*, vol. 331. United States.

Park CS, Choi YS. 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114: 2-10.

Park CS, Yoon SO, Armitage RJ, Choi YS. 2004. Follicular dendritic cells produce IL-15 that enhances germinal center B cell proliferation in membrane-bound form. *J Immunol* 173: 6676-6683.

Parrott DMV, Sousa MABd, East J, Parrott DMV, Sousa MABd, East J. 1966. THYMUS-DEPENDENT AREAS IN THE LYMPHOID ORGANS OF NEONATALLY THYMECTOMIZED MICE. *The Journal of Experimental Medicine* 123: 191-204.

Pasparakis M, Kousteni S, Peschon J, Kollias G. 2000. Tumor necrosis factor and the p55TNF receptor are required for optimal development of the marginal sinus and for migration of follicular dendritic cell precursors into splenic follicles. *Cell Immunol* 201: 33-41.

Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. 2003. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* 111: 275-283.

Pellas TC, Weiss L. 1990. Deep splenic lymphatic vessels in the mouse: a route of splenic exit for recirculating lymphocytes. *Am J Anat* 187: 347-354.

Pereira JP, Kelly LM, Xu Y, Cyster JG. 2009. EB12 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. Pages 1122-1126. *Nature*, vol. 460. England.

Perros F, et al. 2012. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 311-321.

Phan TG, Grigorova I, Okada T, Cyster JG. 2007. Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells. Pages 992-1000. *Nat Immunol*, vol. 8. United States.

Phillips T, Ni J, Hunt J. 2003. Cell-specific expression of B lymphocyte (APRIL, BlyS)- and Th2 (CD30L/CD153)-promoting tumor necrosis factor superfamily ligands in human placentas. *J Leukoc Biol* 74: 81-87.

Pickard JM, Chervonsky AV. 2010. Sampling of the intestinal microbiota by epithelial M cells. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 331-339.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

Poljak L, Carlson L, Cunningham K, Kosco-Vilbois MH, Siebenlist U. 1999. Distinct activities of p52/NF-kappa B required for proper secondary lymphoid organ microarchitecture: functions enhanced by Bcl-3. *J Immunol* 163: 6581-6588.

Qin D, Wu J, Vora KA, Ravetch JV, Szakal AK, Manser T, Tew JG. 2000. Fc gamma receptor IIB on follicular dendritic cells regulates the B cell recall. *J Immunol* 164: 6268-6275.

Rajewsky K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381: 751-758.

Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. 2010. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med* 28: 17-26.

Randolph DA, Huang G, Carruthers CJ, Bromley LE, Chaplin DD. 1999. The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. Pages 2159-2162. *Science*, vol. 286. United States.

Rangel-Moreno J, Moyron-Quiroz J, Kusser K, Hartson L, Nakano H, Randall TD. 2005. Role of CXC chemokine ligand 13, CC chemokine ligand (CCL) 19, and CCL21 in the. *J Immunol* 175: 4904-4913.

Rangel-Moreno J, Hartson L, Navarro C, Gaxiola M, Selman M, Randall TD. 2006. Inducible bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT) in patients with pulmonary complications of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 116: 3183-3194.

Rangel-Moreno J, Carragher DM, de la Luz Garcia-Hernandez M, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, Kolls JK, Khader SA, Randall TD. 2011. The development of inducible bronchus-associated lymphoid tissue depends on. *Nat Immunol* 12: 639-646.

Reif K, Ekland EH, Ohl L, Nakano H, Lipp M, Forster R, Cyster JG. 2002. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. Pages 94-99. *Nature*, vol. 416. England.

Ren G, et al. 2010. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. Pages 2321-2328. *J Immunol*, vol. 184. United States.

Repass JF, Laurent MN, Carter C, Reizis B, Bedford MT, Cardenas K, Narang P, Coles M, Richie ER. 2009. IL7-hCD25 and IL7-Cre BAC transgenic mouse lines: new tools for analysis of IL-7 expressing cells. *Genesis* 47: 281-287.

Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H. 1995. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod* 52: 609-615.

Riddick DH, Kusmik WF. 1977. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 127: 187-190.

Rolf J, et al. 2010. Phosphoinositide 3-kinase activity in T cells regulates the magnitude of the germinal center reaction. Pages 4042-4052. *J Immunol*, vol. 185. United States.

Roosendaal R, Carroll MC. 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. Pages 157-166. *Immunol Rev*, vol. 219. Denmark.

Roosendaal R, Mebius RE. 2010. Stromal Cell-Immune Cell Interactions. *Annu Rev Immunol*.

Ruiz C, Montes MJ, Abadia-Molina AC, Olivares EG. 1997. Phagocytosis by fresh and cultured human decidual stromal cells: opposite effects of interleukin-1 alpha and progesterone. *J Reprod Immunol* 33: 15-26.

Sainte-Marie G, Peng FS. 1982. [Distribution of a diffusible tracer in the subcapsular sinus and the cortex of lymph nodes in the rat]. *Rev Can Biol Exp* 41: 201-208.

Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. 2010. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 63: 601-610.

Scandella E, Bolinger B, Lattmann E, Miller S, Favre S, Littman DR, Finke D, Luther SA, Junt T, Ludewig B. 2008. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. Pages 667-675. *Nat Immunol*, vol. 9. United States.

Schneider P. 2005. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 17: 282-289.

- Schutze N, Noth U, Schneidereit J, Hendrich C, Jakob F. 2005. Differential expression of CCN-family members in primary human bone. *Cell Commun Signal* 3: 5.
- Schwickert TA, Lindquist RL, Shakhar G, Livshits G, Skokos D, Kosco-Vilbois MH, Dustin ML, Nussenzweig MC. 2007. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. Pages 83-87. *Nature*, vol. 446. England.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of. *Brain Pathol* 14: 164-174.
- Shapiro-Shelef M, Calame K. 2005. Regulation of plasma-cell development. Pages 230-242. *Nat Rev Immunol*, vol. 5. England.
- Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G, Reinhardt DP, Pabst R, Lutz MB, Sorokin L. 2005. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. Pages 19-29. *Immunity*, vol. 22. United States.
- Soderberg KA, Payne GW, Sato A, Medzhitov R, Segal SS, Iwasaki A. 2005. Innate control of adaptive immunity via remodeling of lymph node feed arteriole. Pages 16315-16320. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102. United States.
- Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. 2006a. Isolation of functionally active murine follicular dendritic cells. Pages 81-95. *J Immunol Methods*, vol. 313. Netherlands.
- Sukumar S, Conrad DH, Szakal AK, Tew JG. 2006b. Differential T cell-mediated regulation of CD23 (Fc epsilonRII) in B cells and follicular dendritic cells. Pages 4811-4817. *J Immunol*, vol. 176. United States.
- Surh CD, Sprent J. 2005. Regulation of mature T cell homeostasis. Pages 183-191. *Semin Immunol*, vol. 17. United States.
- Suzuki K, Maruya M, Kawamoto S, Sitnik K, Kitamura H, Agace WW, Fagarasan S. 2010. The sensing of environmental stimuli by follicular dendritic cells promotes immunoglobulin A generation in the gut. Pages 71-83. *Immunity*, vol. 33. United States: 2010 Elsevier Inc.
- Szabo MC, Butcher EC, McEvoy LM. 1997. Specialization of mucosal follicular dendritic cells revealed by mucosal addressin-cell adhesion molecule-1 display. *J Immunol* 158: 5584-5588.

Szakai AK, Holmes KL, Tew JG. 1983. Transport of immune complexes from the subcapsular sinus to lymph node follicles on the surface of nonphagocytic cells, including cells with dendritic morphology. *J Immunol* 131: 1714-1727.

Tabanelli S, Tang B, Gurpide E. 1992. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 337-344.

Tang HL, Cyster JG. 1999. Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284: 819-822.

Tarlinton DM, Smith KG. 2000. Dissecting affinity maturation: a model explaining selection of antibody-forming cells and memory B cells in the germinal centre. Pages 436-441. *Immunol Today*, vol. 21. England.

Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakai AK, Qin D. 2001. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends Immunol* 22: 361-367.

Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF, Szakai AK. 1997. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol Rev* 156: 39-52.

Tsai CC, Su PF, Huang YF, Yew TL, Hung SC. 2012. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. Pages 169-182. *Mol Cell*, vol. 47. United States: 2012 Elsevier Inc.

Tumanov A, Kuprash D, Lagarkova M, Grivennikov S, Abe K, Shakhov A, Drutskaya L, Stewart C, Chervonsky A, Nedospasov S. 2002. Distinct role of surface lymphotoxin expressed by B cells in the organization of secondary lymphoid tissues. Pages 239-250. *Immunity*, vol. 17. United States.

Tumanov AV, Grivennikov SI, Shakhov AN, Rybtsov SA, Koroleva EP, Takeda J, Nedospasov SA, Kuprash DV. 2003. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol Rev* 195: 106-116.

Tumanov AV, Grivennikov SI, Kruglov AA, Shebzukhov YV, Koroleva EP, Piao Y, Cui CY, Kuprash DV, Nedospasov SA. 2010. Cellular source and molecular form of TNF specify its distinct functions in organization of secondary lymphoid organs. Pages 3456-3464. *Blood*, vol. 116. United States.

Turley SJ, Fletcher AL, Elpek KG. 2010. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 10: 813-825.

Tykocinski M, Schinella RA, Greco MA. 1983. Fibroblastic reticulum cells in human lymph nodes. An ultrastructural study. *Arch Pathol Lab Med* 107: 418-422.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*.

Umemoto E, et al. 2012. Constitutive plasmacytoid dendritic cell migration to the splenic white pulp is cooperatively regulated by CCR7- and CXCR4-mediated signaling. Pages 191-199. *J Immunol*, vol. 189. United States.

van de Pavert SA, Mebius RE. 2010. New insights into the development of lymphoid tissues. Pages 664-674. *Nat Rev Immunol*, vol. 10. England.

van de Pavert SA, et al. 2009. Chemokine CXCL13 is essential for lymph node initiation and is induced by retinoic acid and neuronal stimulation. Pages 1193-1199. *Nat Immunol*, vol. 10. United States.

Veiga-Fernandes H, Coles MC, Foster KE, Patel A, Williams A, Natarajan D, Barlow A, Pachnis V, Kioussis D. 2007. Tyrosine kinase receptor RET is a key regulator of Peyer's patch organogenesis. *Nature* 446: 547-551.

Victoria GD, Nussenzweig MC. 2012. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 30: 429-457.

Victoria GD, Schwickert TA, Fooksman DR, Kamphorst AO, Meyer-Hermann M, Dustin ML, Nussenzweig MC. 2010. Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. Pages 592-605. *Cell*, vol. 143. United States: 2010 Elsevier Inc.

Vigano P, Pardi R, Magri B, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. 1994. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers. *Am J Reprod Immunol* 32: 139-145.

von Andrian UH, Mempel TR. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 3: 867-878.

Vondenhoff MF, Greuter M, Goverse G, Elewaut D, Dewint P, Ware CF, Hoorweg K, Kraal G, Mebius RE. 2009. LTbetaR signaling induces cytokine expression and up-regulates lymphangiogenic factors in lymph node anlagen. Pages 5439-5445. *J Immunol*, vol. 182. United States.

Webster B, Ekland EH, Agle LM, Chyou S, Ruggieri R, Lu TT. 2006. Regulation of lymph node vascular growth by dendritic cells. Pages 1903-1913. *J Exp Med*, vol. 203. United States.

Wei SH, Safrina O, Yu Y, Garrod KR, Cahalan MD, Parker I. 2007. Ca²⁺ signals in CD4⁺ T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node. Pages 1586-1594. *J Immunol*, vol. 179. United States.

White A, Carragher D, Parnell S, Msaki A, Perkins N, Lane P, Jenkinson E, Anderson G, Caamano JH. 2007. Lymphotoxin α -dependent and -independent signals regulate stromal organizer cell. *Blood* 110: 1950-1959.

Wilke G, Steinhauser G, Grun J, Berek C. 2010. In silico subtraction approach reveals a close lineage relationship between follicular dendritic cells and BP3(hi) stromal cells isolated from SCID mice. *Eur J Immunol* 40: 2165-2173.

Willard-Mack CL. 2006. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. Pages 409-424. *Toxicol Pathol*, vol. 34. United States.

Withers DR, Kim MY, Bekiaris V, Rossi SW, Jenkinson WE, Gaspal F, McConnell F, Caamano JH, Anderson G, Lane PJ. 2007. The role of lymphoid tissue inducer cells in splenic white pulp development. *Eur J Immunol* 37: 3240-3245.

Wu Y, El Shikh ME, El Sayed RM, Best AM, Szakal AK, Tew JG. 2009. IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int Immunol* 21: 745-756.

Yoon SO, Zhang X, Berner P, Blom B, Choi YS. 2009. Notch ligands expressed by follicular dendritic cells protect germinal center B cells from apoptosis. *J Immunol* 183: 352-358.

Yoshida H, Naito A, Inoue J, Satoh M, Santee-Cooper SM, Ware CF, Togawa A, Nishikawa S. 2002. Different cytokines induce surface lymphotoxin- α on IL-7 receptor- α cells that differentially engender lymph nodes and Peyer's patches. Pages 823-833. *Immunity*, vol. 17. United States.

Yoshino T, Kondo E, Cao L, Takahashi K, Hayashi K, Nomura S, Akagi T. 1994. Inverse expression of bcl-2 protein and Fas antigen in lymphoblasts in peripheral lymph nodes and activated peripheral blood T and B lymphocytes. *Blood* 83: 1856-1861.

Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichenspurner H, Kilic N, Ergun S. 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133: 1543-1551.

Zhang P, Baxter J, Vinod K, Tulenko TN, Di Muzio PJ. 2009. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev* 18: 1299-1308.

Zotos D, et al. 2010. IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. Pages 365-378. *J Exp Med*, vol. 207. United States.

PUBLICACIONES

Human decidual stromal cells secrete C-X-C motif chemokine 13, express B cell-activating factor and rescue B lymphocytes from apoptosis: distinctive characteristics of follicular dendritic cells

R. Muñoz-Fernández^{1,†}, A. Prados^{2,†}, E. Leno-Durán², A. Blázquez³, J.-R. García-Fernández⁴, G. Ortiz-Ferrón², and E.-G. Olivares^{2,3,5,*}

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18100 Armilla, Granada, Spain ²Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain ³Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain ⁴Consulta de Hematología, Hospital de Baza, 18800 Baza, Granada, Spain ⁵Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-958240731; Fax: +34-958249015; E mail: engarcia@ugr.es

Submitted on September 9, 2012; resubmitted on March 22, 2012; accepted on May 8, 2012

BACKGROUND: Decidual stromal cells (DSCs) have classically been considered fibroblastic cells, although their function, cell lineage and origin are not fully understood. We previously demonstrated that human DSCs showed similarities with follicular dendritic cells (FDCs): DSCs expressed FDC-associated antigens, both types of cells are contractile and both are related to mesenchymal stem cells (MSCs). To further characterize DSCs, we investigated whether DSCs and FDCs share any distinctive phenotypical and functional characteristics.

METHODS: Human FDC lines were obtained from tonsillectomy samples, human DSC lines from elective termination of pregnancy samples and human MSC lines from bone marrow aspirates. We isolated DSC, FDC and MSC lines and compared their characteristics with flow cytometry and enzyme-linked immunosorbent assay. Cell lines were cultured with tumour necrosis factor (TNF) and lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$, cytokines involved in FDC differentiation. Cell lines were also differentiated in culture after exposure to progesterone and cAMP, factors involved in the differentiation (decidualization) of DSC.

RESULTS: Like MSCs, DSCs and FDCs expressed MSC-associated antigens (CD10, CD29, CD54, CD73, CD106, α -smooth muscle actin and STRO-1) and lacked CD45 expression, and all three types of cell line showed increased expression of CD54 (ICAM-1) and CD106 (VCAM-1) when cultured TNF and LT $\alpha_1\beta_2$. DSCs and FDCs, however, exhibited characteristics not observed in MSCs: DSCs expressed FDC-associated antigens CD14, CD21 and CD23, B cell-activating factor and secreted C-X-C motif chemokine 13. Moreover, DSC lines but not MSC lines inhibited the spontaneous apoptosis of B lymphocytes, a typical functional attribute of FDC. During culture with progesterone and cAMP, FDCs, like DSCs but in contrast to MSCs, changed their morphology from a fibroblastic to a rounder shape, and cells secreted prolactin.

CONCLUSIONS: Our results suggest that DSCs and FDCs share a common precursor in MSCs but this precursor acquires new capacities when it homes to peripheral tissues. We discuss these shared properties in the context of immune–endocrine regulation during pregnancy.

Key words: decidual stromal cells / follicular dendritic cells / mesenchymal stem cells / C-X-C motif chemokine 13 / B cell-activating factor

[†]These authors contributed equally to the work.

Introduction

Decidual tissue, the maternal component of the maternal–fetal interface, is composed predominantly of typical stromal-type cells as well as glandular cells and leucocytes (Bulmer, 1995). Decidual stromal cells (DSCs) constitute a distinctive stromal cell class that is thought to exert nutritive, endocrine and immune functions that play a key role in embryo implantation and trophoblast development (Zhu et al., 2009). The origin and cell lineage of DSCs are, however, not fully defined. DSCs originate from the proliferation and differentiation (decidualization) of fibroblast-like stromal cell precursors that are detectable in the endometrium (Richards et al., 1995). During the luteal phase of the menstrual cycle, or if pregnancy occurs, DSCs are induced to decidualize by progesterone and other hormones. Decidualized cells become rounder, express desmin in their cytoplasm and secrete prolactin (PRL; Tabanelli et al., 1992). Inflammatory and Th1 cytokines, however, inhibit decidualization (Kanda et al., 1999), which is evidence that this process is regulated by immune and endocrine factors. Furthermore, DSCs support the survival of natural killer cells (NKs) and T lymphocytes (Blanco et al., 2009) and are able to regulate the decidual immune responses that may lead to either a successful pregnancy or abortion (Olivares et al., 1997; Kimatrai et al., 2003, 2005; Blanco et al., 2008).

We have been able to isolate and maintain highly purified cultures of DSCs, which has allowed us to demonstrate that human DSCs share some characteristics with follicular dendritic cells (FDCs; Montes et al., 1996; Muñoz-Fernández et al., 2006). FDCs are also stromal cells that exert a supportive activity for B lymphocytes. FDCs are located in the secondary lymphoid organ B-zone, where

they capture and retain native antigens on their cell membrane for prolonged periods to present them to B lymphocytes during the secondary response (El Shikh et al., 2010). Although apparently distinct, DSCs and FDCs are both stromal cells with haematopoietic cell supportive activity, express α -smooth muscle actin (α -SM actin) and exhibit contractile activity (Oliver et al., 1999; Kimatrai et al., 2003, 2005; Muñoz-Fernández et al., 2006). Both types of cell are closely related to mesenchymal stem cells (MSCs; Garcia-Pacheco et al., 2001; Muñoz-Fernández et al., 2006), which suggests that DSCs and FDCs both derive from bone marrow MSCs. Furthermore, DSCs and FDCs are detected in ectopic locations in immune-mediated diseases. Ectopic FDC formation occurs in a number of autoimmune diseases and chronic inflammatory situations (Lindhout et al., 1999), and endometrial stromal cells (the endometrial equivalent of DSCs) are detected in ectopic locations in endometriosis, a gynaecological disease with a significant immune component (Hever et al., 2007).

Pregnancy modulates the immune system of the mother in order to avoid fetal rejection. This implies changes in decidual immune responses, in which DSCs appear to be involved (Olivares et al., 1997; Kimatrai et al., 2003, 2005; Blanco et al., 2008). In this connection, a recent report showed that FDCs are also involved in the induction of maternal–fetal tolerance in mice (McCloskey et al., 2011). In the present study we show that although DSCs and FDCs expressed MSC-associated antigens, DSCs and FDCs shared some of each other's distinctive features such as (i) the expression of B cell-activating factor (BAFF) belonging to the tumour necrosis factor (TNF) family, (ii) C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13) secretion and the capacity to rescue B cells from apoptosis (properties typical of

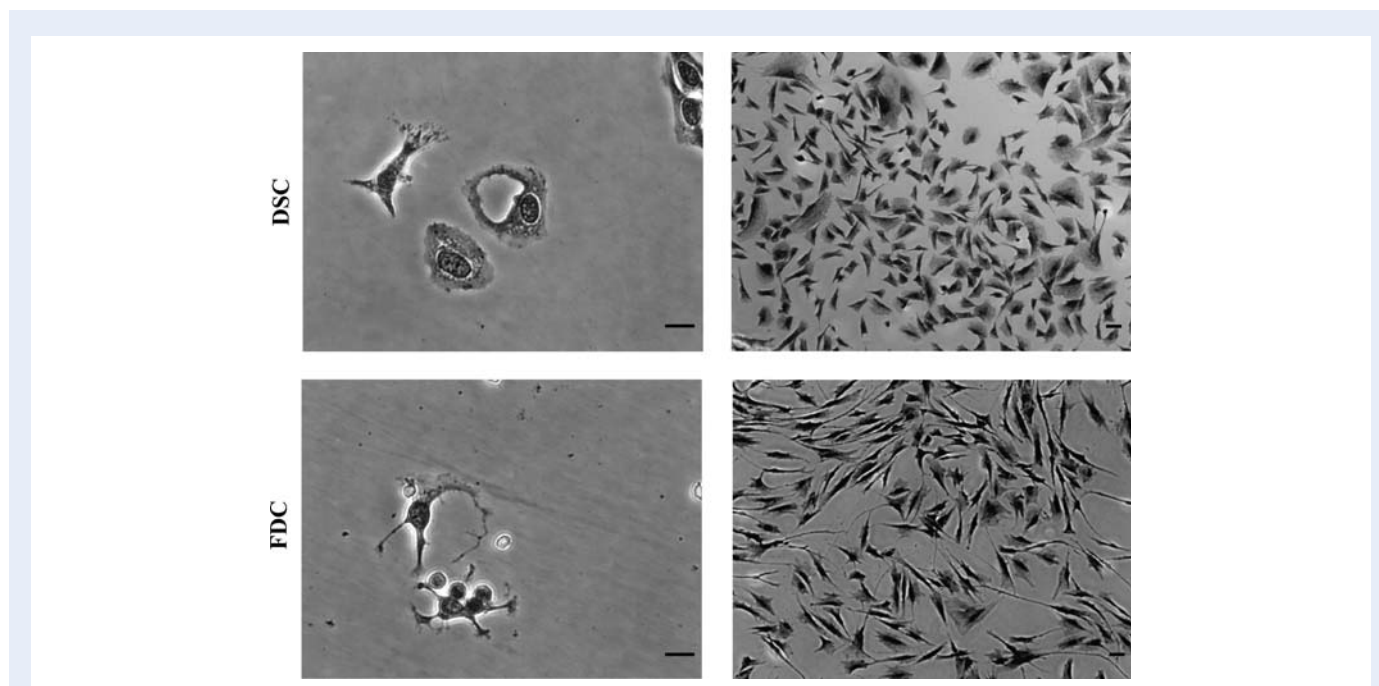


Figure 1 Fresh and cultured human DSCs and FDCs. Fresh DSCs and FDCs (left) were observed 24 h after isolation (bar: 50 μ m). FDC exhibited a dendritic morphology with clustered lymphoid cells. After 1 week of culture (right), non-adherent cells died in both preparations, and DSCs and FDCs showed a more polygonal/fibroblastic morphology (bar: 100 μ m). After 2 weeks of culture, both types of cell lines exhibited a uniformly fibroblastic morphology (see Fig. 6). This experiment was performed independently four times.

FDCs; Buettner *et al.*, 2010) and (iii) prolactin (PRL) secretion (a property typical of DSCs). None of these characteristics were found in MSCs. We discuss the implications of these shared properties in the context of immune-endocrine regulation during pregnancy.

Materials and Methods

Samples

For the FDC lines, tonsil samples were obtained from patients who underwent tonsillectomy for recurrent tonsillitis at the Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, Spain). Patients (3–10 years old) were in complete remission before surgery. Informed consent was obtained

from the parents or guardians of each patient. For the DSC lines, samples from elective vaginal terminations of first-trimester pregnancies (6–11 weeks) were obtained from healthy women aged 20–30 years. We excluded women who were using any medication or with infectious, autoimmune or other systemic or local disease. None of the abortions were pharmacologically induced. The specimens were obtained by suction curettage at the Clínica El Sur in Málaga or the Clínica Ginegranada in Granada. Informed consent was obtained from each woman. For the MSC lines, leftover samples of bone marrow aspirates from haematologically normal donors at the Hospital de Baza, in Baza, Granada, were obtained after donors had provided informed consent. This study was approved by the Research and Ethics Committee of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves and by the Ethics Committee of the University of Granada.

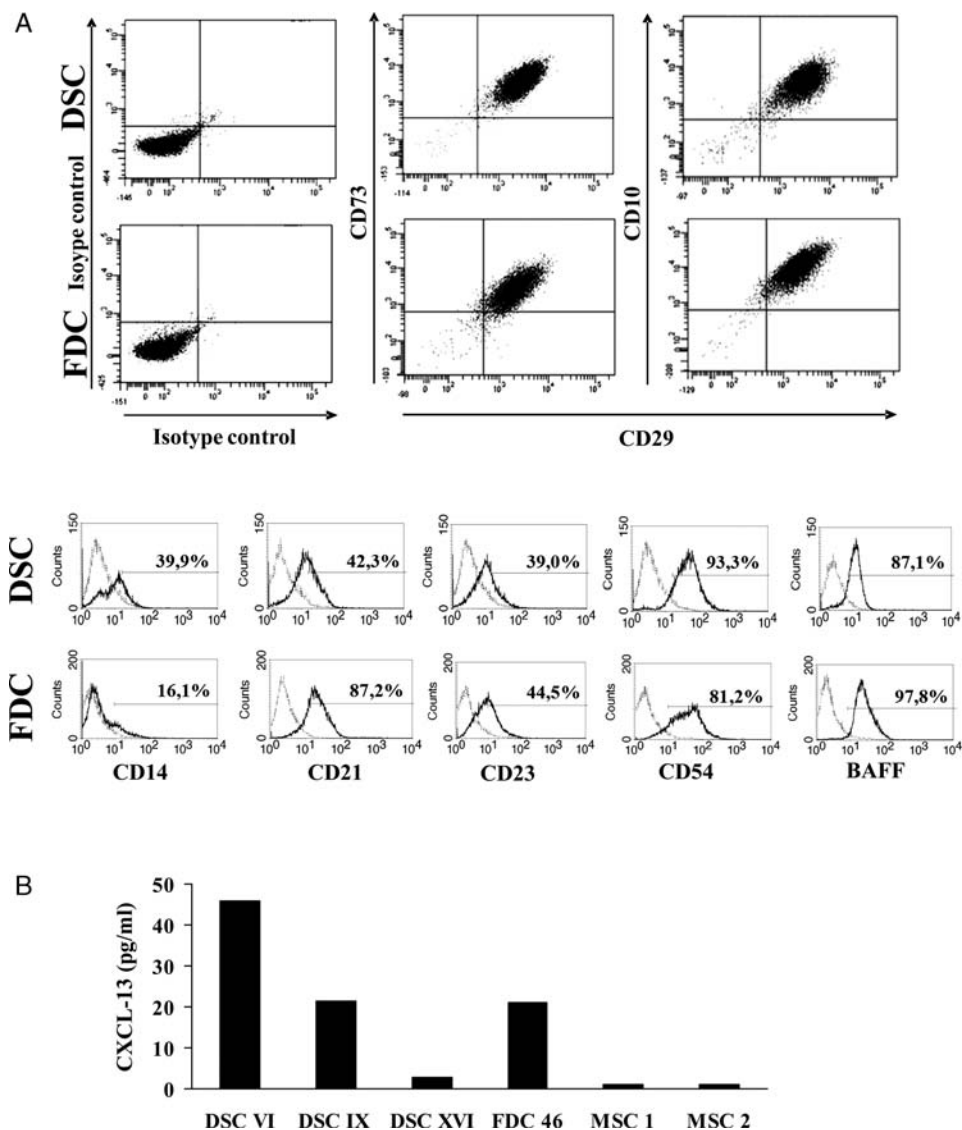


Figure 2 Antigen expression and C-X-C motif chemokine 13 (CXCL13) secretion by human DSCs and FDCs. **(A)** Flow cytometry analysis of antigen expression. Almost all DSCs and FDCs were positive for CD10, CD29 and CD73. Both types of cell expressed FDC markers CD14, CD21, CD23, CD54 and BAFF (intracellular). Isotype control (---); mAb (—). Percentages show the proportion of cells expressing the antigen. This experiment was performed independently three times. **(B)** Secretion of CXCL13 by different DSC, FDC and MSC lines.

Monoclonal antibodies

The monoclonal antibodies (mAbs) used in this study were CD10-phycoerythrin conjugated (PE), CD14-fluorescein isothiocyanate (FITC), CD21-PE, CD23-FITC, CD29-FITC, CD45-FITC, CD73-PE, ICAM-1-FITC (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), VCAM-1-FITC, BAFF-FITC, CXCL13-Alexa Fluoro[®] 750, STRO-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and anti- α -SM actin FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The isotype controls used were immunoglobulin (Ig)M, IgG1-FITC, IgG1-PE or IgG1-APC (Sigma-Aldrich) and IgG2-FITC or IgG2-PE (Caltag Laboratories).

Isolation and culture of DSC, FDC and MSC lines

To establish DSC and FDC lines, we used the method described by Montes *et al.* (1995) and Muñoz-Fernández *et al.* (2006). Briefly, tissues were thoroughly washed in phosphate-buffered saline (PBS) and finely minced between two scalpels in a small volume of PBS. The suspension was put in a solution of 5 mg/ml Collagenase V (Sigma-Aldrich) for 30 min for DSCs and 2 h for FDCs at 37°C. The suspension was diluted in PBS, filtered through gauze and centrifuged at 425g for 10 min. The supernatant was discarded and the cell pellet was suspended in PBS and centrifuged on Ficol-Paque (Sigma-Aldrich) for 20 min at 600g. To establish MSC lines, bone marrow aspirates were directly diluted in PBS and centrifuged on Ficol-Paque. Tonsil, decidual or bone marrow cells were collected from the interface, suspended in PBS and washed. The resulting suspension was incubated in culture flasks for 24 h at 37°C in Opti-MEM (minimum essential medium; Invitrogen, Grand Island, NY) supplemented with 3% fetal calf serum (FCS), 100 IU/ml penicillin, 100 IU/ml streptomycin and 0.25 μ g/ml amphotericin (Sigma-Aldrich). After overnight incubation to allow adherent cells to attach to the flask, non-adherent cells in the supernatant were discarded. The medium was then replaced and changed twice a week. After 1–3 weeks, adherent cells were morphologically uniform and covered the whole surface of the 25 cm² culture flask. Although the different cell lines are referred to generically as DSCs, FDCs or MSCs, in those experiments in which several lines of the same type of cells were included, we used a specific name for each line (DSC MOR, DSC VI, DSC IX, DSC XVI, DSC I, FDC46, FDC13H, FDC12V, FDC1S, MSC1 and MSC2).

Isolation of fresh DSCs

To obtain a fresh cell suspension containing DSCs, we used a protocol similar to that reported by Montes *et al.* (1996). The decidua was washed in PBS and minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 with 10% FCS. The suspension was put in a solution of 5 mg/ml Collagenase V (Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. This preparation was filtered through sterile gauze, washed by centrifugation and suspended in the culture medium. The cell suspension was centrifuged at 650g for 30 min over a discontinuous gradient of 20 and 30% Percoll (Sigma-Aldrich). Cells were collected from the 20/30% interphase and washed in PBS. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Only preparations with >95% viable cells were used.

Preparation of purified B cells

Tonsil B lymphocytes were purified from the supernatant obtained in the preparation of FDCs using the Human B Cell Isolation kit (R&D Systems). The purity of the B lymphocyte preparations was higher than 95%.

Flow cytometric analysis

Cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37°C. The cells were centrifuged, the supernatant was discarded and

the pellet was suspended in PBS at 10⁶ cells/ml. Cell suspension of 100 μ l was incubated with 5 μ l of the appropriate mAbs for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed, suspended in 0.5 ml of PBS and immediately analysed in an FACScan cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The percentage of Ab-positive cells was calculated by comparison with the appropriate isotype control. For double labelling, we followed the same procedure as for single labelling but a second mAb with a different fluorescent marker was also added. For intracytoplasmic labelling, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized with cold 0.05% PBS saponine (Merck, Darmstadt, Germany) before the mAbs was added. For indirect labelling, FITC-labelled goat anti-mouse Ig was added after the first mAbs.

Detection of apoptotic tonsil B lymphocytes co-cultured with DSCs, FDCs or MSCs

DSC, FDC or MSC lines in the exponential growth phase were plated on 6-well plates on the bottom surface of Transwell plates (Corning Incorporated, New York, NY, USA) at 5 \times 10⁴ cells/well. The culture medium was removed and 2 ml of a suspension of 5 \times 10⁴ B lymphocytes in a complete Opti-MEM culture medium was added directly to the FDCs, DSCs or MSCs, or to the upper compartment of Transwell plates, and incubated at 37°C for 72 h. All B lymphocytes were collected from the supernatant, and to identify apoptotic cells we used the method described by Gong *et al.* (1994). Briefly, cells were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol and then stained with propidium iodide during treatment with RNase (Sigma-Aldrich). Quantitative analysis of sub-G1 cells was carried out in an FACScan cytometer.

Treatment of DSC, FDC and MSC lines

DSC, FDC or MSC lines were cultured for 72 h with 10 ng/ml TNF (Sigma-Aldrich) and 10 ng/ml lymphotoxin (LT) $\alpha_1\beta_2$ (Sigma-Aldrich), two cytokines involved in the differentiation of FDCs. To induce decidualization, DSC, FDC or MSC lines were treated with 300 nm progesterone and 500 μ m cAMP (Sigma-Aldrich) for 15 days.

Table I Antigen expression by DSC, FDC and MSC lines.

Antigens	DSC (n = 10)	FDC (n = 10)	MSC (n = 5)
CD10	+++ ^a	+++	+++
CD14	+/-	+	-
CD21	++	+++	-
CD23	++	++	-
CD29	+++	+++	+++
CD45	-	-	-
CD54	+++	+++	+
CD73	+++	+++	+++
CD106	+/-	+/-	+/-
α -SM actin	+++	+++	+++
BAFF	+++	+++	-
CXCL13	+++	+++	-
STRO-1	++	++	++

n, number of cell lines analysed.

^aFlow cytometry reactions: +++ , 67–100% positive cells; ++ , 34–66%; + , 5–33%; +/- , some lines positive and some negative.

Analysis of culture supernatants

The concentration of CXCL13 in supernatants from DSC, FDC or MSC cultures was established by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; R&D Systems). To determine the concentration of PRL, supernatants from cultures of DSCs, FDCs or MSCs treated with progesterone and 8-bromo-cAMP were collected. The presence of PRL was determined with an ELISA (Roche, Basel, Switzerland).

Statistical analysis

Quantitative experiments were performed in triplicate or quadruplicate. The data were analysed with Microsoft Excel 2003 (Microsoft Ibérica, Seville, Spain). Student's *t*-test was used to compare the results. Values of $P < 0.05$ were considered significant. The figures show results for a

single experiment, which is representative of three or more separate assays.

Results

DSCs exhibit distinctive characteristics of FDCs

After 24 h of culture, polygonal and rounded adherent cells appeared in decidua preparations, whereas in tonsil preparations, adherent cells showed a dendritic morphology and were associated with attached lymphoid cells. After 1 week of culture, lymphoid cells bound to FDC detached or died and cultures of DSCs and FDCs formed

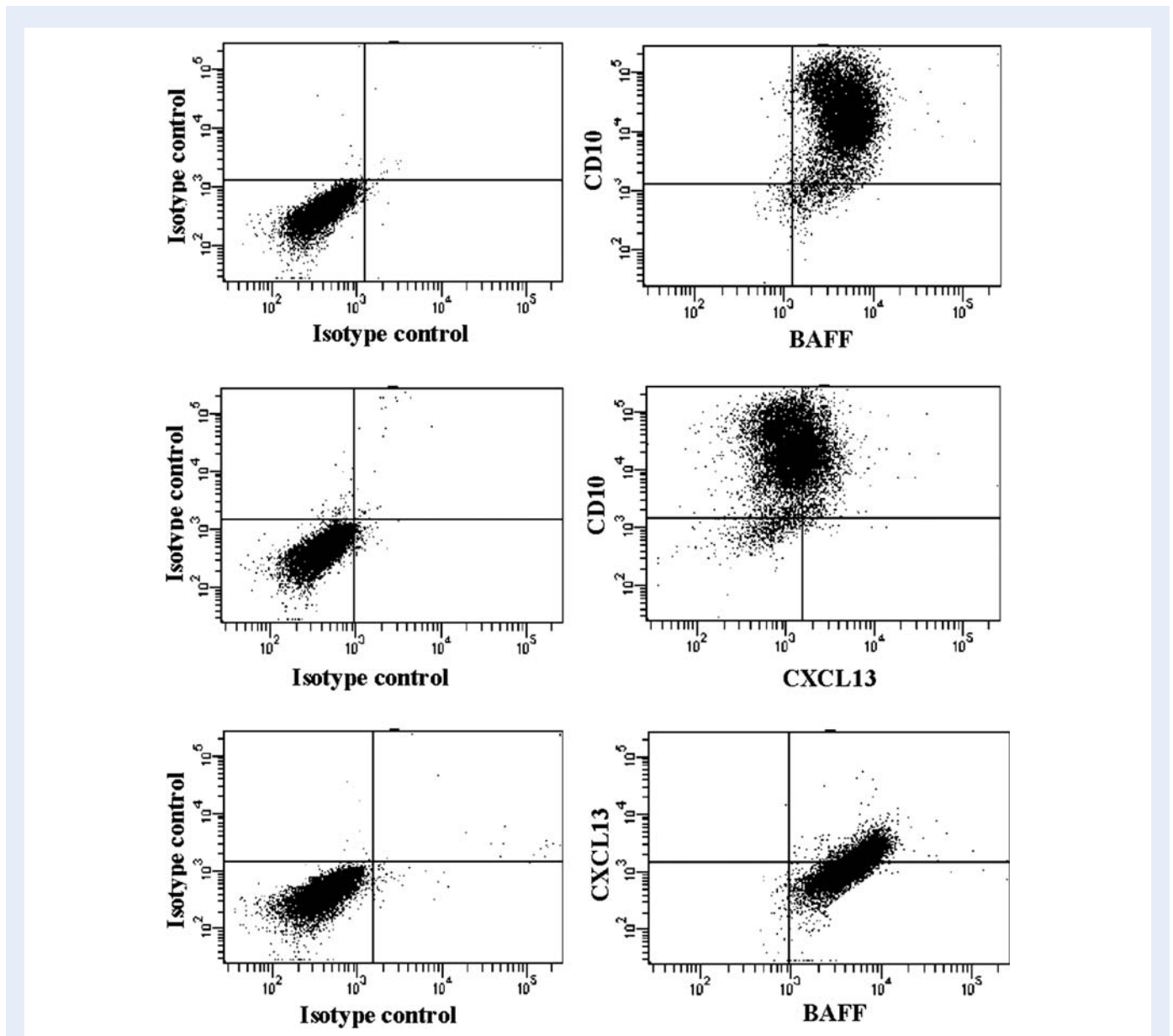


Figure 3 BAFF and CXCL13 expression by fresh human DSCs. Fresh DSCs were isolated by Percoll gradients and electronically selected by the expression of CD10. Most fresh CD10⁺ DSCs were positive for BAFF, and a proportion of them also expressed CXCL13. This experiment was performed independently three times.

uniform populations of adherent cells with a fibroblastic morphology (Fig. 1). In both types of cell lines, almost all cells were positive for CD10, CD29, CD73 and α -SM actin, and lacked CD45; a proportion of them also expressed CD14, CD21, CD23, CD54 (ICAM-1), CD106, BAFF, CXCL13 and STRO-1, and secreted CXCL-13 (Fig. 2, Table I). Flow cytometric analysis of Percoll-isolated low-density decidual cells gated by CD10 expression revealed the presence of cells that, like cultured DSCs and FDCs, expressed BAFF and CXCL13 (Fig. 3).

Table I shows that DSCs, FDCs and MSCs expressed the MSC-associated antigens CD10, CD29, CD54, CD73, CD106, α -SM actin and STRO-1, and lacked CD45. However, unlike DSCs and FDCs, MSCs did not express BAFF or CXCL13, and did not secrete CXCL13. We also found that the FDC-associated antigens CD14, CD21 and CD23 were absent from MSC lines (Fig. 2, Table I).

Treatment of DSCs, FDCs and MSCs with TNF and $LT\alpha_1\beta_2$

Like FDC, DSC and MSC lines treated with TNF and $LT\alpha_1\beta_2$ also increased their expression of CD54 and CD106 (Fig. 4).

Effect of DSCs, FDCs and MSCs on B lymphocyte apoptosis

Like FDCs, DSCs (but not MSCs) inhibited the spontaneous apoptosis of tonsil B lymphocytes (Fig. 5A and B). When FDCs were co-cultured with B lymphocytes in Transwell plates, the protective effect of FDCs on B cells disappeared (Fig. 5C). Likewise, the protective activity of DSCs on B cells was also abrogated in Transwell plate cultures, which demonstrates that this effect also requires DSC-B cell contact (Fig. 5C).

Decidualization of DSCs and FDCs with progesterone and cAMP

Like DSCs, progesterone and cAMP changed the morphology of FDCs and induced PRL secretion (Fig. 6). However, the amount of PRL secreted by FDCs was much lower than that secreted by DSCs ($P < 0.0001$; Fig. 6B). MSC lines cultured with progesterone and cAMP did not secrete PRL (Fig. 6).

Discussion

In an earlier characterization of DSCs, we reported that these cells expressed FDC antigens (Montes et al., 1996). We demonstrated

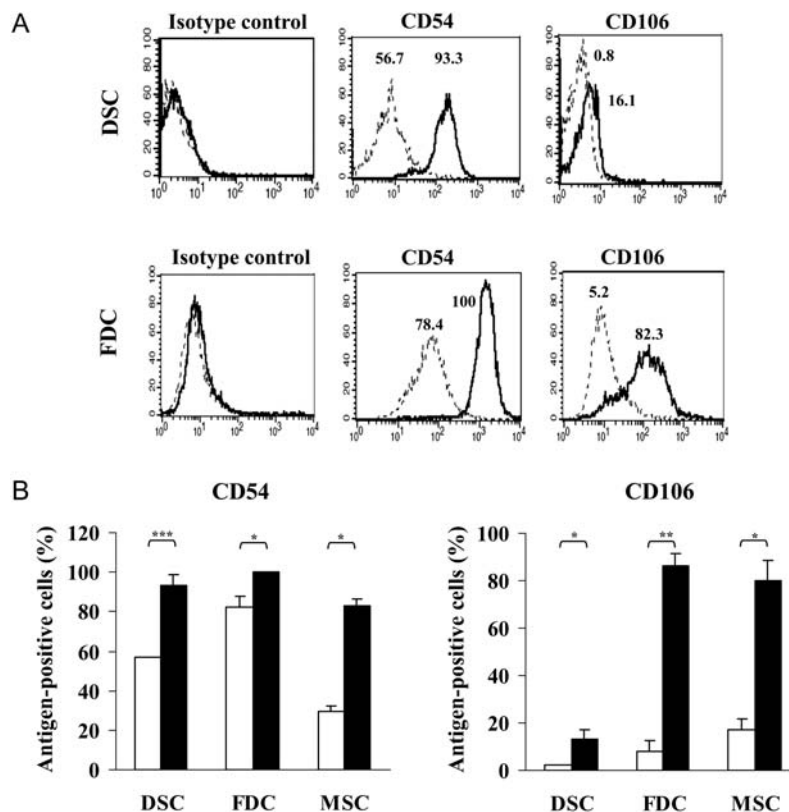


Figure 4 Treatment of human DSCs, FDCs and MSCs with TNF and lymphotoxin ($LT\alpha_1\beta_2$). TNF and $LT\alpha_1\beta_2$ increased the expression of CD54 and CD106 by DSC, FDC and MSC lines. (A) Without cytokines (---); with cytokines (—). Percentages show the proportion of cells expressing the antigen. (B) Bars show the percentage of cells expressing the antigen. White bars: untreated cells; black bars: cells treated with cytokines (mean \pm SD). This experiment was performed independently three times. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$.

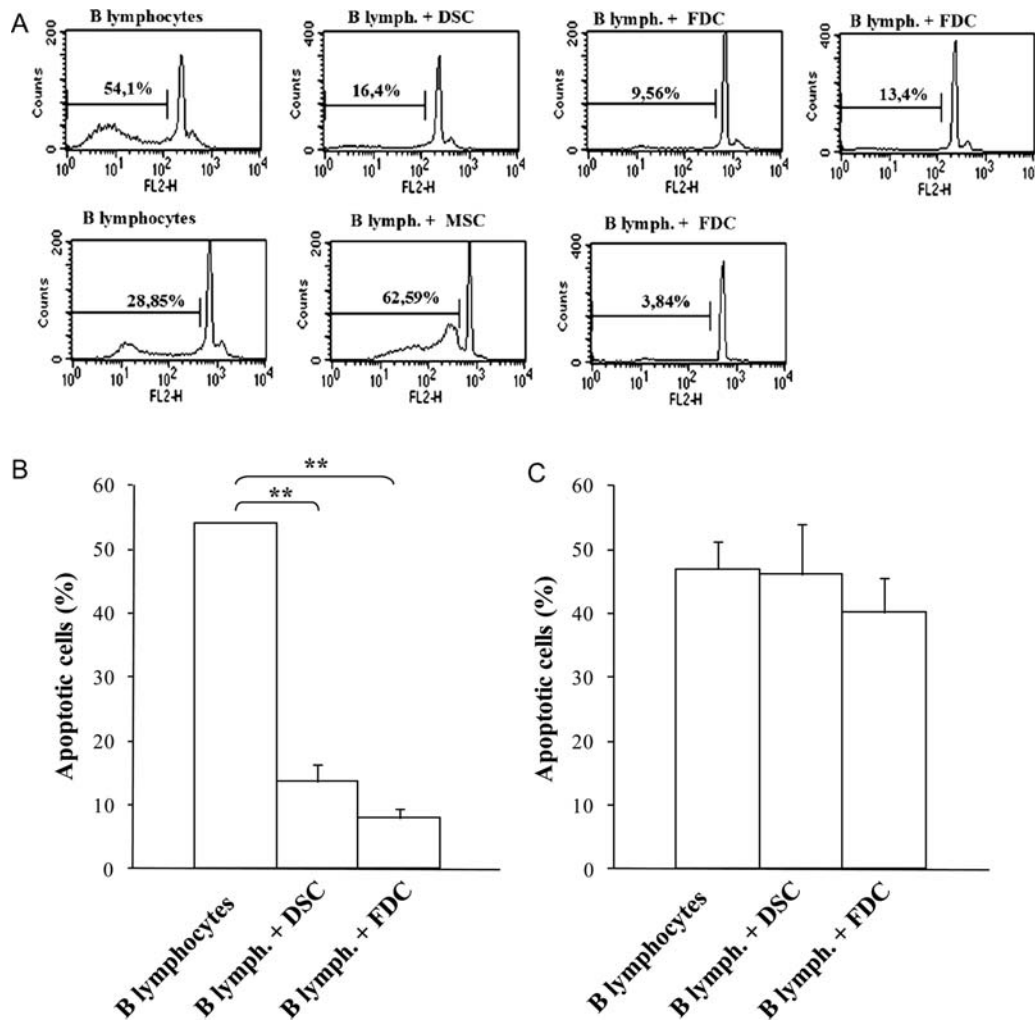


Figure 5 Human DSCs and FDCs, but not MSCs, rescue B cells from spontaneous apoptosis. **(A)** Apoptosis of tonsil B cells cultured without or with DSCs, FDCs or MSCs was studied by quantitative flow cytometry analysis of sub-G1 cells. This experiment was performed independently three times. **(B)** DSCs and FDCs significantly decreased the spontaneous apoptosis of B cells (mean \pm SD of three independent experiments). $**P < 0.005$. **(C)** Culture in Transwell plates abrogated the protective effect of DSCs or FDCs against B cell apoptosis (mean \pm SD of three independent experiments).

that DSC and FDC lines exhibited an antigen phenotype and functional properties equivalent to those of their corresponding fresh cells (Montes *et al.*, 1996, Garcia-Pacheco *et al.*, 2001, Muñoz-Fernandez *et al.*, 2006). Subsequently, we studied the relationships of both types of cells with myofibroblasts (Oliver *et al.*, 1999; Kimatrai *et al.*, 2003, 2005). We also found that DSCs and FDCs were closely related to MSCs, and that this supported the hypothetical origin of the two former types of cells from MSCs (Garcia-Pacheco *et al.*, 2001, Muñoz-Fernandez *et al.*, 2006). The present study confirms the close relationships between DSCs, FDCs and MSCs, because all three cell types expressed the MSC-associated antigens CD10, CD29, CD54, CD73, CD106, α -SM actin and STRO-1, and lacked CD45 expression (Table I; Chamberlain *et al.* 2007). CD10 is also considered a clinical marker of endometrial stromal cells or DSCs (Sumathi and McCluggage, 2002). Furthermore, TNF and LT α ₁ β ,

increased CD54 and CD106 expression in all three types of cells (Fig. 4).

DSCs and FDCs, however, shared some distinctive phenotypical and functional features which were not detected in MSCs. Of these differential properties observed in DSC and FDC lines, PRL secretion during culture with progesterone and cAMP (Fig. 6) is a typical characteristic of DSCs (Tabanelli *et al.*, 1992; Montes *et al.*, 1995), whereas CD14, CD21, CD23, BAFF, CXCL13 expression, the secretion of CXCL13 (Fig. 2, Table I) and the capacity to rescue tonsil B lymphocytes from apoptosis (Fig. 5) are considered distinctive characteristics of FDCs (Lindhout *et al.*, 1997; Park and Choi, 2005; Buettner *et al.*, 2010). Furthermore, we confirmed, as previously reported (Kim *et al.*, 1995), that this latter activity required FDC-B cell contact; likewise, DSCs also required DSC-B contact to inhibit B cell apoptosis (Fig. 5C). We found, however, that the capacity of these DSC lines

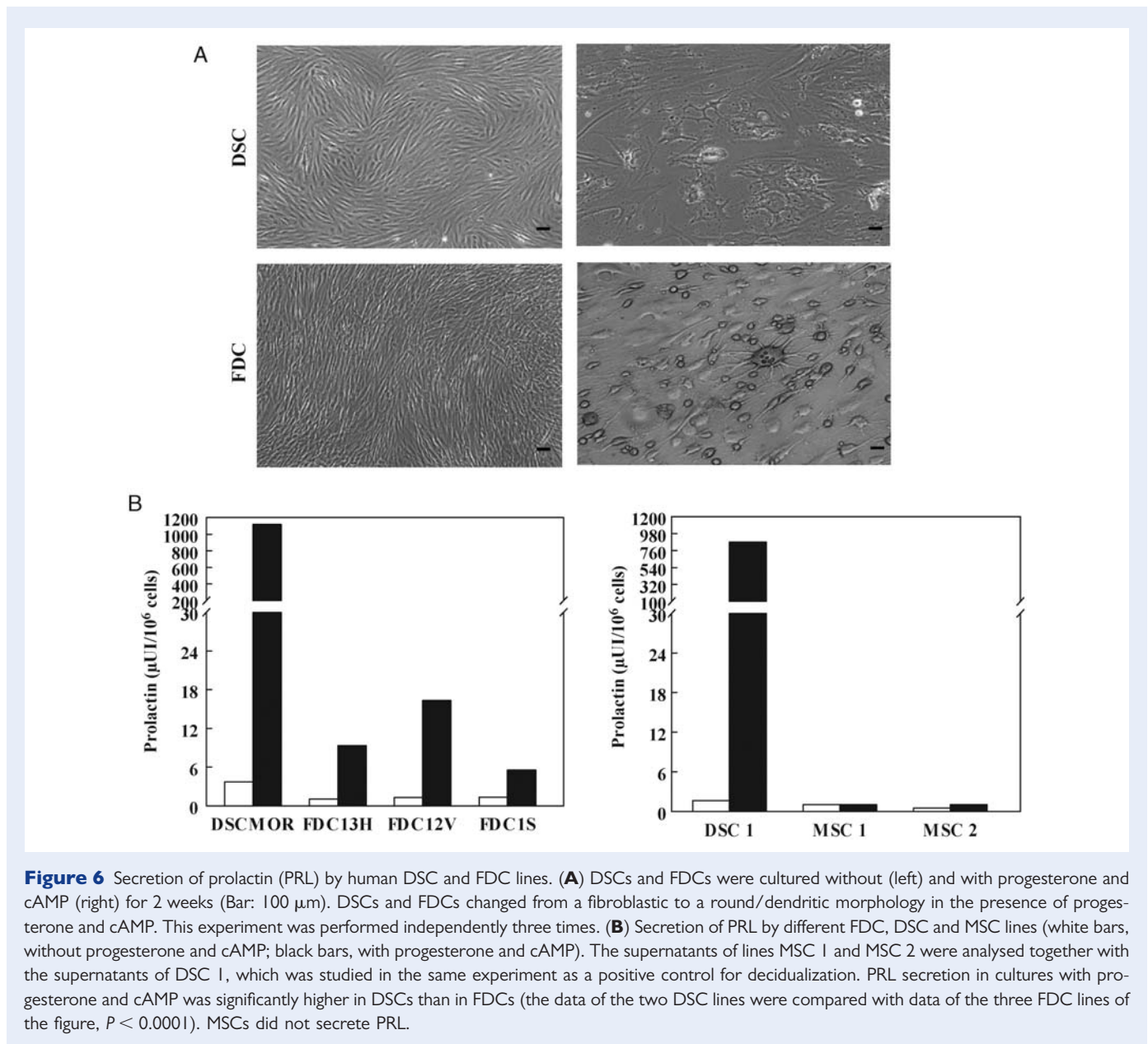


Figure 6 Secretion of prolactin (PRL) by human DSC and FDC lines. **(A)** DSCs and FDCs were cultured without (left) and with progesterone and cAMP (right) for 2 weeks (Bar: 100 μ m). DSCs and FDCs changed from a fibroblastic to a round/dendritic morphology in the presence of progesterone and cAMP. This experiment was performed independently three times. **(B)** Secretion of PRL by different FDC, DSC and MSC lines (white bars, without progesterone and cAMP; black bars, with progesterone and cAMP). The supernatants of lines MSC 1 and MSC 2 were analysed together with the supernatants of DSC 1, which was studied in the same experiment as a positive control for decidualization. PRL secretion in cultures with progesterone and cAMP was significantly higher in DSCs than in FDCs (the data of the two DSC lines were compared with data of the three FDC lines of the figure, $P < 0.0001$). MSCs did not secrete PRL.

to secrete CXCL13 *in vitro* varied (Fig. 2B). Nevertheless, it should be taken into account that DSC lines, like FDC and MSC lines, are normal cells that do not exhibit the *in vitro* uniformity characteristic of tumour cell lines. The FDC properties detected in the DSC lines are, however, associated with B cell functions (El Shikh *et al.*, 2010), yet B cells are absent from the human decidua (Bulmer, 1995). Interactions between B cells and DSCs may play a role in pathological situations such as the development of uterine B cell lymphomas (Alvarez *et al.*, 1997), infections during pregnancy and inflammation (Nhan-Chang *et al.*, 2008). Nevertheless, the *in vitro* effects of DSCs on B cells may reflect physiological effects of DSC factors on other types of decidual lymphocytes, as these factors may operate on different types of immune cells (Blanco *et al.*, 2009).

High levels of CXCL13 were detected in the decidua and plasma of pregnant women (Nhan-Chang *et al.*, 2008), and according to our results (Fig. 2), DSCs may contribute to the secretion of CXCL13

during pregnancy. Moreover, CXCL13 is a chemokine for regulatory T cells (Lee *et al.*, 2006), and these cells have been detected in human decidua and appear to play a key role in maternal–fetal immune tolerance (Leber *et al.*, 2010). BAFF, a cytokine expressed by FDCs, participates in the rescue of B lymphocytes from apoptosis in the lymphoid follicle, and plays an important role in tolerance modulation and B cell homeostasis (Gorelik *et al.*, 2003). In normal decidua, with no B cells to rescue, the BAFF secreted by DSCs may be involved in the induction of a Th2 response (Phillips *et al.*, 2003; Langat *et al.*, 2008), which is the immune response associated with normal pregnancy (Saito *et al.*, 2010), and in the inhibition of decidual T cell and NK cell apoptosis (Mackay and Leung, 2006; Blanco *et al.*, 2009). Interestingly, mesenchymal cells of the trophoblast are also an important source of BAFF, although, as in the decidua, there are no B cells in this fetal tissue (Langat *et al.*, 2008). The BAFF cytokine is also associated with immune-mediated

obstetric and gynaecological pathologies such as endometriosis, in which high levels of BAFF have been detected (Hever *et al.*, 2007), and also with recurrent spontaneous abortions, in which the expression of BAFF in the decidua and trophoblasts was found to be reduced (Guo *et al.*, 2008).

FDCs and DSCs also shared properties when they were treated with TNF and $LT\alpha_1\beta_2$. These cytokines are differentiation factors for FDCs (Fu and Chaplin, 1999), and they increase the expression of CD54 and CD106, molecules involved in FDC-B cell interactions (Muñoz-Fernandez *et al.*, 2006; Fig. 4). Likewise, TNF- and $LT\alpha_1\beta_2$ -treated DSCs also increased their expression of CD54 and CD106, a property that was also observed in MSCs (Fig. 4; Ren *et al.*, 2010). These molecules, which are highly inducible by cytokines, may be associated with relevant functions of these cells in their respective tissues. Interestingly, CD54 plays a role in DSC physiology, regulating the interaction of DSCs with decidual NK cells (Vigano *et al.*, 1994). Furthermore, the expression of CD54 and CD106 by DSCs may be related to immunosuppressive activity and the maintenance of maternal–fetal tolerance (Blanco *et al.*, 2008) as shown in MSCs (Ren *et al.*, 2010). On the other hand, DSCs differentiate (decidualize) under the effects of progesterone and other hormones. During the luteal phase of the menstrual cycle, or if pregnancy occurs, DSCs or their endometrial counterpart, endometrial stromal cells, are induced to decidualize. The decidualized cells become rounder, express desmin in their cytoplasm and secrete PRL (Tabanelli *et al.*, 1992; Montes *et al.*, 1996; Fig. 6). Locally secreted PRL may modulate the mother's immune responses (Draca, 1995). Like DSCs, FDCs (but not MSCs) also became rounder and secreted PRL (Fig. 6) under the effects of progesterone and cAMP. Prolactin locally produced by FDCs as a result of the effects of pregnancy hormones may modulate B cell functions (Peeva *et al.*, 2003). In this connection, a recent report showed that FDCs are involved in the induction of tolerance to fetal antigens that occurs during pregnancy (McCloskey *et al.*, 2011). Thus, pregnancy regulates the mother's immune response, and DSCs and FDCs may be involved in these homeostatic endocrine–immune mechanisms.

We cannot assert, however, that FDCs and DSCs are the same type of cells. Although FDCs and DSCs share many characteristics, they also exhibit differences. For example, the amount of PRL secreted by FDCs was significantly lower than that secreted by DSCs (Fig. 6B). What our results suggest is the existence of a common precursor related to MSCs. This hypothesis is supported by the finding of DSCs or FDCs in ectopic locations in immune-mediated diseases (Lindhout *et al.*, 1999; Hever *et al.*, 2007). Under physiological conditions, the common precursor may home either to the secondary lymphoid organs or to the endometrium to develop, respectively, into FDCs or DSCs, acquiring new phenotypical and functional properties such as the expression of BAFF, PRL and CXCL13 secretion, and the ability to rescue B or other lymphocytes when it emigrates to different peripheral tissues. This MSC precursor, however, may also home to ectopic tissues in certain immune diseases.

Acknowledgements

We are grateful to the Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves in Granada for providing us with tonsils

specimens. We thank K. Shashok for improving the use of English in the manuscript.

Authors' roles

R.M.-F and A.P. carried out all the experiments. E.L. was responsible for cell culture and A.B. for the analysis of prolactin secretion. R.G.-F was responsible for bone marrow aspirations, G.O.-F. supervised the flow cytometry analysis and E.G.-O. supervised the entire study procedure including conception, design and completion.

Funding

This work was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad (grant PS09/00339) and a Proyecto de Investigación de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (grant CTS-6183).

Conflict of interest

None declared.

References

- Alvarez A, Ortiz J, Sacristán F. Large B-cell lymphoma of the uterine corpus: case report with immunohistochemical and molecular study. *Gynecol Oncol* 1997;**65**:534–538.
- Blanco O, Tirado I, Muñoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, Olivares EG. Human decidual stromal cells express HLA-G: effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod* 2008;**23**:144–152.
- Blanco O, Leno-Duran E, Morales JC, Olivares EG, Ruiz-Ruiz C. Human decidual stromal cells protect lymphocytes from apoptosis. *Placenta* 2009;**30**:677–685.
- Buettner M, Pabst R, Bode U. Stromal cell heterogeneity in lymphoid organs. *Trends Immunol* 2010;**31**:80–86.
- Bulmer JN. *Immune Cells in Decidua*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Limited, 1995.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;**25**:2739–2749.
- Draca S. Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunol Cell Biol* 1995;**73**:481–483.
- El Shikh ME, El Sayed RM, Sukumar S, Szakal AK, Tew JG. Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. *Trends Immunol* 2010;**31**:205–211.
- Fu YX, Chaplin DD. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol* 1999;**17**:399–433.
- Garcia-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco FJ, Olivares EG. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod* 2001;**7**:1151–1157.
- Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem* 1994;**218**:314–319.
- Gorelik L, Gilbride K, Dobles M, Kalled SL, Zandman D, Scott ML. Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells. *J Exp Med* 2003;**198**:937–945.
- Guo W, Qu X, Yang M, Zhang W, Liang L, Shao Q, Kong B. Expression of BAFF in the trophoblast and decidua of normal early pregnant women

- and patients with recurrent spontaneous miscarriage. *Chin Med J* 2008; **121**:309–315.
- Hever A, Roth R, Hevezi P, Marin M, Acosta J, Acosta H, Rojas J, Herrera R, Grigoriadis D, White E et al. Human endometriosis is associated with plasma cells and overexpression of B lymphocyte stimulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:12451–12456.
- Kanda Y, Jikihara H, Markoff E, Handwerker S. Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**:677–681.
- Kim HS, Zhang X, Klyushnenkova E, Choi YS. Stimulation of germinal center B lymphocyte proliferation by an FDC-like cell line, HK. *J Immunol* 1995; **155**:1101–1109.
- Kimatrai M, Oliver C, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**:844–849.
- Kimatrai M, Blanco O, Muñoz-Fernandez R, Tirado I, Martin F, Abadia-Molina AC, Olivares EG. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; **90**:6126–6130.
- Langat D, Wheaton D, Platt J, Sifers T, Hunt J. Signaling pathways for B cell-activating factor (BAFF) and a proliferation-inducing ligand (APRIL) in human placenta. *Am J Pathol* 2008; **172**:1303–1311.
- Leber A, Teles A, Zenclussen AC. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**:445–459.
- Lee B, Chen W, Shi H, Der S, Förster R, Zhang L. CXCR5/CXCL13 interaction is important for double-negative regulatory T cell homing to cardiac allografts. *J Immunol* 2006; **176**:5276–5283.
- Lindhout E, Koopman G, Pals S, de Groot C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol Today* 1997; **18**:573–577.
- Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ, de Groot C. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J Immunol* 1999; **162**:5949–5956.
- Mackay F, Leung H. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 2006; **18**:284–289.
- McCloskey ML, Curotto de Lafaille MA, Carroll MC, Erlebacher A. Acquisition and presentation of follicular dendritic cell-bound antigen by lymph node-resident dendritic cells. *J Exp Med* 2011; **208**:135–148.
- Montes MJ, Tortosa CG, Borja C, Abadia AC, Gonzalez-Gomez F, Ruiz C, Olivares EG. Constitutive secretion of interleukin-6 by human decidual stromal cells in culture. Regulatory effect of progesterone. *Am J Reprod Immunol* 1995; **34**:188–194.
- Montes MJ, Aleman P, Garcia-Tortosa C, Borja C, Ruiz C, Garcia-Olivares E. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J Reprod Immunol* 1996; **30**:53–66.
- Muñoz-Fernandez R, Blanco FJ, Frecha C, Martin F, Kimatrai M, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J Immunol* 2006; **177**:280–289.
- Nhan-Chang C, Romero R, Kusanovic J, Gotsch F, Edwin S, Erez O, Mittal P, Kim C, Kim M, Espinoza J et al. A role for CXCL13 (BCA-1) in pregnancy and intra-amniotic infection/inflammation. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2008; **21**:763–775.
- Olivares EG, Montes MJ, Oliver C, Galindo JA, Ruiz C. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol Reprod* 1997; **57**:609–615.
- Oliver C, Cowdrey N, Abadia-Molina AC, Olivares EG. Antigen phenotype of cultured decidual stromal cells of human term decidua. *J Reprod Immunol* 1999; **45**:19–30.
- Park CS, Choi YS. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 2005; **114**:2–10.
- Peeva E, Michael D, Cleary J, Rice J, Chen X, Diamond B. Prolactin modulates the naive B cell repertoire. *J Clin Invest* 2003; **111**:275–283.
- Phillips T, Ni J, Hunt J. Cell-specific expression of B lymphocyte (APRIL, BLyS)- and Th2 (CD30L/CD153)-promoting tumor necrosis factor superfamily ligands in human placentas. *J Leukoc Biol* 2003; **74**:81–87.
- Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C et al. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 2010; **184**:2321–2328.
- Richards RG, Brar AK, Frank GR, Hartman SM, Jikihara H. Fibroblast cells from term human decidua closely resemble endometrial stromal cells: induction of prolactin and insulin-like growth factor binding protein-1 expression. *Biol Reprod* 1995; **52**:609–615.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010; **63**:601–610.
- Sumathi VP, McCluggage WG. CD10 is useful in demonstrating endometrial stroma at ectopic sites and in confirming a diagnosis of endometriosis. *J Clin Pathol* 2002; **55**:391–392.
- Tabanelli S, Tang B, Gurdip E. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; **42**:337–344.
- Vigano P, Pardi R, Magri B, Busacca M, Di Blasio AM, Vignali M. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on cultured human endometrial stromal cells and its role in the interaction with natural killers. *Am J Reprod Immunol* 1994; **32**:139–145.
- Zhu XM, Han T, Sargent IL, Wang YL, Yao YQ. Conditioned medium from human decidual stromal cells has a concentration-dependent effect on trophoblast cell invasion. *Placenta* 2009; **30**:74–78.



Apoptotic DC-SIGN⁺ cells in normal human decidua

I. Tirado-González^a, R. Muñoz-Fernández^a, A. Prados^a, E. Leno-Durán^a, F. Martín^b, A.C. Abadía-Molina^a, E.G. Olivares^{a,c,*}

^aInstituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain

^bBanco Andaluz de Células Madre, 18100 Armilla, Granada, Spain

^cHospital Universitario San Cecilio, 18012 Granada, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 3 January 2012

Keywords:

Abortion
Apoptosis
Decidua
Dendritic cells
NK cells

ABSTRACT

Background: Normal pregnancy and spontaneous abortion in humans and mice are associated with immune responses. The decidua harbors dendritic cells identifiable in humans by their expression of DC-SIGN. Because dendritic cells are essential for immune response regulation, decidual DC-SIGN⁺ cells may play a role in normal or pathological pregnancy outcomes. Previous reports suggested that DC interact with NK cells in decidua, although the functional significance of this phenomenon remains unknown. **Objective:** We studied the presence of conjugates of DC-SIGN⁺ cells with CD56⁺ NK cells in normal human decidua.

Methods: Conjugates of DC-SIGN⁺ cells with CD56⁺ NK cells were studied in leukocyte suspensions of normal human decidua (6–11 weeks) by flow cytometry and confocal microscopy. The presence of apoptotic cells was determined by the TUNEL assay, incubation with annexin V and confocal microscopy in decidual leukocyte suspensions and by the TUNEL assay in decidual sections.

Results: We observed conjugates of decidual DC-SIGN⁺ cells with CD56⁺ NK cells (40.2 ± 26.1% of all the DC-SIGN⁺ cells by flow cytometry and 52.3 ± 10.2% by confocal microscopy). We also found that a proportion of DC-SIGN⁺ cells were in apoptosis, since they were TUNEL⁺ (40.2 ± 7.2% of all DC-SIGN⁺ cells in decidual sections) and annexin V⁺ (34.4 ± 15.2% in leukocyte suspensions). And sorted DC-SIGN⁺ cells had multilobulated nuclei.

Conclusions: The conjugates of decidual DC-SIGN⁺ cells with CD56⁺ NK cells strongly suggest that these latter cells induce apoptosis in DC-SIGN⁺ cells during normal pregnancy. We discuss this possibility in the context of maternal–fetal tolerance.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human pregnancy is often considered a semiallogeneic allograft. Although most abortions occur because of chromosomal abnormalities in the embryo, it has been documented in mice and humans that some sporadic and recurrent spontaneous abortions (and also normal pregnancy) are associated with variations in certain immune responses or in the proportions of peripheral or decidual immune populations [1,2]. Many of the immunological mechanisms that give rise to interactions between the mother and fetus take place in the decidua—the maternal tissue of the placenta in closest contact with the fetal trophoblast. Dendritic cells (DCs) are immune cells responsible for the balance between

immunostimulation and tolerance [3]; therefore DC may be involved in the normal or pathological outcome of pregnancy [4].

Several groups have found immature myeloid DC in normal decidua of humans and mice [5,6]. In human decidua, these cells are identifiable by their expression of DC-SIGN (CD209) [5]. Other authors, however, have suggested that decidual DC-SIGN⁺ cells are macrophages on the basis of their morphology and co-expression of CD14 [7]. Myeloid DC and macrophages are difficult to distinguish clearly, since they share functions and the expression of many antigens; moreover, these two cell types are able to interconvert [8]. This has led some authors to propose that they are the same type of cell in different stages of differentiation [9]. Microarray studies of gene expression by DC and macrophages obtained independently by *in vitro* cytokine differentiation from monocytes showed that both types of cell expressed DC-SIGN. This antigen, however, was upmodulated by DC but downmodulated by macrophages as the two types of cell advanced through their respective differentiation pathways from monocytes [10,11]. In decidua, the differential expression of DC-SIGN, CD14, or both revealed different cell populations that

* Corresponding author. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain. Tel.: +34 958 241000x20008; fax: +34 958 249015.

E-mail address: engarcia@ugr.es (E.G. Olivares).

represent steps in the differentiation from monocyte to macrophage or DC [12]. Nevertheless, under the effects of cytokines *in vitro*, decidual DC-SIGN⁺ cells differentiated into fully mature myeloid DC [5]. Recent studies showed that decidual DC (dDC) perform different functions that are crucial for pregnancy [13,14], and in spontaneous abortion, a significant decrease in the proportion of these cells has been reported in human decidua [12]. Other reports have demonstrated that human and mice DC are involved in angiogenic responses at the fetal–maternal interface [15].

Decidual natural killer (dNK) cells, the most abundant lymphocyte in early human decidua, comprise a distinctive NK cell type different from those of peripheral blood, characterized by their high expression of CD56 and low or absent expression of CD16 [16]. Based on the classical cytotoxic activity of blood NK cells, earlier studies of dNK cells proposed that they exerted cytotoxic control on the trophoblast in order to regulate the physiological invasion of the decidua by these fetal cells. The fact that the trophoblast expresses human leukocyte antigen G (HLA-G), a molecule that binds the inhibitory receptors of dNK cells to block their cytotoxic activity, suggests that this tissue controls this activity via a homeostatic mechanism [17]. Other studies demonstrated that dNK cells were unable to induce spontaneous cytotoxic necrosis in the trophoblast unless they were previously stimulated with IL-2 and IL-15 [18,19]. More recent results suggest that rather than a cytotoxic activity, dNK exert a beneficial control of trophoblast invasion and trophic activity in the decidual vessels [20, 21]. Nevertheless, we and others demonstrated that although human decidual lymphocytes did not induce necrosis, they did induce apoptosis in the trophoblast [22,23]. These findings are consistent with those of Nakashima et al. and Lash et al. [24,25], who showed that granulysin and IFN γ , both produced by human dNK cells, induced apoptosis in the trophoblast. Decidual stromal cells and decidual T cells also appear to be susceptible to the induction of apoptosis by dNK cells [26–30].

Kämmerer et al. [5] found clusters of human decidual DC-SIGN⁺ cells with dNK cells, although the functional significance of this phenomenon remains to be established. In the present study we confirmed the presence of clusters of DC-SIGN⁺ cells and dNK cells in normal pregnancy decidua and found that a proportion of DC-SIGN⁺ cells were in apoptosis. We discuss the hypothesis that dNK cells induce apoptosis in DC-SIGN⁺ cells as a mechanism of maternal–fetal tolerance.

2. Materials and methods

2.1. Tissues

Specimens from elective terminations of pregnancy (6–11 weeks) were obtained from the Clínica El Sur in Málaga (Spain) and Ginegranada in Granada. All patients were aged 20–30 years. Women receiving any medication or having recurrent miscarriages, infectious, autoimmune, or other systemic or local diseases were excluded. None of the abortions was pharmacologically induced. Decidual tissue was obtained by suction curettage. None of the samples showed any evidence of necrosis or acute inflammation. All women provided informed consent, and this study was approved by the clinical research ethics committee of the Hospital Universitario de San Cecilio in Granada.

2.2. Immunohistochemistry

For immunostaining, cryostat sections (5 μ m) of early human decidua were fixed with acetone and labeled with an indirect immunoperoxidase method. Briefly, samples were rehydrated in PBS and incubated with hydrogen peroxide and AB human serum to block endogenous peroxidase and Fc receptors, respectively. The samples were then incubated for 30 min at room temperature in a humid chamber with an appropriately diluted anti-DC-SIGN monoclonal antibody (mAb) (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Normal mouse serum or an irrelevant mAb was substituted for the first antibody as a negative control. After three brief washings with PBS, samples were overlaid with peroxidase-conjugated goat antimouse immunoglobulin G (IgG) (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) and diluted 1:100 in 1% PBS–BSA, and the reaction was developed with 0.5 mg/mL diaminobenzidine

(Sigma–Aldrich) containing 0.01% hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 5–10 min by washing in excess PBS. Samples were counterstained with Mayer's hematoxylin (Sigma–Aldrich).

2.3. Extraction of decidual leukocytes

To avoid inducing an allogeneic reaction by leukocytes, samples of decidua from different patients were not mixed. The method of extraction has been described elsewhere [23]. Briefly, samples from the decidua of elective terminations of pregnancy were thoroughly washed in PBS. Decidual fragments were finely minced in a small volume of RPMI 1640 (Sigma–Aldrich) and then pushed through a 53- μ m sieve (Gallenkamp, Loughborough, UK). The resulting cell suspension was washed with RPMI and layered on an equivalent volume of Lymphoprep (Flow Laboratories, Hertsfordshire, UK) at room temperature, and centrifuged for 20 min at 600 g. The cells, decidual leukocytes, were collected from the interface, suspended in RPMI, washed and suspended in PBS for further analysis. Cell viability was determined microscopically by trypan blue exclusion. Only samples with more than 90% viable leukocytes were used.

2.4. Flow cytometry analysis

Decidual leukocytes were suspended in PBS at 10⁶ cells/mL. One hundred μ L of the cell suspension was incubated with 10 μ L of the appropriate mAb for 30 min at 4 °C in the dark. The cells were washed, suspended in 0.5 mL PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (Ortho-Cyturon, Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ, USA). To identify dead cells we incubated decidual cells with propidium iodide (Sigma–Aldrich). Decidual cells were stained with the appropriate mAb labeled with FITC or phycoerythrin (PE), or with their corresponding control isotype. The percentage of cells that were antibody-positive was calculated with reference to the appropriate isotype control. The mAbs against surface proteins were: CD56 (Caltag, San Francisco, CA, USA), CD83 (BD Biosciences, Denderstraat, Erembodegem, Belgium) and DC-SIGN (R&D Systems, Minneapolis, USA). For flow cytometric analysis we used the electronic gate in which most DC-SIGN⁺ cells were detected (R1) (Fig. 1).

Decidual leukocytes were treated with a mAb against DC-SIGN labeled with PE (R&D Systems) and sorted in a FACS Vantage cell sorter (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). Sorting was done twice and the proportion of DC-SIGN⁺ cells obtained was higher than 90%.

2.5. Immunofluorescence microscopy

For immunofluorescence microscopy we used the same protocol as for flow cytometry. Cells were stained with mAbs against DC-SIGN labeled with PE (R&D Systems) and against CD56 labeled with FITC (BD Biosciences) or their corresponding control isotype. They were suspended in Vectashield (Vector, Peterborough, UK) and examined with a Leica confocal or conventional immunofluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.6. Apoptosis detection

To identify apoptotic DC-SIGN⁺ cells in decidual sections, double staining was used. We first treated the cells with the In Situ Cell Death Detection Kit, POD [TdT-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay with peroxidase] according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), and then incubated them with an anti-DC-SIGN mAb (Sigma–Aldrich), followed by the Vector VIP Substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Positive apoptotic cells were identified by their brown nuclei, whereas DC-SIGN⁺ cells were purple. As a negative control for DC-SIGN staining, an irrelevant monoclonal antibody was used instead of the anti-DC-SIGN mAb. As a negative control for the TUNEL assay, we followed all the steps in the method described above except for cell permeabilization, which was omitted.

To study early apoptosis, decidual leukocytes were suspended in PBS at a concentration of 10⁶ cells/mL. One hundred μ L of this suspension was incubated with 10 μ L annexin-V-Fluos (Roche Diagnostics) and 10 μ L DC-SIGN PE (R&D Systems) at 4 °C for 30 min in the dark. Finally the cells were washed and suspended in 0.5 mL PBS and immediately analyzed in a flow cytometer.

To study late apoptosis, decidual leukocyte suspensions or sorted DC-SIGN⁺ cells were washed in PBS and then fixed at a concentration 10⁷ cells/mL in a solution of 2% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 1 h at room temperature on a shaker. The preparation was centrifuged at 400 g for 10 min, and cells were permeabilized by treatment with a solution of 0.1% Triton-X 100 and 0.1% sodium citrate for 2 min on ice. The cells were washed in PBS and analyzed with the TUNEL assay (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostic) according to the manufacturer's instructions. Samples were washed again in PBS and suspended in PBS for analysis by flow cytometry, or examined by fluorescence microscopy. To identify apoptotic cells, decidual cells were stained with a PE-labeled mAb against DC-SIGN (R&D Systems) or against CD56 (Caltag) before the TUNEL assay.

To observe apoptotic DC-SIGN⁺ nuclei, sorted DC-SIGN⁺ cells were permeabilized with 0.5% Tween 20 in citric acid solution before the nuclei were stained

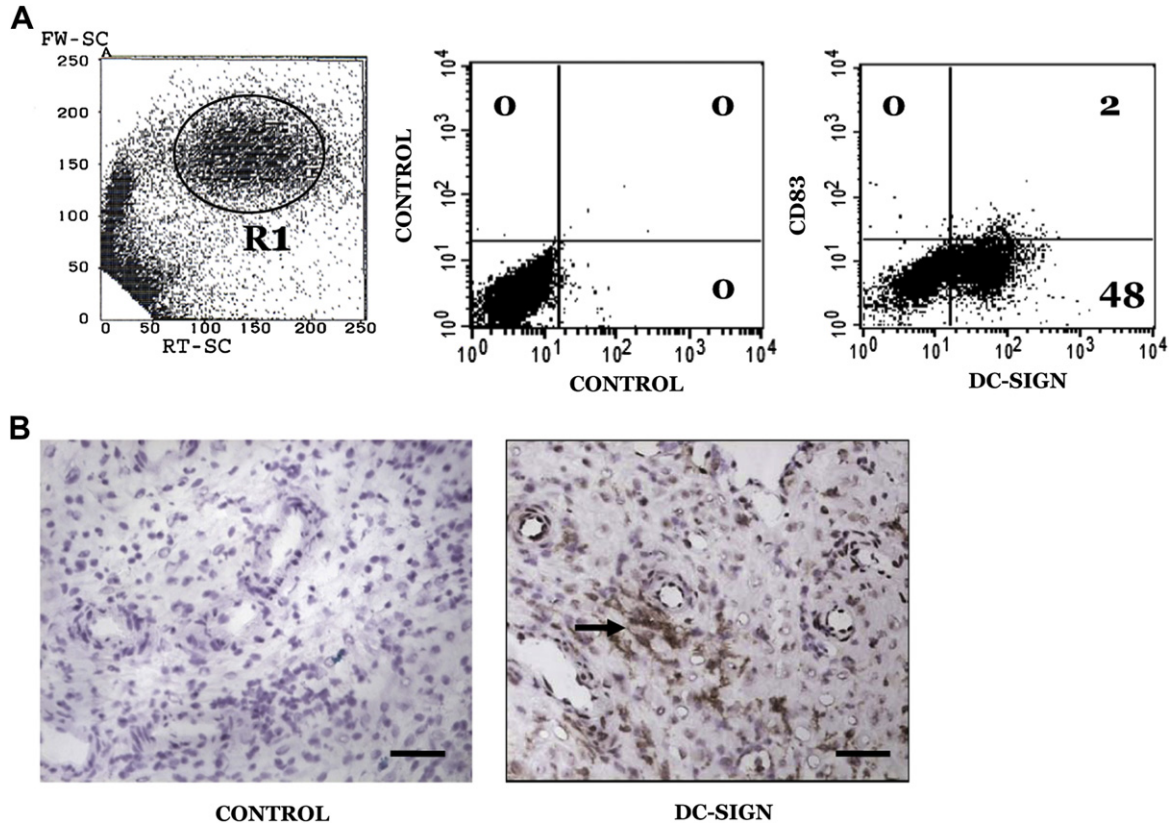


Fig. 1. Decidual DC-SIGN⁺ cells from elective termination of pregnancy. Decidual DC-SIGN⁺ cells were analyzed by flow cytometry, confocal microscopy and immunohistochemistry. A) Flow cytometric analysis of decidual DC-SIGN⁺ cells. R1 identifies the flow cytometry electronic gate in which most DC-SIGN⁺ cells were detected. DC-SIGN⁺ cells were studied in R1 in this and the following flow cytometry experiments (left). DC-SIGN⁺ cells showed little or no expression of CD83 (right). B) Immunoperoxidase staining of DC-SIGN⁺ cells in a section of early human decidua. The arrow points out perivascular clusters of positive cells. Bar = 50 μm.

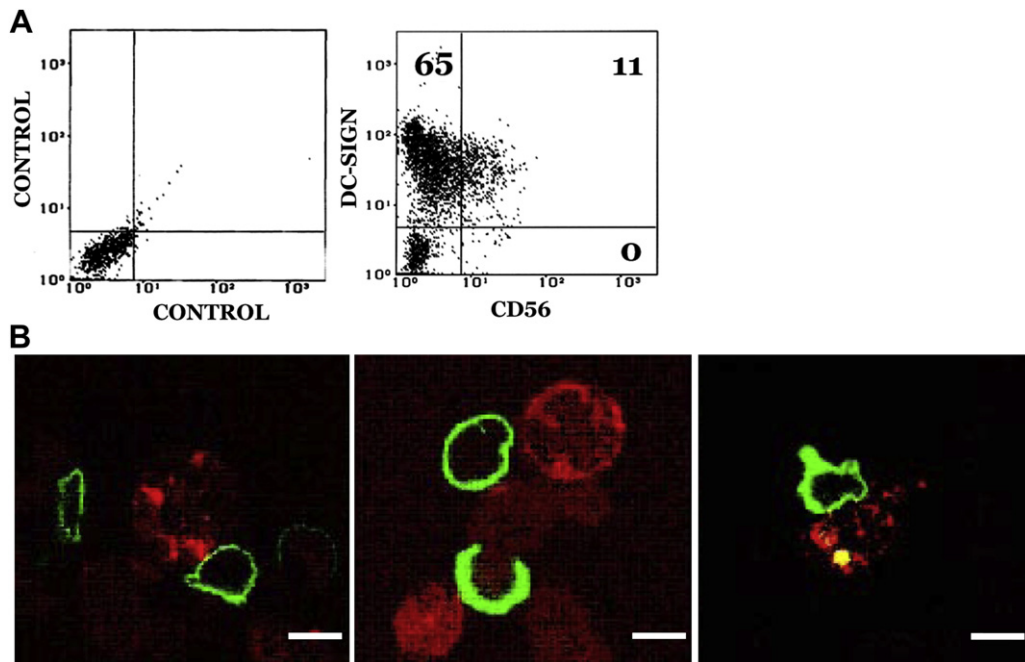


Fig. 2. Conjugates of DC SIGN⁺ cells with CD56⁺ NK cells of decidua from elective termination of pregnancy. A) Flow cytometric analysis by double-labeling with anti-CD56 and anti-DC-SIGN mAbs. A proportion of DC-SIGN⁺ cells were also positive for CD56. B) Confocal microscopic images showing conjugates of DC-SIGN⁺ cells (PE, red) and CD56⁺ NK cells (FITC, green). DC-SIGN and CD56 were expressed by different cells; we did not detect double-labeling with these antigens on any cells. The third photo on the right shows a DC-SIGN⁺ cell with a “boiling” surface morphology typical of apoptotic cells. Bar = 10 μm.

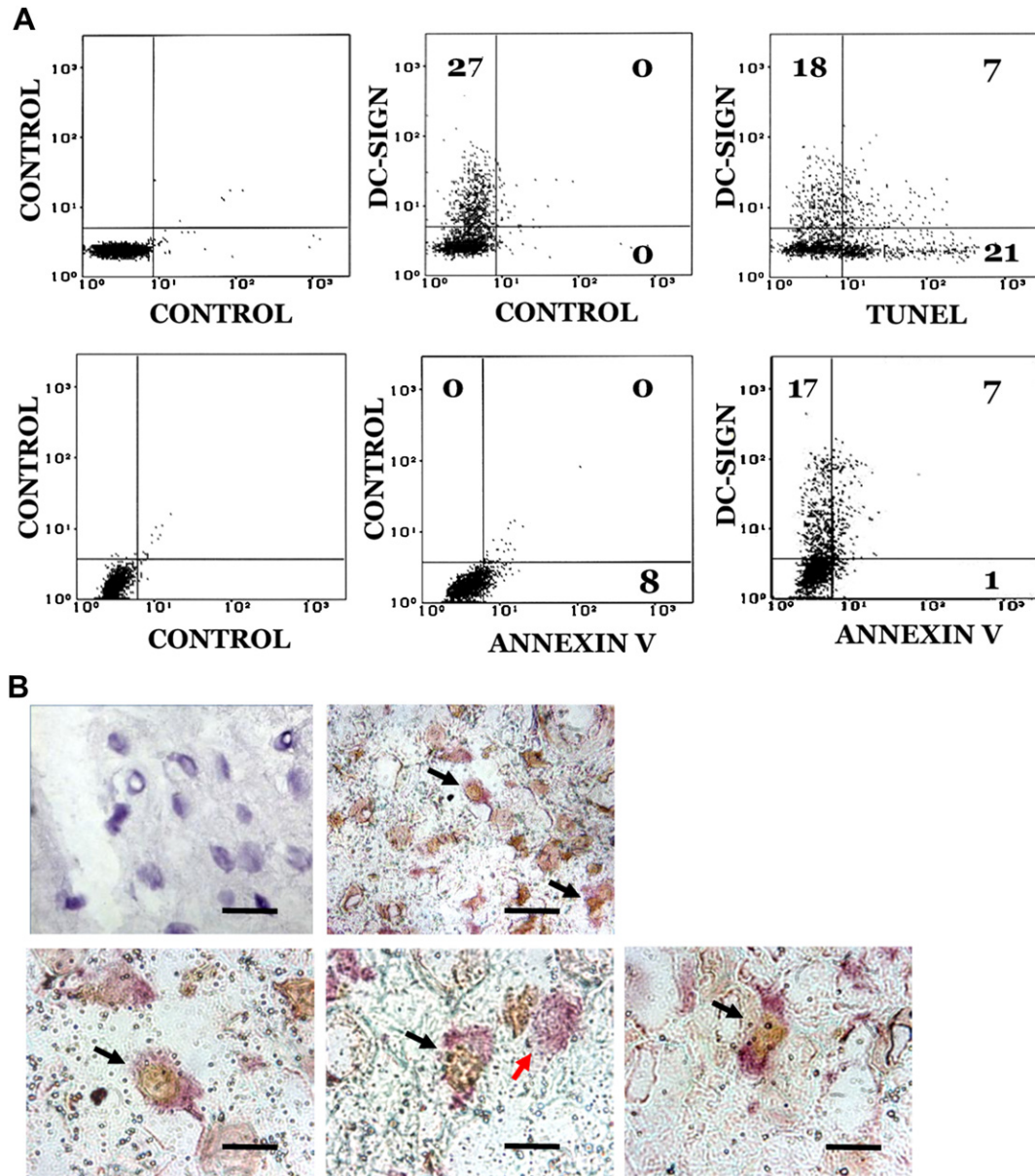


Fig. 3. Analysis of apoptosis in decidual DC-SIGN+ cells from elective termination of pregnancy. A) Flow cytometric analysis by double-labeling with TUNEL or annexin V and anti-DC-SIGN. A proportion of DC-SIGN+ cells were in apoptosis, since they were also TUNEL+ or annexin V+ B) Immunohistochemical analysis by double-labeling with TUNEL (brown) and anti-DC-SIGN (purple) of a section of decidua. The black arrows mark DC-SIGN+ TUNEL+ cells; the red arrow marks a DC-SIGN+ TUNEL- cell. Bar in the two upper panels = 25 μ m, and bar in the three lower panels = 12 μ m.

with 2 μ g/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) stain in a solution containing Na_2HPO_4 for 5 min at 37 $^\circ\text{C}$, and were examined by fluorescence microscopy.

All assays were done at least 3 times, and the figures illustrate representative results from a specific assay.

3. Results

3.1. NK-DC-SIGN+ cell conjugates

We and others [5,12] previously reported that decidual DC-SIGN+ cells from elective terminations of pregnancy (normal decidua) exhibited a phenotype compatible with immature myeloid DC. We found that these cells expressed CD11c (a myeloid DC marker), but showed little or no expression of CD123 (a plasmacytoid DC marker) and HLA-DR was only weakly detected [12]. DC-SIGN+ cells showed little or no expression of CD83 (a mature

myeloid DC marker) (Fig. 1A). Like other authors [5], we observed DC-SIGN+ cells predominantly in perivascular localizations (Fig. 1B). Immunohistological assays [5] showed clusters of DC-SIGN+ cells and CD56+ NK cells in human decidua. We confirmed the presence of these clusters by flow cytometry ($40.2 \pm 26.1\%$ of all the DC-SIGN+ cells, $n = 15$) and confocal microscopy ($52.3 \pm 10.2\%$ of all the DC-SIGN+ cells, $n = 3$) (Fig. 2). This latter method showed that DC-SIGN and CD56 were expressed on different cells. We also observed that some DC-SIGN+ cells that formed conjugates with CD56+ dNK cells displayed a “boiling” surface, a classical morphological feature of apoptosis (Fig. 2B).

3.2. Apoptotic DC-SIGN+ cells

Double-labeling analysis with anti-DC-SIGN and TUNEL assay to identify apoptotic cells by flow cytometry showed that a substantial

proportion of DC-SIGN⁺ cells were also TUNEL⁺ (Fig. 3A). When annexin V was used instead of the TUNEL assay, a proportion of DC-SIGN⁺ annexin V⁺ cells was also detected by flow cytometry ($34.4 \pm 15.2\%$ of all the DC-SIGN⁺ cells, $n = 10$) (Fig. 3A). In decidual sections, we observed by immunocytochemistry that part of the DC-SIGN⁺ cells were TUNEL⁺ (Fig. 3B) ($40.2 \pm 7.2\%$ of all the DC-SIGN⁺ cells, $n = 3$), whereas we did not detect TUNEL⁺ CD56⁺ NK cells (not shown). When we purified DC-SIGN⁺ cells by cell sorting, we found by immunofluorescence microscopy that a proportion of these cells were TUNEL⁺, and apoptotic nuclei in DC-SIGN⁺ cells were seen with this method as well as with DAPI staining (Fig. 4). These results showed that some of the decidual DC-SIGN⁺ cells were apoptotic.

4. Discussion

Several lines of evidence in mice and humans have confirmed the involvement of DC in normal and pathological pregnancies [6,12,13,15]. Dendritic cells in the human decidua are identified by the expression of DC-SIGN, exhibit an antigen phenotype compatible with immature myeloid DC [5,12], and are detected around the vessels (Fig. 1). Kammerer et al. [5] demonstrated by immunohistology that approximately half of the decidual DC-SIGN⁺ cells formed clusters with dNK cells. Conjugates of dDC and dNK cells have also been reported in mice [31]. We confirmed the clusters of human decidual DC-SIGN⁺ cells and CD56⁺ NK cells by flow cytometry and confocal microscopy (Fig. 2). Flow cytometry showed that these conjugates were not an artifact of the immunohistology (Fig. 2A), and confocal microscopy demonstrated that DC-SIGN and CD56 were expressed on different cells (Fig. 2B).

Furthermore, the proportion of clusters of decidual DC-SIGN⁺ cells-dNK cells detected by flow cytometry was close to the proportion found by immunohistology [5].

Several hypotheses have been proposed to explain the functional significance of these conjugates: 1) activation of dNK cells by dDC, 2) activation of dDC by dNK cells, 3) inhibition or killing of dDC by dNK cells, and 4) inhibition or killing of dNK cells by dDC [13,32–35]. Our data neither support nor refute the possibility that dDC activate dNK. However, the proportion of DC-SIGN⁺ cells that were also TUNEL⁺ or annexin-V⁺ (Fig. 3), and that exhibited multilobulated nuclei (Fig. 4), together with the fact that some of the DC-SIGN⁺ cells that formed conjugates with dNK cells showed a “boiling” morphology (a feature of apoptosis) (Fig. 2B), suggest that dNK cells kill dDC by apoptosis. Dendritic cell killing by NK cells, previously documented for immature myeloid DC, prevents further maturation of DC and thus controls the immunostimulation of Th1 cells [36].

Recent reports are consistent with our hypothesis. Collins and colleagues [37] showed that dDC are entrapped in the decidua in normal murine pregnancy, and these authors suggested that dDC entrapment impaired T cell activation against fetal antigens. The immobilization of dDC may be associated with apoptosis in these cells. Tirado-Gonzalez et al., [12] showed that, unlike normal pregnancy, spontaneous abortion is characterized by a reduction in the proportions of decidual DC-SIGN⁺ cells, apoptotic DC-SIGN⁺ cells and conjugates of DC-SIGN⁺ and dNK cells. This reduction suggested that dDC escape from the decidua to the local lymph nodes, where they activate T cells [12,38,39]. Further differentiation of dDC into fully mature myeloid DC in the local lymph nodes would induce a Th1 response, which would in turn trigger

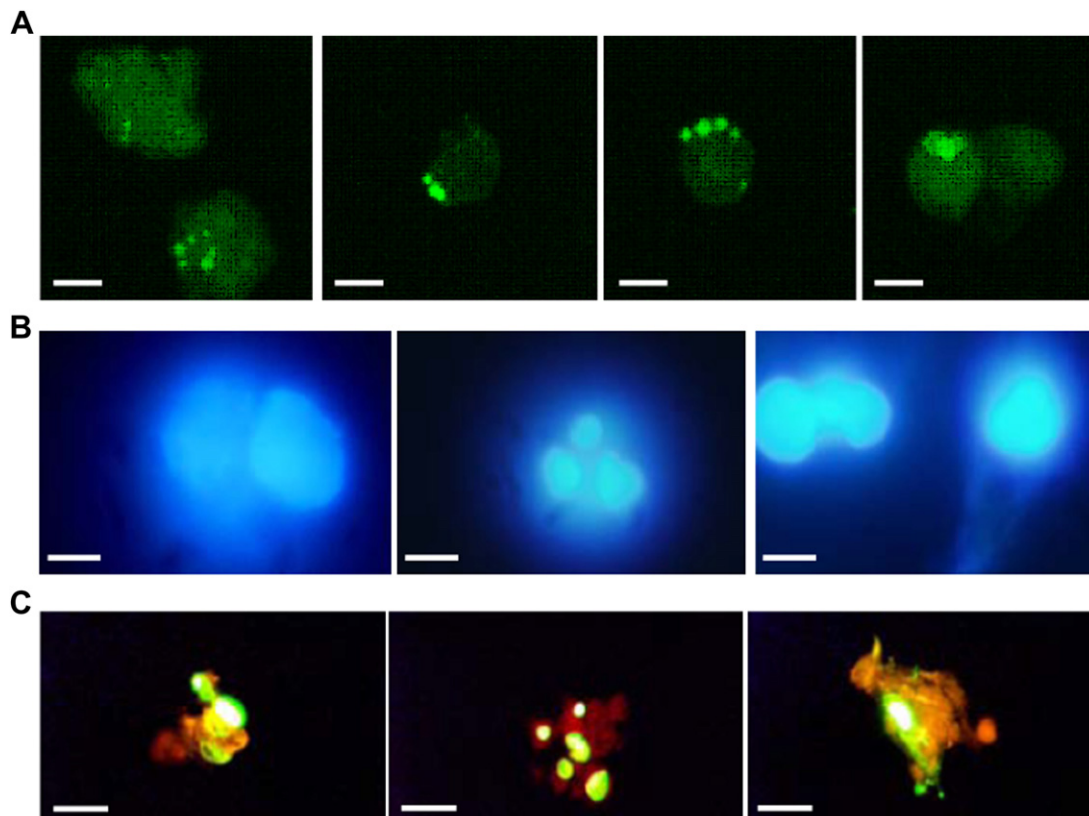


Fig. 4. Fluorescence microscopic images showing sorted DC-SIGN⁺ cells with multilobulated nuclei as revealed by A) TUNEL staining (FITC), B) DAPI staining, and C) TUNEL staining (FITC, green) with DC-SIGN labeling (PE, red). Bar in A and C = 10 μ m, and bar in B = 5 μ m.

spontaneous abortion [12,23,40–42]. The induction of apoptosis in dDC during normal pregnancy may therefore constitute another mechanism of maternal–fetal tolerance that is inhibited in spontaneous abortion.

The current view, however, is that dNK cells, rather than harming cells of the maternal–fetal interface through their cytotoxic activity, actually secrete cytokines and growth factors that favor different local cells and activities [20,21,35]. Nevertheless, several lines of experimental evidence showed that dNK cells also induce apoptosis, but not necrosis, in trophoblast, decidual stromal cells and decidual T cells [22–30]. Different dNK subsets may exert distinct or even opposite functions that contribute to local homeostasis [43].

5. Conclusions

Our findings confirm the existence of decidual DC-SIGN⁺ cell–NK cell conjugates and demonstrate the presence of apoptotic DC-SIGN⁺ cells in normal human decidua. Functional experiments to study the dynamics of the formation of conjugates and to test the effects of dNK on DC-SIGN⁺ cells are needed to confirm our hypothesis. These experiments, which should ideally be performed with autologous cells, are challenging because of the low number of DC-SIGN⁺ cells that can be obtained from a given sample. Our hypothesis should therefore be tested in animal models such as syngeneic mice.

Acknowledgements

We thank K. Shashok and W. Ellis for improving use of English in the manuscript. Immunohistology experiments were carried out by Irene Tirado-Gonzalez at Dr. Petra Arck's laboratory in Berlin. This work was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministry of Health of Spain (PS09/00339), and from the Fundación Progreso y Salud (TCRM 0010/2006).

References

- Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunol Rev* 2011;241:20–38.
- Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:601–10.
- Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1–TH2 development. *Nat Immunol* 2000;1:199–205.
- Blois SM, Kammerer U, Alba Soto C, Tometten MC, Shaikly V, Barrientos G, et al. Dendritic cells: key to fetal tolerance? *Biol Reprod* 2007;77:590–8.
- Kammerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TB, Dietl J, et al. Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *Am J Pathol* 2003;162:887–96.
- Blois SM, Alba Soto CD, Tometten M, Klapp BF, Margni RA, Arck PC. Lineage, maturity, and phenotype of uterine murine dendritic cells throughout gestation indicate a protective role in maintaining pregnancy. *Biol Reprod* 2004;70:1018–23.
- Houser BL, Tilburgs T, Hill J, Nicotra ML, Strominger JL. Two unique human decidual macrophage populations. *J Immunol* 2011;186:2633–42.
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 1998;160:4587–95.
- Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol* 2006;18:49–53.
- Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, Misek DE, Lescure P, Geiger JD, et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2001;276:17920–31.
- Lehtonen A, Ahlfors H, Veckman V, Miettinen M, Lahesmaa R, Julkunen I. Gene expression profiling during differentiation of human monocytes to macrophages or dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2007;82:710–20.
- Tirado-Gonzalez I, Munoz-Fernandez R, Blanco O, Leno-Duran E, Abadia-Molina AC, Olivares EG. Reduced proportion of decidual DC-SIGN⁺ cells in human spontaneous abortion. *Placenta* 2010;31:1019–22.
- Laskarin G, Kammerer U, Rukavina D, Thomson AW, Fernandez N, Blois SM. Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:255–67.
- Plaks V, Birnberg T, Berkutzi T, Sela S, BenYashar A, Kalchenko V, et al. Uterine DCs are crucial for decidua formation during embryo implantation in mice. *J Clin Invest* 2008;118:3954–65.
- Barrientos G, Tirado-Gonzalez I, Klapp BF, Karimi K, Arck PC, Garcia MG, et al. The impact of dendritic cells on angiogenic responses at the fetal–maternal interface. *J Reprod Immunol* 2009;83:85–94.
- Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003;198:1201–12.
- Ponte M, Cantoni C, Biassoni R, Tradori-Cappai A, Bentivoglio G, Vitale C, et al. Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5674–9.
- King A, Loke YW. Human trophoblast and JEG choriocarcinoma cells are sensitive to lysis by IL-2-stimulated decidual NK cells. *Cell Immunol* 1990;129:435–48.
- Verma S, Hiby SE, Loke YW, King A. Human decidual natural killer cells express the receptor for and respond to the cytokine interleukin 15. *Biol Reprod* 2000;62:959–68.
- Lash GE, Otun HA, Innes BA, Percival K, Searle RF, Robson SC, et al. Regulation of extravillous trophoblast invasion by uterine natural killer cells is dependent on gestational age. *Hum Reprod* 2010;25:1137–45.
- Le Bouteiller P, Tabiasco J. Killers become builders during pregnancy. *Nat Med* 2006;12:991–2.
- Minas V, Jeschke U, Kalantaridou SN, Richter DU, Reimer T, Mylonas I, et al. Abortion is associated with increased expression of FasL in decidual leukocytes and apoptosis of extravillous trophoblasts: a role for CRH and urocortin. *Mol Hum Reprod* 2007;13:663–73.
- Olivares EG, Munoz R, Tejerizo G, Montes MJ, Gomez-Molina F, Abadia-Molina AC. Decidual lymphocytes of human spontaneous abortions induce apoptosis but not necrosis in JEG-3 extravillous trophoblast cells. *Biol Reprod* 2002;67:1211–7.
- Lash GE, Otun HA, Innes BA, Kirkley M, De Oliveira L, Searle RF, et al. Interferon-gamma inhibits extravillous trophoblast cell invasion by a mechanism that involves both changes in apoptosis and protease levels. *FASEB J* 2006;20:2512–8.
- Nakashima A, Shiozaki A, Myojo S, Ito M, Tatematsu M, Sakai M, et al. Granulysin produced by uterine natural killer cells induces apoptosis of extravillous trophoblasts in spontaneous abortion. *Am J Pathol* 2008;173:653–64.
- Almeida A, Correia-da-Silva G, Cepa M, Bell SC, Teixeira NA. Synergistic induction of apoptosis in primary rat decidual cells by INF-gamma and TNF. *Mol Reprod Dev* 2007;74:371–7.
- Ashkar AA, Croy BA. Interferon-gamma contributes to the normalcy of murine pregnancy. *Biol Reprod* 1999;61:493–502.
- Blanco O, Tirado I, Munoz-Fernandez R, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Pena J, et al. Human decidual stromal cells express HLA-G: effects of cytokines and decidualization. *Hum Reprod* 2008;23:144–52.
- Fluhr H, Krenzer S, Stein GM, Stork B, Deperschmidt M, Wallwiener D, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha sensitize primarily resistant human endometrial stromal cells to Fas-mediated apoptosis. *J Cell Sci* 2007;120:4126–33.
- Kopcow HD, Rosetti F, Leung Y, Allan DS, Kutok JL, Strominger JL. T cell apoptosis at the maternal–fetal interface in early human pregnancy, involvement of galectin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18472–7.
- Behrends J, Karsten CM, Wilke S, Robke A, Kruse A. Identification of ITGA4/ITGB7 and ITGAE/ITGB7 expressing subsets of decidual dendritic-like cells within distinct microdomains of the pregnant mouse uterus. *Biol Reprod* 2008;79:624–32.
- Dietl J, Honig A, Kammerer U, Rieger L. Natural killer cells and dendritic cells at the human foeto-maternal interface: an effective cooperation? *Placenta* 2006;27:341–7.
- Laskarin G, Redzovic A, Rubesa Z, Mantovani A, Allavena P, Haller H, et al. Decidual natural killer cell tuning by autologous dendritic cells. *Am J Reprod Immunol* 2008;59:433–45.
- Rieger L, Hofmeister V, Probe C, Dietl J, Weiss EH, Steck T, et al. Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E. *Mol Hum Reprod* 2002;8:255–61.
- Vacca P, Cantoni C, Vitale M, Prato C, Canegallo F, Fenoglio D, et al. Crosstalk between decidual NK and CD14⁺ myelomonocytic cells results in induction of Tregs and immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:11918–23.
- Marcenaro E, Della Chiesa M, Bellora F, Parolini S, Millo R, Moretta L, et al. IL-12 or IL-4 prime human NK cells to mediate functionally divergent interactions with dendritic cells or tumors. *J Immunol* 2005;174:3992–8.
- Collins MK, Tay CS, Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J Clin Invest* 2009;119:2062–73.

- [38] Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, et al. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol* 2000;157:159–69.
- [39] Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183–6.
- [40] Marzi M, Vigano A, Trabattoni D, Villa ML, Salvaggio A, Clerici E, et al. Characterization of type 1 and type 2 cytokine production profile in physiologic and pathologic human pregnancy. *Clin Exp Immunol* 1996;106:127–33.
- [41] Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000;15:713–8.
- [42] Tangri S, Wegmann TG, Lin H, Raghupathy R. Maternal anti-placental reactivity in natural, immunologically-mediated fetal resorptions. *J Immunol* 1994;152:4903–11.
- [43] Lash GE, Robson SC, Bulmer JN. Review: functional role of uterine natural killer (uNK) cells in human early pregnancy decidua. *Placenta* 2010;31(Suppl.):S87–92.

Interleukin 10 decreases the contractility of follicular dendritic cells and increases the inhibitory effect of these cells on B cell apoptosis

Raquel Muñoz-Fernández¹, Alejandro Prados², Irene Tirado-González³, Francisco Martín⁴, Ana C. Abadía², Enrique G. Olivares^{3,5}

Key words: α -smooth muscle actin; Apoptosis; Cell contractility; Cytokines; Follicular dendritic cells

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 18100 Armilla, Granada, Spain

²Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, 18100 Armilla, Granada, Spain

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada

⁴Centro Pfizer - Universidad de Granada - Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica (GENYO); Granada, Spain

⁵Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Address for correspondence: Dr. Enrique G. Olivares, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada, 18012 Granada, Spain.

Tel: +34-958240731. FAX: +34-958249015. E mail: engarcia@ugr.es

Abbreviations: BAFF: B cell-activating factor; CFSE: 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester; Cy: cyanine; DSC: decidual stromal cells; FDC: follicular dendritic cells; HFF: Human foreskin fibroblasts; LT: lymphotoxin; MTT: 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; MSC: mesenchymal stem cells; SM: smooth muscle;

Abstract

Follicular dendritic cells (FDC) present antigens to B cells in the lymphoid follicle and inhibit B cell apoptosis. In previous work, we obtained human FDC lines and found that they expressed α -smooth muscle (SM) actin, and were able to contract collagen gel matrixes. We report here that IL-2 and IFN γ increased FDC contractility, and IL-10 reduced contractility, whereas IL-4 had no effect. TNF and lymphotoxin (LT) $\alpha 1\beta 2$, cytokines involved in FDC differentiation, also increased FDC contractility. In different cell systems, cell contraction is related with the incorporation of α -SM actin into stress fibers. By confocal microscopy we showed that cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, inhibited α -SM actin incorporation and relaxed FDC. Likewise, IL-10 significantly decreased the proportion of FDC with α -SM-actin-positive stress fibers, whereas the cytokines that increased FDC contractility increased that proportion. However, none of the cytokines tested significantly affected α -SM actin expression determined by flow cytometry. IL-10 also increased the inhibitory activity of FDC on spontaneous B cell apoptosis ($P < 0.05$), but other cytokines did not affect this activity. We conclude that cytokines related with FDC physiology regulate the contractility of these cells, and IL-10 also regulates the effect of FDC on B cell apoptosis.

Introduction

Follicular dendritic cells (FDC) are located in the primary lymphoid follicles and germinal centers of lymphoid tissues. These cells store antigens in their native form on their membrane, where they remain bound to Fc and complement receptors for prolonged periods. This ensures antigen presentation to B cells, and contributes to the differentiation and maintenance of memory B cells. Follicular dendritic cells secrete CXCL13 to attract B cells from the parafollicular region into the follicle, and express and secrete B cell-activating factor (BAFF) and other molecules to rescue B cells from apoptosis [1, 2].

We have isolated and maintained human FDC lines in culture, and studied the phenotype and functions of these cells to demonstrate relationships between FDC and mesenchymal stem cells (MSC) — research that has confirmed the link between FDC and the mesenchymal lineage [3, 4]. We also found that FDC expressed α -smooth muscle actin (α -SM actin) [3], a typical marker of myofibroblasts, cells with contractile activity involved in wound retraction [5]. Like myofibroblasts, FDC express stress fibers containing α -SM actin in their cytoplasm, and these cells contracted collagen gels under the effect of cytokines [3]. α -SM actin and contractile activity were also detected in MSC, and other mesenchymal cells [6-8]. Interestingly, it was recently reported in mouse that FDC emerge from perivascular precursors that also express α -SM actin [9]. Cellular contractility and the ability of cells to change their shape are prerequisites for many biological phenomena such as cytokinesis, movement, differentiation and substrate adherence. Actin polymerization associated with cell contractility is essential for many cellular functions such as signal transduction and cell-to-cell interaction [10]. In this study we investigated the effects of different cytokines

related with FDC physiology on FDC contractility, and discuss these effects in terms of FDC functionality.

Results

Antigen phenotype and functions of the FDC lines

As reported previously [3, 11], after tonsil cells were isolated and incubated in culture overnight (see Materials and methods), we detected adherent cells with a dendritic morphology that formed clusters with lymphoid cells. After 2 weeks in culture, lymphoid cells had died and only a homogeneous population with fibroblastic morphology had survived (Figure 1A). These cells expressed α -SM actin, BAFF, CD21 (CR2), CD23 (Fc ϵ RII), CD29, CD73, weakly expressed CD14, and lacked CD45 expression (Figure 1B). They secreted CXCL13 in culture, and this secretion was increased by TNF and LT $\alpha_1\beta_2$ (Figure 1C). The FDC lines were able to rescue tonsil B cells from spontaneous apoptosis (Figure 1D-F), and, as reported previously [12], we found that this activity was dependent on cell-to-cell contact, since it was abrogated if FDC and B cells were cultured separately in Transwell plates (Figure 1F). Also as previously reported [13], FDC lines alone had no effect on B cell proliferation (Figure 1G). The antigen phenotype and functions of the cell lines are compatible with those reported in previous studies of FDC [1, 2]. Like FDC lines, most HFF expressed CD29, CD73 (Figure 1H) and CD10 and lacked CD45 (not shown). HFF, however, did not express the FDC-associated antigens CD21, CD23 (Figure 1H), CD14, CD40 and CXCL13 (not shown) and were unable to rescue B cells from apoptosis (Figure 1H).

Effects of cytokines on FDC contractility

We found that IL-2, INF γ , LT $\alpha_1\beta_2$ and TNF induced contraction in collagen gel matrices that contained FDC in a dose-dependent manner. In contrast, IL-10 induced an increase in the volume of collagen gel matrices, also in a dose-dependent manner,

whereas IL4 had no effect. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, also increased gel matrix volumes (Figure 2).

Effect of cytokines on α -SM actin in FDC

By confocal microscopy, α -SM-actin was detected in FDC in a nonpolymerized form (diffuse pattern of fluorescence) or polymerized and incorporated in the stress fibers (Figure 3A). In different cell types, cell contractility was found to be related with the polymerization of α -SM-actin in stress fibers [14]. Cytochalasin D, an inhibitor of actin polymerization, impeded the formation of FDC stress fibers (Figure 3A) and inhibited FDC contractility (Figure 2). Cytokines IL-2, $\text{INF}\gamma$, $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ and TNF, which induced cell contraction (Figure 2), increased the presence of α -SM-actin in the FDC stress fibers and significantly increased the proportion of FDC with α -SM-actin-positive stress fibers, whereas IL-10, which inhibited FDC contractility, decreased this proportion (Figures 3A and B). Neither cytokines nor cytochalasin D significantly affected the expression of α -SM-actin by FDC lines (Figure 3C). These results show that rather than affecting the intracellular concentration of α -SM-actin, the activity of the cytokines on FDC contractility depends on their effects on α -SM-actin polymerization.

Effect of cytokines on the activity of FDC on B cell apoptosis

We further tested the effect of cytokines that modified FDC contractility on the activity of FDC on B cell apoptosis. When B cells were cultured with FDC, the cytokines that induced FDC contraction (IL-2, $\text{INF}\gamma$, $\text{LT}\alpha_1\beta_2$ and TNF) did not affect the inhibition of spontaneous B cell apoptosis by FDC. However, IL-10 significantly increased this activity (Figure 4A). This result was not due to a direct effect of IL-10 on FDC proliferation, since this cytokine, like the other cytokines tested, did not affect FDC

numbers (Figure 4B). The effect of IL-10 on FDC activity on B cell apoptosis was also not due to a direct effect of this cytokine on B cells, since neither IL-10 nor the other cytokines affected the spontaneous apoptosis of B cells cultured in the absence of FDC (not shown). As shown previously, the rescue of B cells from apoptosis by FDC was not associated with induction of B cell proliferation (Figure 1G). Likewise, the increase of FDC activity on B cells apoptosis induced by IL-10 was also not associated with B cell proliferation (Figure 4C). IL-10, however, did not induce changes in the expression of molecules involved in functional FDC–B cell interactions, such as CD23, CD54, CD106, intracellular or surface BAFF, or CXCL13 nor in the other antigens expressed by FDC (Figure 5).

Discussion

Human FDC represent only 1% of the cells in the germ center. The number of fresh FDC that can be isolated from lymphoid tissues is so low that most functional studies on these cells were carried out with established FDC lines [3, 4, 13]. We have been able to isolate and maintain highly purified cultures of FDC lines, which has allowed us to demonstrate that these cells exhibited an antigen phenotype equivalent to that of fresh FDC, are related to MSC, and have the ability to contract collagen gels [3, 4]. The antigen phenotype of the FDC lines, principally the expression of CD21, CD23, CD40, CD54, CD106, BAFF, the secretion of CXCL13, the capacity to rescue B cells from apoptosis and the requirement of cell-to-cell contact for this activity (Figures 1 and 5) showed that these cells are compatible with FDC [1, 2, 12] rather than with other types of stromal cell found in lymphoid organs [15]. Nevertheless, the ability of these FDC lines to differentiate under the effects of TNF and $LT\alpha 1\beta 2$ demonstrated that they were not fully mature FDC [3, 4]. Follicular dendritic cells appear to cooperate in B cell proliferation and affinity maturation [16]; however, in the absence of antigen and T cells, FDC lines, as previously reported [13], affected B cell apoptosis but not B cell proliferation (Figure 1G). Thus, the rescue of B cells from apoptosis appears to be a “basal” function of FDC.

In the present study, we demonstrated that the effect of the cytokines on FDC contractility was associated with the incorporation of α -SM-actin into the stress fibers rather than with the regulation of the concentration of this protein in FDC. These results coincide with those reported in other types of stromal cells [6, 14]. The cytokines that increased FDC contractility (IL-2, $IFN\gamma$, TNF and $LT\alpha 1\beta 2$) also increased α -SM-actin incorporation, whereas IL-10, which decreased FDC contractility, reduced the presence

of α -SM-actin in stress fibers (Figures 2, 3A and B). No cytokine, however, significantly changed the expression of α -SM-actin by FDC (Figure 3C). All the cytokines studied may be locally secreted by T cells, and these cells may interact physically and functionally with FDC [17]. Other cytokines produced by T cells in the lymphoid tissues, such as IL-17 (Th17) or IL-21 (Tfh) also increased FDC contractility (not shown). B cells, however, appear to be the major source of IL-10 in the lymphoid follicles [18]. Furthermore, the membrane expression or secretion of TNF and LT α 1 β 2 by B cells in lymphoid tissues promotes the generation of FDC [19, 20]. The effect of TNF and LT α 1 β 2 on FDC contraction may then regulate B cell–FDC interactions during FDC differentiation. These latter cytokines were found to increase the expression of ICAM-1 (CD54) and VCAM-1 (CD106) and the secretion of CXCL13 by FDC [3, 4, 19, 20] (Figure 1C).

The effects of different cytokines on α -SM-actin and FDC contractility may affect the typical dendritic morphology that these cells exhibit *in vivo*. This type of morphology, seen in different types of cells (e.g., neurons and conventional dendritic cells), increases the cell surface and therefore has an effect on cell–cell interactions. In the case of FDC, this morphological feature probably also affects interactions with antigens, B cells and T cells. Although cell–cell contact is established by membrane molecules, it is likely that physical rapprochement between a protein and its ligand is conditioned by cell morphology, and this is determined in turn by the degree of cellular contractility. In fact, when B cells recognize the antigen on the surface of antigen-presenting cells, they rapidly spread over the target membrane before slowly contracting, a process that also involves actin polymerization [10]. Follicular dendritic cells treated with cytochalasin D showed clear evidence of the relationships between α -SM-actin polymerization, cell contractility and cell morphology. After this treatment,

the proportion of FDC with α -SM-actin-positive stress fibers decreased to almost zero, FDC relaxed, and their fibroblastic morphology was completely abrogated (Figures 2 and 3).

A relevant point would be to determine to what extent a cytokine-induced FDC contraction directly affects FDC functions. To investigate this, we studied the effect of FDC on B cells apoptosis. None of the cytokines that induced contraction, however, affected this activity. In contrast, IL-10, which induced relaxation, significantly increased the inhibitory effect of FDC on B cell apoptosis (Figure 4A). Nevertheless, we have no data to support that this effect was due to a change in FDC morphology. Another possibility is that IL-10 independently affects the FDC molecules that inhibit B cell apoptosis. However, we observed no significant changes in the expression of some of these molecules (CD54, CD106, BAFF, CXCL13) by FDC (Figure 5), although other molecules yet to be studied may be involved. Nevertheless, actin polymerization may regulate FDC signal pathways associated to FDC functions. [21].

We previously reported the similarities between human FDC and decidual stromal cells (DSC) [3, 4, 22]. These latter cells are the main cellular component of the decidua, the maternal tissue of the placenta in close contact with the fetal trophoblast. Like FDC, DSC are stromal cells with immunoregulatory activity [4]. Interestingly, the pattern of contractility in response to cytokines and the incorporation of α -SM-actin into the stress fibers that we observed in DSC were identical to these features as documented in FDC: PDGF, TGF- β 1, IL-2, TNF, IFN γ and LT α 1 β 2 increased DSC contractility [7] and our unpublished results), whereas IL-10 induced relaxation, and IL-4 had no effect [6]. We obtained evidence that both DSC and FDC are related to MSC [3, 4, 23] and MSC also express α -SM-actin and are able to contract in vitro [8]. Although these three types of cells appear to be distinct and only distantly related, they

share the capacity to support hematopoietic cells: MSC support different hematopoietic cells [24], DSC support decidual NK cells [22] and FDC support B cells [1]. The relationship of this common function of these three types of cells with the expression of α -SM-actin and cell contractility needs further research.

Materials and Methods

Samples

Tonsil samples were obtained from patients with tonsillitis at the Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada, Spain). The patients (3 to 10 years old) were in complete remission before the intervention. Informed consent was obtained from the parents or guardians of each patient. This study was approved by the Comité Ético y de Investigación (Ethics and Research Committee) of the Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Cytokines and reagents

Human cytokines IL-2, IL-4, IL-10, INF γ , LT $\alpha_1\beta_2$ and TNF were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Type V collagenase, cytochalasin D and 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) were also purchased from Sigma-Aldrich. 5(6)-Carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester (CFSE) was purchased from Molecular Probes (Molecular Probes, Eugene, OR).

Monoclonal antibodies

The mAbs used in this study were CD10-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD21-PE, CD23-FITC, CD29-FITC, CD40-FITC, CD45-PE, CD54-FITC (ICAM-1), CD73-PE, (Caltag Laboratories, Burlingame, CA), CD106- FITC (VCAM-1), BAFF-FITC, CXCL-13-allophycocyanin (R&D Systems, Minneapolis, MN) and anti- α -SM actin-cyanine(Cy)3 (Sigma-Aldrich).

Isolation and culture of FDC lines

To establish FDC lines, we used the method described by Kim et al. [11] with modifications. Briefly, human tonsils freshly obtained from routine tonsillectomy were thoroughly washed in PBS solution and cut into small pieces that were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin (Sigma-Aldrich). The suspension was put in a solution of type V collagenase (5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) for 2 h at 37 °C. The suspension was filtered through gauze and centrifuged at $425 \times g$ for 10 min. The supernatant was discarded, and the cell pellet was suspended in RPMI 1640 and centrifuged on Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich) for 20 min at $600 \times g$. Cells were collected from the interface, suspended in PBS, and washed. This suspension was incubated in culture flasks for 1 h at 37 °C in complete RPMI 1640 with 10% FBS to allow macrophages and granulocytes to adhere to the flask. The supernatant cells were washed and incubated in Opti-MEM Medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 3% FBS, 100 UI/ml penicillin, 100 UI/ml streptomycin and 0.25µg/ml amphotericin (Sigma-Aldrich). After overnight incubation to allow adherent cells to attach to the flask, lymphocytes in the supernatant were discarded. The Opti-MEM medium was then replaced and changed twice a week. After 2–4 wk, adherent cells were morphologically uniform and covered the whole surface of the 25-cm² culture flask. Cell viability was determined by trypan blue exclusion before any experiments were done. Only preparations with >95% viable cells were used.

Fibroblast culture

Human foreskin fibroblasts (HFF) derived from neonatal human foreskins (ATCC; Rockville, MD) were cultured in EMEM (Sigma) with 100 U/ml penicillin and 50 µg/ml gentamicin and 10% FBS.

Preparation of purified B lymphocytes

Tonsil B lymphocytes were purified from the supernatant obtained in FDC preparation by using the Human B Cell Isolation kit (R&D Systems). Purity of the isolated B cells was determined by flow cytometry with a mAb against CD19. Only preparations with >95% viable B lymphocytes were used.

Flow cytometric analysis

Adherent cells were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37 °C. The cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was suspended in PBS at 10^6 cells/ml. For direct staining, 100 µl of the cell suspension was incubated with 5 µl of the appropriate mAb for 30 min at 4 °C in the dark. Cells were washed, suspended in 0.5 ml PBS, and immediately analyzed in a FACScan cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA). The percentage of cells that were Ab-positive was calculated by comparison with the appropriate isotype control. For double labeling, we followed the same procedure except that a second mAb with a fluorescent marker different from that of the first mAb was also added. For intracytoplasmic labeling, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C and permeabilized with cold 0.05% PBS saponine (Merck, Darmstadt, Germany) before the mAb was added.

Detection of apoptotic tonsil B lymphocytes co-cultured with FDC

Follicular dendritic cell lines or HFF in the exponential growth phase were cultured in complete Opti-MEM medium in 6-well plates (Becton Dickinson, NJ, USA) at 5×10^4 cells/well. Tonsil B lymphocytes were added at different proportions directly to each well and incubated for 72 h. B lymphocytes were collected from the supernatant and the proportion of apoptotic cells was determined with quantitative analysis of sub-G1 cells by flow cytometry. Briefly, lymphocytes were washed with PBS, fixed in cold 70% ethanol and then stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich) during treatment with RNase (Sigma-Aldrich). Quantitative analysis of sub-G1 cells was done with flow cytometry. The results were expressed as the percentage of apoptotic B cells or percentage inhibition of B cell apoptosis. To determine the effect of the cell to cell contact, we carried out the same experiment in Transwell plates. Follicular dendritic cell lines were cultured on the bottom surface of the plate, and tonsil B lymphocytes (FDC/B cell ratio of 1/20) were added to the upper compartment of Transwell plates. After 72 h of incubation, B lymphocytes were collected and apoptotic cells were detected as described above.

Gel contraction assay

Cellular collagen gel contraction assays were performed as previously described [3]. A sterile solution of purified, pepsin-solubilized bovine dermal collagen (Vitrogen; Cohesion Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA) was prepared according to the manufacturer's instructions and combined with 25×10^4 FDC. The collagen/cell mixture (100 μ l/well) was dispensed into culture plates and allowed to polymerize at 37 °C for 30 min. Immediately after polymerization, 2 ml Opti-MEM with 3% FBS

with or without the appropriate cytokine was added to each well. After incubation for 24 h, the height (l) and diameter (d) of each gel were measured with a microscope micrometer, and the volume (V) of each gel was calculated with the following formula:

$$V=1/6 \times \pi \times l \times (3d^2 + l^2)$$

Immunofluorescence microscopy

Follicular dendritic cells were plated onto slides in Opti-MEM with 3% FBS. After 24 h, the cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C and permeabilized with cold acetone for 10 min before the addition of anti- α -SM actin-Cy3. The preparations were examined with a Leica confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

MTT assay

Follicular dendritic cell proliferation was determined with the MTT assay. 15×10^3 FDC/well were cultured in a 24-well plate in the presence different cytokines (30 ng/ml) for 72 h at 37 °C. Supernatants were removed and the wells washed three to five times with PBS. 100 μ l complete medium and 10 μ l 5 mg/ml MTT (Sigma) solution in PBS were added per well, and plates were incubated for 4 h at 37 °C. Then the medium was discarded and acid-isopropanol (100 μ l 0.04N HCl in isopropanol) (Scharlau, Barcelona, Spain) was added and mixed thoroughly to dissolve the dark blue crystals. The plates were shaken for 10 min at 37 °C and the optical density was determined with a micro-ELISA reader (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) reader at a test wavelength of 570 nm.

Proliferation assay with CFSE

Tonsil B lymphocytes were stained with 0.5 μ l CFSE (5 mM) per 2×10^7 cells/ml during 5 min in dark at 37 °C. The cellular suspension was washed twice in 50 ml PBS with 20% FBS. Stained B cells were cultured with or without cytokines and with or without FDC for 72 h at 37 °C. Proliferation was determined at fluorescence intensity measured with flow cytometry.

Statistical analysis

Quantitative experiments were performed in triplicate or quadruplicate. Student's *t* test was used to compare the results. Values of $P < 0.05$ were considered significant. The figures show results for an experiment representative of three or more separate assays.

Acknowledgments

We are grateful to the Servicio de Otorrinolaringología at Hospital Universitario Virgen de las Nieves in Granada for providing us with tonsil specimens. We thank K. Shashok for improving the readability of the manuscript. This work was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Ministerio de Sanidad (Grants PS09/00339; PI12/01085) and a Proyecto de Investigación de Excelencia, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (Grant CTS-6183).

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 **Allen, C. D. C. and Cyster, J. G.,** Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: Phenotype and function. *Sem. Immunol.* 2008. **20**: 14-25.
- 2 **El Shikh, M. E., El Sayed, R. M., Sukumar, S., Szakal, A. K. and Tew, J. G.,** Activation of B cells by antigens on follicular dendritic cells. *Trends Immunol.* 2010. **31**: 205-211
- 3 **Munoz-Fernandez, R., Blanco, F. J., Frecha, C., Martin, F., Kimatrai, M., Abadia-Molina, A. C., Garcia-Pacheco, J. M. and Olivares, E. G.,** Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. *J. Immunol.* 2006. **177**: 280-289.
- 4 **Munoz-Fernandez, R., Prados, A., Leno-Duran, E., Blazquez, A., Garcia-Fernandez, J. R., Ortiz-Ferron, G. and Olivares, E. G.,** Human decidual stromal cells secrete C-X-C motif chemokine 13, express B cell-activating factor and rescue B lymphocytes from apoptosis: distinctive characteristics of follicular dendritic cells. *Hum. Reprod.* 2012. **27**: 2775-2784.
- 5 **Foo, I. T., Naylor, I. L., Timmons, M. J. and Trejdosiewicz, L. K.,** Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab. Invest.* 1992. **67**: 727-733.
- 6 **Kimatrai, M., Blanco, O., Munoz-Fernandez, R., Tirado, I., Martin, F., Abadia-Molina, A. C. and Olivares, E. G.,** Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. **90**: 6126-6130.
- 7 **Kimatrai, M., Oliver, C., Abadia-Molina, A. C., Garcia-Pacheco, J. M. and Olivares, E. G.,** Contractile activity of human decidual stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. **88**: 844-849.
- 8 **Kinner, B., Zaleskas, J. and Spector, M.,** Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 2002. **278**: 72-83.
- 9 **Krautler, N. J., Kana, V., Kranich, J., Tian, Y., Perera, D., Lemm, D., Schwarz, P., et al.,** Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* 2012. **150**: 194-206.

- 10 **Fleire, S. J., Goldman, J. P., Carrasco, Y. R., Weber, M., Bray, D. and Batista, F. D.,** B cell ligand discrimination through a spreading and contraction response. *Science* 2006. **312**: 738-741.
- 11 **Kim, H., Zhang, X. and Choi, Y.,** Activation and proliferation of follicular dendritic cell-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 1994. **153**: 2951-2961.
- 12 **Lindhout, E., Mevissen, M. L., Kwekkeboom, J., Tager, J. M. and de Groot, C.,** Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1993. **91**: 330-336.
- 13 **Kim, H. S., Zhang, X., Klyushnenkova, E. and Choi, Y. S.,** Stimulation of germinal center B lymphocyte proliferation by an FDC-like cell line, HK. *J. Immunol.* 1995. **155**: 1101-1109.
- 14 **Hinz, B., Gabbiani, G. and Chaponnier, C.,** The NH₂-terminal peptide of alpha-smooth muscle actin inhibits force generation by the myofibroblast in vitro and in vivo. *J. Cell. Biol.* 2002. **157**: 657-663.
- 15 **Buettner, M., Pabst, R. and Bode, U.,** Stromal cell heterogeneity in lymphoid organs. *Trends Immunol.* **31**: 80-86.
- 16 **Koni, P. A. and Flavell, R. A.,** Lymph node germinal centers form in the absence of follicular dendritic cell networks. *J. Exp. Med.* 1999. **189**: 855-864.
- 17 **Boles, K., Vermi, W., Facchetti, F., Fuchs, A., Wilson, T., Diacovo, T., Cella, M. and Colonna, M.,** A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur. J. Immunol.* 2009. **39**: 695-703.
- 18 **Lund, F. E. and Randall, T. D.,** Effector and regulatory B cells: modulators of CD4(+) T cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2010. **10**: 236-247.
- 19 **Fu, Y. and Chaplin, D.,** Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 1999. **17**: 399-433.
- 20 **Tumanov, A. V., Kuprash, D. V., Mach, J. A., Nedospasov, S. A. and Chervonsky, A. V.,** Lymphotoxin and TNF produced by B cells are dispensable for maintenance of the follicle-associated epithelium but are required for development of lymphoid follicles in the Peyer's patches. *J. Immunol.* 2004. **173**: 86-91.
- 21 **Gill, M. B., Roecklein-Canfield, J., Sage, D. R., Zambela-Soediono, M., Longtine, N., Uknis, M. and Fingerroth, J. D.,** EBV attachment stimulates FHOS/FHOD1 redistribution and co-aggregation with CD21: formin

- interactions with the cytoplasmic domain of human CD21. *J. Cell. Sci.* 2004. **117**: 2709-2720.
- 22 **Blanco, O., Leno-Duran, E., Morales, J. C., Olivares, E. G. and Ruiz-Ruiz, C.,** Human decidual stromal cells protect lymphocytes from apoptosis. *Placenta* 2009. **30**: 677-685.
- 23 **Garcia-Pacheco, J. M., Oliver, C., Kimatrai, M., Blanco, F. J. and Olivares, E. G.,** Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol. Hum. Reprod.* 2001. **7**: 1151-1157.
- 24 **Dexter, T. M.,** Stromal cell associated haemopoiesis. *J. Cell. Physiol. Suppl.* 1982. **1**: 87-94.

Legends to the figures

Figure 1. Characteristics of the FDC lines. A) Morphology of fresh and cultured FDC. Fresh FDC cells with clustered lymphoid cells (arrows) 24 h after isolation (left). FDC lines showing fibroblast morphology after 2 weeks of culture (right). Magnification 200×. B) Flow cytometry analysis of antigen expression by FDC. C) Secretion of CXCL13 by two FDC lines (FDC46 and FDC47). Untreated FDC (white bar). Cytokines LT α 1 β 2 (gray bar) and TNF (black bar) (10 ng/ml, 72 h incubation) increased the secretion of CXCL13 in line FDC47. D) Percentage of apoptotic B cells cultured with or without FDC (FDC/B cell ratio 1/20). B cells were cultured with or without FDC at different FDC/B cell ratios for 72 h at 37 °C. Apoptosis of B cells was determined with quantitative analysis of sub-G1 cells by flow cytometry. E) Inhibition of apoptosis of B cells cultured with FDC at different FDC/B cell ratios. Percentage inhibition was expressed with the following formula: $100 \times (\text{apoptotic B cells alone (\%)} - \text{apoptotic B cells cultured with FDC (\%)}) / \text{apoptotic B cells alone (\%)}$. Each point represents the mean \pm SD of three measurements F) Culture in Transwell plates abrogated the protective effect of FDC against B cell apoptosis (white bar: B cells alone, black bar: B cells cultured with FDC at a FDC/B cell ratio of 1/20) (mean \pm SD of three measurements). G) FDC did not increase B cell proliferation. B cells were stained with CFSE, cultured alone (white histogram) and with FDC (FDC/B cell ratio 1/20) (gray histogram) and analyzed by flow cytometry. H) Flow cytometry analysis of antigen expression by HFF (upper row). HFF did not rescue B cells from apoptosis (lower row). These experiments were done independently four times. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

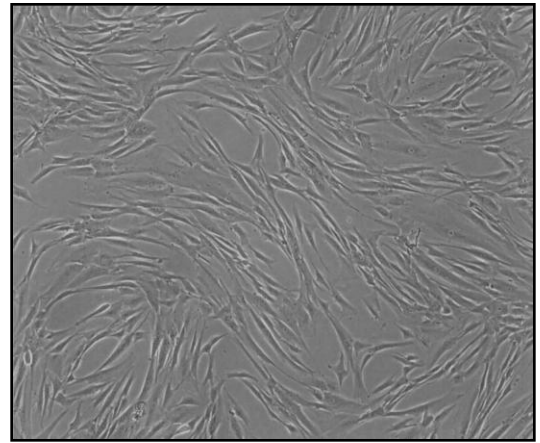
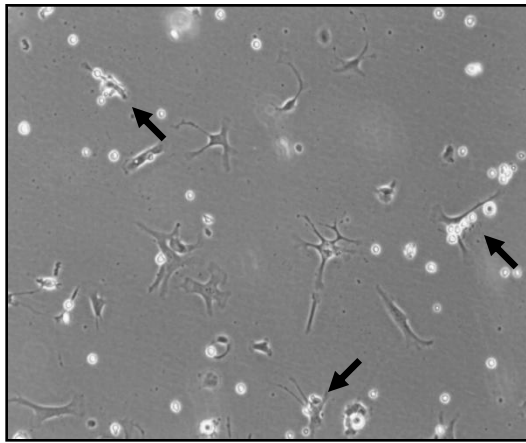
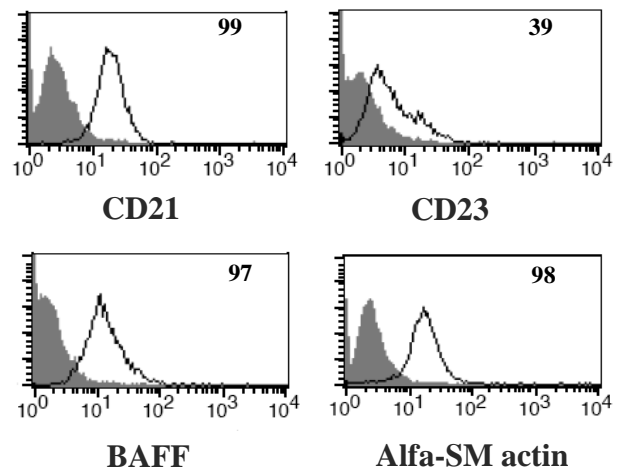
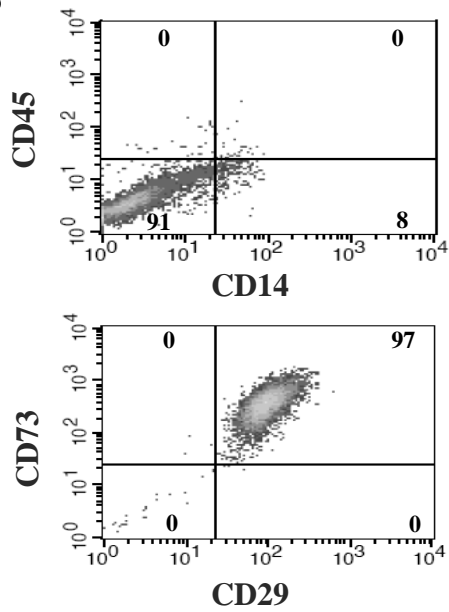
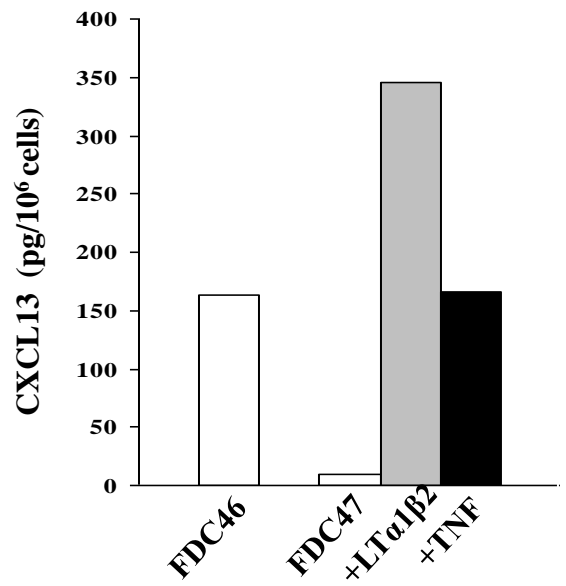
Figure 2. Effects of different cytokines on FDC contractility. FDC contractility was determined with the collagen gel contraction matrix assay after incubation with the corresponding cytokine at 37 °C for 24 h. Cytochalasin D is an inhibitor of actin polymerization. The mean of 3 measurements for each sample at each concentration point was used to estimate gel volume (*V*). The data are shown as the percentage variation in volume of the collagen gel matrix \pm SD in cytokine-treated FDC compared to FDC without cytokine, calculated with the following formula: gel volume variation (%) = $100 \times (V \text{ with cytokine} - V \text{ without cytokine})/V \text{ without cytokine}$. Negative values indicate cell contraction, whereas positive values indicate relaxation. This experiment was done independently four times. **P*<0.05, ***P*<0.001, ****P*<0.0001.

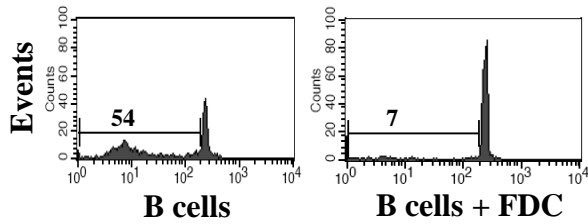
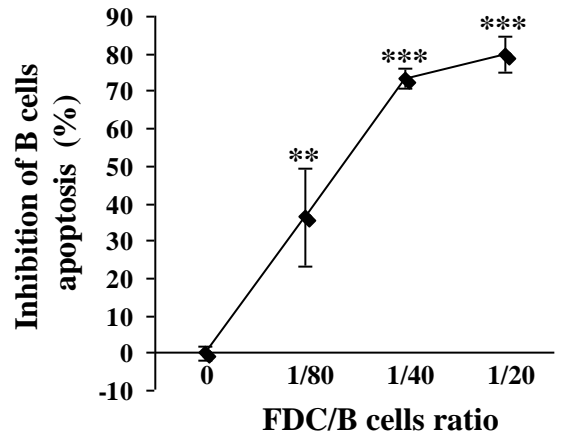
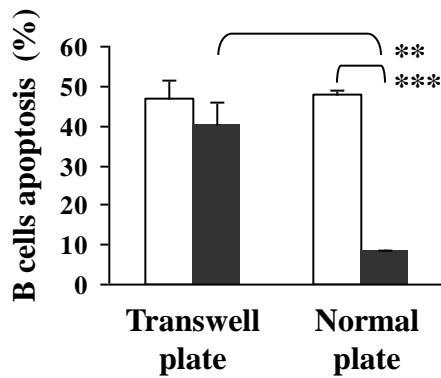
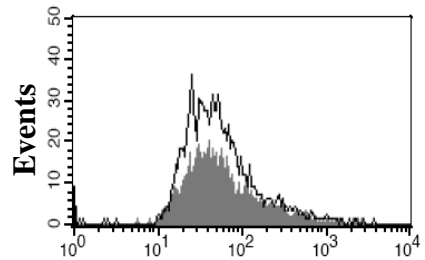
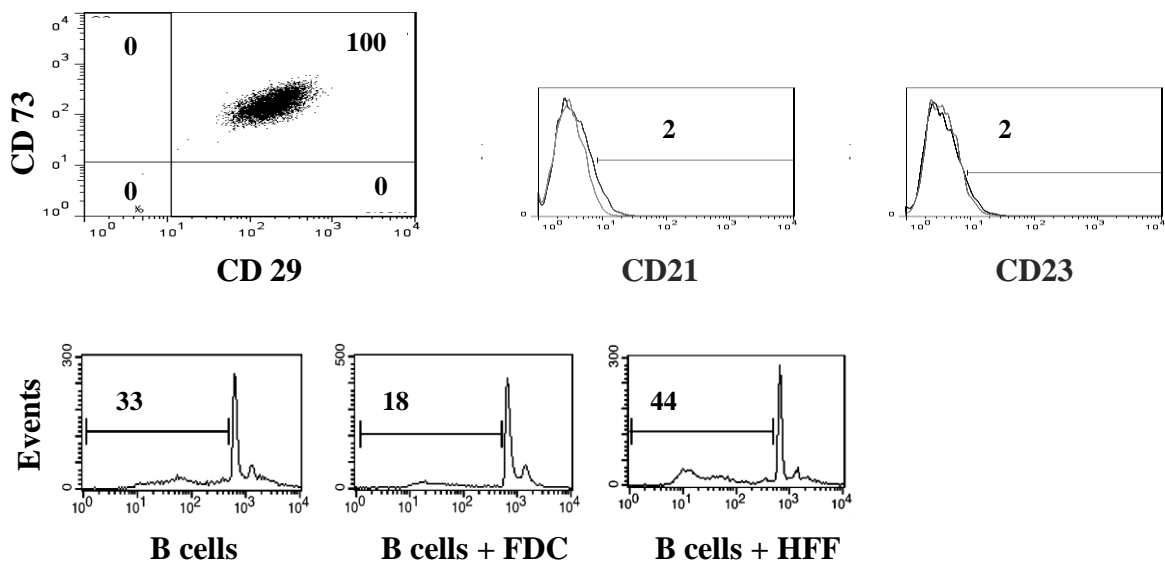
Figure 3. Immunofluorescence detection of α -SM-actin in the cytoplasm of FDC treated with different cytokines. FDC were cultured with the cytokine (25 ng/ml) or with cytochalasin D (7 μ g/ml) at 37 °C for 24 h. Alfa-SM-actin was detected with an anti- α -SM actin-Cy3 mAb and confocal microscopy. A) Unpolymerized α -SM-actin showed a diffuse pattern of fluorescence, whereas polymerized α -SM-actin was detected in the stress fibers. Cytokines IL-2, INF γ , LT α 1 β 2, and TNF increased the presence of α -SM-actin in the stress fibers, whereas IL-10 decreased their presence. FDC treated with cytochalasin D showed a diffuse pattern of fluorescence, no stress fibers, and loss of their fibroblastic morphology. A representative FDC line among the four lines studied here is shown. B) Cytokines IL-2, INF γ , LT α 1 β 2 and TNF significantly increased the proportion of FDC with α -SM-actin-positive stress fibers, and IL-10 significantly decreased the proportion. Each bar represents the mean \pm SD of three measurements. C) Expression of α -SM-actin by FDC analyzed by flow cytometry

(white bar: antigen-positive cells (%), black bar: mean fluorescence intensity) This experiment was done independently three times. * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Figure 4. Effects of different cytokines on the inhibition of B cell apoptosis by FDC. A) Inhibition of B cell apoptosis by FDC cultured with different cytokines. FDC were co-cultured with tonsil B lymphocytes (ratio 1/80) in the presence of the appropriate cytokine (30 ng/ml). After 72 h, all B lymphocytes were collected and the proportion of apoptotic cells was determined with quantitative analysis of sub-G1 cells by flow cytometry. The data are presented as the percentage inhibition of apoptosis of B lymphocytes co-cultured with FDC in the presence of cytokine compared to B lymphocytes co-cultured with FDC without cytokines according to the formula in Figure 2. Each bar represents the mean \pm SD of three measurements. IL-10 significantly increased the effect of FDC on the rescue of B cells from apoptosis (* $P < 0.05$). B) Effect of different cytokines on FDC proliferation. Cells were cultured in the presence of cytokines IL-2, IL-10, $\text{INF}\gamma$, $\text{LT}\alpha 1\beta 2$ or TNF (30 ng/ml) at 37 °C for 72 h. FDC proliferation was analyzed with MTT. Each bar represents the mean \pm SD of three measurements. None of the cytokines affected FDC proliferation. C) Effect of different cytokines on B cell proliferation. B cells were stained with CFSE and cultured alone or with FDC (FDC/B cell ratio 1/80) at 37 °C. After 72 h of incubation, B cells were collected and analyzed by flow cytometry. B cells untreated (white histogram) and treated with the cytokine (gray histogram). None of the cytokines showed an effect on the proliferation of B cells cultured alone or co-cultured with FDC. These experiments were done independently three times.

Figure 5. Effect of IL-10 on the antigen phenotype of FDC. FDC were cultured with IL-10 (30 ng/ml) for 72 h. Flow cytometry was used to analyze the effect of this cytokine on the expression of antigens that regulate B cell–FDC interactions (white bar: untreated cells, black bar: IL-10-treated FDC). BAFF was analyzed on the FDC surface (sBAFF) or in the cytoplasm (BAFF). CXL13 was analyzed in the cytoplasm. These experiments were done independently three times. No significant effect was observed.

A**B****C****Figure 1**

D**E****F****G****H****Figure 1**

Gel volume variation (%)

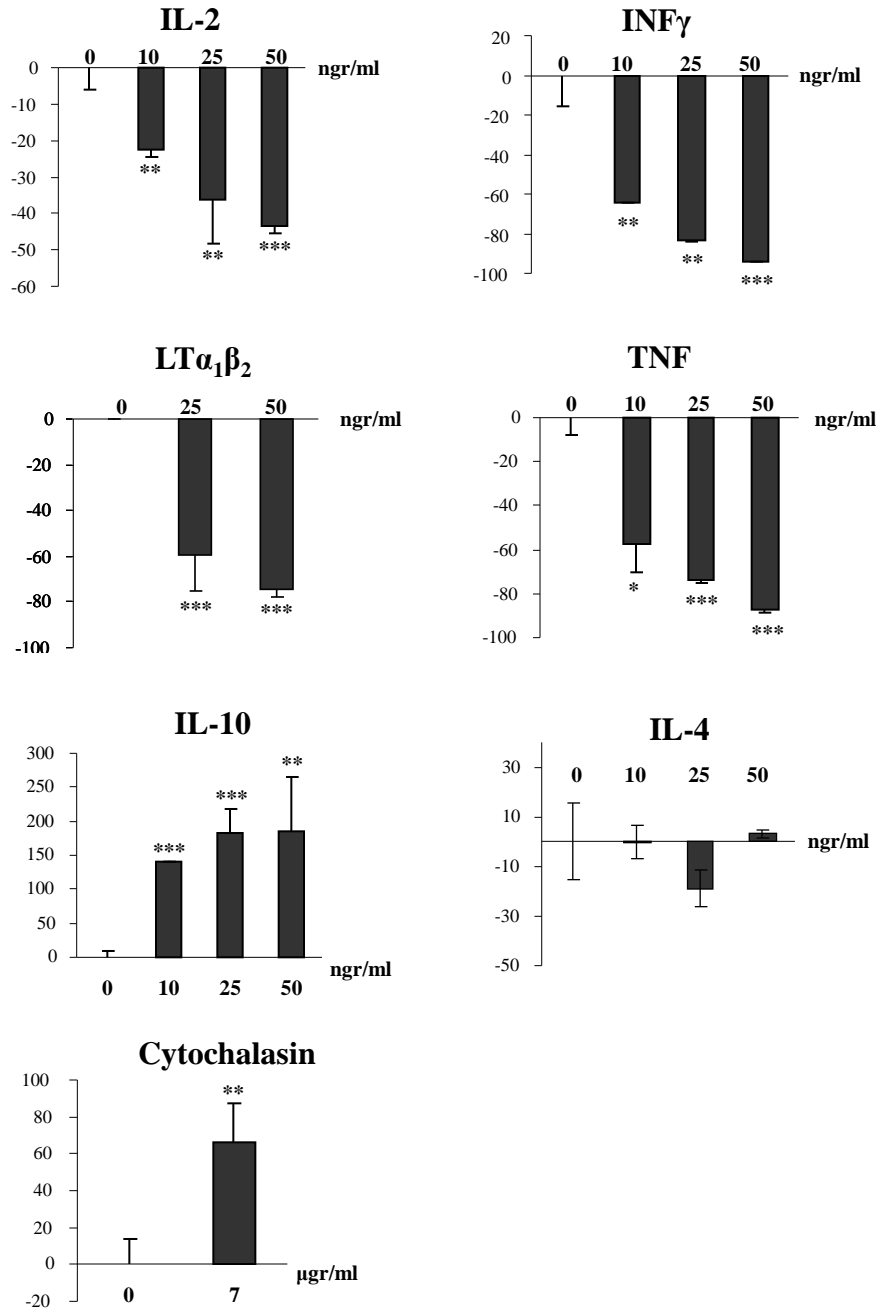


Figure 2

A

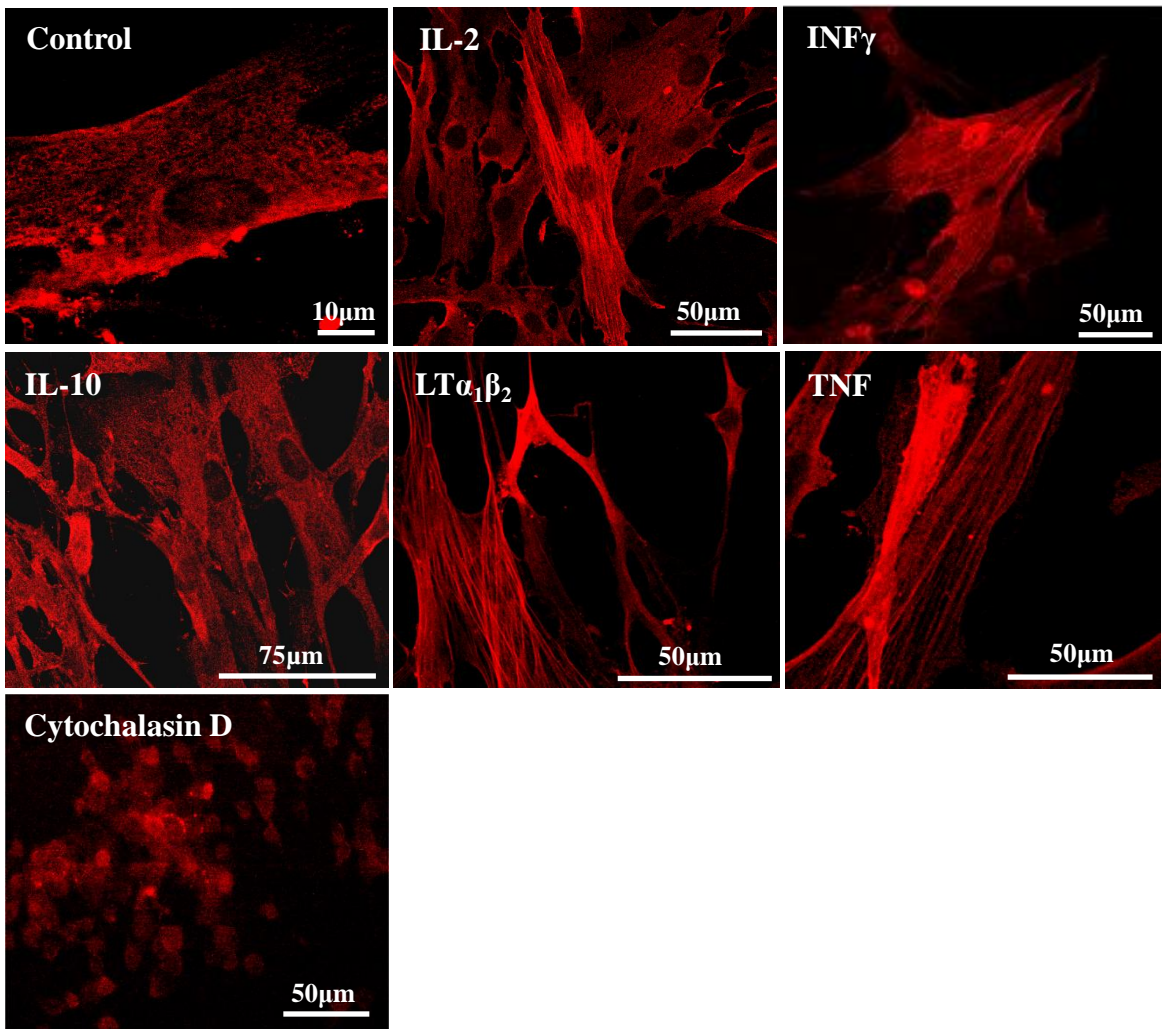
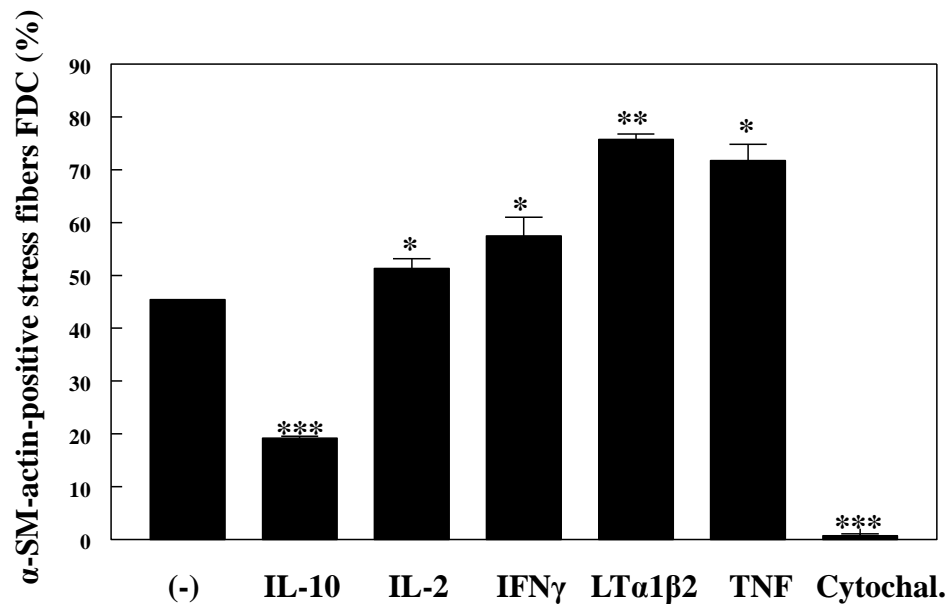
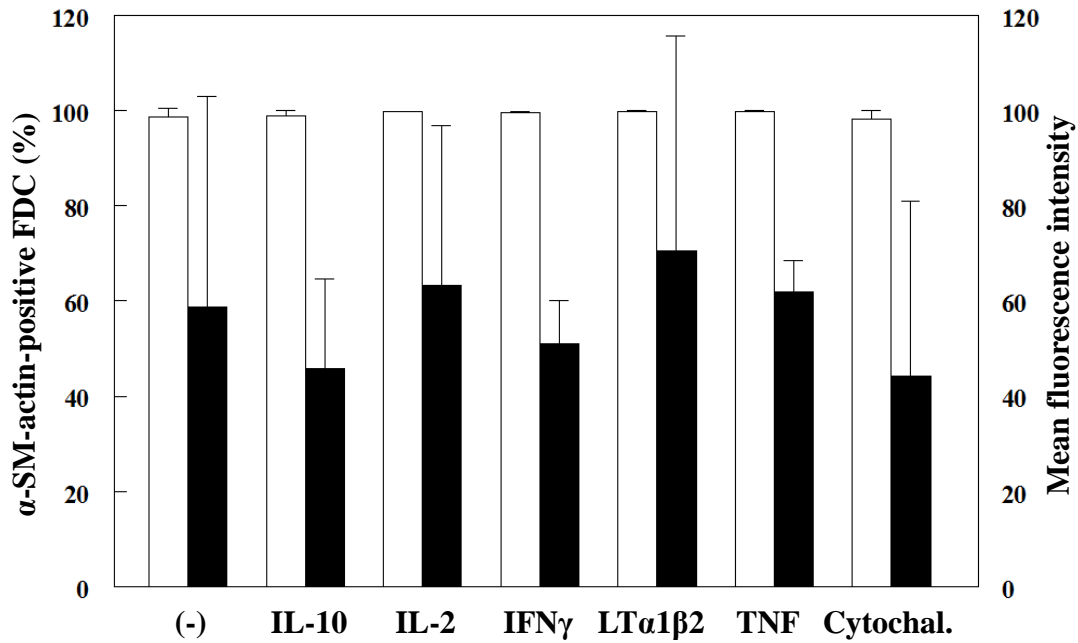
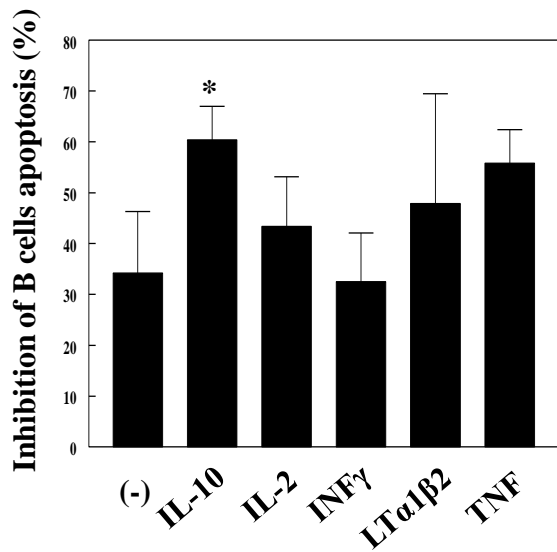
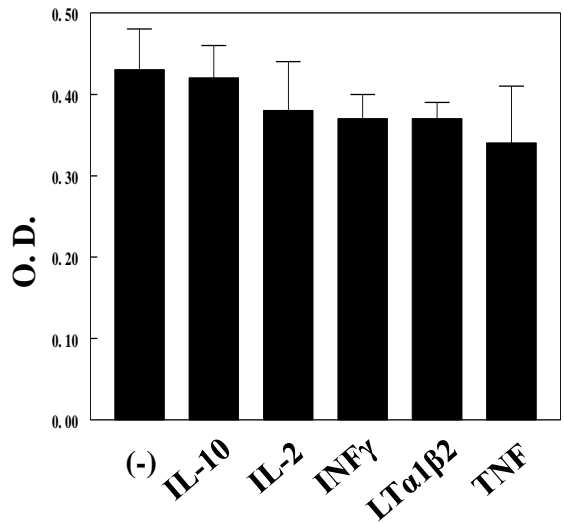
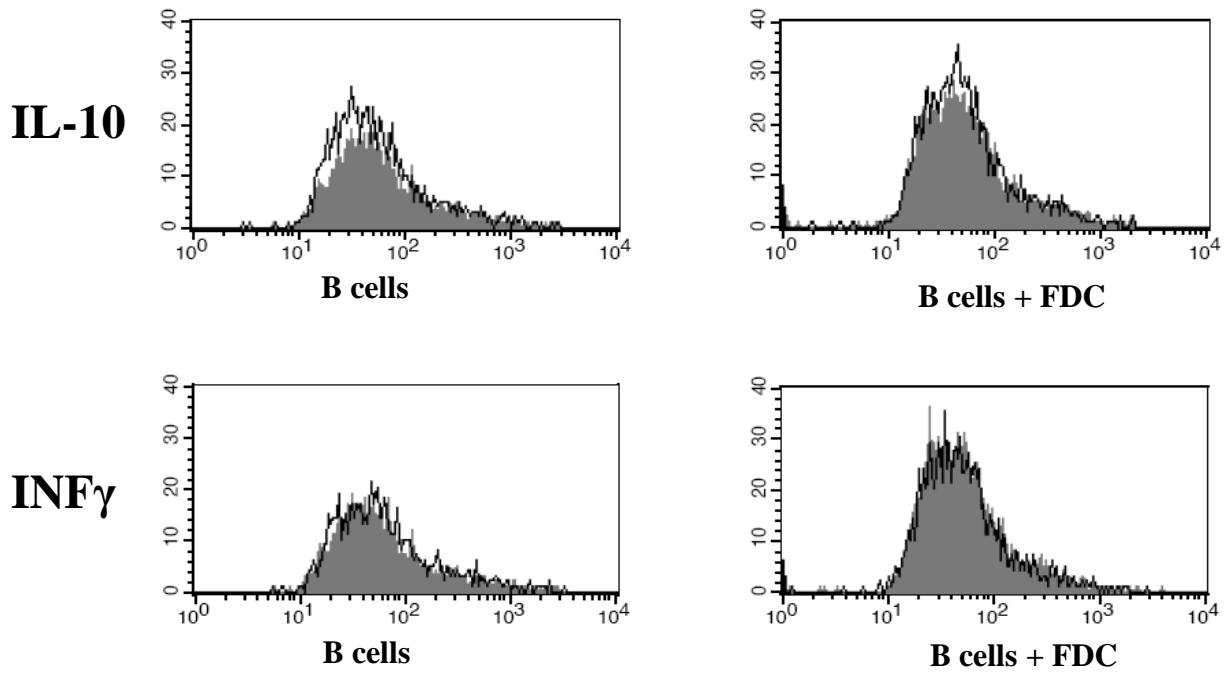


Figure 3

B**C****Figure 3**

A**B****C****Figure 4**

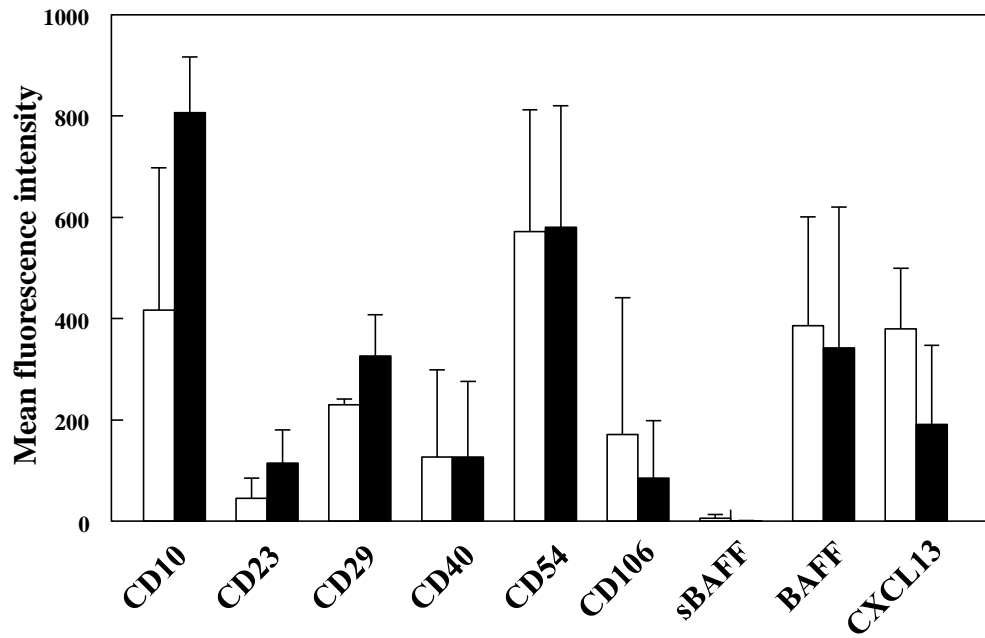
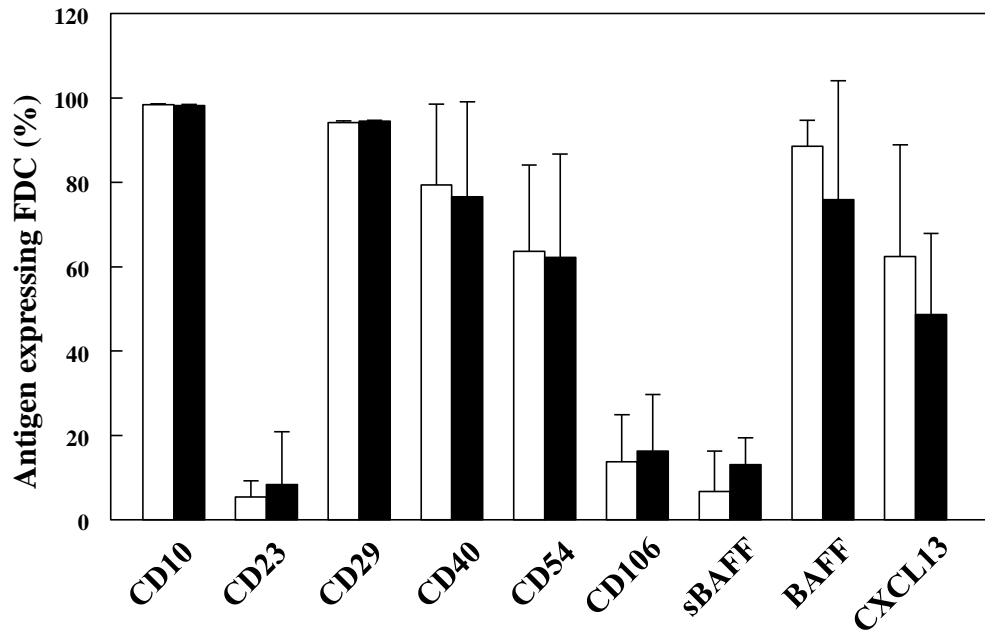


Figure 5