

104



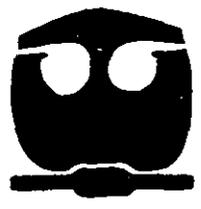
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Caracterización de Células Dendríticas en Nódulos Linfáticos de Ratones Normales y Transgénicos con Expresión Constitutiva de CD154**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**  
**P R E S E N T A**  
**GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS**

290411



MÉXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

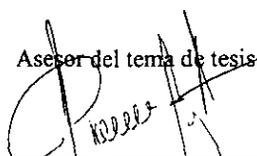
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

|               |  |
|---------------|--|
| Presidente    | Prof. Saturnino De León Chapa                |
| Vocal         | Profra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso        |
| Secretario    | Profra. Mónica Berenice Heras Chavarría      |
| 1er. Suplente | Profra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera         |
| 2º. Suplente  | Profra. Ma. Teresa de Lourdes Flores Camacho |

Sitio donde se desarrolló el tema: Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Aseor del tema de tesis



---

Dra. Laura C. Bonifaz Alfonso

Sustentante:



---

Gibrán Pérez Montesinos

## Agradecimientos

Primero que nada quiero agradecerle a mis **padres** por haberme permitido ser como soy, tomar mis decisiones, correctas y equivocadas y haberme apoyado siempre. Realmente no tengo la capacidad de describir todo lo que siento por ustedes. Los quiero mucho.

**Héctor**, aunque sé que en general no he sido el mejor hermano del mundo ni mucho menos, quiero agradecerte porque gracias a ti, a veces me comprendo mejor y aunque no lo demuestre muy seguido, te quiero mucho.

También quiero agradecer a mi **abuelita Conchita**, por todo el apoyo que me ha dado durante toda mi vida y especialmente en estos últimos años. También dedico esto a mis otros abuelitos: **Román, Adelina y Moisés**, a quienes recuerdo con mucho cariño y me hubiera gustado conocer mejor pero no conté con esa suerte.

También a todos mis tíos: **Román, Marcela, Rodolfo, Mary, Rafael, Ticha, Marisa, Rubén, Ricardo, Minerva**, a mi tía **Elenita**, a mi tía nena y Javier por esas reuniones familiares en las que me divertía mucho de chico y que a la fecha me divierten. Han tenido una gran influencia en mí.

A mi tío **Moisés** y mi tía **Otilia** por el gran apoyo que me han brindado, siempre estuvieron ahí cuando los necesité. A mis tíos **Jose y Jorge**, que aunque no los veo tan seguido han influido mucho en mí.

Esperando no haber olvidado a nadie, pasamos ahora a los asuntos académicos y no familiares.

A mi asesora **Laura Bonifaz** quiero agradecerle el haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de trabajar con ella. No tienes idea de todo lo que he aprendido de ti. Me has cambiado la forma de ver muchas cosas. Gracias.

A todos mis compañeros de la Facultad de Química en especial a **Edgar e Iván** (son como mis hermanos); **Mayté, Nelly, Sandra y Noemí**, que tuvieron la mala fortuna de tener que soportar mis enojos y demás, en infinidad de clases y laboratorios. Muchísimas gracias, los quiero muchísimo. **Alberto**, no vayas a creer que me olvidé de ti y aunque nos hayamos distanciado un poco, tu amistad siempre ha sido importante para mí.

Aprovechando el cambio de hoja quiero agradecerle a todos en el laboratorio de la UIM en Enfermedades autoinmunes: Dr. Moreno, gracias por permitirme trabajar ahí, he aprendido mucho. A Chucho, Paty, Yu – Mei y Melisa. Para finalizar mi muy especial agradecimiento a **Abi** y **Judith**, he aprendido muchísimo de ustedes y creo que me han ayudado a crecer personalmente, en parte gracias a esas largas conversaciones. Ambas son muy importantes para mí.

También quiero agradecer a la **UNAM** y a la **Facultad de Química** por todo lo que me proporcionaron en este tiempo, ya que no solo se buscan el desarrollo académico de sus estudiantes, sino también su desarrollo como individuos pertenecientes a una sociedad.

Casi para finalizar quiero agradecer a mis amigos de Hermosillo especialmente a: José Angel, Joel, Fernanda, Griselda, Giselle, Mónica, Betty, América, Alfonso, Fabrett y Abraham.

Finalmente quiero agradecer a dos personas, una con la cual aprendí a querer de otra forma, y a ver la vida de otra forma. Muchísimas gracias, aunque ya te lo haya dicho en más de una ocasión. La segunda, **Laura Rabelo** gracias a ti mi vida a cambiado y este último mes habría sido mucho más difícil sin ti.

## Índice

|   | Página |
|---|--------|
| Lista de Abreviaturas.....  | i      |
| I. Introducción.....  | 2      |
| II. Antecedentes.....   | 4      |
| a. Células Dendríticas.   |        |
| i. Características Generales.....   | 4      |
| ii. Obtención y Maduración de Células Dendríticas <i>in vitro</i> .....             | 4      |
| iii. Maduración de Células Dendríticas <i>in vivo</i> .....                         | 5      |
| iv. Subpoblaciones y Marcadores.....  | 7      |
| v. Funciones.....   | 9      |
| b. CD40 y CD154 (Ligando de CD40).  |        |
| i. Descripción.....   | 14     |
| ii. Funciones Generales.....  | 16     |
| c. Participación de CD154 en la Maduración y Función de<br>Células Dendríticas..... | 17     |
| III. Justificación y Planteamiento del Problema.....                                | 20     |
| IV. Hipótesis.....  | 21     |
| V. Objetivos.....   | 22     |
| VI. Modelo Experimental.....  | 23     |
| VII. Materiales y Métodos.....  | 24     |
| VIII. Resultados.....   | 26     |
| IX. Discusión.....  | 39     |
| X. Conclusiones.....  | 42     |
| Referencias.....  | 43     |

## Lista de Abreviaturas.

|               |  |
|---------------|--|
| <b>APC</b>    | <b>Alofococianina (fluorocromo).</b>   |
| <b>AQP</b>    | <b>Acuaporina.</b>   |
| <b>CCR5</b>   | <b>Receptor 5 para quimiocinas CC. Las quimiocinas CC se caracterizan por tener 2 cisteínas consecutivas en su secuencia (Quimiocinas CC).</b> |
| <b>CCR6</b>   | <b>Receptor 6 para quimiocinas CC.</b>   |
| <b>CCR7</b>   | <b>Receptor 7 para quimiocinas CC.</b>   |
| <b>CD4</b>    | <b>Correceptor de moléculas de clase II del complejo principal de histocompatibilidad.</b>   |
| <b>CD8</b>    | <b>Correceptor de moléculas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad.</b>  |
| <b>CD11b</b>  | <b>Subunidad de la integrina CR3, se asocia a CD18.</b>  |
| <b>CD11c</b>  | <b>Subunidad de la integrina CR4, se asocia a CD18.</b>  |
| <b>CD34</b>   | <b>Ligando para la L-selectina.</b>  |
| <b>CD40</b>   | <b>Receptor para señales de coestimulación. Se une a CD154.</b>  |
| <b>CD54</b>   | <b>Molécula de adhesión intercelular I (ICAM-1).</b>   |
| <b>CD80</b>   | <b>Molécula coestimuladora presente en células presentadoras de antígeno (B7.1).</b>   |
| <b>CD83</b>   | <b>Molécula de la familia de las inmunoglobulinas de función desconocida.</b>  |
| <b>CD86</b>   | <b>Molécula coestimuladora presente en células presentadoras de antígeno (B7.2).</b>   |
| <b>CD95</b>   | <b>Molécula inductora de apoptosis (Fas).</b>  |
| <b>CD95L</b>  | <b>Ligando de CD95 o ligando de Fas.</b>   |
| <b>CD154</b>  | <b>Ligando de CD40.</b>  |
| <b>c-kitL</b> | <b>Ligando de c-kit o factor de células estaminales (“stem cell factor”).</b>  |
| <b>CXCR4</b>  | <b>Receptor 4 para quimiocinas que poseen dentro de su secuencia una cisteína, un aminoácido cualquiera y una cisteína (quimiocinas CXC).</b>  |
| <b>DBFT</b>   | <b>Dibutilftalato.</b>   |
| <b>DNA</b>    | <b>Ácido desoxirribonucleico.</b>  |

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>EDTA</b>                    | <b>Ácido etilen-diamino-tetracético.</b>  |
| <b>FITC</b>                    | <b>Isotiocianato de fluoresceína.</b>   |
| <b>Flt-3</b>                   | <b>También denominado FLK2 o CD135. Receptor para factores de crecimiento en células hematopoyéticas y células precursoras en hígado fetal.</b> |
| <b>Flt-3L</b>                  | <b>Ligando de Flt-3.</b>  |
| <b>G-CSF</b>                   | <b>Factor estimulador de colonias de granulocitos.</b>  |
| <b>GM-CSF</b>                  | <b>Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.</b>   |
| <b>IL</b>                      | <b>Interleucina.</b>  |
| <b>IMF</b>                     | <b>Intensidad media del fluorescencia.</b>  |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | <b>Interferón <math>\gamma</math>.</b>  |
| <b>kDa</b>                     | <b>kilo Daltones.</b>   |
| <b>LPS</b>                     | <b>Lipopolisacárido.</b>  |
| <b>MHC</b>                     | <b>Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.</b>   |
| <b>MHC I</b>                   | <b>Moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad.</b>   |
| <b>MHC II</b>                  | <b>Moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad.</b>  |
| <b>MIP</b>                     | <b>Quimiocinas pertenecientes al grupo de quimiocinas caracterizado por tener 2 cisteínas consecutivas en su secuencia (quimiocinas CC).</b>    |
| <b>PBS</b>                     | <b>Solución amortiguadora de fosfatos y salina.</b>   |
| <b>PCR</b>                     | <b>Reacción en cadena de la polimerasa.</b>   |
| <b>PE</b>                      | <b>Ficoeritrina (fluorocromo).</b>  |
| <b>PerCP</b>                   | <b>Proteína peridinina clorofila – a (fluorocromo).</b>   |
| <b>PMA</b>                     | <b>Éster de forbol-miristato-acetato.</b>   |
| <b>RANTES</b>                  | <b>Quimiocina perteneciente al grupo de quimiocinas caracterizado por tener 2 cisteínas consecutivas en su secuencia (quimiocinas CC).</b>      |
| <b>SDF-1</b>                   | <b>Quimiocina perteneciente al grupo de quimiocinas CXC.</b>  |
| <b>Th1</b>                     | <b>Subpoblación de linfocitos T CD4 involucrados en la activación de macrófagos.</b>  |
| <b>Th2</b>                     | <b>Subpoblación de linfocitos T CD4 involucrados en la estimulación de células B a producir anticuerpos.</b>                                    |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | <b>Factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math>.</b>  |

## I. Introducción.

La respuesta inmune tiene como finalidad asegurar que un organismo pueda sobrevivir en un ambiente donde se encuentran una gran cantidad de microorganismos potencialmente patogénicos.

En la respuesta inmune participan una gran variedad de células que llevan a cabo distintas funciones. En el inicio de una respuesta inmune participan principalmente células fagocíticas, como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y células dendríticas. Esta respuesta inicial también es conocida como respuesta inmune innata. La respuesta inmune adaptativa se encarga de amplificar y hacer más eficiente a la respuesta inmune innata, además de llevar a cabo funciones efectoras por sí misma. En esta segunda fase de la respuesta inmune o respuesta inmune adaptativa, participan células como los linfocitos T, citotóxicos y de ayuda, y los linfocitos B. Éstas células poseen receptores específicos que las distinguen de las células que participan en la respuesta inicial. Sin embargo, células como los macrófagos y células dendríticas son de gran importancia para que pueda iniciarse la respuesta inmune adaptativa.

La importancia de los macrófagos y de las células dendríticas reside principalmente en que, al ser células presentadoras de antígeno profesionales (junto con los linfocitos B) son capaces endocitar antígenos y degradarlos en su interior (procesamiento) para posteriormente presentar los productos de estos antígenos unidos a moléculas clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Además, las células presentadoras de antígeno son las únicas capaces de expresar moléculas coestimuladoras, necesarias para iniciar una respuesta mediada por los linfocitos T. Una vez activados los linfocitos T participan activamente en la respuesta, ya sea llevando a cabo funciones citotóxicas o bien, de ayuda, para activar a los linfocitos B o mejorar las funciones de macrófagos y también de las células dendríticas.

Dentro de las células presentadoras de antígeno profesionales, las células dendríticas son las únicas que expresan constitutivamente moléculas coestimuladoras y son, además, las células más importantes y eficientes en el inicio de una respuesta inmune mediada por linfocitos T. También existen evidencias que sugieren que las células dendríticas participan activamente y de forma importante en la dirección de la respuesta inmune adaptativa

(Banchereau, J. y R. Steinman, 1998) y es por esta razón que su estudio ha cobrado gran importancia en los últimos años.

Diversos estudios *in vitro* así como algunos otros *in vivo* han permitido establecer que uno de los factores que promueve la diferenciación de precursores de células dendríticas, así como su maduración y diversas funciones es la interacción CD40/CD154 (Flores-Romo, *et. al.*, 1997; Moodycliffe, *et. al.*, 2000). La importancia de esta interacción se describió inicialmente en los linfocitos B, ya que estaba involucrada en su proliferación, activación y generación de respuestas humorales adecuadas (van Kooten, C. *et. al.*, 1996). CD40 también es expresado en forma constitutiva tanto en precursores como en células dendríticas inmaduras y aumenta su expresión en células dendríticas maduras (Péguet-Navarro, *et. al.*, 1995; Flores-Romo, *et. al.*, 1997). Por otra parte la expresión de CD154 se induce principalmente en los linfocitos T activados y una característica importante de la expresión de esta molécula es que es transitoria (van Kooten, C. *et. al.*, 1996). Lo anterior sugiere que el momento más importante de la interacción CD40-CD154 es durante la presentación de antígeno de las células dendríticas maduras al linfocito T. Tomando en cuenta las evidencias de que esta interacción es importante para la diferenciación y maduración de las células dendríticas el objetivo de este trabajo es estudiar las consecuencias que puede tener la expresión temprana y prolongada de la interacción CD40/CD154 en las células dendríticas en cuanto a diferenciación, fenotipo, endocitosis y capacidad de migración de piel a nódulos linfáticos.

## **II. Antecedentes.**

### **a. Células Dendríticas.**

#### **i. Características Generales.**

Las células dendríticas son células de amplia distribución en el organismo, tanto en tejidos linfoides como no linfoides. Tienen una morfología particular la cual les da su nombre y pertenecen al grupo de células conocido como presentadoras de antígeno profesionales. Estas células son de vital importancia para el inicio de una respuesta mediada por linfocitos T o con su participación.

Varias líneas de evidencia sugieren que las células dendríticas no son una población homogénea, ya que dentro de éstas células encontramos a las denominadas células interdigitantes, células “veladas”, células de Langerhans y células dendríticas intersticiales. Las células interdigitantes se encuentran en órganos linfoides periféricos principalmente en las denominadas zonas T, las células “veladas” se localizan en la linfa aferente y las células de Langerhans se localizan en piel; específicamente en la epidermis. Por último, las células dendríticas intersticiales se localizan en la mayoría de los órganos, con la excepción del cerebro, en los espacios intersticiales drenados por la linfa aferente. Las células dendríticas intersticiales también se localizan en la dermis (Paul, William, 1999).

Las células dendríticas que se encuentran en tejidos no linfoides y mucosas están en un estado inmaduro y su función principal es la captación y el procesamiento de antígenos y una vez que han hecho esto sufren un proceso de maduración, que se encuentra asociado a su migración hacia órganos linfoides secundarios, donde su función es activar a los linfocitos T específicos para el antígeno que están presentando.

#### **ii. Obtención y Maduración de Células Dendríticas *in vitro*.**

A pesar de que fueron descubiertas hace tiempo, los avances en el conocimiento de las células dendríticas comenzaron a darse alrededor de 1992, principalmente porque no se contaba con una buena fuente de células dendríticas, ya que éstas se encuentran en cantidades muy pequeñas en el organismo y no fue sino hasta este año cuando fue descrito un método para obtener dichas células *in vitro*, utilizando precursores de sangre periférica en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM – CSF).

Este método utilizaba como precursores células mononucleares obtenidos de sangre periférica y requería de periodos de cultivo de 2 a 3 semanas para la obtención de células dendríticas. Estos experimentos permitieron la descripción de características que tenían los cultivos de dichas células; como el hecho de que formaban agregados de células (“racimos”) de los cuales se iban desprendiendo las células dendríticas para encontrarlas flotando en el medio de cultivo (Inaba K, *et. al.*, 1992).

Posteriormente se describieron métodos utilizando otras fuentes de células precursoras, como médula ósea de ratón o precursores CD34+ obtenidos de médula ósea humana y otras citocinas como TNF- $\alpha$  en combinación con GM-CSF para tratar de mejorar la eficiencia de obtención de las células dendríticas maduras. (Inaba *et. al.*, 1992; Reid *et. al.*, 1992; y Romani *et. al.*, 1994). Una combinación importante en este tipo de cultivos es la de GM-CSF e interleucina 4 (IL-4), ésta última se utiliza principalmente como un factor de inhibición del desarrollo de macrófagos, lo que permite una mayor diferenciación de los progenitores hacia células dendríticas (Romani *et. al.*, 1994).

Los procedimientos mencionados para la obtención de células dendríticas las vincularon a la línea de desarrollo de células mieloides. Sin embargo, posteriormente se han reportado técnicas en las que no se emplea el GM-CSF como suplemento para el medio de cultivo sino una combinación de distintas citocinas, además de la utilización de precursores tímicos, que se encuentran ligados a la línea de desarrollo linfoide. A partir de estos resultados se plantea que existen distintos tipos de precursores, mieloides o linfoides, que pueden dar origen a las células dendríticas (Saunders *et. al.*, 1996).

### **iii. Maduración de Células Dendríticas *in vivo*.**

En estudios realizados *in vivo* se determinó que las células dendríticas pueden encontrarse en diferentes estadios de maduración. Esto es, hay células dendríticas inmaduras y células dendríticas maduras, y este estado de maduración se refleja por los marcadores que expresan en su superficie, la función que llevan a cabo y su localización en el organismo. Lo anterior se confirmó con estudios *in vitro*, que demostraron que al cultivar células de Langerhans estas maduran y cambian su fenotipo (Péguet-Navarro *et. al.*, 1995).

Por otro lado, también se ha demostrado que los monocitos que se encuentran en los epitelios son capaces de diferenciarse a células dendríticas *in vivo*. Sin embargo, las células

dendríticas que provienen de monocitos presentan algunas diferencias fenotípicas con respecto a las células dendríticas derivadas de otras fuentes como las células de Langerhans (Randolph G. J. *et. al.*, 1999). Así, las células de Langerhans no son las únicas que pueden dar origen a células dendríticas después de aplicar un antígeno en piel.

En estudios realizados *in vivo*, se ha encontrado que la administración de factores como LPS, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  producen una migración de células dendríticas, además de cambios fenotípicos asociados a maduración (Roake J. *et. al.*, 1995). Para facilitar los estudios *in vivo* y es necesario obtener mayores cantidades de células dendríticas de los órganos linfoides, con esa finalidad se han administrado también factores de crecimiento, previamente probados *in vitro* como GM-CSF, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y el ligando de c-kit (c-kitL) también conocido como factor de células estaminales o *stem cell factor*; otro de los factores probados fue el ligando de Flt3 (Flt3L), un factor de crecimiento que estimula la proliferación de progenitores y células estaminales hematopoyéticas. En estos estudios, sólo el ligando de Flt3 probó ser una citocina efectiva en lograr un aumento significativo en el número de las poblaciones de células dendríticas (Maraskovsky E. *et. al.*, 1996). El ligando de Flt3 también ha probado ser útil como suplemento, en cultivos *in vitro*, para los precursores de células dendríticas que se obtienen en ausencia de GM-CSF.

Otra interacción cuya influencia sobre la diferenciación de precursores y la maduración de las células dendríticas ha sido estudiada es la de CD40/CD154. Esta se describió inicialmente *in vitro* cuando se compararon sus efectos con los del TNF- $\alpha$ . (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) y aunque existen algunos estudios *in vivo*, los modelos *in vitro* son los que se han empleado principalmente para el estudio de este estímulo en células dendríticas.

Así entre los factores que se han descrito que participan de forma importante en los procesos de diferenciación y maduración finales de las células dendríticas se encuentran el TNF- $\alpha$ , LPS y CD154.

Las células dendríticas realizan dos funciones distintas pero interdependientes durante su proceso de maduración: las células inmaduras captan y procesan los antígenos, función que pierden al madurar pero adquieren la capacidad de activar a los linfocitos T.

Para activar a los linfocitos T las células dendríticas migran de la periferia hacia los órganos linfoides.

Lo anterior es apoyado por evidencias de que la aplicación sistémica de los estímulos inflamatorios como TNF $\alpha$  y LPS producen una redistribución de las células dendríticas, de manera que las que se encuentran en los órganos no linfoides desaparecen de ellos, (aunque esta desaparición se asocia más a migración que a muerte) mientras que las células que se encuentran en órganos linfoides, migran de las zonas marginales de éstos, hacia las zonas de linfocitos T. Durante esta migración, ocurren cambios fenotípicos que se asocian a procesos de maduración como la movilización de moléculas clase II de compartimentos intracelulares hacia la superficie de la célula (De Smet *et. al.*, 1996; Roake J *et. al.*, 1995).

#### **iv. Subpoblaciones y Marcadores.**

Otro de los factores que complicó en los inicios el estudio de las células dendríticas fue la falta de marcadores específicos, siendo uno de los primeros el reconocido por el anticuerpo NLDC-145. El antígeno reconocido por éste anticuerpo es denominado actualmente DEC-205 y es un receptor de tipo multielectina, el cual, no se expresa en todas las poblaciones de células dendríticas (Kraal G., *et. al.*, 1986).

Así debido a la ausencia de un marcador específico, para el estudio de las células dendríticas se usan combinaciones de marcadores, entre los que destacan CD11c y una expresión elevada de moléculas clase II del MHC. Otros marcadores que se expresan habitualmente en células dendríticas son: CD40, CD80, CD86 y CD58, entre otros. Las células dendríticas inmaduras, como las células de Langerhans tienen baja expresión de moléculas de presentación y coestimulación, pero su expresión de receptores para Fc es elevada, además de que también expresan la molécula CD40 (Péguet-Navarro *et. al.*, 1995).

Al estudiar las células dendríticas en los diferentes órganos linfoides, se ha encontrado que en el timo murino éstas expresan el marcador CD8 como un homodímero de cadenas  $\alpha$ . En otros órganos linfoides del ratón, las células dendríticas también pueden ser subdivididas en células CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>-</sup> (Vremec *et. al.*, 1992).

Otros estudios han encontrado que la expresión de la molécula DEC-205 correlaciona con la de CD8 $\alpha$  y que la mayoría de las células negativas para estos dos

marcadores expresan frecuentemente el marcador CD11b (Vremec and Shortman, 1997). Estos acontecimientos apoyan la idea de dos orígenes de las células dendríticas, uno linfóide vinculado con el marcador CD8 $\alpha$  y uno mielóide vinculado con la expresión de CD11b.

Así, en varios estudios se han denominado células dendríticas a las células que expresan CD11c en elevada proporción y que, además, expresan altos niveles de moléculas clase II del MHC, que se subdividen en linfoides, cuando coexpresan CD8 $\alpha$  y DEC-205 (CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DEC-205<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup>); y mieloides, que expresan CD11b (CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DEC-205<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>).

En los nódulos linfáticos de ratón se han encontrado células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DEC-205<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> y células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DEC-205<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>, predominando estas últimas. También se ha reportado una pequeña población de células dendríticas de nódulo linfático que expresa el marcador DEC-205 pero es negativa o tiene una expresión muy baja de CD8 $\alpha$  además de ser también CD11b<sup>+</sup> (Vremec and Shortman, 1997).

En el humano hay una similitud en cuanto a las subpoblaciones de células dendríticas descritas en el ratón y pueden ser obtenidas *in vitro* a partir de precursores CD34<sup>+</sup>, de médula ósea o de sangre de cordón umbilical, así como de monocitos CD14<sup>+</sup> cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4. Las células obtenidas de esta forma han sido denominadas células dendríticas mieloides (Young *et. al.*, 1995; Caux *et. al.*, 1996; Bender *et. al.*, 1996).

Por otro lado las células dendríticas linfoides descritas en el humano, son obtenidas principalmente a partir de células plasmocitoides aisladas de amígdalas, y se les ha denominado linfoides ya que carecen de marcadores de línea mielóide además de que pueden ser obtenidas en cultivo en ausencia de GM-CSF, siendo en este caso la IL-3 la principal citocina utilizada (Grouard *et. al.*, 1997; Rissoan *et.al.*, 1999).

En el estudio de las células dendríticas de origen humano ha sido posible establecer un marcador de maduración, la molécula CD83, mientras que en el ratón no ha sido posible hasta el momento establecer un marcador de maduración específico para las células dendríticas. Las diferencias en fenotipo dentro de las células dendríticas han sido relacionadas con posibles diferencias funcionales, mismas que serán tratadas más adelante.

Así tenemos que, dependiendo del origen de las células dendríticas, ya sea obtenidas en cultivo o de análisis *ex vivo*, así como si son de origen humano o murino; éstas expresan una gran variedad de marcadores de superficie. En la Tabla I encontramos un pequeño resumen de los marcadores expresados por las células dendríticas de ratón, dependiendo de su origen.

**Tabla I. Marcadores de Superficie de Células Dendríticas de Ratón.**

| Marcador de Superficie | Células Dendríticas derivadas <i>in vitro</i> | Células Dendríticas <i>ex vivo</i> |             |
|------------------------|---|------------------------------------|-------------|
|                        | Derivadas de CD34 <sup>+</sup><br>"Mieloides" | "Mieloides"                        | "Linfoides" |
| CD4                    | -   | ++                                 | -           |
| CD8 $\alpha$           | -   | -                                  | ++          |
| CD11a                  | ++  | ++                                 | ++          |
| CD11b                  | ++  | ++                                 | -/+         |
| CD11c                  | ++  | ++                                 | ++          |
| CD80                   | ++  | +                                  | +           |
| CD86                   | ++  | ++                                 | +           |
| CD95L                  | +   | +                                  | ++          |
| MHC Clase I            | ++  | ++                                 | ++          |
| MHC Clase II           | ++  | ++                                 | ++          |
| DEC-205                | -/+   | -/+                                | ++          |

Adaptada de Reid *et. al.*, 2000

#### v. Funciones.

Las células dendríticas como células presentadoras de antígeno profesionales son capaces de llevar a cabo procesos de fagocitosis, endocitosis mediada por receptores y macropinocitosis, además pueden procesar antígenos para ser presentados tanto por moléculas MCH I, como por moléculas MHC II y estimular linfocitos T vírgenes (Banchereau and Steinman, 1998).

Las células de Langerhans y las células dendríticas obtenidas a partir de cultivos con GM-CSF e IL-4, sin la adición de estímulos inflamatorios, poseen un fenotipo considerado de inmadurez. Sin embargo, con el cultivo van perdiendo gradualmente su capacidad para

captar antígenos solubles. Así, la principal función de las células dendríticas inmaduras consiste en la captación de antígenos, ya sea por fagocitosis, endocitosis o macropinocitosis, seguido de su transporte y procesamiento (Romani N. *et. al.*, 1989; Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

La endocitosis que llevan a cabo las células dendríticas inmaduras está controlada por GTPasas de la familia Rho, principalmente Cdc42 y Rac1 y aunque se desconoce exactamente a que nivel actúan, se sabe que este control es dependiente del estado de maduración de la célula, ya que al avanzar el estado de maduración éstas van perdiendo la capacidad de activar Cdc42 y, como consecuencia de ello, disminuye su capacidad endocítica (Garret *et. al.*, 2000). DEC-205 participa de forma importante en la endocitosis mediada por receptor en las células dendríticas que lo expresan.

Los procesos de macropinocitosis y endocitosis que no son mediados por receptores y que llevan a cabo las células dendríticas también son regulados por las acuaporinas, que son moléculas encargadas de llevar a cabo procesos de intercambio de agua, de esta forma la célula dendrítica es capaz de regular el volumen celular así como el volumen de las vesículas de macropinocitosis, además de concentrar los solutos dentro de éstas. Las células dendríticas inmaduras expresan activamente 3 acuaporinas distintas, la AQP3, AQP7 y AQP9, donde la expresión de las dos primeras se pierde al madurar la célula lo cual está relacionado con la poca actividad endocítica que manifiesta una célula dendrítica madura. El bloqueo de la actividad de estas acuaporinas en células dendríticas inmaduras disminuye su capacidad de macropinocitosis además de producir turgencia de la célula con la consecuente pérdida de la morfología dendrítica (de Baey and Lanzavecchia, 2000).

La disminución en la endocitosis de las células dendríticas maduras se ha propuesto que permite tanto a los complejos MHC-péptido como a las moléculas coestimuladoras permanecer un mayor tiempo en la superficie de la célula, mejorando así su capacidad de presentación y estimulación de linfocitos T.

El procesamiento de los antígenos endocitados también es llevado a cabo por las células dendríticas cuando aún se encuentran en el estado inmaduro, pero son incapaces de formar complejos MHC-péptido, aún cuando los antígenos y las moléculas clase II del MHC se encuentren en los mismos compartimentos. Al recibir un estímulo de maduración o un estímulo inflamatorio, los péptidos se unen a las moléculas clase II y se movilizan de

los compartimentos intracelulares hacia la superficie (Inaba *et. al.*, 2000). La ausencia de formación de los complejos MHC-péptido se ha vinculado con la inactividad de la catepsina S, que es la encargada de degradar la cadena invariante, y cuya actividad también parece estar regulada por el estado de maduración de la célula dendrítica (Driessen *et. al.*, 1999). La presentación de antígenos que llevan a cabo las células dendríticas ocurre cuando completan su proceso de maduración, que es inducido por los estímulos ya mencionados (LPS, TNF- $\alpha$ , CD154, etc.). Las células dendríticas maduras se caracterizan principalmente por el aumento en superficie de moléculas de presentación de péptidos (MHC I y MHC II), coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), de adhesión como ICAM, así como expresión de nuevos receptores de citocinas y quimiocinas, y disminución en la expresión de moléculas relacionadas con la captación de antígenos. La mayoría de estos estudios se han realizado con células dendríticas obtenidas *in vitro*.

La migración de las células dendríticas está regulada por la expresión de receptores para quimiocinas y su respuesta a éstas que, además, sigue patrones distintos en las células dendríticas inmaduras y maduras. Las células dendríticas inmaduras expresan en altos niveles el receptor CCR5 y en bajos niveles el receptor CXCR4 respondiendo principalmente a quimiocinas como MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES. Este patrón de respuesta a quimiocinas, se ha relacionado con la localización o la llegada de las células de Langerhans y precursores de células dendríticas a los tejidos periféricos (Lin, Chen-Lung *et. al.*, 1998). De igual forma se ha caracterizado la importancia que tiene el receptor CCR6. Este receptor es expresado por células dendríticas derivadas de progenitores CD34<sup>+</sup> y se ha observado que en ratones CCR6<sup>+</sup> la cantidad de células dendríticas mieloides (CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) en las placas de Peyer se encuentra muy disminuida. Las células de las placas de Peyer, principalmente las del epitelio que las separa de la luz intestinal liberan grandes cantidades de MIP-3 $\alpha$ , un ligando de CCR6, por lo que éste receptor es muy importante para la localización de las células dendríticas en la mucosa intestinal (Cook *et. al.*, 2000).

Al madurar la célula dendrítica, se incrementa la expresión del receptor CXCR4 y CCR7 y disminuye la expresión de CCR5. De esta forma la célula dendrítica responde ahora a quimiocinas como MIP-3 $\beta$  y SDF-1, que están relacionadas con el fenómeno de

migración de la periferia hacia los órganos linfoides secundarios (Lin, Chen-Lung *et. al.*, 1998; Jason G. Cyster, 1999).

Dentro de los órganos linfoides secundarios, las células dendríticas no sólo se encargan de promover la proliferación de linfocitos T, ya que también se han relacionado con una participación activa en la polarización del tipo de respuesta que se generará, Th1 o Th2.

Algunas células dendríticas al madurar son capaces de producir citocinas, principalmente IL-12, la cual lleva a los linfocitos T activados de esta forma a producir una mayor cantidad de INF- $\gamma$  (Heufler *et. al.*, 1996). Además la producción de IL-12 se ha encontrado que las células dendríticas son capaces de producir también IL-18, la cual potencia la diferenciación a Th1, iniciada por la IL-12. (Stoll *et. al.*, 1998).

En cuanto a la diferenciación hacia Th2, se ha encontrado que las células dendríticas que se encuentran en presencia de IL-10 son capaces de estimular a los linfocitos T a secretar IL-4. Dicho efecto se bloquea por la adición de IL-12 y se favorece por la presencia de anticuerpos contra ésta citocina (Liu *et. al.*, 1998).

Por este tipo de resultados, algunos autores proponen que el ambiente de citocinas en el que se encuentra la célula dendrítica al momento de captar y procesar el antígeno es importante para el tipo de respuesta que inducirá en los linfocitos T CD4 al momento de estimularlos; sin embargo, existen otros autores que proponen que el tipo de respuesta que promoverá una célula dendrítica está dada por su origen, mielóide o linfóide.

Es importante mencionar que en relación con el patrón de citocinas liberadas por células dendríticas mieloides y linfoides, y el tipo de respuesta que favorecen, se han descrito diferencias entre las células dendríticas murinas y humanas, destacándose que las células dendríticas CD8 $\alpha^+$  o linfoides murinas favorecen respuestas tipo Th1 y las mieloides murinas favorecen una respuesta tipo Th2, caso contrario de lo que ocurre en humanos para dichas subpoblaciones de células (Reid *et. al.*, 2000; de Saint-Vis *et. al.*, 1998).

En la Tabla II se encuentra un resumen de las citocinas liberadas por las células dendríticas linfoides y mieloides en el ratón.

**Tabla II. Producción de Citocinas y Respuestas T inducidas por las Subpoblaciones de Células Dendríticas de Ratón.**

| Células Dendríticas de Ratón           |   |                                    |             |
|--|---|------------------------------------|-------------|
|  | Células Dendríticas derivadas <i>in vitro</i> | Células Dendríticas <i>ex vivo</i> |             |
| Citocina Producida                     | Derivadas de CD34 <sup>+</sup><br>"Mieloides" | "Mieloides"                        | "Linfoides" |
| IL-10                                  | ++  |                                    | ++          |
| IL-12                                  | ++  | +                                  | ++          |
| INF- $\gamma$                          | ++  | +                                  | ++          |
| Respuesta Inducida en Linfocitos T CD4 | Th1 / Th2                                     | Th2                                | Th1         |

Adaptada de Reid *et. al.*, 2000

Lo anterior sugiere que el patrón de citocinas que es secretado por una célula dendrítica depende de su subtipo; esto es, la subpoblación a la que pertenece y, además, que esto tendría distintas repercusiones en la activación de linfocitos T y en su polarización hacia Th1 o Th2. Sin embargo, en estudios realizados en humanos, se han encontrado que esto no necesariamente ocurre *in vivo*, ya que células dendríticas mieloides son capaces de generar la polarización de linfocitos T hacia una respuesta tipo Th1 o Th2, dependiendo del momento en que interactúa con el linfocito T posterior a su activación. (Langenkamp, Anja, *et. al.*, 2000). También se ha reportado que las células dendríticas derivadas de células plasmocitoides son capaces de generar una respuesta Th1 al estimular linfocitos T (Cella, Marina, *et. al.*, 2000). Estos resultados muestran a las células dendríticas con una mayor versatilidad en cuanto a su capacidad de generar respuestas Th1 o Th2.

Así mismo, se han encontrado evidencias de que las subpoblaciones de células dendríticas CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>-</sup>, además de liberar un distinto patrón de citocinas tienen otras diferencias funcionales.

Lo anterior se propone porque se ha observado que en estudios de proliferación realizados en ratones las células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> estimulan mucho mejor tanto a linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que las células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>.

En cuanto a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, la proliferación disminuida al ser estimuladas por células dendríticas CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> se asocia a muerte por apoptosis de la célula T en etapas

tempranas de la estimulación. Esta apoptosis está mediada por la célula dendrítica a través de la interacción Fas/FasL ya que la célula dendrítica expresa FasL en su superficie (Süss and Shortman, 1996).

La baja proliferación de los linfocitos T CD8 al ser estimulados por células dendríticas CD8 $\alpha^+$  es en etapas más tardías y no está relacionada con la interacción Fas/FasL, sino que se debe a que los linfocitos T CD8 estimulados así, producen una cantidad significativamente menor de IL-2 (Kronin *et. al.*, 1996).

Otro papel de regulación que se ha propuesto para algunas células dendríticas consiste en la inducción de tolerancia hacia antígenos propios, mediante la captura de células que han muerto por apoptosis en el estado estacionario o en ausencia de estímulos inflamatorios (Steinman *et. al.*, 2000).

Actualmente no hay suficientes evidencias de que las células dendríticas y los linfocitos B interactúen entre sí, sin embargo, se ha observado que la presencia de células dendríticas facilita y promueve una mejor respuesta de formación de anticuerpos por parte de los linfocitos B (Ludewig *et. al.*, 2000), aunque esto podría ser indirecto a través de la activación de linfocitos T.

En conclusión, las células dendríticas tienen una participación importante tanto en el inicio como en algunos aspectos de la regulación de la respuesta inmune; y aunque existen evidencias que parecieran indicar que éstas distintas funciones son llevadas a cabo por subpoblaciones diferentes de células dendríticas, también hay evidencias que llevan a algunos autores a proponer que todos los subtipos de células dendríticas son capaces de llevar a cabo las distintas funciones y que la función que realizan depende más de la forma en que son activadas y del momento, después de su activación, en que interactúan con los linfocitos T (Reid *et. al.*, 2000; de Saint-Vis *et. al.*, 1998; Langenkamp, Anja, *et. al.*, 2000; Cella, Marina, *et. al.*, 2000).

## **b. CD40 y CD154 (Ligando de CD40).**

### **i. Descripción.**

La molécula CD154 murina (CD40L ó gp39) es una glicoproteína transmembranal de 260 aminoácidos, mientras que su homólogo humano es de 261 aminoácidos. Es una proteína de tipo II, esto es que el extremo carboxilo terminal se encuentra en el dominio extracelular

y el extremo amino terminal se encuentra en el intracelular. El dominio extracelular de esta proteína es de 214 aminoácidos en el ratón y de 215 en el humano. Ambas moléculas poseen un sitio de N-glicosilación conservado y 4 residuos de cisteína en el dominio extracelular. Tanto en el ratón como en el humano el gen de CD154 es codificado en el cromosoma X.

Dada la gran homología estructural de esta molécula y el TNF $\alpha$ , CD154 ha sido clasificada como miembro de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral (TNF). Otros miembros de esta familia son la linfotóxina  $\alpha$  y  $\beta$ , CD27L, CD30L, FasL y OX40L (Clark L. *et. al.*, 1996; Laman, J.D., *et. al.*, 1996). Al igual que el TNF- $\alpha$  la molécula de CD154 es un homotrímero (Peitsch M. *et. al.*, 1993).

La expresión de CD154 puede ser inducida en linfocitos T CD4<sup>+</sup> en reposo o activados, células de nódulos linfáticos activadas y clonas Th1 y Th2 activadas. La expresión de ésta molécula por linfocitos T CD8<sup>+</sup> puede ser inducida por activación de la célula usando una combinación de ionomicina y PMA. También se ha observado la expresión de CD154 en células cebadas activadas, plaquetas activadas y basófilos (Lane, *et.al.*, 1999).

Una característica importante de la expresión de CD154 es que ésta es inducible y transitoria, es decir, solo es expresada por un periodo de tiempo determinado y es durante este periodo que lleva a cabo todas sus funciones. CD154 también puede ser secretado en forma soluble resultado de una proteólisis en un compartimiento intracelular.

La función de CD154 se lleva a cabo por su interacción con CD40, el cual pertenece a la familia de los receptores de TNF. CD40 es una proteína integral de membrana de tipo I de 40 kDa y que posee 40 aminoácidos, característicos de esta familia, con pseudorepeticiones ricas en cisteína, las cuales tienen alrededor de seis cisteínas. (Laman, J.D., *et. al.*, 1996).

CD40 se encuentra expresado en varios tipos celulares como progenitores hematopoyéticos, linfocitos B, linfocitos T, monocitos, precursores de células dendríticas, células dendríticas inmaduras, maduras, células dendríticas foliculares, células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos. De esta forma las células que expresan CD40 son capaces de interactuar con CD154 y desencadenando distintos procesos como consecuencia de ésta interacción (van Kooten C. *et. al.*, 1996).

## ii. Funciones Generales.

La importancia de la interacción CD40/CD154 se determinó inicialmente en los linfocitos B porque es necesaria para el desarrollo de respuestas humorales óptimas a antígenos T dependientes. Los linfocitos B maduros requieren de señalización por esta vía para llevar a cabo la proliferación, activación y formación de blastos así como llevar a cabo cambio de isotipo de inmunoglobulina, generación de centros germinales y generación de memoria. Esta interacción produce también, en el linfocito B, un incremento en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM, y moléculas de coestimulación como CD80 y CD86 (van Kooten C. *et. al.*, 1996).

En linfocitos T la estimulación vía CD40 promueve la expresión de moléculas de activación como CD55, CD69 y de CD154. Además, el entrecruzamiento de CD40 en linfocitos T resulta en un incremento en la proliferación y secreción de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2.

Por otro lado los monocitos estimulados por células transfectadas con CD154 secretan bajas cantidades de IL-6 e IL-8 y elevadas de IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-10, MIP-1 $\alpha$  e IL-12. También se ha vinculado la ligación de CD40 en los monocitos con la activación de la síntesis de óxido nítrico.

Por último la ligación de CD40 en los fibroblastos y sinoviocitos incrementa su proliferación, además de que provoca un incremento en la producción de GM-CSF y MIP-1 $\alpha$  por éstos últimos (van Kooten C. *et. al.*, 1996).

No obstante la interacción CD40/CD154 no solo tiene consecuencias positivas en las células, como las ya mencionadas, ya que se han reportado evidencias de que esta interacción puede presentar también efectos adversos en las células que reciben la interacción CD40/CD154. Ejemplo de esto es el hecho de que la interacción CD40/CD154 tiene una participación importante en la eliminación de linfocitos B tolerantes por medio de la inducción de Fas en éstas células (Rathmell, J.C., *et. al.*, 1996; Schattner, Elaine J., *et. al.*, 1995). También se ha reportado un fenómeno similar en hibridomas de B y en algunas células transformadas, en las cuales la estimulación con CD154 induce muerte por apoptosis, sólo que estos casos ésta es independiente de Fas (Bergman, Mary C., *et. al.*, 1996; Hess, Sigrun, 1996).

Finalmente se ha reportado que la interacción CD40/CD154 impide a los linfocitos B llevar a cabo la diferenciación final a célula plasmática. En el caso anterior la interacción CD40-CD154 participa en la fase de activación y proliferación del linfocito B, pero un estímulo prolongado de la interacción CD40-CD154 hace a la célula insensible a otros estímulos como LPS y algunas interleucinas, provocando que ésta no pueda diferenciarse a célula plasmática y no haya producción de anticuerpos (Randall, T.D., *et. al.*, 1998). Estos estudios sugieren que es importante el momento y el tiempo durante el cual se realiza la interacción CD40-CD154.

### **c. Participación de CD154 en la Diferenciación, Maduración y Función de Células Dendríticas.**

Como ya se ha mencionado, CD154 tiene una participación importante en la maduración y diferenciación de las células dendríticas.

Inicialmente CD154 se describió como una molécula que incrementaba la supervivencia de células dendríticas en cultivo y posteriormente se demostró que también era capaz de inducir cambios fenotípicos y funcionales. También, la interacción de CD154 con CD40 provocaba que las células plasmocitoides (precursoras de células dendríticas) cultivadas en IL-3 se diferenciaron a células dendríticas, esto último reportado en estudios realizados en humano (Grouard *et. al.*, 1997).

También se ha descrito que los precursores CD34<sup>+</sup> aislados de sangre de cordón umbilical, al ser cultivadas *in vitro* en presencia de estímulos a CD40, ya sea por CD154 o por un anticuerpo agonista, se diferencian hacia células dendríticas, respaldándose así la importancia de ésta molécula no solo como mediadora de la maduración de las células dendríticas, sino como un posible factor relevante en la diferenciación de precursores hematopoyéticos hacia este tipo celular (Flores-Romo *et. al.*, 1997). Esto sugiere que la interacción CD40-CD154 podría ser importante durante la diferenciación de precursores a células dendríticas maduras.

Los cambios fenotípicos inducidos en las células dendríticas inmaduras a causa de la interacción con CD154 en linfocitos T, son un incremento en la expresión MHC II, así como de moléculas coestimuladoras, principalmente CD80, CD86 y de adhesión como CD54 (ICAM-1). Además, la capacidad estimuladora de las células dendríticas disminuye

cuando se bloquea la interacción CD40/CD154 (Caux *et. al.*, 1994). Dentro de los cambios fenotípicos, también se puede mencionar el incremento en la expresión de la fractalcina en la superficie de las células dendríticas. Esta quimiocina se encuentra asociada a membrana y se ha pensado que está relacionada en la interacción célula dendrítica / linfocito T (Papadopoulos *et. al.*, 1999).

Por otro lado se ha reportado que la estimulación con CD154 induce que las células de Langerhans adquieran la expresión CD8, tanto en estudios hechos *in vitro* como *in vivo* (Anjuère *et. al.*, 2000).

Tomando en cuenta que primordialmente son los linfocitos T activados los que expresan CD154 y que esto se da después de la interacción con la CPA, la interacción CD40-CD154 se da durante el contacto de las células dendrítica maduras y el linfocito T, sin embargo, de acuerdo a los estudios mencionados y tomando en cuenta que tanto los precursores como las células dendríticas inmaduras expresan también CD40 es posible que la interacción CD40-CD154 previa al contacto con el linfocito T pudiera tener implicaciones en la diferenciación y maduración de la células dendríticas.

En modelos de respuesta a tumores, también se ha observado que es vital la cooperación célula dendrítica / linfocito T CD4<sup>+</sup> para se lleve a cabo una adecuada estimulación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y se pueda generar así una inmunidad protectora (Mackey *et. al.*, 1998; Hermans *et. al.*, 1999).

También la ligación de CD40 por parte de CD154 es de vital importancia para que las células dendríticas produzcan altas cantidades de IL-12. Las cantidades de IL-12 producida como producto de ésta interacción es mayor que el que se obtiene con otros estímulos de maduración como TNF- $\alpha$  o LPS (Cella *et. al.*, 1996).

La importancia de CD154 en la producción de IL-12 se ha puesto de manifiesto en algunos modelos experimentales donde la falta de ésta molécula está relacionada con una pobre función de la célula dendrítica como célula presentadora de antígeno y una disminuida producción de IL-12, que da como resultado una pobre inmunidad protectora en modelos de respuesta Th1 (Mackey *et. al.*, 1998). La IL-12 liberada por las células dendríticas cumple también funciones autócrinas incrementando la capacidad de la célula dendrítica para presentar péptidos (Bianchi *et. al.*, 1999).

Finalmente la importancia de la interacción CD40/CD154 en la migración de las células dendríticas (células de Langerhans) hacia los nódulos linfáticos ha sido demostrada haciendo uso de modelos de sensibilización por contacto, ya que los ratones CD154<sup>-/-</sup> no son capaces de movilizar a las células de Langerhans fuera de la piel, después de la aplicación del estímulo (Moodycliffe *et. al.*, 2000).

Así, la interacción CD40/CD154 en las células dendríticas tiene gran importancia en su diferenciación, maduración y función, pero aún quedan por resolverse el momento en que esta interacción ocurre y los mecanismos involucrados.

### III. Justificación y Planteamiento del Problema

Los antecedentes descritos demuestran claramente una participación de la interacción CD40-CD154 en la diferenciación y maduración de células dendríticas. Sin embargo, la mayoría de estudios han sido realizados *in vitro* y no dejan claro el momento y el tiempo en el que esta interacción es importante para promover la diferenciación y la maduración de las células dendríticas. Tomando en cuenta las evidencias experimentales descritas, junto con el hecho de que CD40 es expresado tanto en precursores de células dendríticas como en células dendríticas inmaduras es posible que la expresión temprana de esta molécula favorezca la diferenciación, migración de células dendríticas inmaduras a los órganos linfoides y su maduración final. Sin embargo, ya que CD154 es expresado principalmente en linfocitos T activados y en condiciones normales esta expresión es transitoria, es posible que una expresión temprana y prolongada de esta molécula pueda tener efectos negativos en los fenómenos antes mencionados. Por lo tanto la pregunta de este trabajo es:

¿Qué consecuencias puede tener la expresión temprana y prolongada de un estímulo de diferenciación y maduración como lo es la interacción CD40/CD154 en las células dendríticas en cuanto a diferenciación, fenotipo, endocitosis y capacidad de migración de piel a nódulos linfáticos?

#### **IV. Hipótesis.**

- Las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos se encontrarán en mayor número en un ratón con un estímulo temprano y prolongado de CD154.
- La migración de células dendríticas de piel a los nódulos linfáticos será mayor en un ratón con un estímulo temprano y prolongado de CD154.
- La estimulación continua por CD154 disminuirá la endocitosis, pero favorecerá la expresión de moléculas de coestimulación en las células dendríticas.
- Dentro de las células dendríticas residentes en nódulos linfáticos y las que migran a ellos después de un estímulo se encontrarán ambas subpoblaciones, mioide y linfoide, tanto en los ratones normales como en ratones con un estímulo temprano y prolongado de CD154.
- La estimulación temprana y continua por CD154 puede tener consecuencias negativas en las células dendríticas en cuanto a su diferenciación, capacidad de migración y maduración.

## V. Objetivos.

- Determinar si existen diferencias en cuanto al número de células dendríticas en nódulos linfáticos entre un ratón normal y uno que exprese constitutivamente CD154.
- Determinar si existen diferencias en el número de células dendríticas que migran de la piel a los nódulos linfáticos correspondientes después de una sensibilización por contacto entre un ratón normal y uno que expresa constitutivamente CD154.
- Determinar la capacidad de captar antígeno y la expresión de moléculas de coestimulación de las células dendríticas en ratones normales y ratones que expresen constitutivamente CD154.
- Caracterizar las subpoblaciones de las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos y las que migran a ellos después de una sensibilización por contacto en el ratón normal y en el que expresa constitutivamente CD154.
- Determinar si la presencia del estímulo continuo con CD154 pudiera tener consecuencias negativas en la diferenciación, migración y maduración de las células dendríticas.

## VI. Modelo Experimental.

El modelo experimental empleado para llevar a cabo los estudios consiste en el uso de ratones transgénicos, generados en el laboratorio, que expresan constitutivamente la molécula CD154 en sus linfocitos B ( $\kappa$ EP-CD154-Tg) (Martínez-Barnetche, et.al., enviado a publicación). Esto se logró acoplado el cDNA de CD154 a un cassette formado por el *enhancer* intrónico de la cadena  $\kappa$  de inmunoglobulina y el promotor de la misma. Los ratones obtenidos se retrocruzaron con C57BL/6. En estos ratones, CD154 se expresa desde la etapa pro-B de diferenciación del linfocito B.

La genotipificación de los animales se realizó mediante PCR (ver Materiales y Métodos).

Entre las características importantes que presentan estos ratones encontramos una severa deficiencia de linfocitos B en la periferia, que se hace más marcada a mayor edad del ratón. Presentan, además, infiltrados tisulares y un marcado síndrome de desgaste.

Por otro lado, el modelo elegido para la caracterización de las células dendríticas que migran de la piel a los nódulos linfáticos fue la fase inicial o aferente de la hipersensibilidad por contacto (reacciones de hipersensibilidad de tipo IV). Este modelo consiste en la aplicación de un hapteno en la piel, estos haptenos son capaces de absorberse por la piel y unirse covalentemente a proteínas endógenas, las cuales son captadas por células presentadoras de antígeno como las células de Langerhans, las cuales los transportan hacia los nódulos linfáticos, en lo que se conoce como fase aferente. Una vez ahí, el antígeno es presentado a linfocitos T CD4<sup>+</sup> que son los que llevan a cabo la fase efectora o eferente de la reacción (Janeway C., *et. al.*, 1999; Klein J. & Hořejší V., 1997).

En este caso particular, el hapteno es isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual es aplicado disuelto en una mezcla de acetona / dibutilftalato 1:1 (Ver Materiales y Métodos). La función que cumple el dibutilftalato en este modelo es la de facilitar la entrada del hapteno, esto es, facilita la absorción del FITC. Se ha demostrado que la aplicación de dibutilftalato al sensibilizar piel con FITC eleva significativamente la proporción de fluoresceína que es absorbida por piel. No se ha reportado alguna sensibilización que ocurra por parte del dibutilftalato en concentraciones hasta del 10% (Dearman, et.al., 1996).

## VII. Materiales y Métodos.

### Animales.

Se utilizaron ratones C57BL/6 y C57BL/6 (κEP-CD154 Tg) descritos anteriormente. Los experimentos fueron realizados en ratones de 8 semanas de edad. Los ratones de ambos genotipos se trataron bajo 3 condiciones: 1) Ratones control sin estímulo, 2) Ratones con diluyente (acetona: dibutilftalato, 1:1) y 3) Ratones con diluyente + FITC (FITC 0.5% en acetona: dibutilftalato, 1:1).

### Genotipificación de los Animales.

La genotipificación de los ratones se llevó a cabo mediante PCR a partir de DNA genómico obtenido de la cola del ratón. La extracción del DNA se realizó utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

Para la reacción de PCR se utilizaron iniciadores específicos, cuyo producto es un fragmento de 0.8 kb que corresponde al cDNA de CD154 en el transgen. Las secuencias de los iniciadores son: 5'-GGAATTCTFCAGATCATGATAGAAACA-3' y 5'-GGGCCCTCTAGAAVAGCGCACTGTTCA-3'.

La reacción de PCR se llevó a cabo en amortiguador para PCR 1x, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM y 5 U de Taq-DNA polimerasa (Life Sciences). Cada ciclo de PCR era como sigue: 95° C x 30'', 55° C x 30'' y 72° C x 30''. La reacción constó de 35 ciclos. Los productos de reacción fueron visualizados por corrimiento en gel de agarosa al 1.2% en TAE a un voltaje constante de 80 V.

### Sensibilización por Contacto con FITC.

Para llevar a cabo este experimento se requiere de 0.4 mL (2 x 200 μL) de una solución 0.5% de isotiocianato de fluoresceína (FITC) preparada en acetona / dibutilftalato (1:1). La cual se aplica sobre el abdomen rasurado de cada ratón.

Después de 16 a 18 horas de la aplicación del estímulo se prepararon suspensiones celulares a partir de los nódulos linfáticos correspondientes. Se contaron y analizaron tanto células totales del nódulo linfático, así como células positivas para FITC.

### **Preparaciones Celulares.**

Los nódulos linfáticos se disgregaron por acción mecánica utilizando dos portaobjetos esmerilados.

Las células fueron obtenidas en PBS/ Suero Fetal Bovino (SFB) 2%/ Azida de Sodio ( $\text{NaN}_3$ ) 0.1%/ EDTA 5 mM. La eliminación de eritrocitos contaminantes en los casos en que éstos existieran fue mediante lisis con el amortiguador ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15 M,  $\text{KHCO}_3$  1.0 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.1 mM, pH 7.2 a 7.4).

### **Citometría de Flujo.**

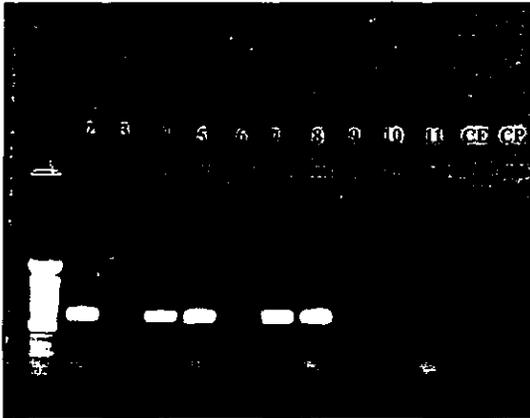
Se utilizaron  $1 \times 10^6$  células para cada tinción, donde éstas fueron incubadas por 30 minutos en PBS/ SFB 2%/  $\text{NaN}_3$  0.1%/ EDTA 5 mM en presencia de diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-MHCII-FITC (NIM-R4), anti-MHCII-bio (NIM-R4), anti-CD8 $\alpha$ -PE (PharMingen, San Diego, CA), anti-CD11c-PE (PharMingen), anti-CD11c-bio (PharMingen), y anti-CD11b-APC (PharMingen), anti-CD86-bio (GL-1), anti-CD54 (ICAM-1)-bio (PharMingen) y controles de isotipo IgG1-PE e IgG2a-PE (ambos de PharMingen). El marcaje de los anticuerpos conjugados con biotina se llevó a cabo utilizando estreptavidina-PerCP o estreptavidina-APC (ambas de PharMingen).

El análisis de las células se realizó por citometría de flujo de 4 colores utilizando un FACSCalibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson, San Jose, CA).

## VIII. Resultados

### a. Genotipificación de los Animales.

Para realizar los experimentos fue necesario conocer primero el genotipo de los ratones de cada camada utilizada, esto es, cuáles eran transgénicos y cuales normales. En la Figura 1 se muestra un ejemplo de un gel en el que se corrieron los productos de PCR para el transgen. El producto de PCR esperado para el transgen es de 0.8 kb.



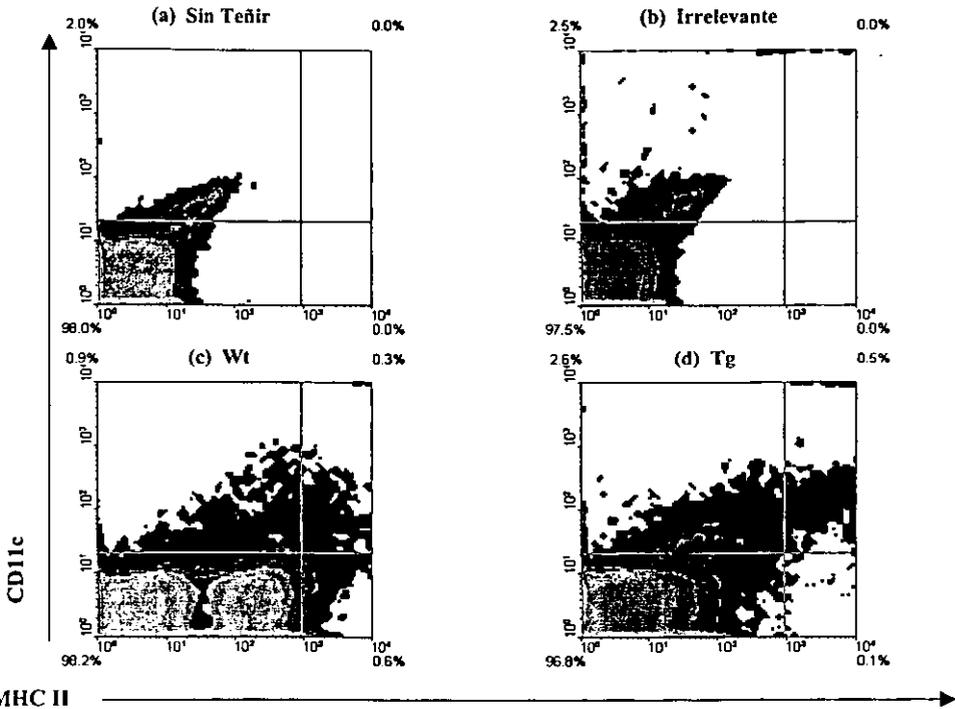
**Figura 1. Genotipificación de Animales.** Se corrieron los productos de PCR de una camada de 9 ratones en un gel de agarosa al 1.2%. Carriles: 1) Pesos Moleculares; 2 al 9) Ratones número 2 al número 9; 10) Vacío; 11) Ratón 10; CE) Control Extracción; CP) Control de PCR.

Como puede observarse los ratones 2, 4, 5, 7 y 8 son positivos para el transgen, mientras que los ratones 3, 6, 9 y 10 son normales. El control de extracción es un tubo en donde no se coloca muestra para extraer DNA y sigue todo el proceso igual que el resto de los tubos y el control de PCR es un tubo en donde no se coloca DNA al momento de hacer el PCR pero sigue el mismo proceso que el resto.

### b. Células Dendríticas Residentes en Nódulo Linfático.

En este caso se utilizaron ratones transgénicos y normales a los cuales no se les había realizado ningún tipo de estímulo. Se extrajeron los nódulos linfáticos y se procesaron para posteriormente hacer una doble tinción utilizando los anticuerpos anti-

MHC II-bio y anti-CD11c-PE, revelándose el primero con estreptavidina-PerCP, de tal manera que permitieran reconocer la población de células dendríticas. La población de células dendríticas fue definida como las células que poseían una elevada expresión de moléculas MHC II y que además, eran positivas para el marcador CD11c (MHC II<sup>alto</sup> CD11c<sup>+</sup>). Como se muestra en la Figura 2 en ambos ratones el porcentaje de células dendríticas es muy bajo (0.3% en el ratón normal y 0.5% en el ratón transgénico), aunque es ligeramente mayor en el transgénico (cuadrante superior derecho).



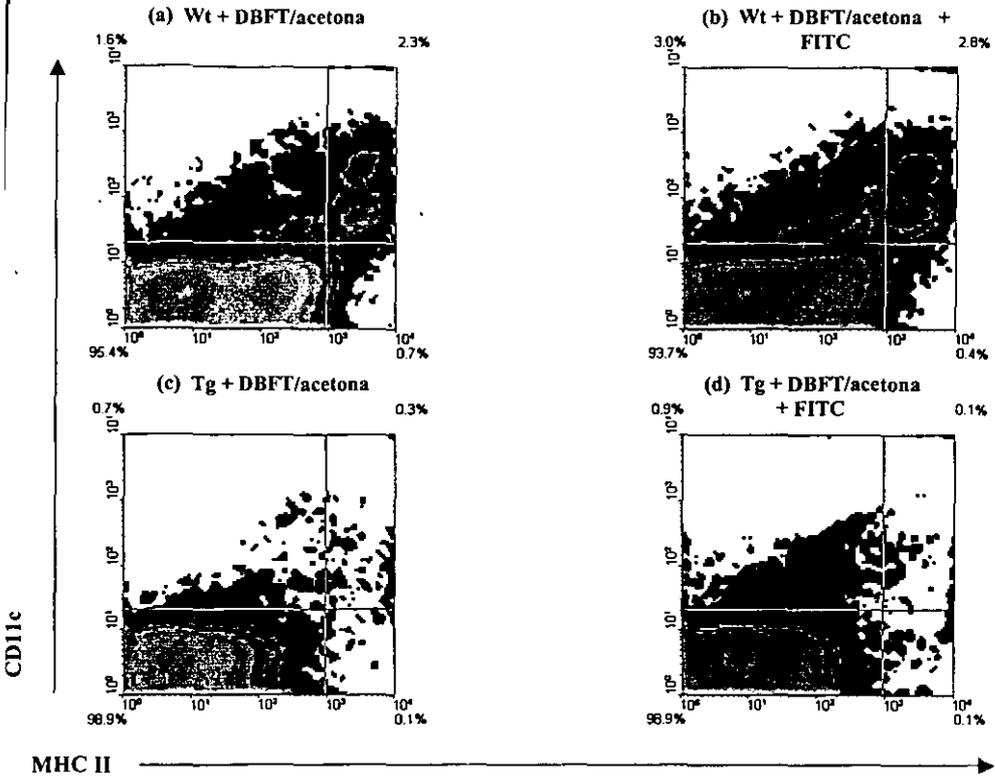
**Figura 2. Determinación de Células Dendríticas Residentes en Nódulos Linfáticos.** La figura muestra gráficos de densidad de doble fluorescencia de células de nódulo linfáticos de ratones no estimulados analizados por citometría de flujo. En el eje X se muestra la tinción con anticuerpos anti-MHC II y en el eje Y se muestra la tinción con anti-CD11c. (a) Células sin teñir, (b) Tinción con controles de isotipo IgG<sub>1</sub> e IgG2<sub>a</sub>, (c) Tinción con anti-MHC II y anti-CD11c en el ratón normal y en el ratón transgénico (d). Se adquirieron un total de 105000 células en cada caso. Experimento representativo de 4 independientes.

### **c. Migración de Células Dendríticas de Piel a Nódulos Linfáticos.**

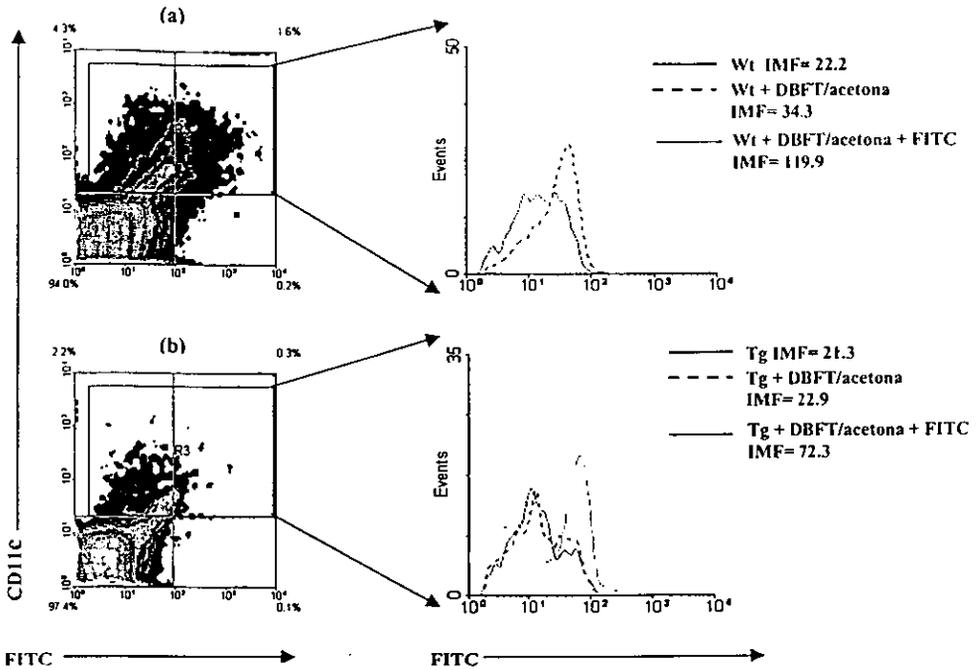
La migración de células dendríticas de piel a nódulos linfáticos se determinó usando los ratones que fueron estimulados, ya sea con la mezcla dibutilftalato (DBFT)/acetona o con DBFT/acetona + FITC. Las células analizadas en estos ratones fueron teñidas como en el caso anterior con anti-MHC II-bio + estreptavidina-PerCP y con anti-CD11c-PE, para seleccionar a las células dendríticas. En la Figura 3 se observa como la aplicación del DBFT/acetona por si sola es capaz de inducir la migración de células dendríticas en el ratón normal ya que se encuentra un 2.3% de células dendríticas. La aplicación del DBFT/acetona + FITC induce todavía más la migración de células en el ratón normal (2.8%). Sin embargo, en el ratón transgénico el porcentaje de células dendríticas en ratones estimulados con DBFT/acetona es del 0.3% y con DBFT/acetona + FITC de 0.1%. Estos porcentajes de células dendríticas en los ratones transgénicos estimulados son incluso menores que en el ratón transgénico sin estimular.

### **d. Endocitosis de FITC por Células Dendríticas.**

La capacidad de endocitosis de las células dendríticas fue evaluada mediante la aplicación de FITC en piel, ya que las células que se encuentran en los nódulos linfáticos que son FITC<sup>+</sup> son las que provienen de piel, lo que es indicativo de la capacidad endocítica de las células de Langerhans. La evaluación de estas células se realizó por citometría de flujo de 3 colores, uno correspondería al FITC, otro a la tinción con anti-MHC II y otro a la tinción con CD11c. Como se puede observar en la Figura 4, la cantidad de células capaces de endocitar FITC (FITC<sup>+</sup>) se encuentra muy reducida en el ratón transgénico, comparado con el normal (0.3% y 1.6% respectivamente). Este bajo porcentaje de células FITC<sup>+</sup> correlaciona con la poca migración de células de piel a nódulos linfáticos en el ratón transgénico. Al seleccionar una región de células CD11c<sup>+</sup> para a partir de ella analizar la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína es posible observar que las células del ratón transgénico tienen una capacidad disminuida de endocitar FITC, por comparación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF), 119.9 en el ratón normal por 72.3 en el ratón transgénico.



**Figura 3. Migración de células dendríticas a nódulos linfáticos.** La figura muestra gráficos de densidad de doble fluorescencia de suspensiones celulares de nódulos linfáticos obtenidas 18 horas después de la aplicación del estímulo y analizadas por citometría de flujo para la expresión de MHC II y CD11c. (a) Ratón normal estimulado con DBFT/acetona; (b) Ratón normal estimulado con DBFT/acetona + FITC; (c) Ratón transgénico estimulado con DBFT/acetona y (d) Ratón transgénico estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se adquirieron un total de 105000 células para cada caso. Experimento representativo de 4 independientes.



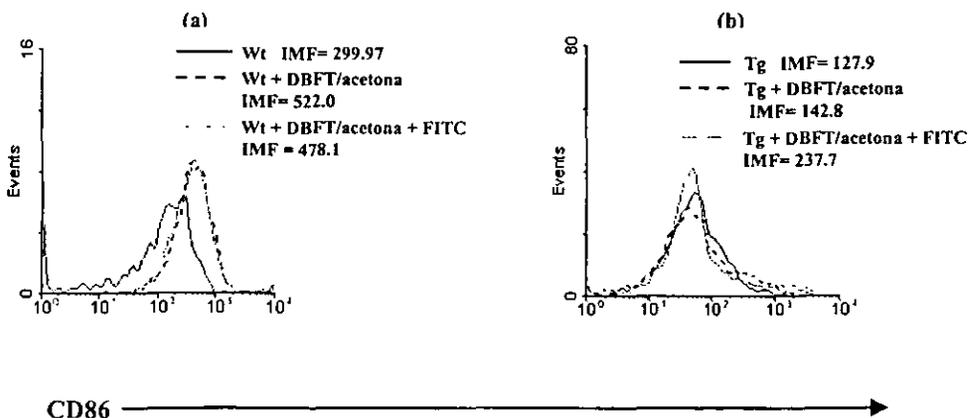
**Figura 4. Endocitosis de FITC por Células Dendríticas.** Se analizó por citometría de flujo la endocitosis de FITC en células de nódulo linfático de ratones no estimulados y estimulados con DBFT/acetona o DBFT/acetona + FITC. La endocitosis se muestra en el histograma de la derecha obtenido de la región de células CD11c<sup>+</sup>. (a) Ratones normales y (b) ratones transgénicos. (—) Ratón sin estimular; (---) Ratón estimulado con DBFT/acetona y (—) Ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se adquirieron un total de 105000 células en cada caso. Experimento representativo de 4 independientes. IMF= Intensidad media de fluorescencia.

#### e. Expresión de Moléculas de Coestimulación y Adhesión por Células Dendríticas.

Para determinar si la interacción CD40/CD154 en los ratones transgénicos inducía una maduración previa de las células dendríticas, se examinó la expresión de marcadores de coestimulación en células dendríticas de ratones normales y transgénicos. Las moléculas de coestimulación y adhesión analizadas fueron CD86 y CD54, respectivamente. Se comparó la expresión de estas moléculas en las células dendríticas de nódulos linfáticos en cada

ratón, normal o transgénico y en ausencia o presencia de estímulos. El monitoreo de estas moléculas se realizó por citometría de flujo de 3 colores usando anticuerpos anti- MHC II, anti-CD11c y anti-CD86 o anti-CD54 según el caso; haciendo el análisis de CD86 y CD54 sobre la región de células dendríticas que fueron previamente seleccionadas como células MHC II<sup>allo</sup> CD11c<sup>+</sup> para los ratones sin estimular y estimulados con DBFT/acetona y como células FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> para los ratones estimulados con DBFT/acetona + FITC.

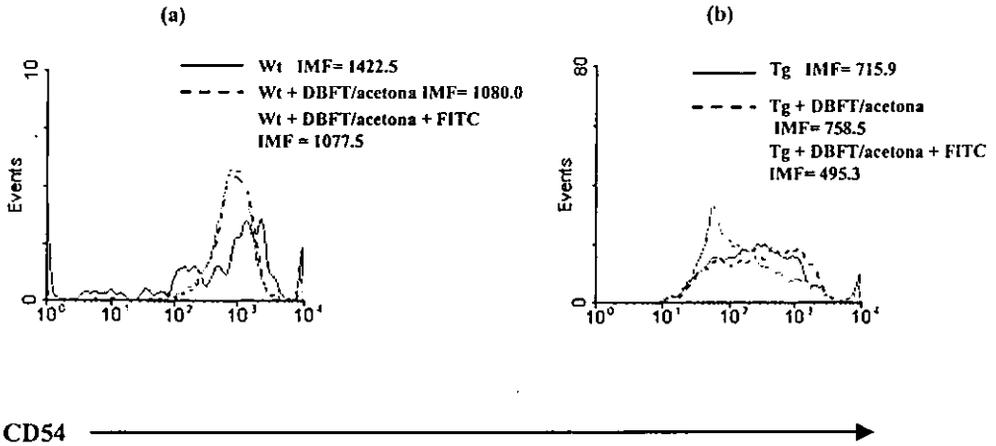
En cuanto a la expresión de CD86 es posible observar que el ratón normal cuenta con altos niveles de expresión de esta molécula en estado basal, esto es sin estimular, y dichos niveles se incrementan y se hacen más homogéneos al aplicar cualquiera de los dos estímulos. En el caso del ratón transgénico, los niveles basales son menores y éstos no se modifican cuando hay una aplicación de estímulos.



**Figura 5. Expresión de CD86 por Células Dendríticas.** La figura muestra histogramas para la expresión de CD86 obtenidos a partir de la región MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> y FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> según el caso. (a) Ratones normales y (b) ratones transgénicos. (—) Ratón sin estimular; (- - -) Ratón estimulado con DBFT/acetona y (· · ·) Ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se adquirieron un total de 105000 células en cada caso. Experimento representativo de 4 independientes. IMF= Intensidad media de fluorescencia.

En el caso de CD54 lo que podemos observar en la Figura 6 es que en el ratón normal la expresión de esta molécula disminuye ligeramente y se hace más homogénea al aplicar

cualquiera de los estímulos, lo que no ocurre en el ratón transgénico, donde incluso la expresión disminuye cuando es aplicado el estímulo de DBFT/acetona + FITC. Los niveles de expresión de la molécula CD54 en los ratones transgénicos son muy heterogéneos.

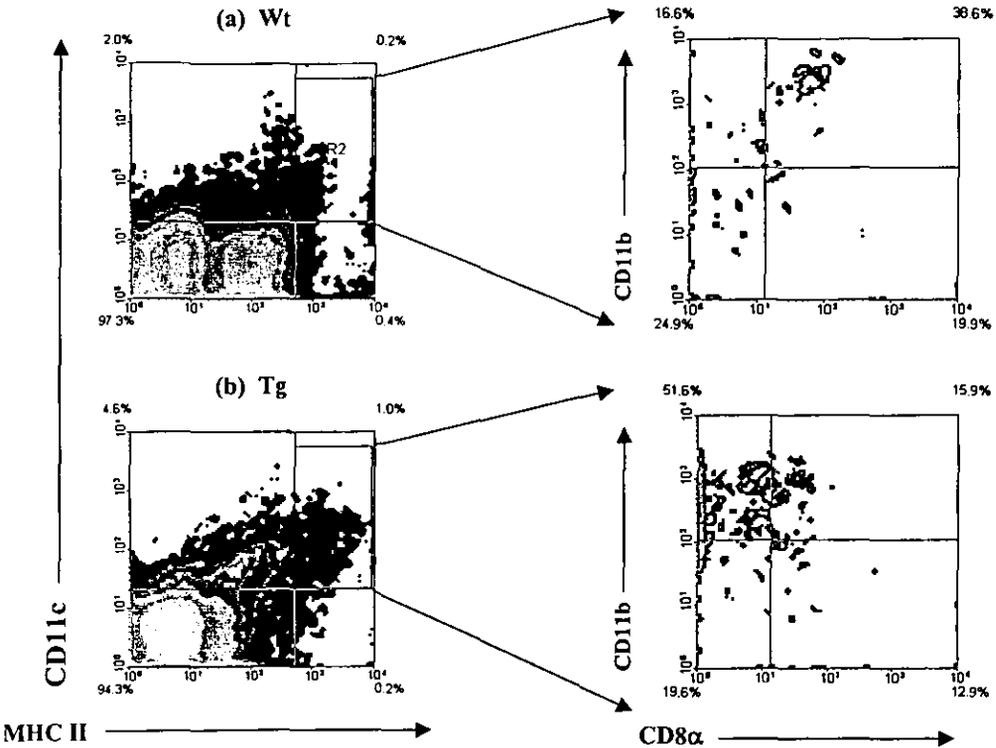


**Figura 6. Expresión de CD54 en Células Dendríticas.** La figura muestra histogramas para la expresión de CD54 obtenidos a partir de la región MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> y FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> según el caso. (a) Ratones normales y (b) ratones transgénicos. (—) Ratón sin estimular; (- - -) Ratón estimulado con DBFT/acetona y (—) Ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se adquirieron un total de 105000 células en cada caso.

**f. Subpoblaciones de Células Dendríticas en Nódulos Linfáticos.**

Para llevar a cabo el análisis de las subpoblaciones de células dendríticas, éstas se seleccionaron como en los casos anteriores (MHC II<sup>allo</sup> CD11c<sup>+</sup> ó FITC<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) y en éstas células se analizó la expresión de los marcadores CD8α y CD11b que definen a las subpoblaciones linfoide y mioide respectivamente. Así, en los ratones que no recibieron ningún estímulo, esto es, entre las células dendríticas residentes en nódulo linfático (Figura 7) hay un predominio de células dendríticas que expresan el marcador CD11b. Este predominio es mucho más significativo en el ratón transgénico. En el ratón normal se encuentran células dendríticas que coexpresan los marcadores CD11b y CD8α (38.6%) pero el nivel de expresión de CD8α en estas células es bajo, mientras que CD11b se encuentra expresado en alta cantidad. Lo anterior no ocurre en el ratón transgénico donde la

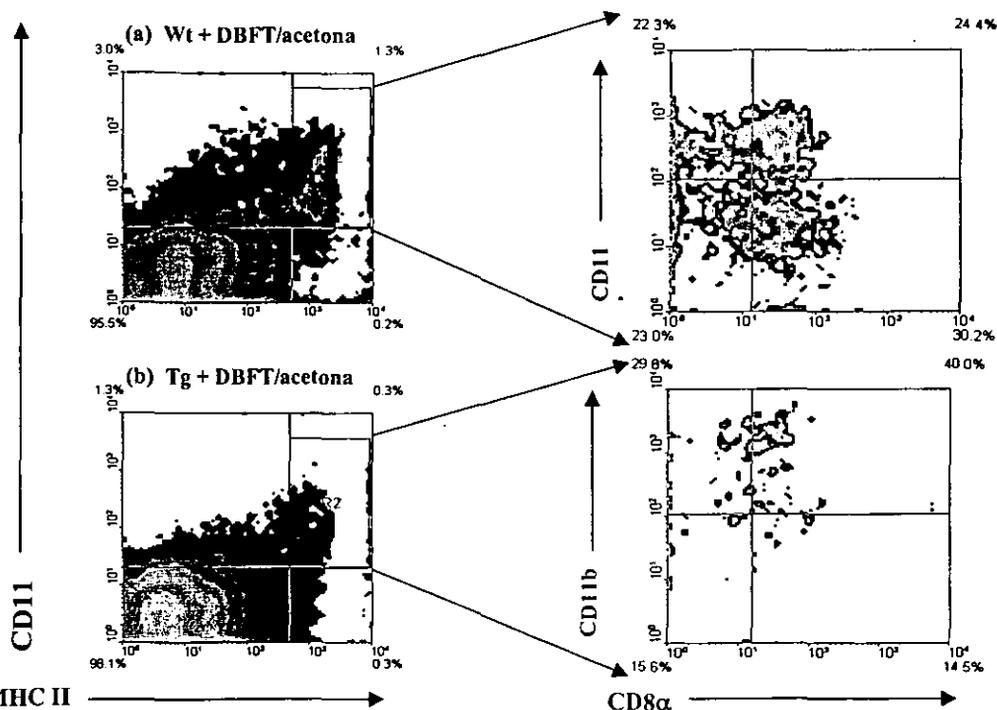
proporción de células dendríticas  $CD11b^+ CD8\alpha^+$  se encuentra disminuida significativamente (15.9%). Además, en el ratón transgénico se observa un incremento en el porcentaje de células  $CD11b^+ CD8\alpha^-$  (51.6%) comparado con el ratón normal (16.6%)



**Figura 7. Subpoblaciones de Células Dendríticas Residentes en Nódulos Linfáticos.** La figura muestra gráficos de densidad de células de nódulos linfáticos de ratones sin estimular y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-MHC II y anti-CD11c para definir la población de células dendríticas y con anti-CD8α y anti-CD11b para definir las subpoblaciones en la región MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. (a) Ratón normal y (b) Ratón transgénico. Se adquirieron un total de 105000 células en ambos casos. Experimento representativo de 4 independientes.

Al analizar las células de los nódulos linfáticos de los ratones estimulados, esto es, las que migran de piel, se encuentran grandes cambios en cuanto a la distribución de células. Primeramente en los ratones estimulados con DBFT/acetona (Figura 8) es posible observar que en los ratones normales se incrementa de forma significativa el número de células

dendríticas que expresan el marcador CD8 $\alpha$ , sin embargo, el nivel de expresión de ésta molécula es similar al mostrado por las células dendríticas del ratón normal sin estimular. Además, es posible distinguir claramente dos poblaciones en cuanto a la expresión del marcador CD11b (CD11b<sup>alto</sup> y CD11b<sup>bajo</sup>). Estas dos poblaciones se encuentran en proporciones muy similares, 24.4% y 30.2% respectivamente. En cuanto al ratón transgénico que siguió este mismo tratamiento se observa que el número de células dendríticas que expresan CD8 $\alpha$  se incrementa ligeramente en comparación con el transgénico no estimulado, sin embargo, solo aparece la población CD11b<sup>alto</sup>.



**Figura 8. Subpoblaciones de Células Dendríticas que Migran de Piel a Nódulos Linfáticos.** La figura muestra gráficos de densidad de células de nódulos linfáticos de ratones estimulados con DBFT/acetona y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-MHC II y anti-CD11c para definir la población de células dendríticas y con anti-CD8 $\alpha$  y anti-CD11b para definir las subpoblaciones en la región MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. (a) Ratón normal y (b) Ratón transgénico. Se adquirieron un total de 105000 células en ambos casos. Experimento representativo de 4 independientes.

En los ratones estimulados con DBFT/acetona + FITC (Figura 9) se aprecian diferencias en comparación con los casos anteriores. En el ratón normal existe un incremento en los niveles de expresión de CD8 $\alpha$ , además de una disminución significativa de células CD8 $\alpha^+$ . También, ya no es posible diferenciar claramente las poblaciones CD11b<sup>alto</sup> y CD11b<sup>bajo</sup>, además de que la segunda se incrementa de forma importante (55.9%) en comparación con el ratón que no fue tratado con FITC (30.2%). En el ratón transgénico se mantiene la baja proporción de células dendríticas, sin embargo, ahora casi todas son CD8 $\alpha^+$  CD11b<sup>bajo</sup> (73.5%) contrario al ratón transgénico estimulado con DBFT/acetona, donde predominaban las células dendríticas CD8 $\alpha^+$  CD11b<sup>alto</sup>.

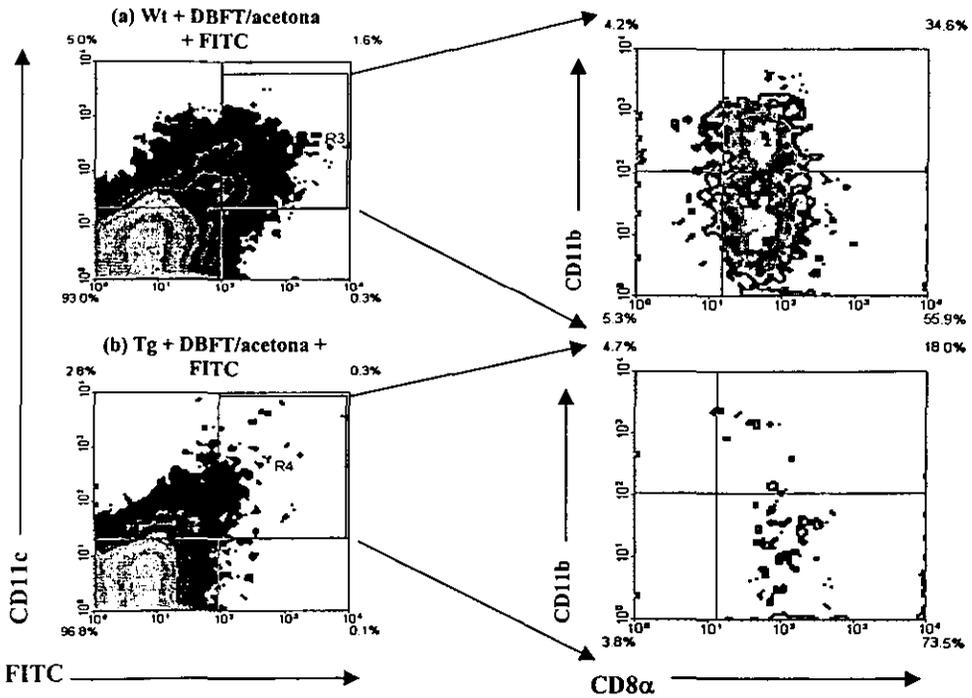
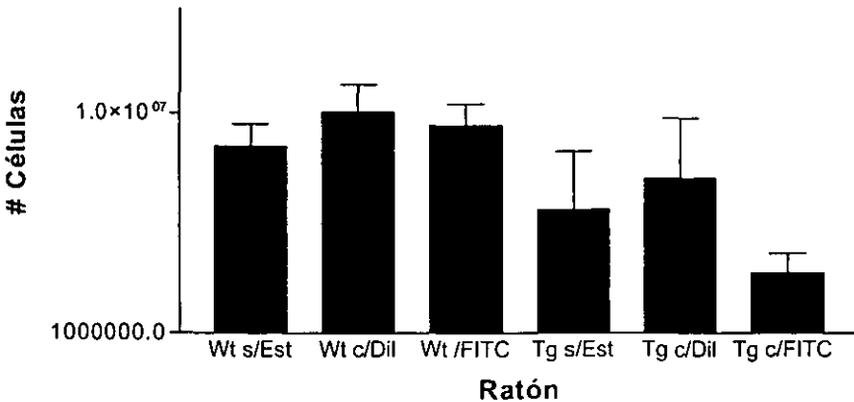


Figura 9. Subpoblaciones de Células Dendríticas que Migran de Piel a Nódulos Linfáticos. La figura muestra gráficos de densidad de células de nódulos linfáticos de ratones estimulados con DBFT/acetona + FITC y analizadas por citometría de flujo. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-MHC II y anti-CD11c para definir la población de células dendríticas y con anti-CD8 $\alpha$  y anti-CD11b para definir las subpoblaciones en la región MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. (a) Ratón normal y (b) Ratón transgénico. Se adquirieron un total de 105000 células en ambos casos. Experimento representativo de 4 independientes.

**g. Células Totales y Células Dendríticas Totales.**

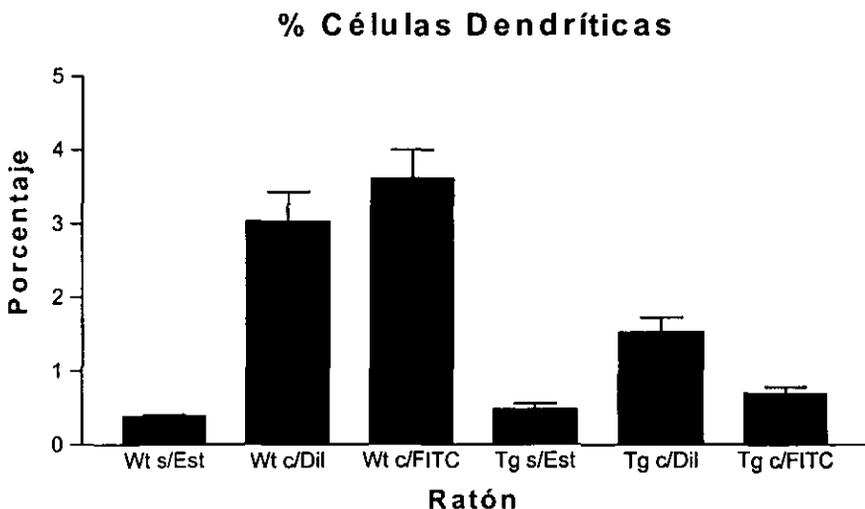
Debido a que los resultados anteriores reflejan el comportamiento proporcional de las células dendríticas en los nódulos linfáticos, se consideró importante determinar los números totales de éstas, ya que el número de células obtenidas de nódulos linfáticos de ratones transgénicos fue menor que el número de células que se obtuvieron de los ratones normales. En la Figura 10 se muestra mediante gráficas de barras el número de células totales obtenidas de los nódulos linfáticos de cada grupo de ratones. Como se puede observar en los ratones normales el número de células totales aumenta cuando se aplica el estímulo con DBFT/acetona y es ligeramente menor cuando se añade a este estímulo la fluoresceína, sin embargo, en este último caso el número de células es mayor que en el ratón que no fue estimulado. En el caso del ratón transgénico el comportamiento fue similar, pero el incremento en el número de células es muy reducido y en este ratón no hay un incremento en el número de células cuando es aplicado el estímulo con DBFT/acetona + FITC.

**Células Totales**



**Figura 10. Células Totales en Nódulo Linfático.** La figura muestra el número total de células obtenidas de los nódulos linfáticos de los ratones de cada uno de los grupos. Se muestra el promedio del número de células junto con el error estándar de la media (EEM). Wt= ratón normal; Tg= ratón transgénico; s/Est= ratón sin estimular; c/Dil.= ratón estimulado con DBFT/acetona; c/FITC= ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se contó con un promedio de 4 ratones por grupo.

En la Figura 11 se muestran los porcentajes de células dendríticas encontrado en cada grupo de ratones, en el ratón normal este porcentaje se incrementa cuando los ratones se estimulan, ya sea con DBFT/acetona o con DBFT/acetona + FITC siendo en este último grupo donde se encuentra el mayor porcentaje de células dendríticas. En el ratón transgénico se observa un comportamiento similar al que se observó en el número total de células, incrementándose el porcentaje de dendríticas del ratón sin estimular al estimulado con DBFT/acetona y no observándose ningún incremento en el ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC, sólo que en este caso el porcentaje de dendríticas en este último ratón es ligeramente mayor que en el ratón sin estimular.

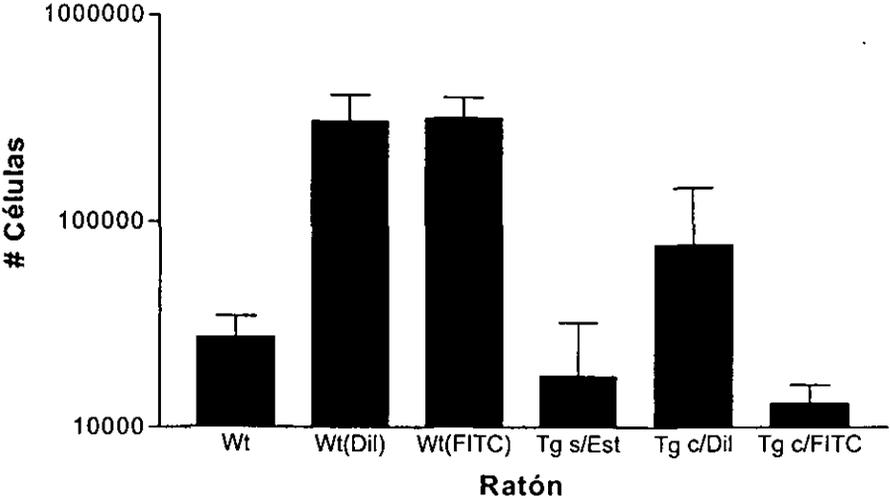


**Figura 11. Porcentaje de Células Dendríticas en Nódulo Linfático.** La figura muestra los porcentajes de células dendríticas obtenidas de los nódulos linfáticos de cada grupo de ratones. Las células dendríticas se definieron como células MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Se muestra el promedio del porcentaje de células junto con el error estándar de la media (EEM). Wt= ratón normal; Tg= ratón transgénico; s/Est= ratón sin estimular; c/Dil.= ratón estimulado con DBFT/acetona; c/FITC= ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se contó con un promedio de 4 ratones por grupo.

Por último, haciendo uso del número total de células y del porcentaje de células dendríticas fue posible determinar el número total de células dendríticas en los nódulos linfáticos de cada grupo de ratones (Figura 12). Este resultado es muy similar al que se obtiene para el

número total de células. En el caso del ratón normal el número de células dendríticas totales es prácticamente el mismo en los grupos de ratones estimulados y que a su vez es mucho mayor que en los ratones no estimulados, mientras que en los ratones transgénicos el mayor número de células dendríticas se encuentran en el grupo de ratones estimulados con DBFT/acetona y no se observa ningún incremento en el grupo de ratones estimulados con DBFT/acetona + FITC.

### Células Dendríticas Totales



**Figura 12. Células Dendríticas Totales en Nódulo Linfático.** La figura muestra el número de células dendríticas totales obtenidas de los nódulos linfáticos de los ratones de cada uno de los grupos. Las células dendríticas se definieron como células MHC II<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>. Se muestra el promedio del número de células junto con el error estándar de la media (EEM). Wt= ratón normal; Tg= ratón transgénico; s/Est= ratón sin estimular; c/Dil.= ratón estimulado con DBFT/acetona; c/FITC= ratón estimulado con DBFT/acetona + FITC. Se contó con un promedio de 4 ratones por grupo.

## IX. Discusión.

Debido a la gran importancia que tiene la interacción CD40/CD154 sobre las células dendríticas, se estudió en un modelo de ratón transgénico que expresa de forma constitutiva CD154, las consecuencias que el estímulo temprano y prolongado por parte de ésta molécula podía tener en la diferenciación, migración así como en la maduración de las células dendríticas. Para ello se utilizó el modelo de sensibilización en piel evaluándose las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos y las que migran de la piel a los nódulos linfáticos después de la aplicación de un estímulo.

Al estudiar las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos se encontró un ligero aumento en cuanto a su proporción en los ratones transgénicos, sin embargo, el número total era menor que en los ratones normales. Este resultado es contrario a lo que se suponía ya que se ha demostrado que, al menos *in vitro*, CD154 favorece la diferenciación de precursores a células dendríticas (Flores-Romo *et. al.*, 1997). Estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando el mismo ratón transgénico han mostrado que hay una disminución en el número de linfocitos B en la periferia y esto es en parte, consecuencia de un defecto en la ontogenia de los linfocitos B, por lo que es posible que la disminución en las células dendríticas residentes de los nódulos linfáticos sea consecuencia también de defectos en la ontogenia de los precursores de las células dendríticas en la médula ósea por la interacción temprana con CD154.

Por otro lado, los resultados muestran también que la sola aplicación de la mezcla DBFT/acetona es capaz de inducir la migración y maduración de las células dendríticas de la piel, esto es distinto a lo encontrado en un reporte anterior (Dearman, *et.al.*, 1996). Sin embargo, es importante destacar que en el estudio citado la concentración máxima de dibutilftalato utilizada es del 10% mientras que en nuestro estudio la concentración fue del 50% y esto pudiera ser la causa de la diferencia en los resultados.

Al evaluar la migración de células dendríticas de piel a nódulos linfáticos, donde también se ha demostrado la importancia de la interacción CD40-CD154 (Moodycliffe *et. al.*, 2000) se encontró que, en el ratón transgénico la capacidad de migración disminuyó, así el número de células dendríticas que se encontraron en los nódulos linfáticos después de la aplicación de un estímulo fue menor que en el ratón normal. Este resultado genera

nuevamente la posibilidad de que exista un defecto en la diferenciación de los precursores de células dendríticas y que éstos no estén llegando a la piel o de forma alternativa que el problema sea en la migración.

En caso de que el problema sea en la migración, en el estudio de Moodycliffe se reportó que en ausencia de CD154 los ratones presentaban una regulación aberrante en la producción de TNF $\alpha$  cutáneo y posiblemente esta era la razón por la que las células dendríticas eran incapaces responder a estímulos y migrar, por lo que es posible que en el modelo de ratón transgénico utilizado en el presente trabajo la interacción prolongada de CD154 con su ligando altere los niveles de TNF $\alpha$  y por lo tanto se inhiba la migración.

Por otro lado se encontró que la capacidad de endocitosis se vió disminuida en las células dendríticas del ratón transgénico, lo que podría relacionarse con una maduración temprana de la célula, pero al estudiarse moléculas que modifican su expresión con la maduración de la célula dendrítica como CD86 y CD54, se observó que los niveles de estas moléculas no se modifican significativamente con respecto al basal, lo que se podría relacionar a un proceso de maduración inadecuado. Esto podría explicarse si se considera que el estímulo temprano de CD154 en la célula dendrítica pudiera dar como resultado pérdida en su capacidad endocítica y como consecuencia incapacidad para sobre expresar moléculas coestimuladoras. Sin embargo, la incapacidad de las células dendríticas de incrementar los niveles de CD86 y CD54 puede ser producto directamente de la interacción temprana con CD154 y no tanto por la falta de endocitosis, ya que en el ratón normal en ausencia del estímulo endocítico (FITC) sí se observa un incremento en la expresión de CD86 y CD54 lo que no ocurre en el transgénico que siguió el mismo tratamiento. A pesar de que las células en las que se estudió la endocitosis y expresión de CD86 y CD54 son muy pocas, las diferencias en fenotipo que presentan, en cuanto a su expresión de los marcadores CD8 $\alpha$  y CD11b, comparado con las células residentes de nódulo apoyan el hecho de que estas células provienen de la piel.

Con respecto a los estudios hechos para determinar las subpoblaciones de las células dendríticas se encontró que las que migran de piel a nódulos linfáticos adquieren la expresión del marcador CD8 $\alpha$ . Este resultado está de acuerdo con lo reportado por Anjuère *et. al.* Sin embargo, este mismo hecho se contrapone al concepto de que las células de Langerhans son de origen mieloide y como tales deberían dar origen a células dendríticas

mieloides que no expresan CD8 $\alpha$ . Así se podría suponer que las células de Langerhans son capaces de dar origen a ambos tipos de células dendríticas CD8 $\alpha^+$  y CD11b $^+$ , linfoides y mieloides respectivamente. Por lo anterior, también sería posible considerar que el marcador CD8 $\alpha$  más que un marcador de linaje podría ser un marcador de maduración en lo que respecta a las células dendríticas.

Por otro lado en el ratón transgénico parece que la población CD8 $\alpha^+$  de las células dendríticas es la que se encuentra principalmente afectada lo que nos llevaría a pensar en que las dos subpoblaciones responden de forma distinta a la presencia prolongada de CD154 e incluso a apoyar los resultados que proponen que su origen es distinto. La diferencia en cuanto al origen podría apoyarse en que los linfocitos B que son de linaje linfoide también se encuentran disminuidos en este ratón.

Finalmente los distintos resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a proponer que la presencia de CD154, desde etapas tempranas y por un periodo prolongado, tiene efectos negativos (como ha sido sugerido en linfocitos B) sobre la diferenciación y funciones de las células dendríticas, resaltando así la importancia que tiene el hecho de que la expresión de esta molécula en condiciones normales sea inducible y transitoria en el tiempo. Lo anterior tiene implicaciones ya que una expresión inadecuada o una interacción temprana de esta molécula con precursores de células dendríticas o células dendríticas inmaduras podría interferir de manera importante en la generación de una respuesta inmune.

## X. Conclusiones.

- El número de células dendríticas residentes en nódulos linfáticos es menor en el ratón transgénico.
- La capacidad de migración de las células dendríticas de piel a nódulos linfáticos se encuentra disminuida en el ratón transgénico.
- La capacidad de endocitosis y la expresión de CD84 y CD54 se encuentran disminuidas en el ratón transgénico.
- Las células dendríticas que migran de piel a nódulos linfáticos expresan el marcador CD8 $\alpha$  y esta subpoblación es la que se encuentra principalmente afectada en el ratón transgénico.
- El estímulo temprano y prolongado por CD154 que tienen los ratones transgénicos podría ser el responsable de los efectos negativos observados en las células dendríticas.

## Referencias.

- Anjuère, Fabienne, G. Martínez del Hoyo, P. Martín, C. Ardavin. (2000). Langerhans cells acquire a CD8<sup>+</sup> dendritic cell phenotype on maturation by CD40 ligation. *J. Leukoc. Biol.*, 67: 206 – 209.
- Anjuère, Fabienne, P. Martín, I. Ferrero, M. López Fraga, G. Martínez del Hoyo, N. Wright, C. Ardavin. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood*, 93: 590 – 598.
- Armitage, Richard J., W.C. Fanslow, L. Strockbine, T.A. Sato, K.N. Clifford, B.M. Macduff, D.M. Anderson, S.D. Gimpel, T. Davis-Smith, C.R. Maliszewski, E.A. Clark, C.A. Smith, K.H. Grabstein, D. Cosman, M.K. Spriggs. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature*, 357: 80 – 82.
- Banchereau, Jacques & R.M. Steinman. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392: 245 – 252.
- Bender, Armin, M. Sapp, G. Schuler, R.M. Steinman, N. Bhardwaj. (1996). Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J. Immunol. Meth.*, 196: 121 – 135.
- Bergman, Mary C., J.F. Attrep, A.C. Grammer, P.E. Lipsky. (1996). Ligation of CD40 influences the function of human Ig-secreting B cell hybridomas both positively and negatively. *J. Immunol.*, 156: 3118 – 3132.
- Bianchi, Roberta, U. Grohmann, C. Vacca, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, P. Puccetti. (1999). Autocrine IL-12 is involved in dendritic cell modulation via CD40 ligation. *J. Immunol.*, 163: 2517 – 2521.
- Bottomly, Kim. (1999). T cells and dendritic cells get intimate. *Science*, 283: 1124 – 1125.
- Caux, Christophe, C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. van Kooten, I. Durand, J. Banchereau. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.*, 180: 1263 – 1272.
- Caux, Christophe, B. Vanbervliet, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. de Saint-Vis, C. Jaquet, K. Yoneda, S. Imamura, D. Schmitt, J. Banchereau. (1996). CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF $\alpha$ . *J. Exp. Med.*, 184: 695 – 706.
- Cella, Marina, D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia, G. Alber. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.*, 184: 747 – 752.
- Cella, Marina, F. Facchetti, A. Lanzavecchia, M. Colonna. (2000). Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent Th1 polarization. *Nature Immunol.*, 1: 305 – 310.
- Clark, Lisa B., T.M. Foy, R.J. Noelle. (1996). CD40 and its ligand. *Adv. Immunol.*, 63: 43 – 77.

Cook, Donald N., D.M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N.A. Kuklin, S.J. Abbondanzo, Xiao-Da Niu, Shu-Cheng Chen, D.J. Manfra, M.T. Wiekowski, L.M. Sullivan, S.R. Smith, H.B. Greenberg, S.K. Narula, M. Lipp, S.A. Lira. (2000). CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*, 12: 495 – 503.

Cyster, Jason G. (1999). Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. *J. Exp. Med.*, 189: 447 – 450.

De Baey, Annegret, A. Lanzavecchia. (2000). The role of aquaporins in dendritic cell macropinocytosis. *J. Exp. Med.*, 191: 743 – 747.

De Saint-Vis, Blandine, I. Fugier-Vivier, C. Massacrier, C. Gaillard, B. Vanbervliet, S. Ait-Yahia, J. Banchereau, Yong-Jun Liu, S. Lebeque, C. Caux. (1998). The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.*, 160: 1666 – 1676.

De Smedt, Thibaut, B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, M. Moser. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J. Exp. Med.*, 184: 1413 – 1424.

Dearman, R.J., M. Cumberbatch, J. Hilton, H.M. Clowes, I. Fielding, J.R. Heylings, I. Kimber. (1996). Influence of dibutyl phthalate on dermal sensitization to fluorescein isothiocyanate. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 33: 24 – 30.

Driessen, Christoph, R.A.R. Bryant, A.M. Lennon-Duménil, J.A. Villadangos, P.W. Bryant, Guo-Ping Shi, H.A. Chapman, H.L. Ploegh. (1999). Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J. Cell Biol.*, 147: 775 – 790.

Flores-Romo, Leopoldo, P. Björk, V. Duvert, C. van Kooten, S. Saeland, J. Banchereau. (1997). CD40 ligation on human cord blood CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 185: 341 – 349.

Galy, Anne, M. Travis, D. Cen, B. Chen. (1995). Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*, 3: 459 – 473.

Gapin, Laurent, Y. Bravo de Alba, A. Casrouge, J.P. Cabaniols, P. Kourilsky, J. Kanellopoulos. (1998). Antigen presentation by dendritic cells focuses T cell responses against immunodominant peptides: studies in the hen egg-white lysozyme (HEL) model. *J. Immunol.*, 160: 1555 – 1564.

Garret, Wendy S., Li-Mei Chen, R. Kroschewsky, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J.E. Galán, I. Mellman. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell*, 102: 325 – 334.

Grewal, Iqbal S., R.A. Flavell. (1997). The CD40 ligand. At the center of the immune universe? *Immunol. Res.*, 16: 59 – 70.

Grouard, Géraldine, M.C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau, Yong-Jun Liu. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.*, 185: 1101 – 1111.

Hermans, Ian F., D.S. Ritchie, A. Daish, J. Yang, M.R. Kehry, F. Ronchese. (1999). Impaired ability of MHC class II<sup>+</sup> dendritic cells to provide tumor protection is rescued by CD40 ligation. *J. Immunol.*, 163: 77 – 81.

Hess, Sigrun, H. Engelman. (1996). A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.*, 183: 159 – 167.

Heuffler, Christine, F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R.M. Steinman, N. Romani, G. Schuler. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- $\gamma$  production by T helper 1 Cells. *Eur. J. Immunol.*, 26: 659 – 668.

Inaba, Kayo, M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.M. Steinman. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 176: 1693 – 1702.

Inaba, Kayo, S. Turley, T. Iyoda, F. Yamaide, S. Shimoyama, C. Reis e Sousa, R.N. Germain, I. Mellman, R.M. Steinman. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J. Exp. Med.*, 191: 927 – 936.

Janeway, C.A., Paul Travers, M. Walport, J.D. Capra. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* 4<sup>th</sup> edition. Current Biology Publications. Garland Publishing. 1999.

Josien, Régis, Hong-Li Li, E. Ingulli, S. Sarma, B.R. Wong, M. Vologodskaya, R.M. Steinman, Y. Choi. (2000). TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.*, 191: 495 – 501.

Kalinski, Pawel, J.H.N. Schuitemaker, C.M.U. Hilkens, E.A. Wierenga, M.L. Kapsenberg. (1999). Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- $\gamma$  and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol.*, 162: 3231 – 3136.

Klein, J. & V. Hořejší. *Immunology.* 2<sup>nd</sup> edition. Blackwell Science. 1997

Koch, Franz, U. Stanzl, P. Jennewein, K. Janke, C. Heuffler, E. Kämpgen, N. Romani, G. Schuler. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.*, 184: 741 – 746.

Kraal, G., M. Breel, M. Janse, G. Bruin. (1986). Langerhans cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.*, 163: 981.

Kronin, Vadim, K. Winkel, G. Süß, A. Kelso, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer, K. Shortman. (1996). A subclass of dendritic cells regulates the response of naïve CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.*, 157: 3819 – 3827.

Laman, Jon D., E. Claassen, R.J. Noelle. (1996). Functions of CD40 and its ligand, gp39 (CD40L). *Crit. Rev. Immunol.*, 16: 59 – 108.

Lane, Peter J.L., T. Brocker. (1999). Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr. Opin. Immunol.*, 11: 308 – 313.

Langenkamp, Anja, M. Messi, A. Lanzavecchia, F. Sallusto. (2000). Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunol.*, 1: 311 – 316.

Larsen, Christian P., S.C. Ritchie, R. Hendrix, P.S. Linsley, K.S. Hathcock, R.J. Hodes, R.P. Lowry, T.C. Pearson. (1994). Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J. Immunol.*, 152: 5208 – 5219.

Lin, Chen-Lung, R.M. Suri, R.A. Rahdon, J.M. Austyn, J.A. Roake. (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *Eur. J. Immunol.*, 28: 4114 – 4122.

Liu, Liming, B.E. Rich, Jun-ichi Inobe, W. Chen, H.L. Weiner. (1998). Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naïve CD4<sup>+</sup> T cells to secrete IL-4. *Int. Immunol.*, 10: 1017 – 1026.

Ludewig, Burkhard, K.J. Maloy, C. López-Macías, B. Odermatt, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel. (2000). Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.*, 30: 185 – 196.

Mackey, Matthew F., J.R. Gunn, C. Maliszewski, H. Kikutani, R.J. Noelle, R.J. Barth Jr. (1998). Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J. Immunol.*, 161: 2094 – 2098.

Maraskovsky, Eugene, K. Brasel, M. Teepe, E.R. Roux, S.D. Lyman, K. Shortman, H.J. McKenna. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.*, 184: 1953 – 1962.

McLellan, Alexander D., R.V. Sorg, L.A. Williams, D.N.J. Hart. (1996). Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur. J. Immunol.*, 26: 1204 – 1210.

Moodycliffe, Angus M., V. Shreedhar, S.E. Ullrich, J. Walterscheid, C. Bucana, M.L. Kripke, L. Flores-Romo. (2000). CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of antigen-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 191: 2011 – 2020.

Moulin, Véronique, F. Andris, K. Thielemans, C. Maliszewski, J. Urbain, M. Moser. (2000). B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. *J. Exp. Med.*, 192: 475 – 482.

Nakamura, Koichiro, A. Saitoh, N. Yasaka, M. Furue, K. Tamaki. (1999). Molecular mechanisms involved in the migration of epidermal dendritic cells in the skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 4: 169 – 172.

Papadopoulos, Elektra J., C. Sasseti, H. Saeki, N. Yamada, T. Kawamura, D.J. Fitzhugh, M.A. Saraf, T. Schall, A. Blauvelt, S.D. Rosen, S.T. Hwang. (1999). Fractalkine, a CX3C chemokine, is expressed by dendritic cells and is up-regulated upon dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 29: 2551 – 2559.

Park, Sun-Mi, Han-Soo Kim, J. Choe, T.H. Lee. (1999). Differential induction of cytokine genes and activation of mitogen-activated protein kinase family by soluble CD40 ligand and TNF in a human follicular dendritic cell line. *J. Immunol.*, 163: 631 – 638.

Paul, William E. *Fundamental Immunology*. 4<sup>th</sup> edition. Chapter 16. Lippincott – Raven. USA, 1999.

Péguet-Navarro, Josette, C. Dalbiez-Gauthier, F.M. Rattis, C. van Kooten, J. Banchereau, D. Schmitt. (1995). Functional expression of CD40 antigen on human epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.*, 155: 4241 – 4247.

Peitsch, Manuel C., V. Jongeneel. (1993). A 3-D model for the CD40 ligand predicts that it is a compact timer similar to the tumor necrosis factors. *Int. Immunol.*, 5: 233 – 238.

Pinchuk, Lesya M., S.J. Kalus, D.M. Magaletti, G.V. Pinchuk, J.P. Norsen, E.A. Clark. (1996). Functional CD40 ligand expressed by human blood dendritic cells is up-regulated by CD40 ligation. *J. Immunol.*, 157: 4363 – 4370.

Randall, Troy D., A.W. Heath, L. Santos-Argumedo, M.C. Howard, I.L. Weissman, F.E. Lund. (1998). Arrest of B lymphocyte terminal differentiation by CD40 signaling: mechanism for lack of antibody-secreting cells in germinal centers. *Immunity*, 8: 733 – 742.

Randolph, Gwendalyn J., K. Inaba, D.F. Robbiani, R.M. Steinman, W.A. Muller. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*, 11: 753 – 761.

Rathmell, Jeffrey C, S.E. Townsend, J.C. Xu, R.A. Flavell, C.C. Goodnow. (1996). Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)- ligands modulated by the B cell antigen receptor. *Cell*, 87: 319 – 329.

Reid, Steven D., G. Penna, L. Adorini. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.*, 12: 114 – 121.

Reid, Cecil D.L., A. Stackpole, A. Meager, J. Tikerpae. (1992). Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34<sup>+</sup> progenitors in human bone marrow. *J. Immunol.*, 149: 2681 – 2688.

Reis e Sousa, Caetano, S. Hieny, T. Schariton-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R.N. Germain, A. Sher. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin-12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.*, 186: 1819 – 1829.

Rissoan, Marie-Clotilde, V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R.de Waal Malefyt, Yong-Jun Liu. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 283: 1183 – 1186.

Roake, Justin A., A.S. Rao, P.J. Morris, C.P. Larsen, D.F. Hankins, J.M. Austyn. (1995). Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J. Exp. Med.*, 181: 2237 – 2247.

Robinson, Stephen Paul, S. Patterson, N. English, D. Davies, S.C. Knight, C.D.L. Reid. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 29: 2769 – 2778.

Romani, Nikolaus, S. Gruner, D. Brang, E. Kämpgen, A. Lenz, B. Trockenbacher, G. Konwalinka, P.O. Fritsch, R.M. Steinman, G. Schuler. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.*, 180: 83 – 93.

Romani, Nikolaus, S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A.M. Livingstone, C.G. Fathman, K. Inaba, R.M. Steinman. (1989). Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. *J. Exp. Med.*, 169: 1169 – 1178.

Rovere, Patrizia, C. Vallinoto, A. Bondanza, M.C. Crosti, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Rugarli, A.A. Manfredi. (1998) Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J. Immunol.*, 161: 4467 – 4471.

Ruedl, Christiane, M. Kopf and M.F. Bachmann. (1999). CD8<sup>+</sup> T cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.*, 189: 1875 – 1883.

Sallusto Federica, A. Lanzavecchia. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.*, 179: 1109 – 1118.

Saunders, Dolores, K. Lucas, J. Ismaili, Li Wu, E. Maraskovsky, A. Dunn, K. Shortman. (1996). Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 184: 2185 – 2196.

Sauter, Birthe, M.L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, N. Bhardwaj. (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 191(3): 423 – 433.

Schattner, Elaine J., K.B. Elkon, Dae-Hyun Yoo, J. Tumang, P.H. Krammer, M.K. Crow, S.M. Friedman. (1995). CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *J. Exp. Med.*, 182: 1557 – 1565.

Shreedhar, Vijay, A.M. Moodycliffe, S.E. Ullrich, C. Bucana, M.L. Kripke, L. Flores-Romo. (1999). Dendritic cells require T cells for functional maturation in vivo. *Immunology*, 11: 625 – 636.

Snijders, Alies, P. Kalinski, C.M.U. Hilken, M.L. Kapsenberg. (1998). High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.*, 10: 1593 – 1598.

Shuurhuis, Danita H., S. Laban, R.E.M. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M.J. Keijmeer, E.I.H. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H.J. Geuze, C.J.M. Melief, F. Ossendorp. (2000). Immature dendritic cells acquire CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J. Exp. Med.*, 192(1): 145 – 150.

Steinman, Ralph M., S. Turley, I. Mellman, K. Inaba. (2000). The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.*, 191: 411 – 416.

Stoll, Sabine, H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Müller, H. Yamauchi, M. Kurimoto, J. Knop, A.H. Enk. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur. J. Immunol.*, 28: 3231 – 3239.

Süss, Gabriele, K. Shortman. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/ Fas-ligand- induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, 183: 1789 – 1796.

Tang, Lucy H. and J.G. Cyster. (1999). Chemokine up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 284: 819 – 822.

Terheyden, Patrick, P.T. Straten, E.B. Bröcker, E. Kämpgen, J.C. Becker. (2000). CD40-ligated dendritic cells effectively expand melanoma-specific CD8<sup>+</sup> CTLs and CD4<sup>+</sup> INF- $\gamma$ -producing T cells form tumor-infiltrating lymphocytes. *J. Immunol.*, 164: 6633 – 6639.

Tsuruta D., K. Kaneda, H. Teramae, M. Ishh. (1999). In vivo activation of Langerhans cells and dendritic epidermal T cells in the elicitation phase of murine contact hypersensitivity. *British Journal of Dermatology*, 140: 392 – 399.

Van den Berg T.K., J. Hasbold, C. Renardel de Lavalette, E.A. Döpp, C.D. Dijkstra, G.G.B. Klaus. (1996). Properties of mouse CD40: differential expression of CD40 epitopes on dendritic cells and epithelial cells. *Immunology*, 88: 294 – 300.

van Kooten, C., J. Banchereau. (1996). CD40 – CD40 ligand, a multifunctional receptor – ligand pair. *Adv. Immunol.*, 61: 1 – 77.

Vremec, David, K. Shortman. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs. Cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.*, 159: 565 – 573.

Vremec, David, M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, Li Wu, K. Shortman. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 176: 47 – 58.

Winzler, Claudia, P. Rovere, M. Rescigno, F. Granucci, G. Penna, L. Adorini, V.S. Zimmermann, J. Davoust, P. Ricciardi-Castagnoli. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.*, 185: 317 – 328.

Wu, Li, A. D'Amico, K.D. Winkel, M. Suter, D. Lo, K. Shortman. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> dendritic cells but not of lymphoid-related CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Immunity*, 9: 839 – 847.

Wu, Li, Chung-Leung Li, K. Shortman. (1996). Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.*, 184: 903 – 911.

Wu, Li, D. Vremec, C. Ardavin, K. Winkel, G. Süss, H. Georgiou, E. Maraskovsky, W. Cook, K. Shortman. (1995). Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur. J. Immunol.*, 25: 418 – 425.

Wu, Qiang, Y. Wang, J. Wang, E.O. Hedgeman, J.L. Browning, Yang-Xin Fu. (1999). The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J. Exp. Med.*, 190: 629 – 638.

Young, James W., P. Szabolcs, M.A.S. Moore. (1995). Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J. Exp. Med.*, 182: 1111 – 1120.