

142

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

## ACTIVACION DE CELULAS DENDRITICAS MURINAS CON TRES EPITOPES PROTECTORES CONTRA LA CISTICERCOSIS

TESIS

Que para obtener el titulo de **BIOLOGO**

presenta:

**FERNANDO ONTIVEROS LLAMAS**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

295164

México, D.F. 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**  
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Activación de Células Dendríticas Murinas con Tres Epítopos  
Protectores contra la Cisticercosis"

realizado por **Fernando Ontiveros Llamas**

con número de cuenta 9754738-5, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Propietario

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Propietario

Dra. Gladis Fragoso González

Suplente

M.en C. Rosario Ortiz Hernández.

Suplente

Biol. María Simona Ustoa.

*[Handwritten signatures: Sciutto Conde, Espitia Pinzón, Fragoso González, Ortiz Hernández, Ustoa]*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología

*[Handwritten signature]*  
Dra. Patricia Ramos Mor



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

**Esta tesis de Licenciatura fue desarrollada en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y en el “Center for Vaccine Biology and Immunology” de la Universidad de Rochester, bajo la tutela de las Doctoras Edda Sciutto y Alexandra Livingstone.**

**Director de Tesis:**

**Dra. Edda L. Sciutto Conde**

## **Dedicatoria**

**"No es suficiente la lectura sin el arrepentimiento, el conocimiento sin la devoción, la búsqueda sin el impulso de la sorpresa, la prudencia sin la capacidad de abandonarse a la alegría, la actividad disociada de la religiosidad, el saber separado de la caridad, la inteligencia sin la humildad, el estudio no sostenido por la divina gracia, la reflexión sin la sabiduría inspirada por Dios."**

**San Buenaventura.**

**A mis padres, quienes se preocuparon por brindarme una educación moral y académica y de quienes siempre recibí apoyo.**

**A mis hermanas, por todos esos hermosos momentos vividos a su lado.**

**A mis abuelos, a quienes quiero y debo tanto.**

**A mis maestros, quienes me enseñaron el maravilloso mundo de la ciencia.**

**A mis amigos, quienes hacen de este mundo un mejor lugar para vivir.**

**"Porque he estudiado mucho tengo la fe de un Bretón. Que si hubiese estudiado más, tendría la fe de una Bretona"**

**Louis Pasteur.**

## **Agradecimientos**

A todo el personal del laboratorio de la Dra. Sciutto por su amistad y enseñanzas durante estos 4 años.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias y en especial del Taller de Núcleo Celular donde aprendí tantas cosas.

A Alexandra, Linda y Guang por su paciencia y disponibilidad.

A mis sinodales por su ayuda y disponibilidad en la revisión de esta tesis.

A mi querido Tío Miguel Ontiveros quien siempre ha creído en mí.

A la Fundación Telmex y en especial a la Fundación Lorena Alejandra Gallardo por su apoyo y cariño incondicionales.

A mis abuelos por el cariño de todos estos años.

## **Indice**

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	12
Hipótesis	12
Materiales y Métodos	13
Resultados	16
Discusión	46
Conclusiones	54
Apéndice I	55
Apéndice II	61
Apéndice III	67
Referencias	68

## Resumen

La cisticercosis es un problema grave de salud pública en numerosos países. Con el fin de combatir esta parasitosis, se han identificado epítopes que confieren resistencia a la cisticercosis experimental murina y a la porcina. Hasta el momento, tres péptidos sintéticos forman parte de una vacuna en fase experimental. Estos péptidos han demostrado poseer una capacidad inmunogénica importante, lo cual sugiere entre otras cosas su posible papel como activadores de células presentadoras de antígeno. Las células dendríticas son el tipo celular que estimula con mayor eficacia la proliferación de linfocitos T. El procesado y la presentación de antígenos ocurre durante los diferentes estados de maduración de la célula. Las células dendríticas inmaduras capturan, procesan y presentan antígenos a los linfocitos CD4+ los cuales a su vez activan de manera recíproca a las células dendríticas por medio de la interacción de moléculas de superficie, entre ellas CD40 y su ligando CD40L. Esta interacción resulta en la maduración final de las células presentadoras y les confiere la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos CD8+. En este trabajo se analizan los estados de activación inducidos *in vitro* en células dendríticas por los péptidos sintéticos usados en la vacuna contra la cisticercosis, así como por la ligación del receptor de superficie CD40 con un anticuerpo monoclonal. Además de caracterizar los estados de maduración inducidos en células dendríticas por lipopolisacárido y la ligación de CD40, se demuestra que dos de los péptidos utilizados son capaces de inducir un estado de activación celular que puede ser aumentado por la ligación de CD40.



## Introducción.

### La Cisticercosis.

La cisticercosis causada por el parásito *Taenia solium* es un problema de salud grave en un gran número de países en vías de desarrollo, especialmente en Latinoamérica, Asia y Africa (White, 2000). El ciclo de vida del parásito incluye a una forma larval (cisticerco), la cual afecta tanto al humano como al cerdo y se adquiere cuando estos consumen huevecillos provenientes de excretas humanas. El ciclo se completa cuando los humanos consumen carne de cerdo infectado y la forma adulta del parásito (tenia) se desarrolla en el intestino produciendo millones de huevecillos. La transmisión de esta parasitosis está ligada a condiciones sanitarias deficientes y malos hábitos de higiene personal. El control de la enfermedad por medio de la aplicación de medidas sanitarias adecuadas a gran escala es difícil de establecer a un corto plazo (Larralde, et al., 1992). Sin embargo, dado que el cerdo es un hospedero obligatorio del parásito, la transmisión al humano puede ser reducida al disminuir su prevalencia en el primero por medio de vacunación. Una de las líneas de investigación en nuestro laboratorio consiste en el desarrollo de una vacuna efectiva para prevenir la cisticercosis porcina e interrumpir la transmisión del parásito.

### Identificación de epítopes protectores.

Con el objetivo de diseñar una vacuna contra esta parasitosis, se han identificado epítopes de cisticerco capaces de inducir protección contra la cisticercosis experimental murina causada por el parásito *Taenia crassiceps* (Toledo et al., 1999, 2001). Previamente se había demostrado que los antígenos de este parásito pueden proteger parcialmente contra la cisticercosis porcina causada por *T. solium* (Sciutto, et al., 1995). Hasta el momento, 3 péptidos (GK1, KETc1 y

KETc12) han sido utilizados en la vacunación de cerdos con el propósito de interrumpir el ciclo de vida del parásito y prevenir la infección en humanos. Estos péptidos (Tabla 1) han demostrado ser eficientes estimuladores de la respuesta inmune tanto celular como humoral y los primeros resultados de la vacunación en cerdos son prometedores (Huerta et al., 2000)

GK1 es un péptido de 18 aminoácidos cuya secuencia ha sido localizada por inmunofluorescencia en diferentes estructuras anatómicas de los huevecillos (oncosferas), cisticercos y en la forma adulta del parásito *T. Solium*. En el ratón este péptido es capaz de inducir una respuesta humoral sin la necesidad de proteínas acopladas (*carriers*) y de estimular la proliferación de linfocitos T *in vitro*. En el sobrenadante de las células estimuladas se detectaron niveles altos de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y niveles bajos de IL-4 (Toledo, et al., 1999), lo que sugiere una respuesta de tipo T1.

El péptido KETc1 es una secuencia de 13 aminoácidos que se encuentra presente en todas las etapas de desarrollo del parásito. Además de estimular la producción de anticuerpos y la proliferación de linfocitos T, este péptido es capaz de conferir hasta un 100% de protección contra la cisticercosis murina. KETc12 es un péptido de 9 aminoácidos que comparte características similares de localización y estímulo de la respuesta inmune con KETc1. Aunque KETc12 confiere un nivel de protección inferior al inducido por KETc1, ambos péptidos estimulan la producción de interleucinas inflamatorias (Toledo, et al., 2001)

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>
GK1	G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y S (A)
KETc1	A P M S T P S A T S V R (G)
KETc12	G N L L L S C L (G)

*Tabla 1. Secuencia de los péptidos usados para vacunación.*

Con el propósito de conocer más acerca de la capacidad inmunogénica de éstos péptidos y considerando la relevancia de las células dendríticas como presentadoras de antígenos, en esta tesis se procedió a estudiar la capacidad de los péptidos de activar a este tipo celular. De esta manera, se espera obtener información sobre los mecanismos básicos de activación de estas células presentadoras de antígeno y evaluar la capacidad inmunogénica de los péptidos.

### Células dendríticas.

Los trabajos sobre la biología de la células dendríticas se han multiplicado en los últimos años. Esto se debe principalmente a que se han encontrado métodos de aislamiento más adecuados; los procedimientos comunes de aislamiento de linfocitos y células accesorias dañan a las células dendríticas y por lo general estas no sobreviven (Steinman, 1999). Las células dendríticas fueron identificadas inicialmente dentro del grupo de las células accesorias, las cuales fueron descubiertas durante el estudio de la respuesta inmune *in vitro*. Se encontró que los linfocitos requieren de la presencia de células adicionales ó accesorias para su proliferación (por ejemplo macrófagos). Aunque las células dendríticas fueron obtenidas por primera vez a partir de bazo, se reconoce su origen de médula ósea y la existencia de diferentes linajes (Steinman & Banchereau, 1999).

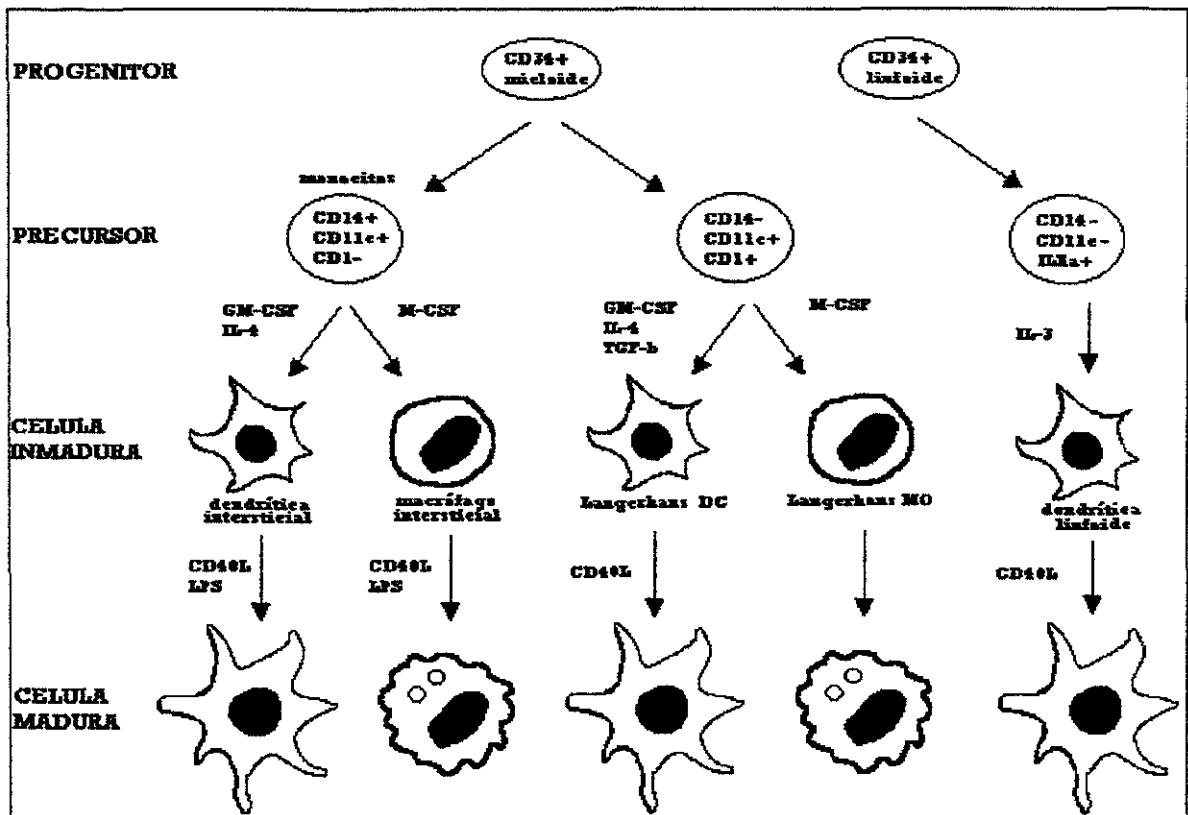
Las células dendríticas son conocidas como células profesionales presentadoras de antígenos (APC). Aún cuando esta denominación puede resultar ambigua, el término “profesional” se usa actualmente para denominar a las células presentadoras que poseen moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 (Steinman & Banchereau, 1999).

Steinman ha propuesto una clasificación de acuerdo a su distribución en el organismo de mamíferos (Steinman, 1999):

Nombre	Ubicación
Langerhans	Epidermis y membranas mucosas
Intersticiales	La mayoría de los órganos
Interdigitales y foliculares	Áreas de células T y B en los tejidos linfoides secundarios y la médula tímica.
Circulantes	Sangre y linfa.

*Tabla 2. Clasificación de células dendríticas.*

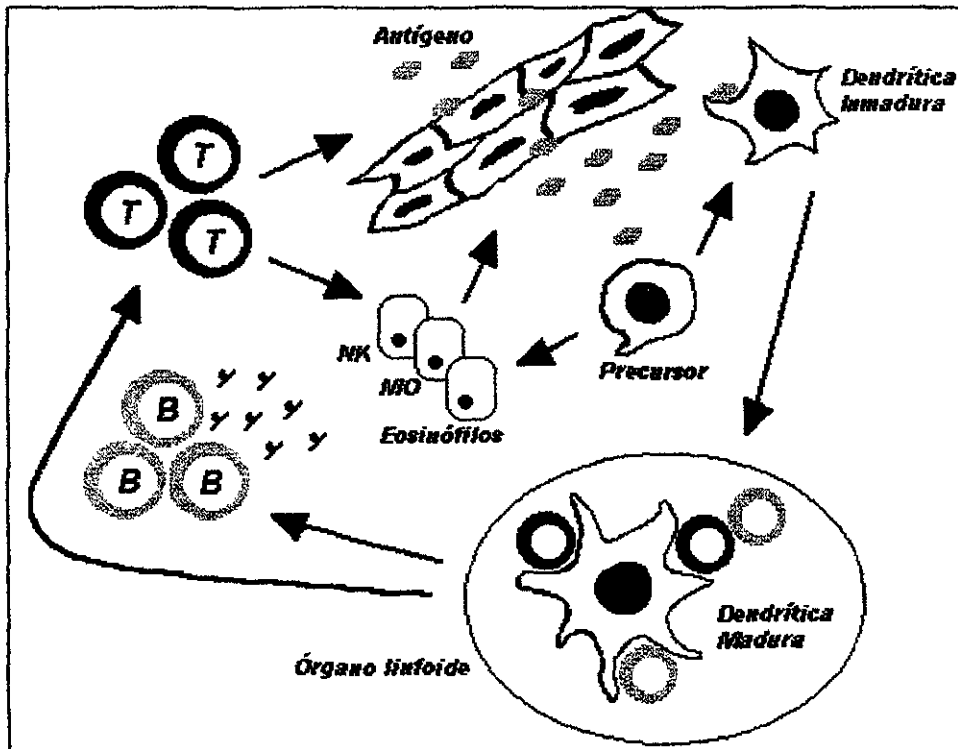
De entre los diferentes tipos de células accesorias, las células dendríticas han demostrado ser las más eficaces presentadoras de antígeno, estimulando proliferación linfocitaria aún en circunstancias en que otras células como linfocitos B y macrófagos resultaron ser débiles estimuladoras. Los niveles altos de expresión de complejos MHCII-péptido (moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II cargadas con péptido) en su superficie, así como las elevadas tasas de endocitosis y macropinocitosis, le facilitan la captura y presentación de péptidos a bajas concentraciones. Así, solo algunas células en presencia de una cantidad limitada de antígeno son suficientes para provocar la respuesta linfocitaria (Steinman & Banchereau, 1999). A las células dendríticas se les concibe como un complejo sistema de células que bajo diferentes estímulos microambientales pueden inducir estados tanto de inmunidad como de tolerancia (Banchereau, et al., 2000).



**Figura A. Desarrollo de células dendríticas.** Progenitores mieloides se diferencian para dar lugar a líneas monocíticas precursoras de células dendríticas (CD14+ CD11c+), las cuales se transforman en células dendríticas inmaduras en respuesta al factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-4. Estos precursores se diferencian como los macrófagos en presencia de M-CSF. Los precursores mieloides también pueden diferenciarse en precursores CD14- CD11c+ los cuales pueden transformarse en células de Langerhans en respuesta a GM-CSF, IL-4 y TGF-β ó en macrófagos en presencia de M-CSF. El precursor CD14-, CD11c- y IL-3Rα parece originarse a partir de un progenitor linfóide CD34+ y se transforma en célula dendrítica inmadura en presencia de IL-3. Las células inmaduras se diferencian en células maduras en respuesta a citocinas y/o productos microbianos (*modificada de Banchereau, et al., 2000*).

## Origen y desarrollo de las células dendríticas.

Las células dendríticas se originan a partir de células precursoras inmaduras (fig. A), las cuales a su vez se desarrollan a partir de diferentes progenitores en tejidos no linfoides, pudiendo tener diferentes funciones. Estos progenitores pueden ser de origen linfoide o mieloide. En el ratón, las poblaciones resultantes de ambos precursores expresan altos niveles de CD11c, MHCII, CD86 y CD40 (ver Apéndice II). Existen varias diferencias funcionales entre estas poblaciones. Las células dendríticas linfoides producen mayores niveles de IL-12 que las mieloides y son capaces de producir IFN- $\alpha$ . Por otro lado, los experimentos *in vitro* sugieren que el linaje mieloide activa linfocitos CD4+ y CD8+ de manera más eficaz (Banchereau, et al., 2000). Las células dendríticas inmaduras, además de poseer una alta capacidad fagocítica, se caracterizan por presentar abundantes compartimentos citoplasmáticos que contienen moléculas co-estimuladoras (ver Apéndice I y II). Generalmente, una célula inmadura habita en los tejidos y su función es la captura de antígenos (Hartgers et al., 2000). Una vez capturado el antígeno, la célula en proceso de maduración migra a los órganos linfáticos e interacciona con linfocitos de manera antígeno-específica (fig. B) (Kuby, 1997). La maduración en presencia de antígeno y/o moléculas como TNF- $\alpha$  y CD40L resulta en la regulación positiva de la expresión en la superficie de los complejos de MHCII-péptido y moléculas co-estimuladoras como CD40, CD54, CD58, CD80 y CD86 (Steinman & Banchereau, 1999). Los diferentes estímulos que requiere la célula dendrítica para madurar a la etapa final en la que es capaz de estimular a las células T no han sido definidos con precisión (ver Apéndice I). Se sabe que además de responder a productos microbianos como LPS, RNA de doble cadena y secuencias específicas de DNA, responden también a varios miembros de la familia de los factores de necrosis tumoral (TNF) como TNF- $\alpha$ , CD40L y TRANCE/RANK (Banchereau, et al., 2000).



**Figura B. Ciclo de vida de las células dendríticas.** Las células precursoras circulantes entran a los tejidos como células inmaduras. Al encontrarse con agentes patógenos secretan citocinas ( $\text{IFN-}\alpha$ ), que a su vez activan la respuesta inmune innata vía eosinófilos, macrófagos y células NK. Después de capturar el antígeno en el tejido, las células inmaduras migran a los órganos linfoides donde, después de madurar, presentan complejos MHC-péptido en su superficie, lo que resulta en la selección de linfocitos antígeno-específicos circulantes. Los linfocitos T seleccionados ayudarán a la célula dendrítica a alcanzar su estado de maduración final lo que lleva a la expansión y diferenciación linfocitaria. Los linfocitos T activados migran hasta alcanzar el tejido afectado. Los linfocitos ayudadores secretan citocinas que estimulan la activación de macrófagos, eosinófilos y células NK. Las células citotóxicas participan en la lisis de células infectadas. Los linfocitos B se activan al contacto con células T y dendríticas para luego migrar a diferentes áreas del sistema circulatorio donde maduran y se convierten en células plasmáticas productoras de anticuerpos (*modificada de Banchereau, et al., 2000*).

## Activación y CD40.

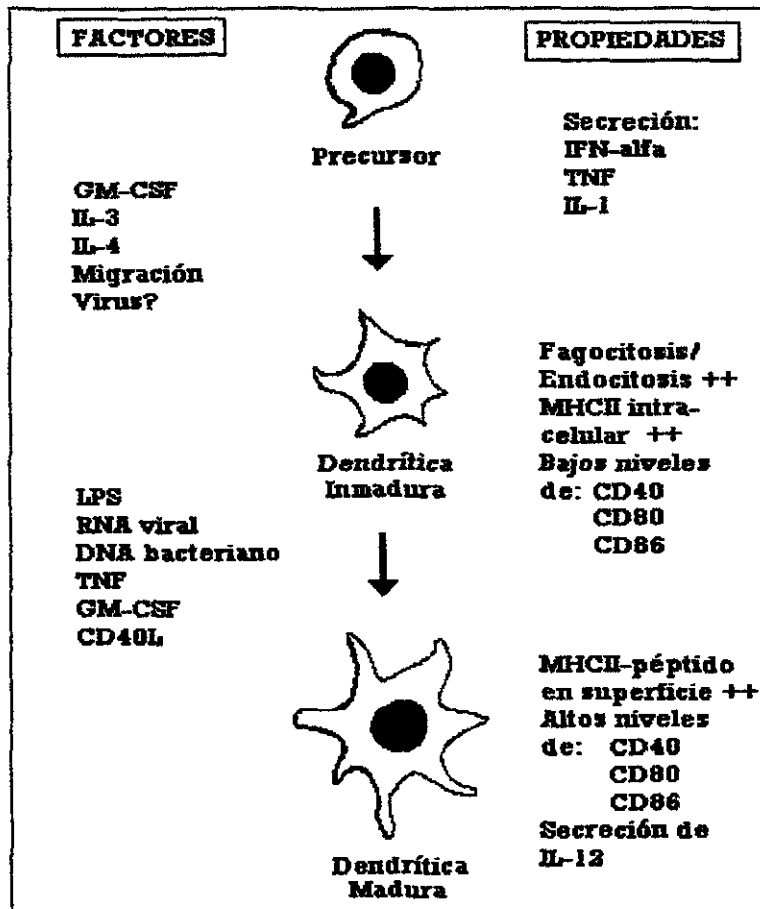
Debido al gran número de propiedades que se ven afectadas en las células dendríticas al ser estimuladas, el término activación debe ser empleado de manera cautelosa. No es claro el que todas las formas de activación resulten necesariamente en un aumento de inmunogenicidad (Reis e Sousa, 2001).

Debido a esto, es evidente la existencia de distintos niveles de activación en este tipo celular dependiendo del tipo de estímulo recibido y del microambiente en el que se encuentran (fig. C). Sin embargo, es posible definir las características generales que indican un estado máximo de maduración o activación. Después de recibir los estímulos adecuados de activación/maduración, las células dendríticas disminuyen su capacidad fagocítica, expresan niveles altos y estables de complejos MHCII-péptido, CD80 y CD86 entre otros. Son móviles, no adherentes, producen IL-12, IL-15 y resisten los efectos supresores de IL-10 (Kuby, 1997)(ver Apéndice II). Morfológicamente, las células dendríticas maduras presentan un tamaño y granularidad mayores así como un gran número de extensiones citoplasmáticas (dendritas).

Recientemente, se ha demostrado que la interacción de CD40 en la superficie de la célula dendrítica con su ligando (CD40L) en la superficie de linfocitos T, es al menos uno de los mecanismos principales por el cual la célula presentadora alcanza el estado de maduración máximo que le permitirá iniciar la activación de clonas específicas de linfocitos (Ridge et al., 1998; Ruedl et al., 1999)(ver Apéndice I). Las diferencias en los modelos tanto humano/murino como *in vivo/in vitro* han dado lugar a resultados contradictorios respecto a este marcador y su papel como activador (Schulz et al., 2000). Algunos estudios señalan la necesidad de la interacción CD40/CD40L para que la célula dendrítica alcance un estado de maduración suficiente para activar linfocitos T (Livingston & Kuhn, 1999, Bennet, et al., 1998). Tomando como señal de activación la producción de IL-12, se ha



reportado que la ligación de CD40 es suficiente para inducir maduración (Cella, et al., 1996).



*Figura C. Maduración de células dendríticas.* Los estados de maduración de este tipo celular son difíciles de definir debido a los numerosos estímulos a los que cada célula puede verse expuesta a lo largo de su ciclo de vida. Una caracterización general de dichos estados se presenta basada principalmente en la expresión de moléculas de superficie celular y capacidad fagocítica. Los factores responsables del proceso de maduración pueden tener diferentes efectos dependiendo de la presencia simultánea de otros factores (GM-CSF, TNF, CD40L y LPS) (modificada de Banchereau, et al, 2000).

Otros investigadores sugieren que esta interacción no es necesaria, especialmente cuando la infección es producida por agentes virales o se administran factores estimulantes de activación como TNFs y LPS entre otros (Ruedl, et al., 1999, Bachmann, et al., 1999, Lu, et al., 2000). Los trabajos recientes de Schulz et al. (2000), parecen indicar la necesidad de un estímulo microbiano, ya sean los productos microbianos mismos (como el LPS) o las señales inflamatorias producidas por los mismos, el cual condicionaría a las células dendríticas para ser susceptibles a una activación total por el ligamiento de CD40, evento que por si mismo no es suficiente para estimular la producción de IL-12 *in vivo* (ver Apéndice I).

#### Biomedicina y células dendríticas.

Las características inmunogénicas de las células dendríticas las señalan como células de interés para la estimulación de la respuesta inmune protectora en inmunoterapia y en vacunación. Sin embargo, este campo de estudio ha sido hasta el momento poco explotado. Considerando su relevancia en la respuesta inmune es necesario conocer más y analizar la biología de las células dendríticas con el propósito de emplearlas en el futuro diseño de nuevas vacunas. Basándose en su capacidad única de estimular fuertes respuestas tipo B y T y de producir IL-12, los usos que se le puede dar son tan variados como la terapia contra los demandantes cuadros clínicos presentados por los tumores, la inducción de tolerancia a alergias y en la auto-inmunidad (Banchereau, et al., 2000). La versatilidad de este tipo celular se manifiesta también en la presentación de péptidos originados por virus no replicativos, bacterias y células apoptóticas. (Steinman & Banchereau, 1999). Existe un número cada vez mayor de estudios sobre el uso terapéutico y preventivo de estos leucocitos (Hartgers, et al., 2000., Ludewig, et al., 2000). La inmunobiología de las células dendríticas es un campo de estudio que seguramente traerá beneficios significativos para el área de la salud en un mediano y largo plazo.

## Objetivos

Estudiar *in vitro* los estados de activación inducidos en células dendríticas murinas por diferentes estímulos:

- a.- Péptidos sintéticos (epítopes protectores contra la cisticercosis)
- b.- Productos bacterianos (LPS)
- c.- Ligamiento de CD40 (anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -CD40)

Caracterizar el estado de activación de las células dendríticas de acuerdo a la producción de IL-12 y la expresión de moléculas MHCII y las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en su superficie.

## Hipótesis

Los estímulos microbianos y de ligación de CD40 inducirán estados de activación en las células dendríticas reflejados en la regulación positiva de moléculas de superficie y la secreción de IL-12.

Los péptidos inducirán estados de activación similares a los inducidos por los productos microbianos.

El estado de activación inducido por los péptidos es susceptible a ser incrementado con el ligamiento de CD40.

## **Materiales y Métodos**

### **Animales.**

Se utilizaron ratones C57BL/6J (B6) y BALB/cAnN de entre 4 y 10 semanas de edad mantenidos en condiciones libres de patógenos en las instalaciones de la "School of Medicine and Dentistry" de la Universidad de Rochester y del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

### **Medio de cultivo.**

Se prepararon suspensiones celulares a partir de médula ósea, mismas que se cultivaron en medio RPMI adicionado con 2mM L-glutamina, 50 $\mu$ M 2-ME, 100 U/ml penicilina y 100 $\mu$ g estreptomina. Se suplementó con 7% de suero fetal bovino (FCS) con o sin 20 ng/ml de IL-4. Para el desarrollo de células dendríticas a partir de progenitores hematopoyéticos se adicionó el medio con 20 ng/ml de GM-CSF. Los cultivos fueron mantenidos a 37C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%.

### **Péptidos.**

Los péptidos fueron sintetizados en fase sólida con N-tert-butiloxycarbonilo derivados de L-aminoácidos en una resina de fenil-acetamidometil. Se determinó una pureza de 90-95% por HPLC en una columna analítica de C18 en fase reversa. Se utilizaron los 3 péptidos empleados en la vacunación contra la cisticercosis porcina (GK1, KETc1 y KETc12) y dos péptidos de tamaño similar a estos como controles (T1 y M1). Se utilizaron diferentes concentraciones de péptido diluido en PBS ó solución salina partiendo de 1 $\mu$ M hasta 10 $\mu$ g/ml en el medio de cultivo.

<b>Péptido</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Peso Molecular</b>
GK1	GYYYPSDPNTFYAPPYS (A)	2,073.0
KETc1	APMSTPSATSVR (G)	1,261.5
KETc12	GNLLLSCL (G)	889.4
T1	KQIINMWQEVGKAMYAPPI (E)	2,346.8
M1	AVERYLKDQQLL (G)	1,532.8

#### Activación.

Se utilizó LPS proveniente de *Escherichia coli* en concentraciones de 100ng/ml en el medio de cultivo. Como ligando de CD40 se utilizó un anticuerpo monoclonal (Pharmingen; clona HM40-3) en una concentración de 5µg/ml. Como control se utilizó un anticuerpo anti-TNP (Pharmingen; clona 49.2) a la misma concentración.

#### Preparación de células dendríticas de médula ósea.

La preparación de las células dendríticas se llevó a cabo de acuerdo al protocolo según Lutz et al. (1999). Se separaron los fémures y las tibias mientras que los restos de músculo fueron retirados manualmente. Los huesos intactos mantenidos en PBS se sumergieron en etanol al 70% por 30 segundos para ser desinfectados y posteriormente se lavaron con medio de cultivo. Ambos extremos de cada hueso se cortaron con tijeras y la médula ósea se extrajo con medio de cultivo usando un jeringa para insulina. La médula se disoció hasta obtener una suspensión celular homogénea de 10 a 15 millones de leucocitos por ratón. A continuación se añadió 10 ml de medio suplementado (suero fetal bovino y GM-CSF) a cajas petri (Falcon No. 1005) donde se cultivaron 2 millones de precursores. Al día 3 de cultivo se añadió 10 ml de medio suplementado y a partir del día 6 y cada tercer día se retiraron 10 ml de medio que fue reemplazado por 10 ml de medio fresco. El plástico de las cajas es importante para el desarrollo del cultivo.

### Análisis citométrico.

Las células fueron marcadas en suspensión en PBS con 2-10% FCS y 0.1% de azida de sodio. El pegado inespecífico se bloqueó con un anticuerpo dirigido a los receptores Fc $\gamma$  (Pharmlngen; clona 2.4G2). Las células muertas fueron seleccionadas negativamente usando tinción de yoduro de propidio. Se utilizaron diferentes anticuerpos contra antígenos murinos acoplados a fluorocromo o biotinilados: anti-CD80/PE (Pharmlngen; clona 16-10A1), anti-CD86/PE (Pharmlngen; clona GL1), anti-H2Kd/FITC (Pharmlngen; clona SF1-1.1) y anti-CD11c/biotin (Pharmlngen; clona HL3). Las muestras fueron leídas en citómetros de flujo *BD* del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y de la “School of Medicine and Dentistry” de la Universidad de Rochester.

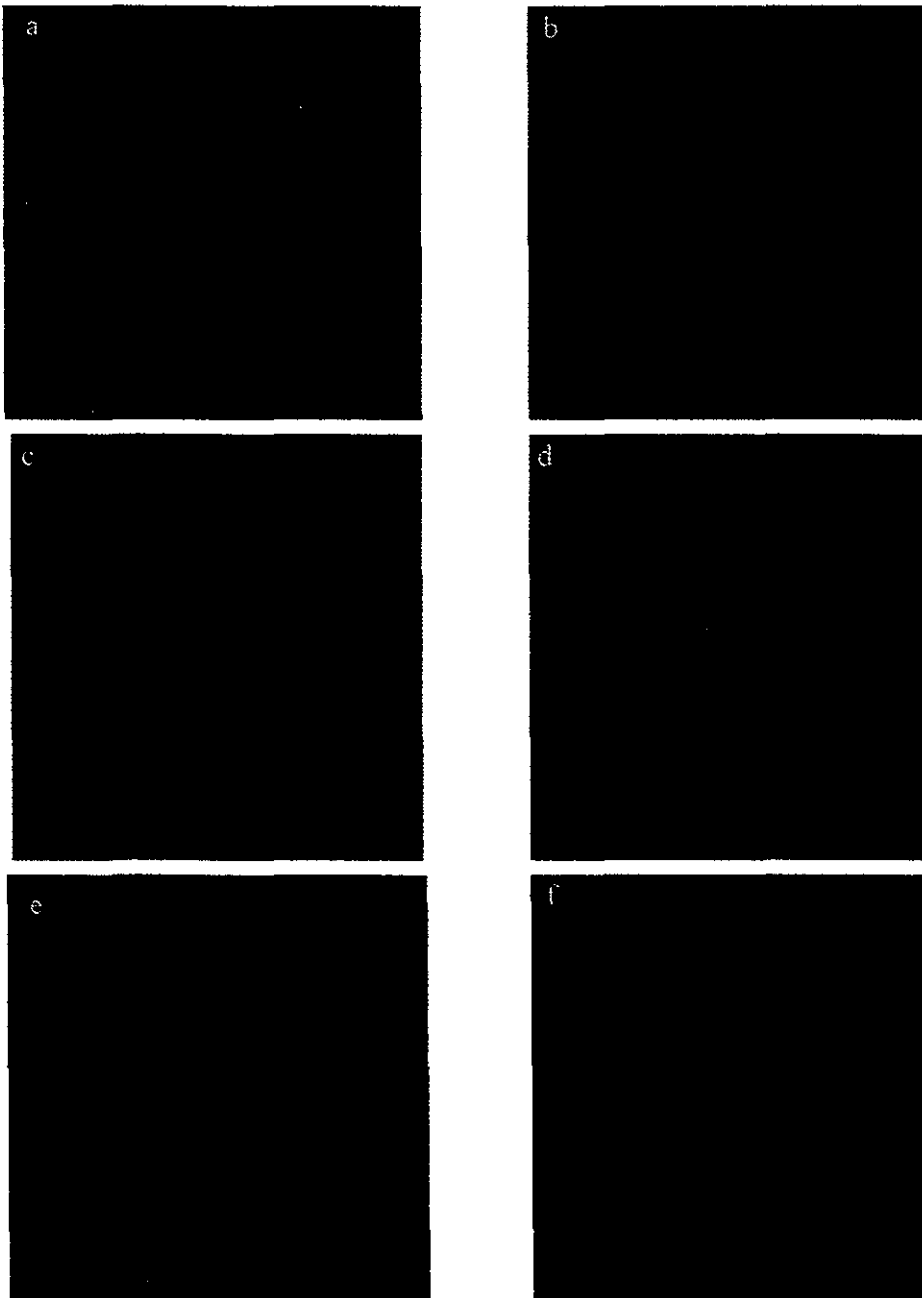
### Microscopía.

Los cultivos celulares en diferentes etapas de desarrollo y/o activación fueron observados en campo claro y fotografiados digitalmente con un microscopio invertido con objetivos de 20x y 40x. Se incubaron muestras de células control y activadas con LPS o anti-CD40 por 20 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-CD86 (Pharmlngen; clona GL1) acoplado a ficoeritrina en una dilución de 1:50 en PBS. Las muestras fueron observadas y fotografiadas digitalmente con un microscopio de fluorescencia usando objetivos de 20x y 40x.

### Medición de IL-12 (p70) en sobrenadantes.

Los niveles de IL-12 en los sobrenadantes de células incubadas con diferentes estímulos fueron medidos por el método de ELISA. Se usó un anticuerpo  $\alpha$ -IL-12(p70) purificado (Pharmlngen; clona 9A5) para la captura y un anticuerpo  $\alpha$ -IL-12 (p40/p70) biotinilado (Pharmlngen; clona C17.8) como detector. TMB fue utilizado como sustrato para el conjugado estreptavidina-peroxidasa (ver Apéndice I).

## Resultados



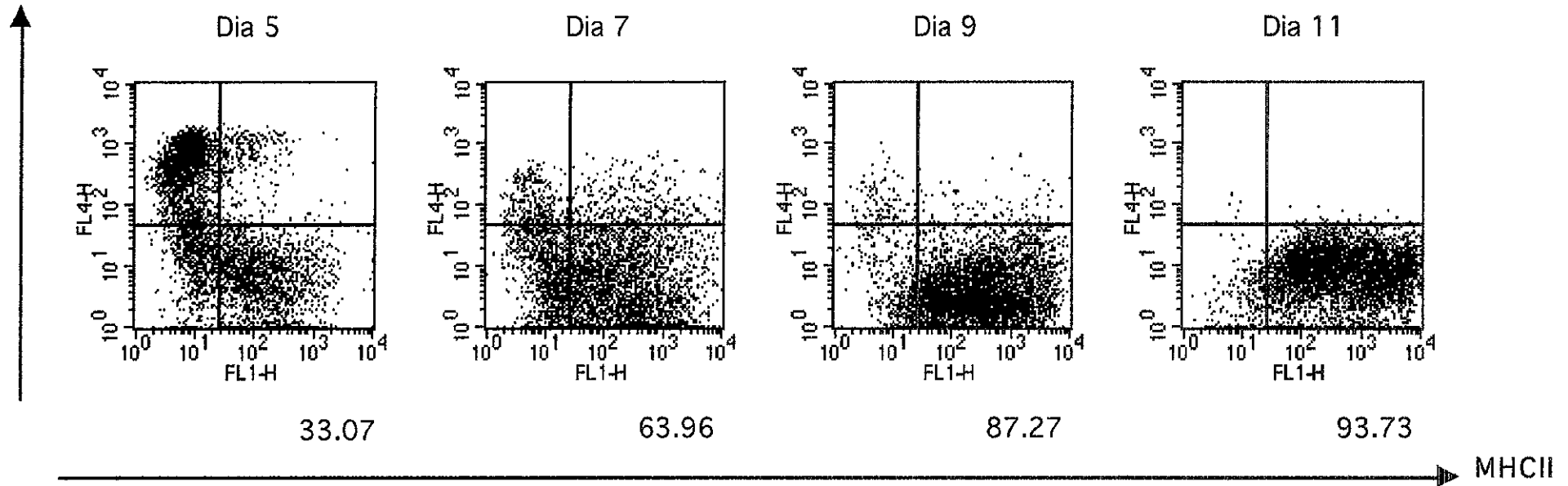
*Figura 1. Marcador CD86 en células dendríticas.* Las células dendríticas en diferentes estados de activación fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD86 acoplado al fluorocromo ficoeritrina (PE) (ver Apéndice III). Las poblaciones celulares fueron incubadas con medio (a y b), 100 ng/ml de LPS (c y d) ó 5  $\mu$ g/ml de  $\alpha$ -CD40 (e y f) por 24 hrs. Las dendritas características de este tipo celular son difíciles de conservar al ser sometidas a procesos de fijación y centrifugación.

**La población MHCII positiva se enriquece al paso del tiempo.** En nuestro cultivo de médula ósea murina (**fig. 2**), la población MHC II positiva se enriquece al paso del tiempo hasta alcanzar más del 85% después del día 9. Un alto número de células en ésta población muestra niveles elevados de MHCII en la superficie a partir del día 9 de cultivo. Por otro lado, la población de granulocitos comienza a disminuir por sí sola de manera significativa al día 7; la disminución continúa hacia el día 9 y la población prácticamente desaparece al día 11.

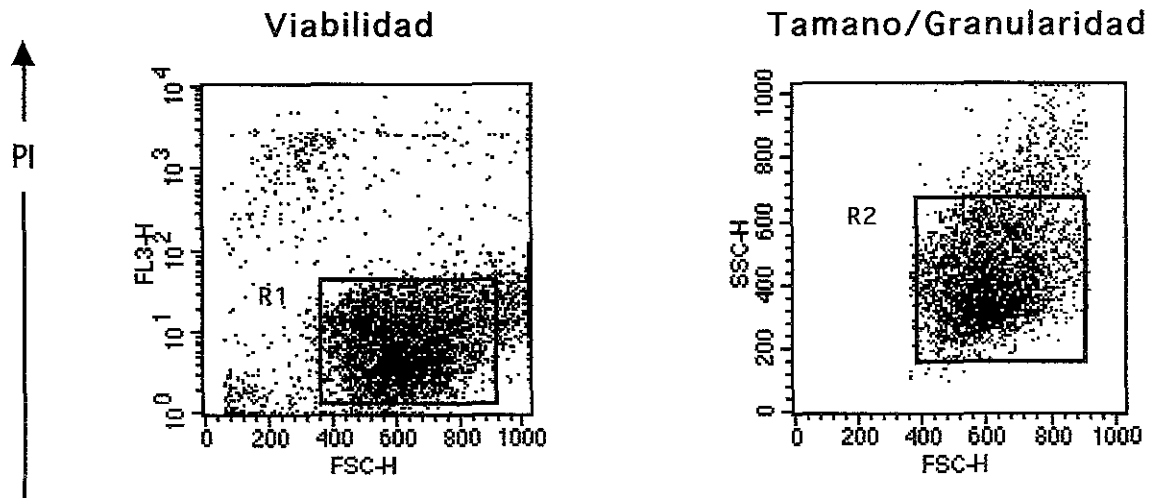
La población seleccionada con los criterios de viabilidad, tamaño y granularidad mostrados (**fig. 3**) resulta ser positiva casi en su totalidad para el marcador CD11c. Esta población es negativa para los marcadores CD4 y CD8 (**fig. 4**) aún en estado de activación por LPS.



Gr-1

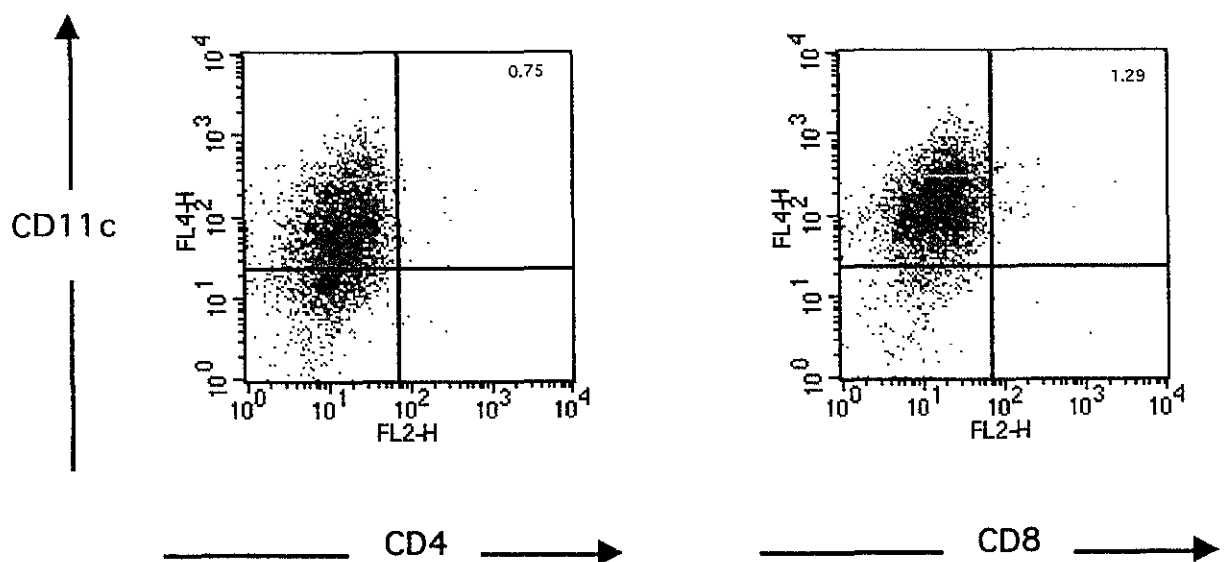


*Figura 2. Células dendríticas y granulocitos.* Análisis de la población celular obtenida a partir del cultivo de médula ósea proveniente de ratones BALB/cAnN y C57B1/6J en presencia de GM-CSF. Muestras provenientes de diferentes días de cultivo fueron analizadas por citometría de flujo. Después de seleccionar a la población celular viable (negativa para el yoduro de propidio, fig. 7), se identificaron poblaciones de células expresando un marcador de poblaciones granulocíticas (Gr-1) y de células con expresión de moléculas MHCII.



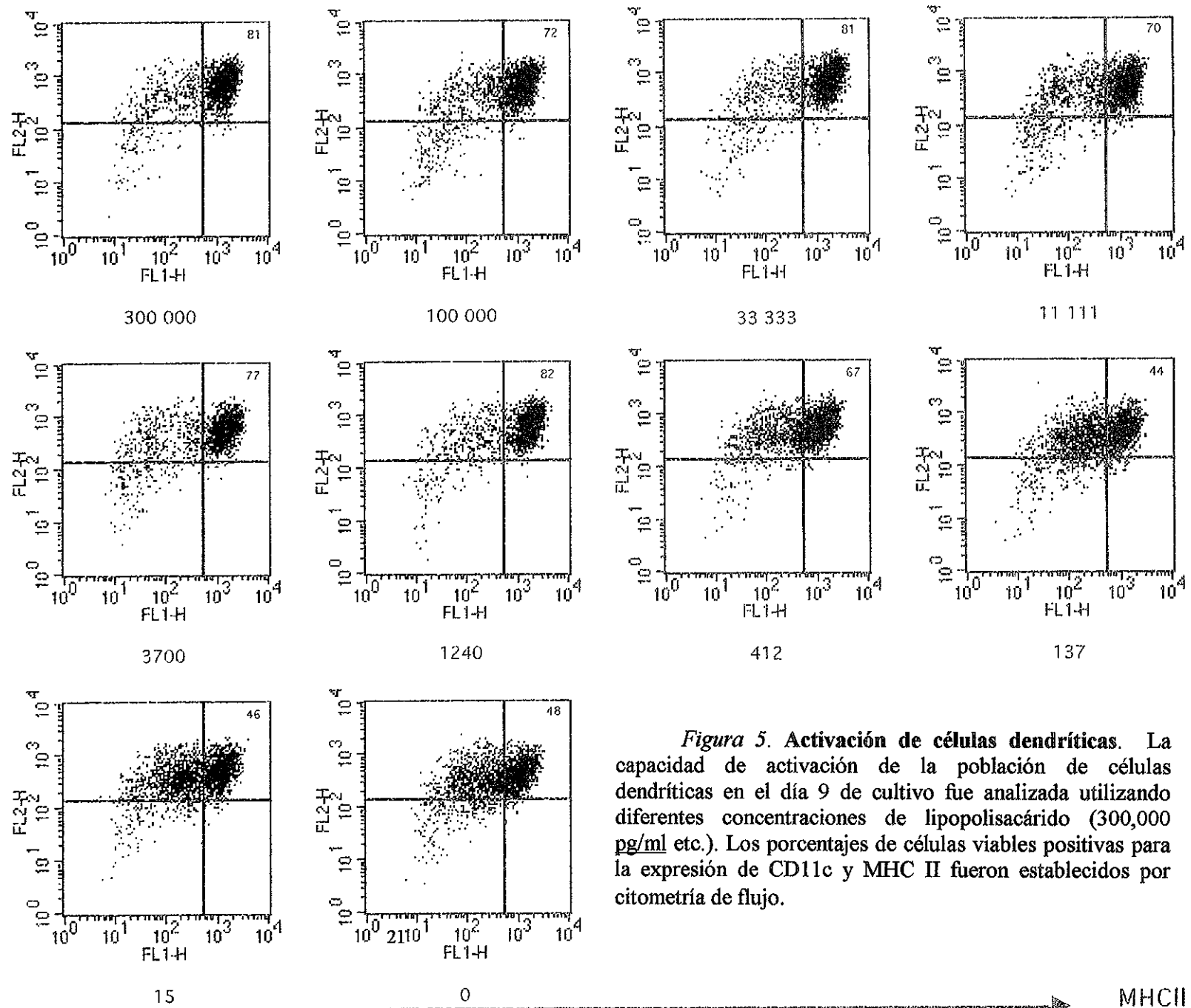
**Figura 3. Selección poblacional.** Las células del día 7 de cultivo fueron incubadas en presencia de PI (ioduro de propidio). La población celular con bajo contenido de PI (FL3H), con tamaño de escalas 400-900 (FSC-H) y una granularidad de entre 200 y 700 (SSC-H) fue seleccionada para todo análisis posterior (población en verde).

**Figura 4. Población de células dendríticas y expresión de CD4 y CD8.** Dada la composición mixta del cultivo (principalmente macrófagos y células dendríticas), se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador CD11c, utilizado ampliamente para reconocer poblaciones de células dendríticas murinas. Al mismo tiempo, se midió la expresión de CD4 y CD8 en la población total viable.



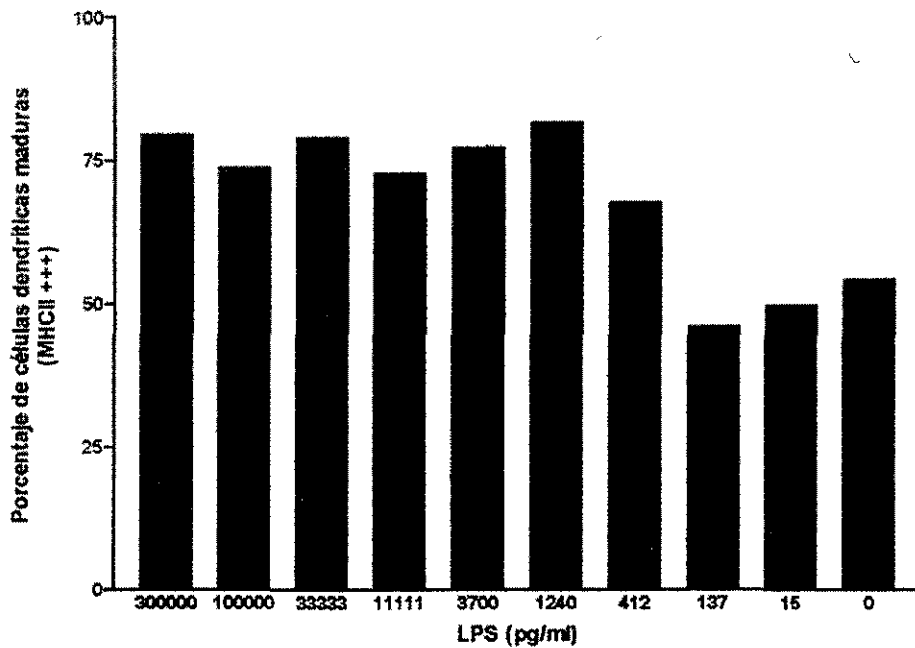
**Concentraciones bajas de LPS estimulan la maduración.** Se incubaron 1 millón de células por mililitro con diferentes cantidades de lipopolisacárido (LPS) durante 24 hrs. Los niveles de activación fueron determinados por la expresión de MHC II en la superficie de las células (**figs. 5 y 6**) y la secreción de IL-12 (**fig. 7**). Los niveles de IL-12 fueron medidos en los sobrenadantes por ELISA. Concentraciones bajas de LPS (~ 4ng/ml) demostraron ser suficientes para inducir una alta expresión de MHCII y la secreción de IL-12. Los estados de activación parecen alcanzar un límite máximo rápidamente el cual no puede ser incrementado aún con concentraciones de LPS varios órdenes de magnitud superiores. De manera llamativa, una concentración de LPS de 412 pg/ml es suficiente para inducir la expresión superficial de MHCII, sin embargo, los niveles de secreción de IL-12 son muy bajos.

CD11c

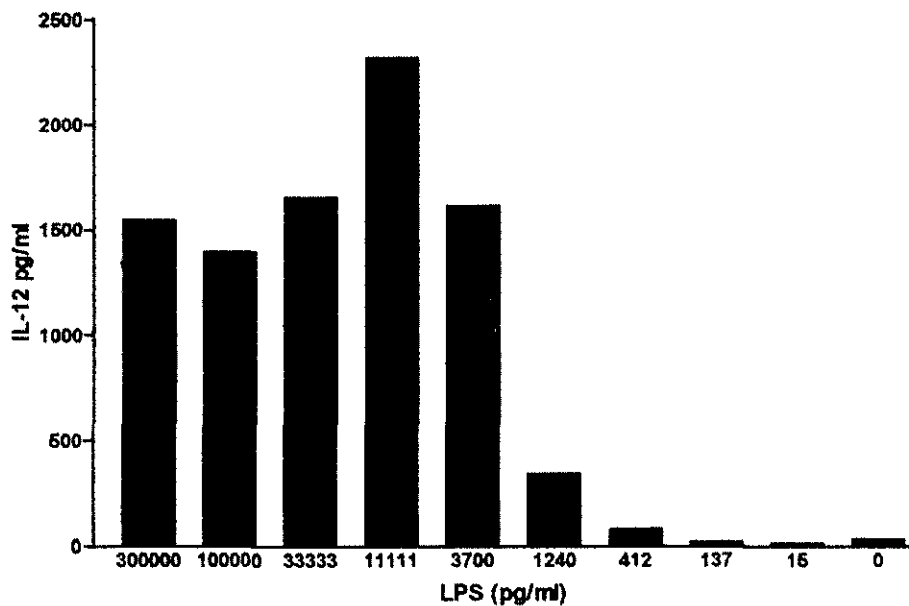


**Figura 5. Activación de células dendríticas.** La capacidad de activación de la población de células dendríticas en el día 9 de cultivo fue analizada utilizando diferentes concentraciones de lipopolisacárido (300,000 pg/ml etc.). Los porcentajes de células viables positivas para la expresión de CD11c y MHC II fueron establecidos por citometría de flujo.

MHCII

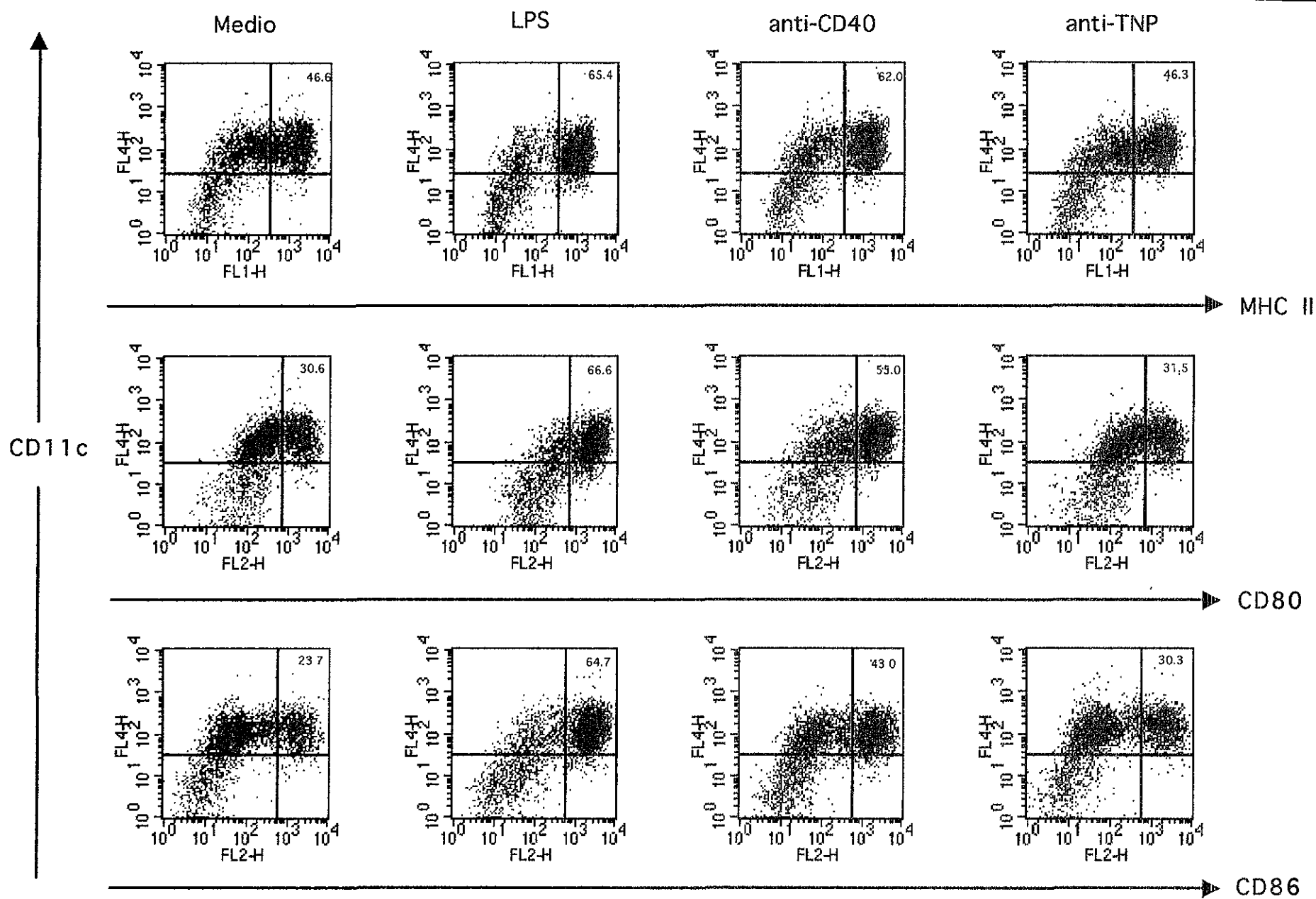


**Figura 6. Porcentajes de maduración (MHCII ++)** en poblaciones de células dendríticas incubadas en presencia de diferentes concentraciones de LPS.

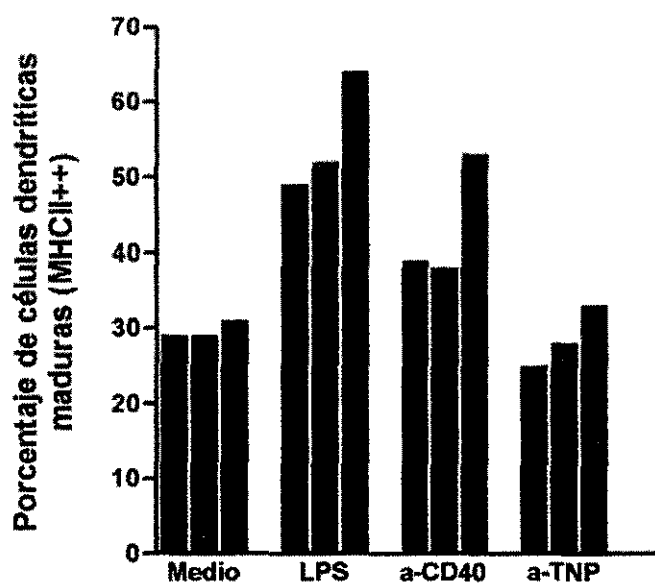


**Figura 7. Secreción de IL-12** en poblaciones de células dendríticas incubadas en presencia de diferentes concentraciones de LPS.

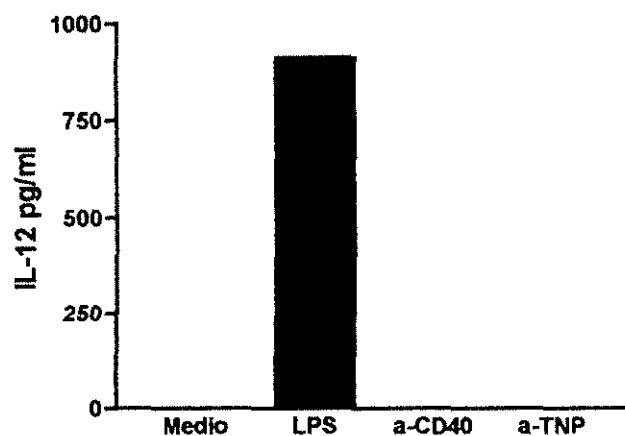
**LPS y un anticuerpo anti-CD40 inducen por separado la expresión superficial de MHCII, CD80 y CD86.** Células en cultivo (día 6) fueron incubadas por 24 hrs en presencia de LPS (100ng/ml) y anti-CD40 (5µg/ml). Como controles negativos se utilizó medio de cultivo y un anticuerpo anti-TNP (5µg/ml). Se analizaron las poblaciones de células viables por citometría de flujo para medir la expresión en la superficie de las moléculas MHC II, CD80 y CD86 . Los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para medir los niveles de IL-12. En la **figura 8** se muestran los datos de un experimento representativo de 3. EL porcentaje de células activadas con respecto a la expresión de MHC II, CD80 y CD86 en la superficie es visiblemente mayor en las poblaciones incubadas con LPS y el anticuerpo anti-CD40 (**fig. 9**). Sin embargo, en contraste con las células estimuladas con LPS, la secreción de IL-12 fue nula en la población en las que CD40 fue ligado (**fig. 10**). La ausencia de IL-12 en los sobrenadantes de células incubadas únicamente con anti-CD40 fue una constante en nuestros experimentos.



**Figura 8. Activación (moléculas de superficie) de células dendríticas con un anticuerpo monoclonal anti-CD40.**



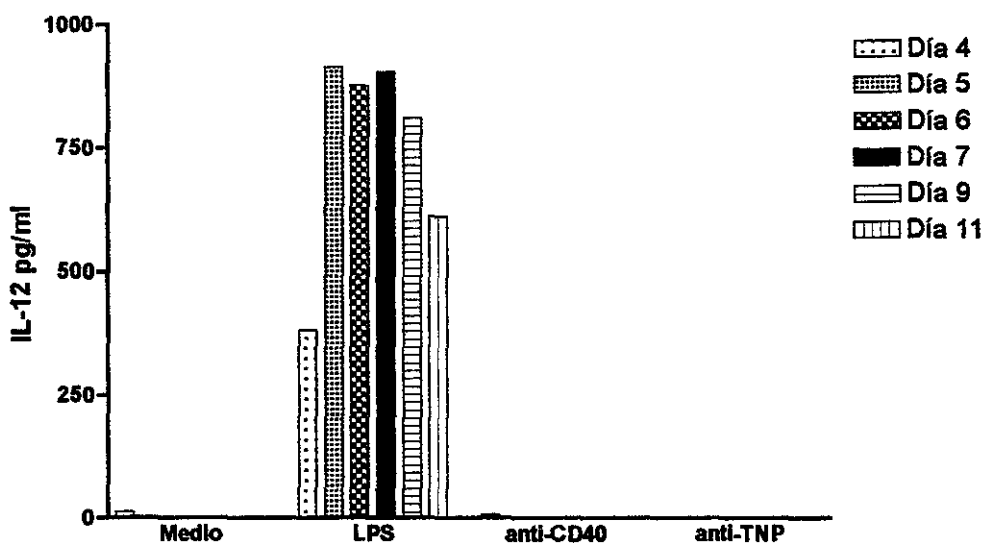
*Figura 9.* Porcentajes de maduración (MHCII++) de células dendríticas incubadas con diferentes estímulos por 24 horas en 3 experimentos distintos.



*Figura 10.* Secreción de IL-12 en cultivos de células dendríticas incubadas con diferentes estímulos por 24 horas.

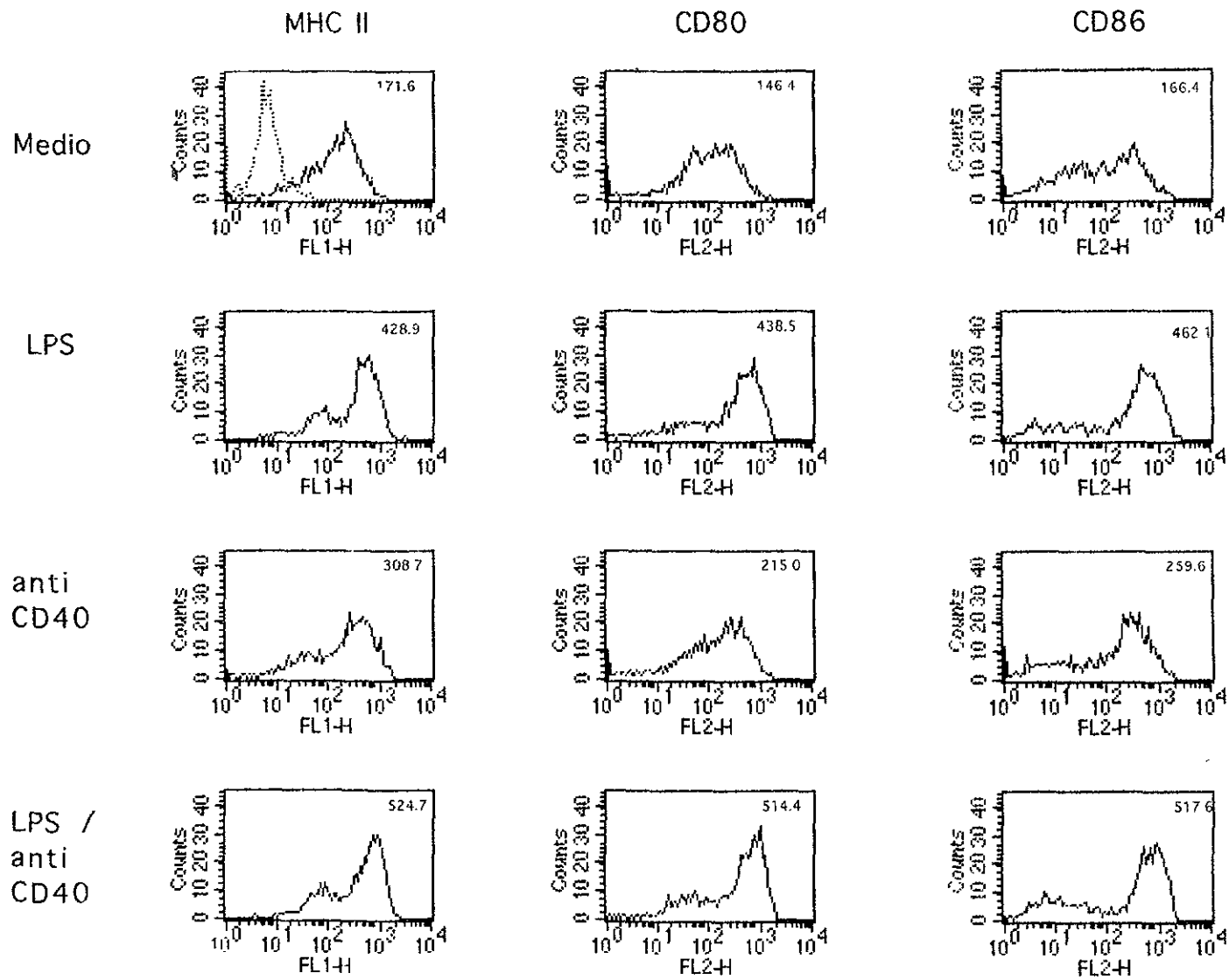


**La secreción de IL-12 se mantiene constante a partir del día 5 de cultivo.** La producción de IL-12 por células incubadas con LPS se mantiene constante a partir del día 5 de cultivo (y se reduce al día 11) mientras que las poblaciones de células incubadas con anti-CD40 permanecen sin producir la interleucina durante los diferentes días de cultivo (**fig. 11**).

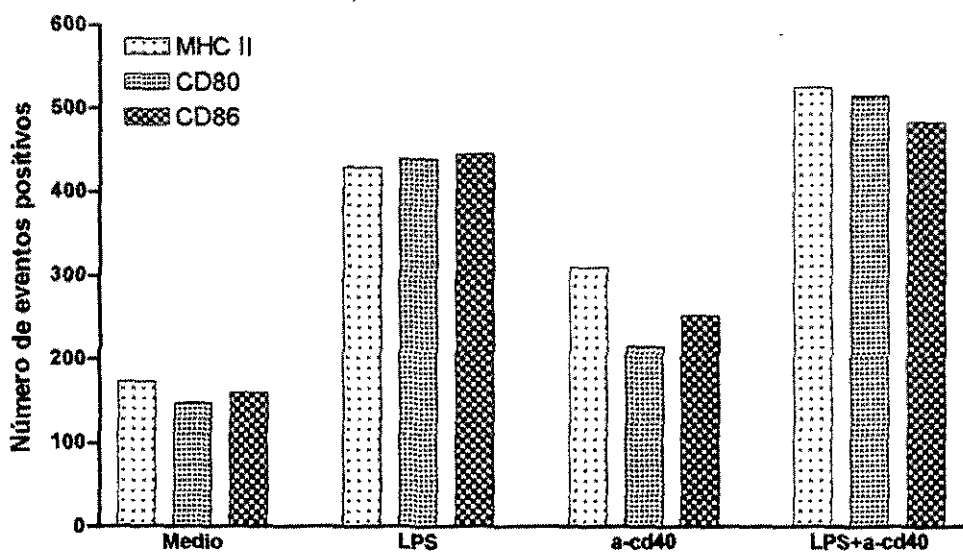


*Figura 11. Producción de IL-12 en diferentes días de cultivo.* Células en diferentes días de cultivo fueron incubadas durante 24 hrs en presencia de LPS, anti-CD40 y sus controles. Los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para determinar los niveles de IL-12.

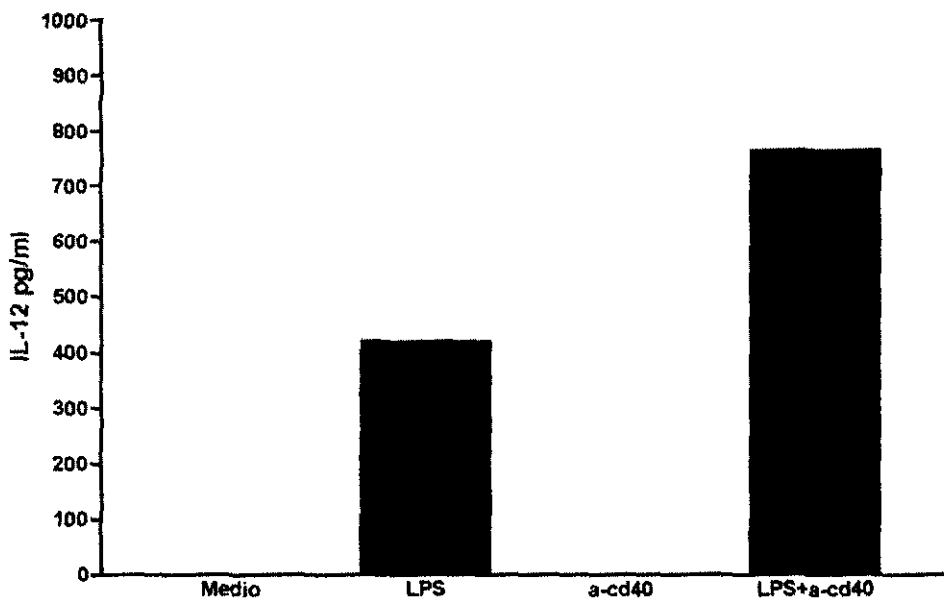
**La ligación de CD40 potencia la activación por LPS.** Con la finalidad de evaluar los niveles de activación inducidos por ambos estímulos, se procedió a incubar células dendríticas en el día 6 de cultivo en presencia de LPS y del anticuerpo anti-CD40 de manera simultánea. La expresión de las moléculas de superficie MHC II, CD80 y CD86 fue medida en células viables por citometría de flujo (**fig. 12**) y se obtuvieron las intensidades media de fluorescencia (**fig. 13**). La secreción de IL-12 fue medida en los sobrenadantes por ELISA (**fig. 14**). La expresión de moléculas de superficie en las células incubadas con LPS es invariablemente superior a la observada en células estimuladas con anti-CD40. Sin embargo, los estímulos pueden sumarse para lograr un estado de activación superior tanto en la producción de IL-12 (casi del doble cuando ambos estímulos se encuentran presentes) como en la expresión de MHCII, CD80 y CD86.



**Figura 12. Activación de células dendríticas incubadas con LPS y a-CD40.**

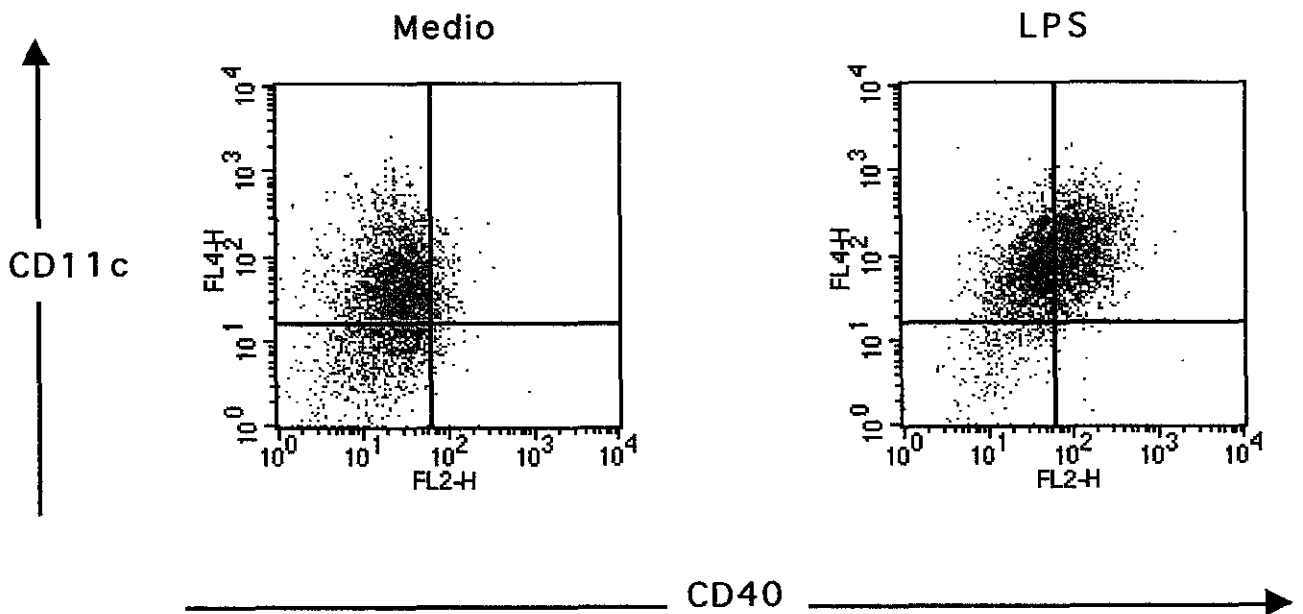


**Figura 13. Activación (moléculas de superficie) de células dendríticas incubadas por 24 horas con diferentes estímulos.**



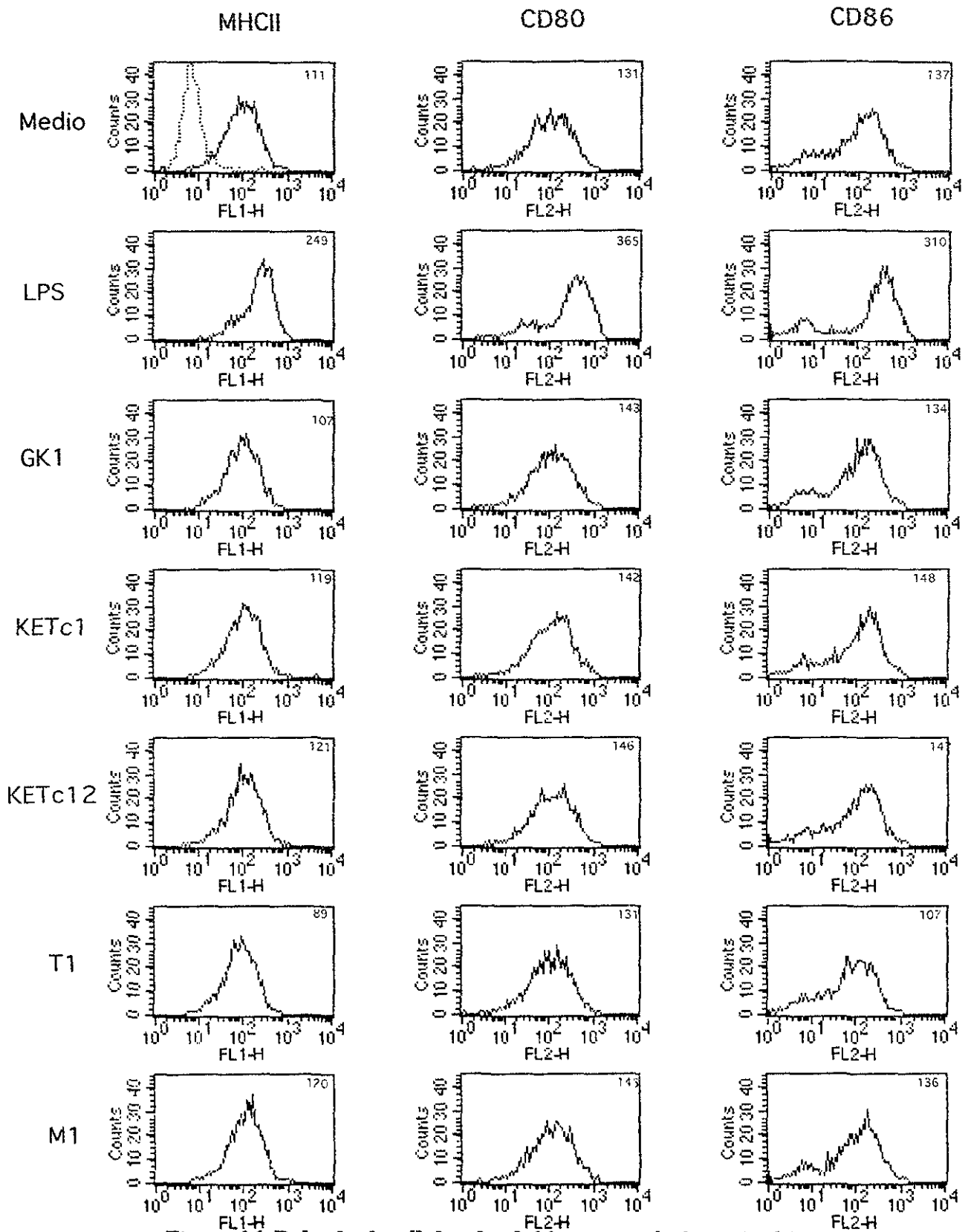
**Figura 14. Secreción de IL-12 en células dendríticas incubadas por 24 horas con diferentes estímulos.**

**La estimulación con LPS regula positivamente la expresión de CD40 en la superficie.** Aún cuando la expresión de CD40 en la superficie es una constante en las células dendríticas, la presencia de este marcador aumenta de manera significativa cuando la célula recibe un estímulo microbiano, en este caso LPS (**fig. 15**)

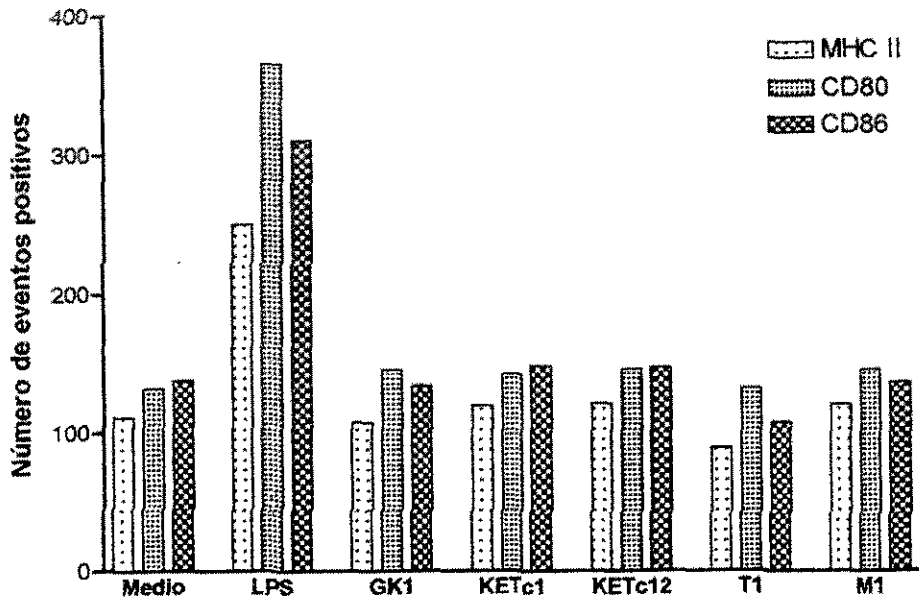


*Figura 15. Expresión de CD40 en la superficie de células dendríticas.* Células en el día 6 de cultivo fueron incubadas por 24 hrs en presencia de LPS. La expresión de CD40 y el marcador CD11c fueron medidas por citometría de flujo. La población viable positiva para el marcador CD11c muestra un claro aumento en la expresión de CD40 después de la incubación con LPS.

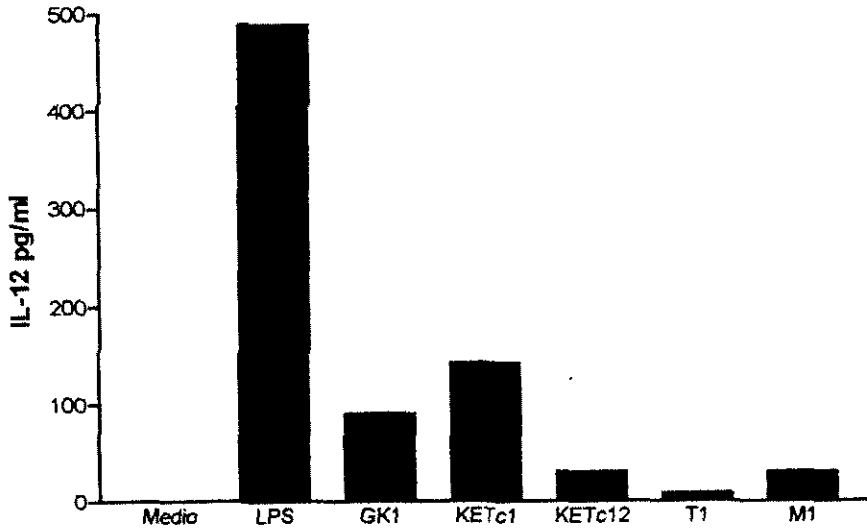
**La producción de IL-12 puede ser estimulada por péptidos.** En concentraciones de 10 $\mu$ M, los péptidos fueron incubados con un millón de células durante 24 horas. Las células fueron analizadas en el citómetro para medir la expresión en la superficie de las moléculas MHC II, CD80 y CD86 (**fig. 16**). Los sobrenadantes fueron recolectados para la medición de IL-12 por ELISA (**fig. 18**). Todos los péptidos usados demostraron no inducir niveles de expresión de moléculas de superficie significativamente mayores a los existentes en células incubadas solo en medio de cultivo (**fig. 17**). Los péptidos GK1 y KETc1 estimularon niveles bajos de secreción de IL-12 mientras que los niveles observados en los sobrenadantes de las poblaciones incubadas con los péptidos restantes se encuentran dentro del límite de detección de la ELISA.



**Figura 16. Pulsado de células dendríticas con péptidos sintéticos.**



**Figura 17. Activación (moléculas de superficie) de células dendríticas incubadas con péptidos por 24 horas.**

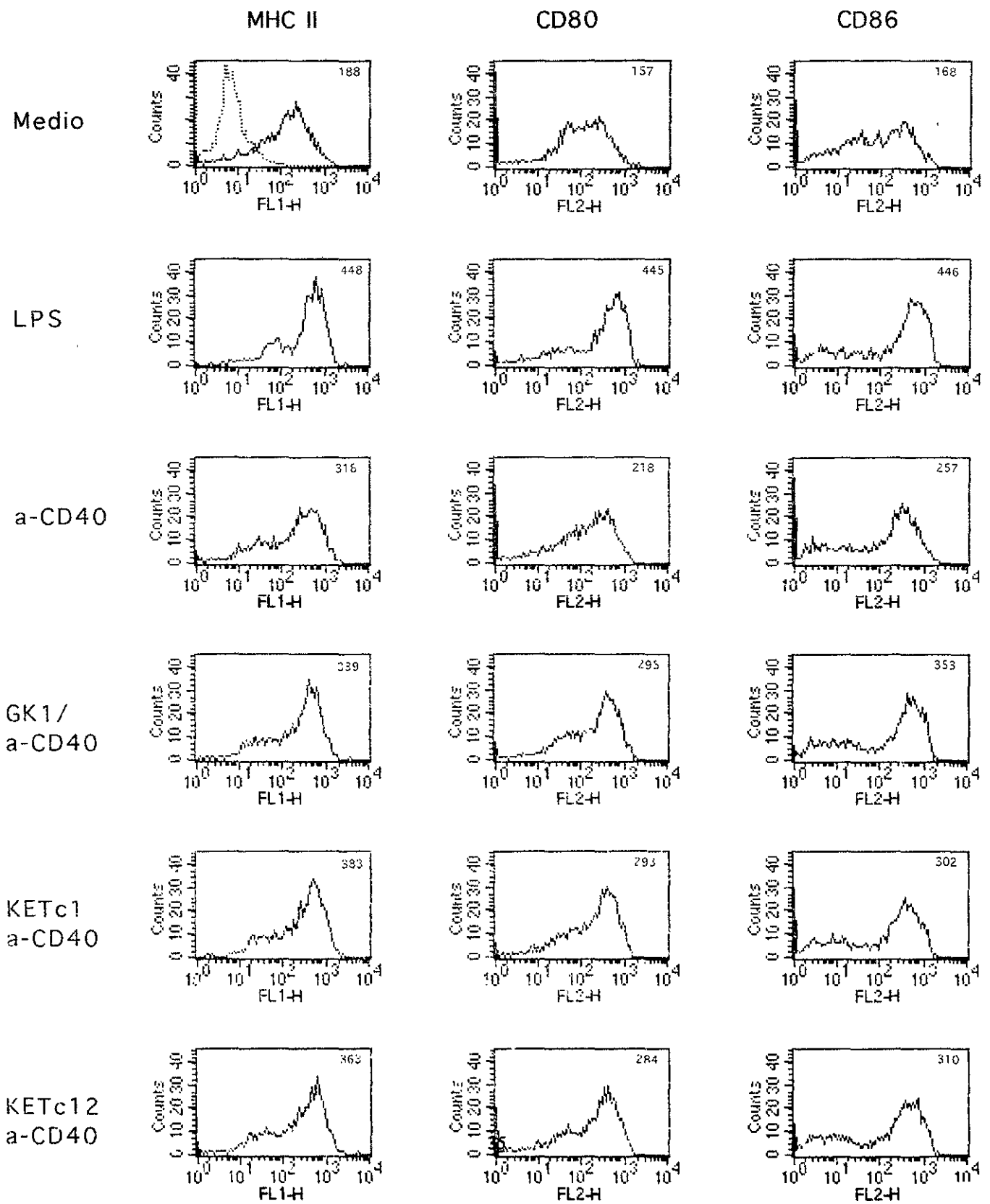


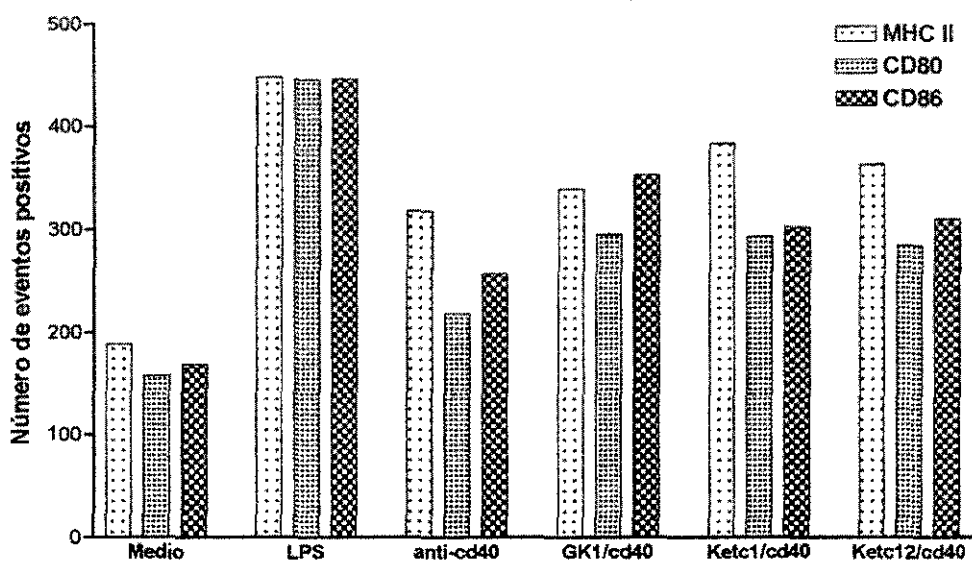
**Figura 18. Secreción de IL-12 en cultivos de células dendríticas incubadas con péptidos por 24 horas.**



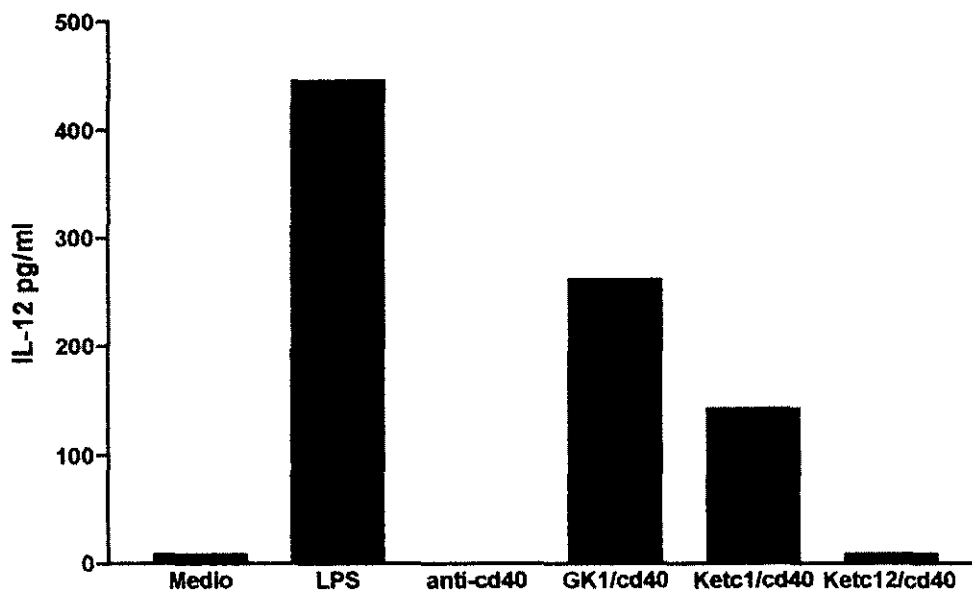
**La ligación de CD40 potencia la activación inducida por péptidos.** Con la finalidad de evaluar los niveles de activación inducidos por los péptidos en presencia del ligando de CD40, se tomaron células dendríticas en el día 6 de cultivo y se incubaron por 24hrs. con los péptidos y el anticuerpo anti-CD40 de manera simultánea. Se analizó por citometría la expresión en la superficie celular de MHC II, CD80 y CD86 (**fig. 19**). Los sobrenadantes fueron recuperados para la medición de IL-12 por ELISA. Se puede observar un ligero incremento general en la expresión de la moléculas de superficie en las muestras incubadas con los tres péptidos y el anticuerpo (**fig. 20**). Sobresalen los niveles de MHCII en la muestra KETc1/a-CD40 y los niveles de CD86 en la muestra GK1/a-CD40. De la misma manera, la producción de IL-12 (**fig. 21**) en muestras incubadas con estos péptidos se eleva (de manera considerable en la población estimulada por GK1/a-CD40).

**Figura 19. Pulsado de células dendríticas con péptidos sintéticos y  $\alpha$ -CD40.**

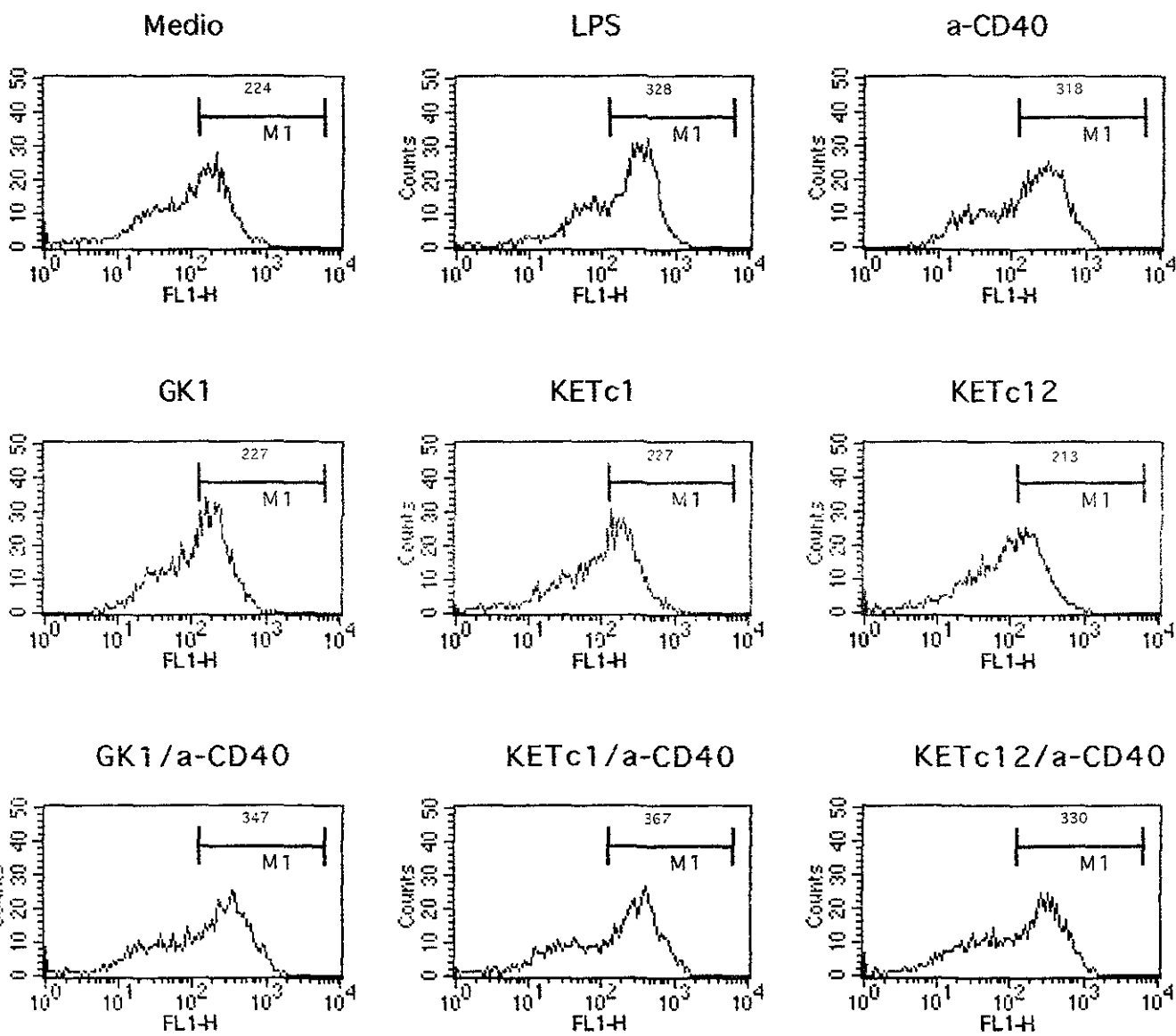




**Figura 20. Activación (moléculas de superficie) de células dendríticas incubadas por 24 horas en presencia de péptidos y a-CD40.**

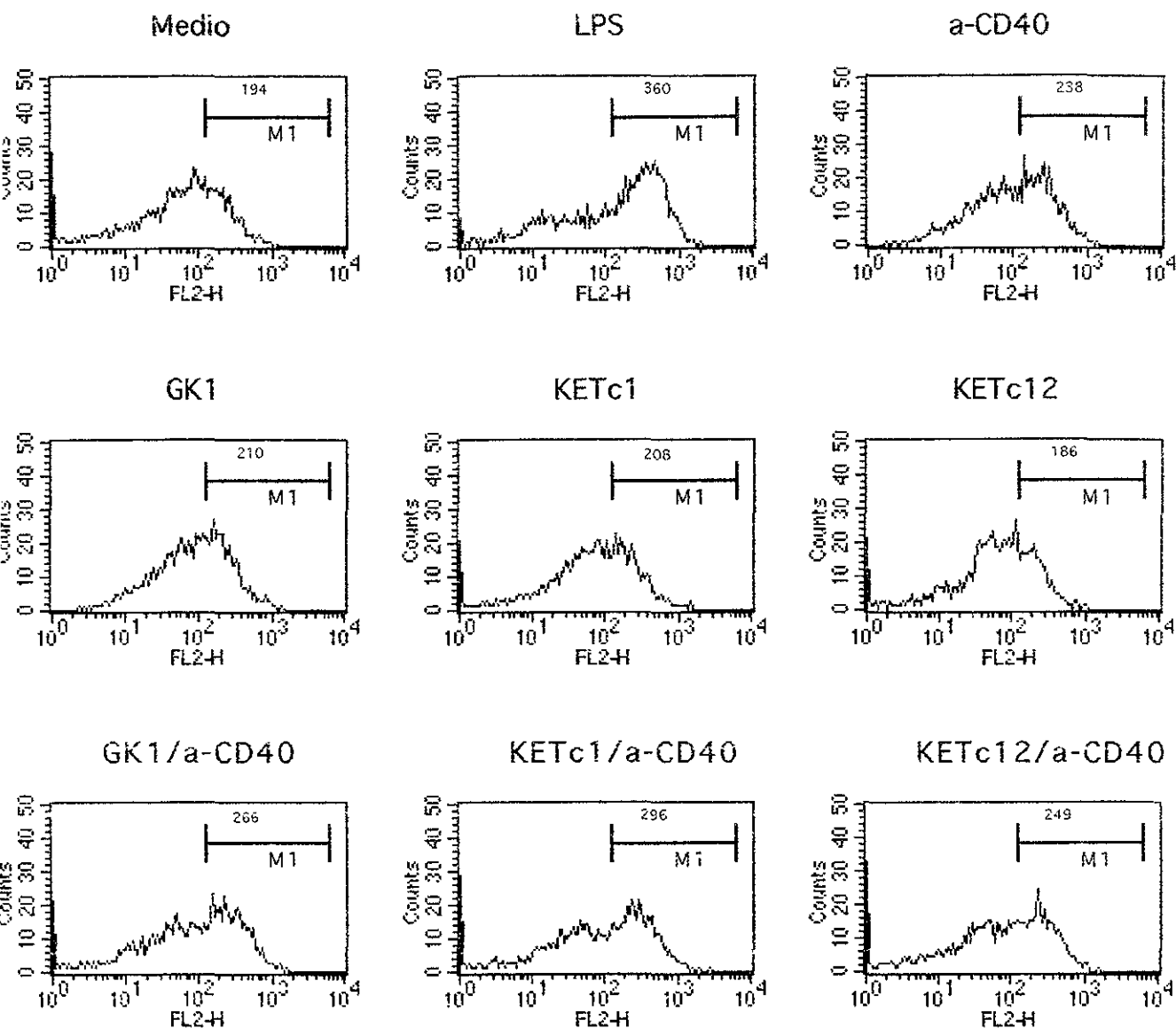


**Figura 21. Secreción de IL-12 en cultivos de células dendríticas incubadas por 24 horas en presencia de péptidos y a-CD40**



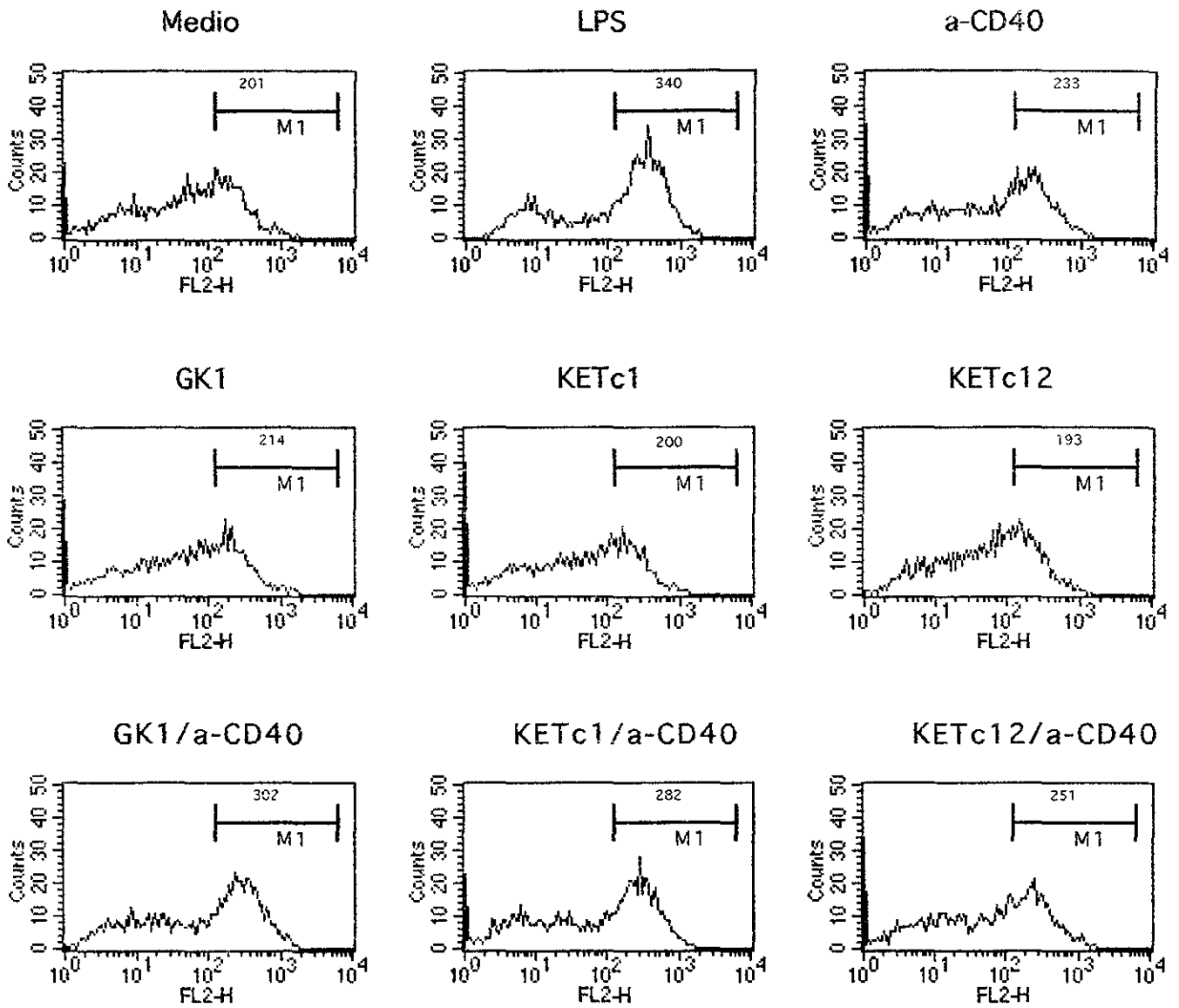
**Figura 22. Análisis de fluorescencia de poblaciones de células dendríticas (MHC II).**

**Las células activadas responden mejor al estímulo péptido/anti-CD40.** Los datos ya obtenidos en el experimento de incubación de péptidos+anti-CD40 fueron analizados separando dos subpoblaciones en función de su estado de activación (definido por la expresión de moléculas de superficie). La población de células dendríticas en cultivo muestra un cierto nivel de activación basal estimulado por la presencia de GM-CSF en el medio de cultivo. El análisis individual de las poblaciones de células bajo diferentes



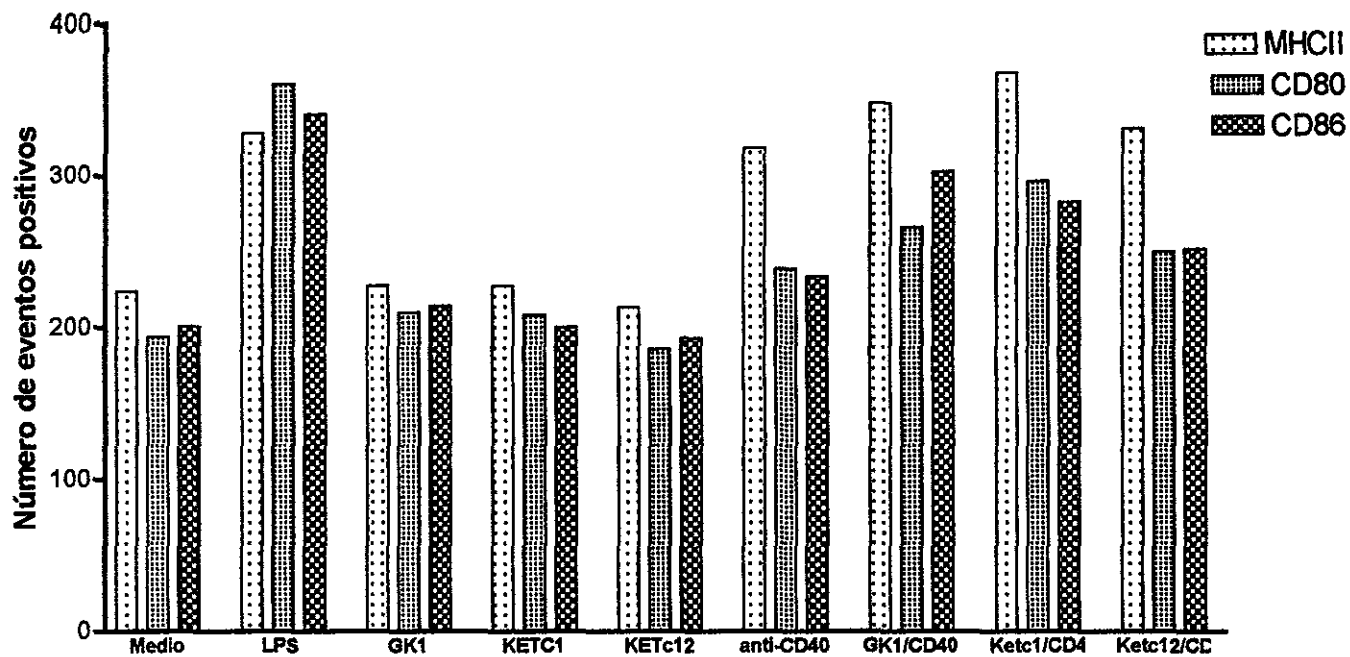
**Figura 23. Análisis de fluorescencia de poblaciones de células dendríticas (CD80).**

estímulos muestra que la subpoblación de células ya activadas o en vías de activación son más susceptibles de ser estimuladas por las combinaciones GK1/a-CD40 y KETc1/a-CD40. Las intensidades de fluorescencia media fueron medidas para la subpoblación de células activadas (marcador M1). El análisis de fluorescencia de cada una de las moléculas de superficie estudiadas (figs. 22, 23 y 24) muestra una vez más que los



**Figura 24. Análisis de fluorescencia de poblaciones de células dendríticas (CD86).**

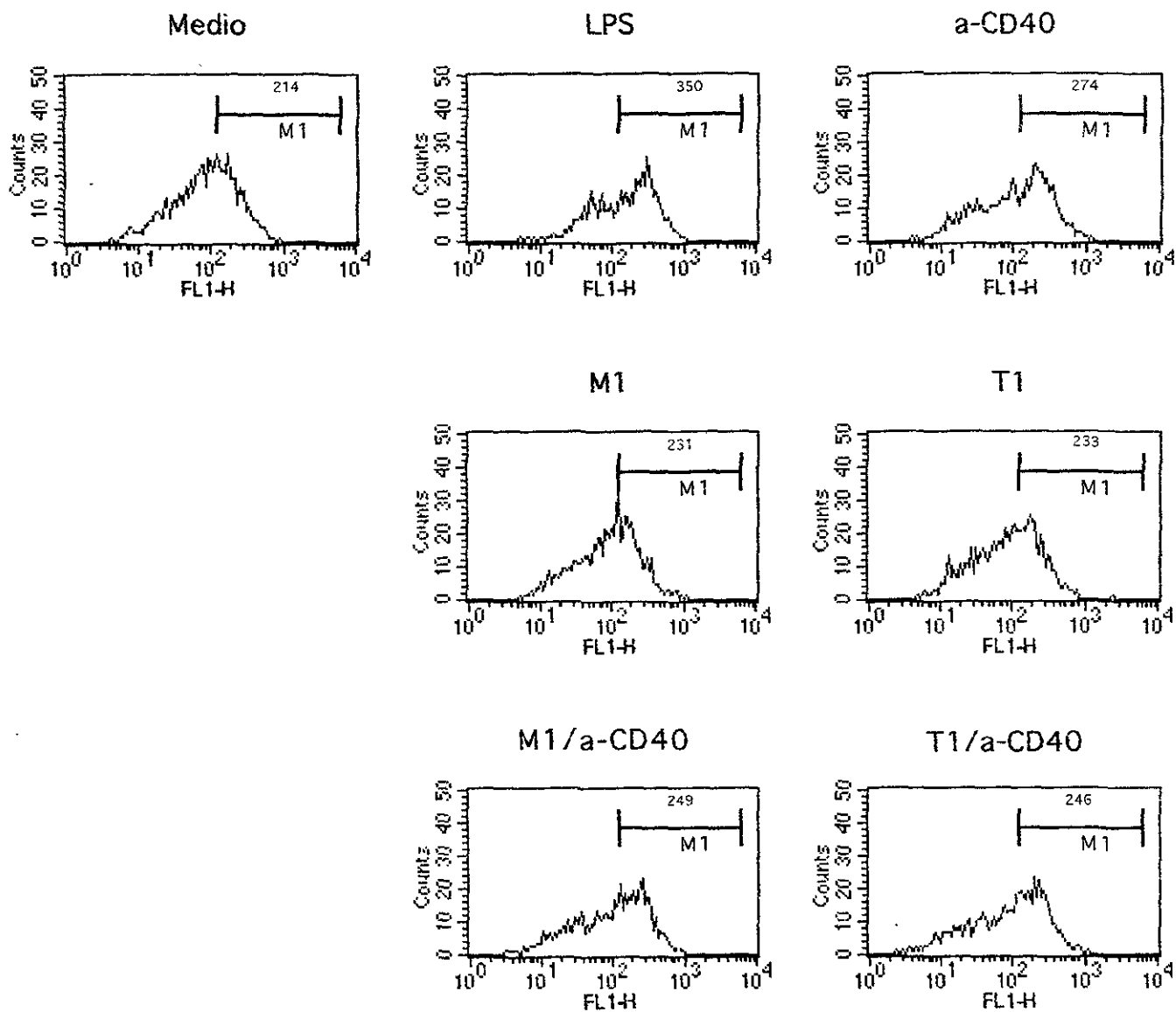
péptidos por sí solos son incapaces de regular positivamente la expresión de moléculas de superficie de manera apreciable. Por otro lado, las combinaciones GK1/a-CD40 y KETc1/a-CD40 muestran un incremento apreciable de fluorescencia en la superficie con respecto a las células incubadas únicamente con a-CD40 (fig 25), inclusive superando los niveles de activación observados en las células estimuladas con 100 ng/ml de LPS.



*Figura 25. Análisis de fluorescencia de poblaciones de células dendríticas incubadas por 24 horas con péptido y  $\alpha$ -CD40.*

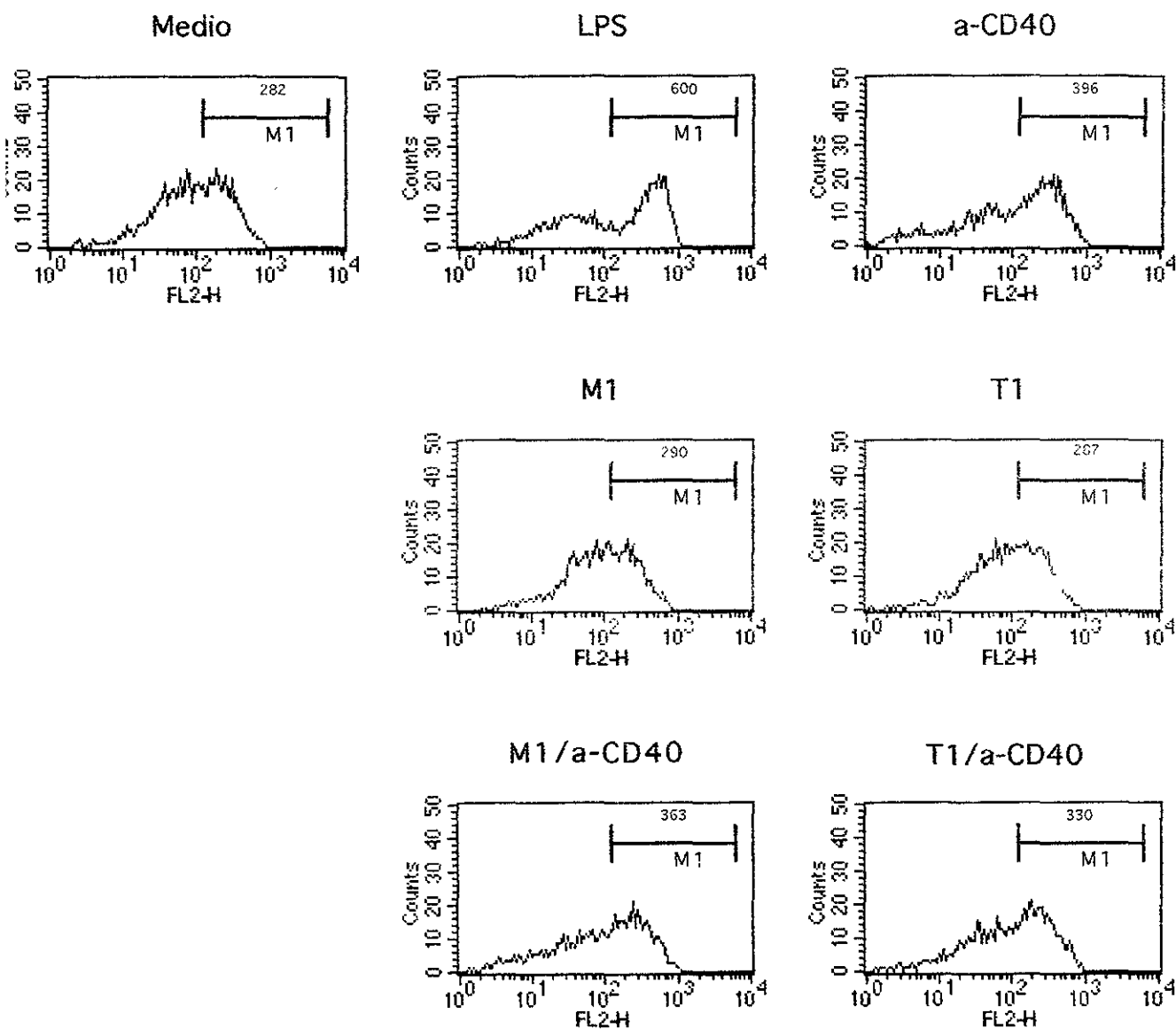
**Los péptidos control no estimulan la expresión superficial de moléculas co-estimuladoras.** Las células dendríticas incubadas con péptidos control y CD40 durante 24 horas no muestran un aumento en la expresión de las moléculas MHCII (**fig. 26**), CD80 (**fig. 27**) y CD86 (**fig. 28**) en comparación con las células incubadas únicamente con a-CD40.





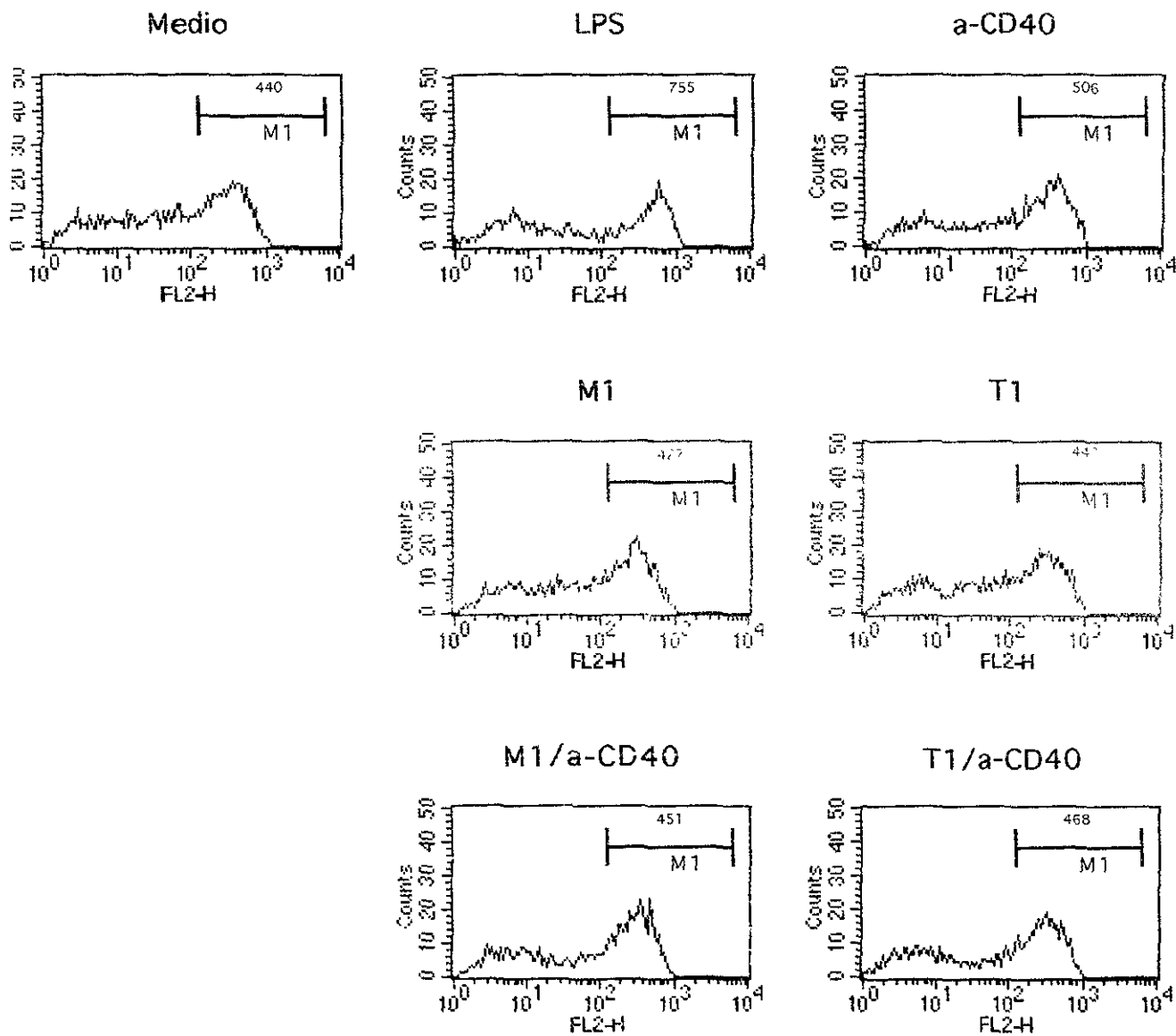
**Figura 26. Análisis de fluorescencia en péptidos control (MHC II)**

Los péptidos control (T1 Y M1) son incapaces de estimular la expresión de moléculas de superficie aún en presencia de a-CD40. . Células dendríticas en el día 6 de cultivo fueron incubadas por 24hrs. con los péptidos control y el anticuerpo anti-CD40 de manera simultánea. Se analizó por citometría la expresión en la superficie celular de MHC II, CD80 y CD86 (figs. 26, 27 y 28). Los sobrenadantes fueron recuperados para la



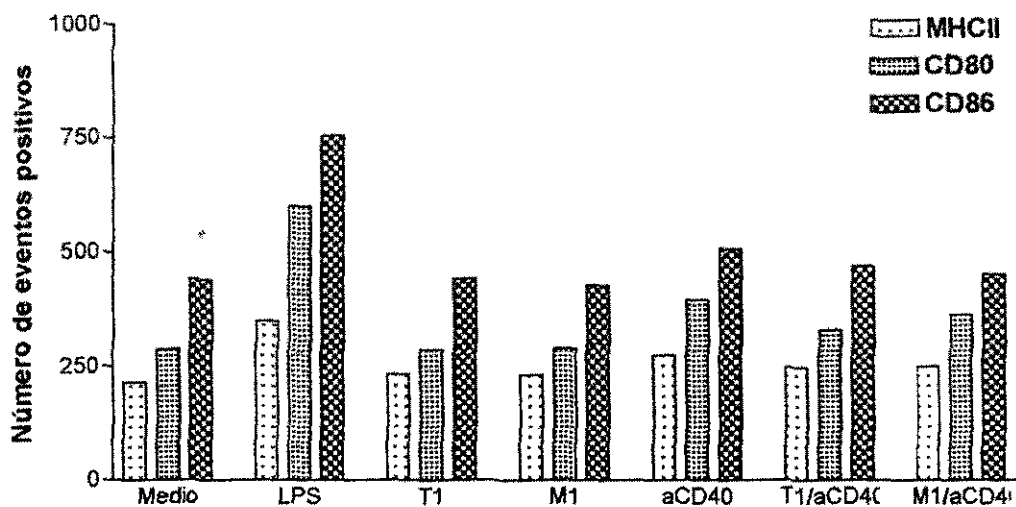
**Figura 27. Análisis de fluorescencia en péptidos control (CD80)**

medición de IL-12 por ELISA (**fig. 30**). Las intensidades de fluorescencia media fueron medidas para la subpoblación de células activadas (marcador M1). Las combinaciones péptido/a-CD40 no estimulan de manera apreciable la expresión superficial de las moléculas estudiadas (**fig. 29**). Sin embargo, aún cuando en niveles muy bajos, la

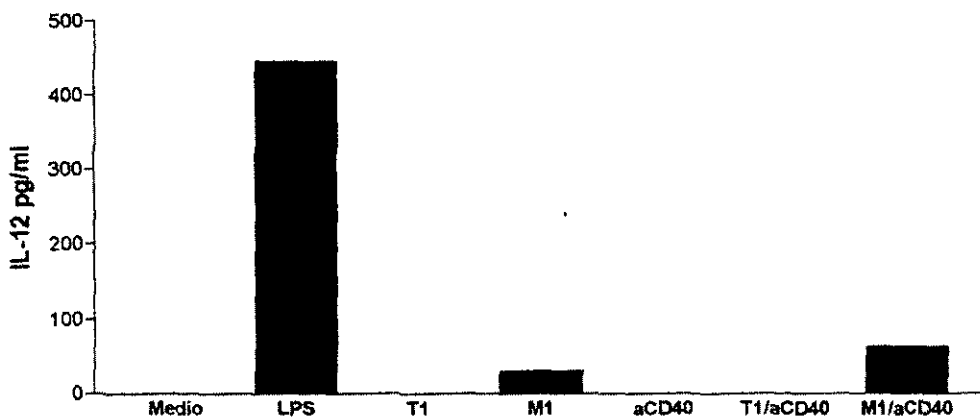


**Figura 28. Análisis de fluorescencia en péptidos control (CD86)**

combinación M1/a-CD40 incrementa la producción de IL-12 con respecto a los niveles producidos por el péptido solo (fig. 30).



**Figura 29. Análisis de fluorescencia de poblaciones de células dendríticas incubadas por 24 horas con péptido y  $\alpha$ -CD40.**



**Figura 30. Secreción de IL-12 en cultivos de poblaciones de células dendríticas incubadas por 24 horas con péptido y  $\alpha$ -CD40.**

## Discusión

### Obtención de Células Dendríticas Murinas *In Vitro*.

A pesar de la existencia de protocolos bien estandarizados para la obtención de células dendríticas murinas (Lutz et al., 1999, Inaba et al., 1992), las metodologías descritas no garantizan resultados positivos. Con el fin de trabajar con cultivos ricos en células dendríticas susceptibles a los diferentes estímulos de activación fue necesario establecer condiciones óptimas de desarrollo. Tanto el suero fetal bovino como el GM-CSF deben ser probados ya que las pequeñas diferencias entre lotes (en el caso del suero), u origen (marca comercial o línea celular en el caso del GM-CSF), resultan en cultivos con diferencias en viabilidad y número de células. Una vez que estas diferencias son consideradas y se definen las mejores condiciones de cultivo, se pueden obtener entre 40 y 50 millones de células dendríticas de médula ósea por ratón. Las células dendríticas pueden ser también obtenidas a partir de bazo. Las diferencias entre ambas poblaciones han sido y siguen siendo objeto de estudio. Se sabe que estas poblaciones son capaces de estimular a las células T con la misma eficiencia, sin embargo, las células de origen esplénico parecen perder *in vitro* su capacidad de procesamiento de antígeno en comparación con las obtenidas *in vitro* a partir de médula ósea (Garrigan, 1996). La conservación de sus propiedades inmunoestimuladoras hacen de esta última población un modelo útil de estudio.

Una vez establecidas las condiciones ideales de cultivo se procedió a identificar las poblaciones presentes en el mismo a través del tiempo. La población de granulocitos es considerable en los primeros días de desarrollo (fig. 2), mientras que la población de células MHC II positivas (principalmente monocitos, datos no mostrados indican una población casi nula de células CD3+), representa apenas alrededor de un 30% al día 5 de cultivo. Con el fin de evitar el uso de agentes de selección que dañaran o disminuyeran la población monocítica, se observó la evolución de ambas poblaciones (los pocos

eritrocitos presentes en el cultivo inicial desaparecieron por completo después de 24hrs, por lo que no fue necesario el uso de soluciones hemolisantes). La población MHC II positiva aumenta con el tiempo de la misma manera que la población de granulocitos desaparece gradualmente. El aumento de moléculas MHCII en la superficie de los monocitos obedece al estímulo de activación/maduración del GM-CSF. De esta manera, se observa que al día 11 de cultivo más del 90% de la población total fue positiva para este marcador de superficie. A pesar de este elevado porcentaje, se decidió que los experimentos de activación fueran llevados a cabo con poblaciones en los días 6 y 7 de cultivo; en este tiempo existió una considerable cantidad de células MHC II positivas en las que los estados de activación (MHC II+ versus MHC II+++ ) pueden ser diferenciados. El uso de poblaciones en estados mas avanzados de activación impide observar claramente los estados de activación inducidos por factores como el LPS, la ligación de CD40 o los péptidos usados en este estudio.

Con el fin de diferenciar y conocer la prevalencia de las poblaciones monocíticas por un método diferente al morfológico (al microscopio se observa un gran número de células no adherentes y con numerosas dendritas), se midieron los niveles del marcador CD11c (fig. 19), comúnmente usado para definir la población de células dendríticas murinas. Como se esperaba, la población positiva para este marcador representa un alto porcentaje de las células en cultivo. Las poblaciones de células dendríticas obtenidas por este medio son negativas para la expresión de marcadores CD4 y CD8 en concordancia con su origen mieloide. La determinación del fenotipo CD4-/CD8- es de importancia debido a las diferentes funciones que se ha adjudicado a las poblaciones positivas y negativas para estos marcadores y de las cuales hablaremos mas adelante.

#### Activación de células dendríticas.

LPS. Una vez identificada la composición de la población de células dendríticas en nuestros cultivos, se procedió a estudiar su respuesta a productos bacterianos que funcionaran como un control positivo de activación. Se sabe que los lipopolisacáridos

inducen estados de activación en células presentadoras de antígenos; es muy probable que la activación sea inducida a través de moléculas TLR (toll-like receptors) (Yang et al., 1999, Hertz et al., 2001). Usando diferentes concentraciones de LPS (fig. 5), observamos que las concentraciones relativamente bajas del mismo son suficientes para inducir un estado de activación total (es decir, niveles altos de expresión de las moléculas MHCII, CD80 y CD86 en la superficie celular y la secreción de IL-12), en un alto porcentaje de células dendríticas. Una vez más, la diferencias en el origen del lipopolisacárido tuvieron que ser consideradas (LPS de *SIGMA* tuvo un efecto nulo de activación). Con este experimento determinamos la capacidad de activación de la población de células dendríticas y establecimos el uso de una concentración de 100 ng/ml para los experimentos subsecuentes. También se observó una diferencia en las concentraciones mínimas necesarias para la regulación positiva de moléculas de superficie (137 pg/ml) y para la producción de IL-12 (1240 pg/ml). Dado que la secreción de IL-12 no siempre es necesaria (dependiendo del microambiente en el que se encuentra la célula y el agente patógeno) e incluso puede ser peligrosa (autoinmunidad), es probable que una baja cantidad de antígeno, aunque suficiente para inducir un cierto estado de activación, no lleve a la secreción de esta citocina.

CD40. Con el fin de incluir el factor de “ayuda” conferido por linfocitos T *in vivo* (Schoenberger et al, 1998), utilizamos un anticuerpo dirigido contra CD40, marcador que ha sido identificado como el principal actor en la activación de células dendríticas por células T CD4+ (Bennett et al, 1998). Observamos que este anticuerpo puede ligar de manera efectiva el marcador en la superficie de las células dendríticas e inducir niveles altos de expresión de MHC II, CD80 y CD86 (fig. 8). En contraste con numerosos estudios (Cella et al., 1996, Koch et al., 1996, Hochrein et al., 2001), las células ligadas con este anticuerpo no secretaron niveles detectables de IL-12. Las diferencias más notables entre nuestros experimentos y los previamente descritos son el uso de células humanas, células dendríticas esplénicas y fibroblastos expresando CD40L, entre otros. En un estudio reciente, Schulz y colaboradores (2000) demostraron por primera vez *in*

*vivo*, que la ligación de CD40 no es suficiente para estimular la producción de IL-12. Sus experimentos *in vitro* con células esplénicas no concuerdan con este resultado ya que éstas secretan IL-12 después de la ligación de CD40. Los autores concluyeron que es necesario un estímulo microbiano inicial que condicione a las células dendríticas para después ser “super activadas” por medio de CD40, además, sugieren que sus experimentos *in vitro* no son representativos de lo que ocurre *in vivo* y muestran cómo células estimuladas con LPS y ligadas con anti-CD40 producen una mayor cantidad de IL-12. Los resultados de nuestros experimentos concuerdan con las conclusiones alcanzadas por este grupo y muestran por primera vez *in vitro* la necesidad de un estímulo microbiano para inducir estados de activación tempranos. En concordancia con estos resultados, los experimentos de Turley y colaboradores (2000), demuestran la necesidad de señales microbianas o señales inflamatorias generadas por los mismos como requisito para la formación y presentación de complejos MHC-péptido en la superficie de las células dendríticas. En un estudio elegante, Reinhardt y colaboradores (2001), demostraron *in vivo* que la administración de LPS conjuntamente con un péptido (derivado de OVA) resulta en una dramática expansión de células T y la generación de células de memoria, en contraste con la inyección del péptido sin adyuvante.

El hecho de que nuestras poblaciones de células dendríticas incubadas en presencia del anticuerpo dirigido contra CD40 semejan a las poblaciones *in vivo* en la ausencia de secreción de IL-12 (fig. 10), parece ser consecuencia del método de obtención y de ligación. Todos los estudios en los que se reporta la secreción de IL-12 por la ligación de CD40 han sometido previamente al cultivo de células dendríticas a factores potencialmente activadores como son enzimas (colagenasa, liberasa) (Livingston & Kuhn, 1999), productos de células necróticas e incluso adyuvantes. También se debe recordar que los reactivos usados en el cultivo deben estar libres de endotoxinas. Nuestro método de cultivo excluye todas estas posibilidades y semeja a las condiciones en que se encuentran las células dendríticas inmaduras. Confirmamos también, que la ligación de CD40 incrementa el estado de activación inducido por LPS (fig. 12). De esta manera, el grupo de Schulz sugiere el proceso siguiente: las células dendríticas en los tejidos



encuentran productos microbianos pero no producirán niveles demasiado altos de IL-12 hasta no interactuar con las células T apropiadas para el tipo de infección. Se puede sugerir que las cantidades de antígeno que las células dendríticas encuentran en los tejidos son suficientes únicamente para estimular un estado de activación primario con una mínima o nula producción de IL-12, la cual será producida en cantidades mayores cuando la célula se encuentre en los órganos linfoides secundarios. Por otro lado, el debatido papel de CD40 en la activación de células dendríticas está mejor comprendido; parece ser que este marcador no es indispensable para la generación de la respuesta inmune pero es un importante regulador de la misma .

Péptidos. Una vez analizados los niveles de activación inducibles en nuestras poblaciones y estudiado el papel de CD40 se procedió a observar la respuesta de éstas células a la incubación con los péptidos usados para la vacunación contra la cisticercosis. Dada la respuesta inmune generada *in vivo* e *in vitro*, se pensó en la posibilidad de que estos péptidos generaran estados de activación en células presentadoras que elevaran su nivel de antigenicidad. Existen reportes de proteínas que pueden influir tanto negativa como positivamente en la presentación de otros antígenos por parte de las APC (Carucci et al., 2000, Shimizu et al., 2001). Aunado a esto, los estudios preliminares en nuestro laboratorio sugieren que al menos uno de los péptidos incrementa la respuesta humoral inducida por vacunación contra antígenos de la influenza; sin embargo, la probabilidad de que una molécula pequeña como un péptido induzca activación ha sido poco explorada. Los primeros resultados mostraron que a una concentración de 10 $\mu$ M los péptidos solos no son capaces de elevar de manera significativa la expresión de moléculas de superficie en células dendríticas (fig. 16). En contraste, GK1 y KETc1 inducen niveles bajos pero detectables de IL-12, sugiriendo la estimulación de un cierto nivel de activación. Cuando estos péptidos fueron incubados simultáneamente con el anticuerpo  $\alpha$ -CD40 (fig. 19), la producción de IL-12 aumentó en las células incubadas con la combinación GK1/ $\alpha$ -CD40 (efecto parecido al producido por la combinación LPS/ $\alpha$ -CD40) y la expresión de moléculas de superficie se vio aumentada (principalmente con los péptidos GK1 y

KETc1). Este aumento es más claro en las células que ya se encontraban en estado de activación, alcanzando en ocasiones los niveles inducidos por el LPS. La activación por medio de CD40 se caracteriza por un aumento notable en la expresión de moléculas MHCII; este fenómeno fue observado también en las muestras donde GK1 y KETc1 fueron incubados con el anticuerpo.

De manera interesante, la expresión de CD86 fue visiblemente superior a la de CD80 en las células expuestas a la combinación GK1/a-CD40 (fig. 20). Esta observación es importante debido a que las moléculas CD80 y CD86 poseen funciones distintas en el proceso de desarrollo de la respuesta inmune contra antígenos intracelulares y extracelulares. CD86 interviene de manera importante en la producción de anticuerpos y en la proliferación de linfocitos T cuando la respuesta es estimulada por antígenos intracelulares (Santra et al., 2000). Este fenómeno concuerda con el hecho de que GK1 estimula la proliferación de linfocitos T CD8+ (Toledo et al., 1999), lo cual sugiere que el péptido puede ganar acceso al citosol y ser procesado para su presentación en moléculas de clase I. Este fenómeno de presentación antigénica se ha sido descrito ampliamente en la literatura y parece ser exclusivo de las células dendríticas (Mitchel et al., 1998, Rodríguez et al., 1999). Diferentes estudios sugieren que los antígenos exógenos pueden ganar acceso al citosol por medio de la internalización de complejos antígeno-anticuerpo capturados por receptores Fc en la superficie de la célula (Rodríguez et al., 1999). Otros mecanismos sugeridos consisten en la traslocación de antígeno capturado en endosomas por medio de proteínas de choque térmico (Cresswell & Howard, 1999) o vías selectivas aún desconocidas (Rodríguez et al., 1999).

El análisis de fluorescencia en la población activada se llevó a cabo debido a que se observó que las pequeñas diferencias en la activación inducida por los péptidos podrían pasar desapercibidas al observar a la población total. Esto es, la observación permanente de dos subpoblaciones (aún en células activadas con LPS) sugiere la existencia de células que podrían encontrarse en un estado no susceptible de activación por ningún estímulo. Al incluir esta población en conteos estadísticos como lo es la intensidad de fluorescencia media, los cambios sutiles en el estado de activación de células susceptibles pueden pasar

desapercibidos. Las células incubadas con péptidos control no muestran variaciones de activación en ninguno de los análisis llevados a cabo.

GK1 y KETc1 mostraron la capacidad de inducir un cierto estado de activación en las células dendríticas. Este estado se caracteriza por la estimulación de la secreción de IL-12 en bajas cantidades y puede ser potenciado o aumentado por la ligación de CD40. La vía por la cual estos péptidos inducen activación es desconocido, sin embargo, se podría sugerir que utilizan un mecanismo similar al LPS en el cual los péptidos serían reconocidos por receptores en la superficie de la célula dendrítica. Se ha propuesto la existencia de receptores que reconocen secuencias antigénicas evolutivamente conservadas por patógenos y que no se encuentran en el hospedero (Janeway, 1989). Dado que estos péptidos poseen secuencias pertenecientes a proteínas de un parásito y han probado ser inmunogénicos, no es demasiado arriesgado pensar que puedan ser reconocidos por estos receptores, de la misma manera que lo es el LPS (Reis e Sousa, 2001). Es probable que el uso de mayores concentraciones de péptido muestren resultados más claros respecto a su posible papel como activadores.

El pulsado de células dendríticas con péptidos *in vitro* abre la posibilidad de su uso como adyuvantes inmunoterapéuticos (Larsson et al, 2000). La caracterización de los niveles de activación alcanzados con la administración de péptidos y la ligación de CD40 aportada por este estudio son útiles para el diseño de protocolos. Existe la posibilidad de re-introducir en pacientes células dendríticas cargadas con el antígeno relevante y completamente activadas. Esto podría lograrse por medio de bajas concentraciones de LPS y la ligación de CD40. Sin embargo, existen razones por las que este método podría resultar inefectivo. Al ser activadas, las células dendríticas comenzarían de manera casi inmediata la producción de IL-12. Esto, aunado a la disminución en su capacidad de migración, resultaría en una respuesta inmune inflamatoria local con un bajo o nulo efecto general.

Con el objetivo de activar *in situ*, las células también pueden ser estimuladas con la inyección de LPS o anticuerpos a-CD40 (en el caso de deficiencia de linfocitos T CD4+) (Ito, et al., 2000). Ante la imposibilidad de inyectar LPS a pacientes, nuestro estudio

sugiere la posibilidad de inducir un estado de pre-activación en células dendríticas cargadas con antígeno por medio del pulsado con los péptidos GK1 y KETc1. De esta manera, la célula inmadura inyectada migraría hasta los nódulos linfáticos donde su estado inicial de activación sería potenciado por la ligación de CD40 conferida por linfocitos T. Estudios subsecuentes son necesarios para establecer la viabilidad de este protocolo.

## Conclusiones

Las células dendríticas son capaces de alcanzar un estado total de activación (caracterizado por altos niveles de MHC II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie celular y la secreción de IL-12), a bajas concentraciones de LPS (entre 3 y 4 ng/ml).

La ligación de CD40 en la superficie de las células dendríticas con un anticuerpo monoclonal resulta en la expresión de altos niveles de MHC II, CD80 y CD86 en la superficie, pero no es suficiente para estimular la secreción de IL-12.

El estado de activación inducido en células dendríticas por productos bacterianos (LPS) se incrementa por la ligación de CD40.

Los péptidos GK1 y KETc1 inducen estados de activación menores a los inducidos por productos bacterianos; estos estados se incrementan por la ligación de CD40.

La participación de CD40 en la respuesta inmune adaptativa parece estar subordinada a señales producidas por la respuesta inmune innata.

Los péptidos GK1 y KETc1 son candidatos que ameritan futuros estudios en los que se considere su uso como adyuvantes.

## Apéndice I

### Péptidos

Comúnmente se piensa que una molécula necesita de cierto grado de complejidad y tamaño considerable para ser un buen antígeno. El trabajo con péptidos sintéticos para su uso como vacuna parece (hasta el momento) demostrar lo contrario. Se ha demostrado que en el caso de la cisticercosis murina, péptidos sin moléculas acopladas actúan como buenos estimuladores de protección (Toledo et al., 1999-2001). Es muy probable que las células dendríticas, con su gran capacidad endocítica y de presentación de antígenos sean las responsables de este fenómeno. *In vitro*, péptidos de pequeño tamaño (8-20 aminoácidos) y en muy bajas concentraciones (micromolares) son presentados eficientemente por estas células (Ludewig et al., 2000). De acuerdo con Turley, et al. (2000), la captura y procesado del antígeno no es suficiente para su presentación efectiva en complejos MHC-péptido. La célula dendrítica debe ser expuesta a estímulos de maduración (productos microbianos como LPS o señales inflamatorias) para entonces completar el proceso de formación de complejos de presentación en la superficie celular. La respuesta inmune eficientemente estimulada por los péptidos GK-1, KETc1 y KETc12 nos lleva a pensar en la posibilidad de que estos no solo participen como epítopes de presentación sino también como activadores de células presentadoras de antígenos. Además de ser procesados para su presentación en moléculas presentadoras tanto de clase I como de clase II, los péptidos podrían funcionar como señales de “peligro” que lleven a las células dendríticas a un determinado estado de activación. Una de las muchas implicaciones que este fenómeno tendría es la consideración del uso de estos péptidos como adyuvantes de otros antígenos en protocolos de vacunación. Se han obtenido resultados prometedores en este sentido al vacunar ratones con antígenos de influenza y los péptidos aquí descritos.

## Células Dendríticas.

Hasta hace poco tiempo aún existía un debate sobre las características distintivas de las células dendríticas. El criterio de identificación se vuelve cada vez más consistente. Son células grandes, de forma irregular y con dendritas, móviles no adherentes, ricas en productos MHC y moléculas co-estimuladoras como CD40, CD54 y CD86, con la ausencia de marcadores de otras líneas como CD3, CD14, CD16 y CD19/20, muy potentes para inducir inmunidad T (Steinman & Banchereau, 1999). Aunque las poblaciones de células dendríticas *in vivo* poseen morfologías y funciones diferentes entre sí, todas expresan altos niveles de marcadores como B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y MHC II, excepto las células foliculares (Steinman, 1999).

La célula dendrítica captura el antígeno, lo procesa y después de madurar lo presenta. Sin embargo, las células fagocíticas (dendríticas inmaduras) no poseen las mismas características de una dendrítica madura, como la forma irregular y los altos niveles de productos MHC y CD86 en la superficie (Kuby, 1997). Además de procesar y presentar los antígenos asociados a MHC, estas células expresan una gran variedad de señales secundarias que median la unión y co-estimulación de células T. Son estas moléculas co-estimuladoras las que hacen de las células dendríticas eficientes estimuladoras de la respuesta inmune (Steinman & Banchereau, 1999).

Las células dendríticas estimulan células T de manera antígeno-específica y se ha reportado que también son capaces de estimular células B y anergizar linfocitos T; se desconoce si esta capacidad puede deberse a la existencia de diferentes tipos de células dendríticas. Las maduras expresan CD40 en altas cantidades al igual que las T CD4+ activadas expresan CD40L, situación que puede influir en la supervivencia de la DC (Steinman & Banchereau, 1999).

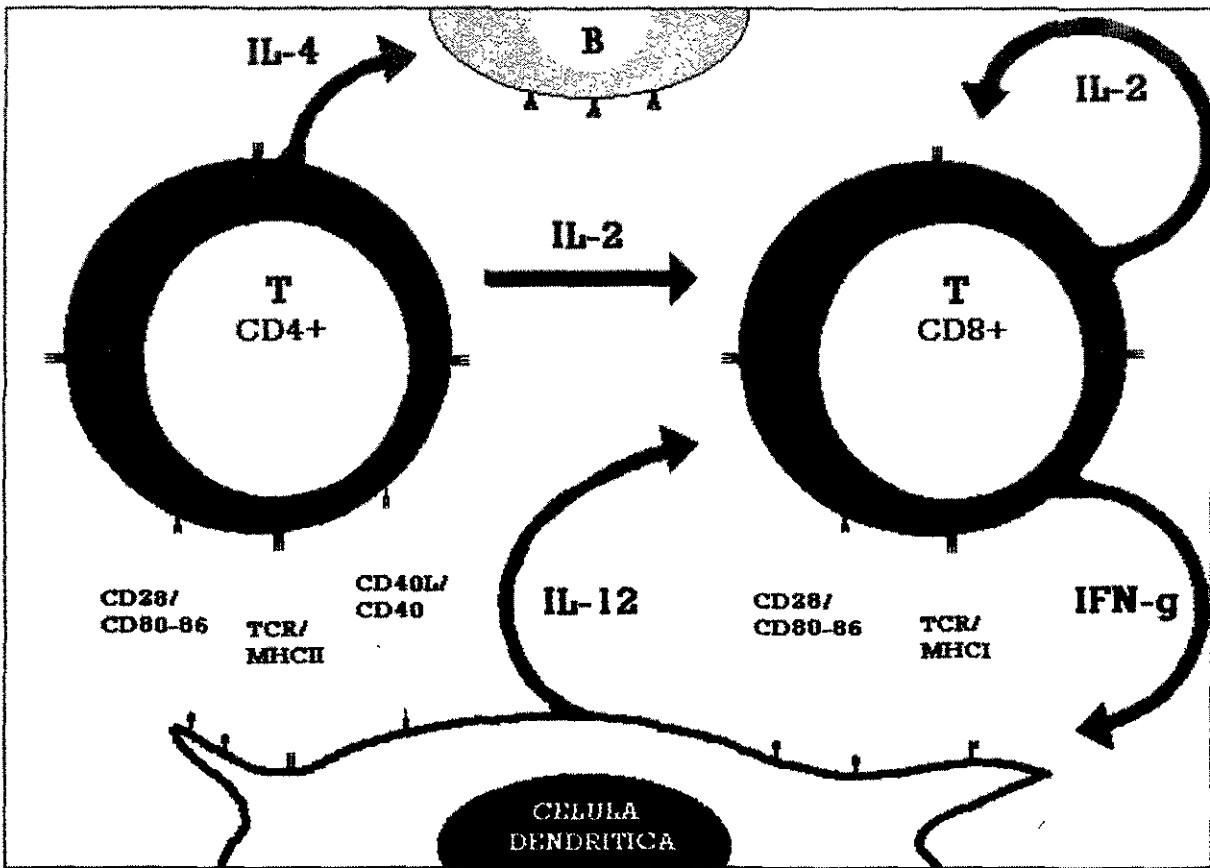
La importancia de CD40 en la estimulación de respuestas citotóxicas ha sido objeto de continuo debate. Los ratones *knockout* en los que CD40L ha sido eliminado muestran severas deficiencias en la respuesta T citotóxica (Borrow et al., 1996); el bloqueo de CD40 en las células dendríticas previene la activación de linfocitos CD8+ (Schoenberger, et al., 1998). Debido a éstas evidencias y a pesar de los reportes que sugieren la

existencia de diferentes vías de activación linfocitaria (Lu, et al., 2000, Ruedl, et al., 1999), el papel de CD40 parece ser fundamental para estimular una respuesta citotóxica.

La ligación de CD40 no es suficiente para estimular la secreción de IL-12. En su reporte, Schulz y colegas (2000) demostraron *in vivo* (sus resultados *in vitro* son contradictorios) la necesidad de productos microbianos que sirvan como un estímulo innato que lleve a un estado de activación suficiente para ser potenciado por la ligación de CD40. Así, la activación de linfocitos T de ayuda y la subsecuente ligación de CD40 en la superficie de las células dendríticas no siempre llevará a la producción de IL-12 permitiendo el desarrollo de respuestas de tipo T2. De hecho, si la ligación de CD40 fuera suficiente para la activación total de las células la producción de IL-12 sería constitutiva. De esta manera, CD40 parece ser un importante marcador de regulación de la respuesta inmune que actúa en forma sinérgica con el estímulo microbiano. En el presente trabajo se apoya esta teoría con experimentos *in vitro*.

Otro aspecto de la respuesta inmune generada por parte de las células dendríticas que debemos mencionar es la presentación de antígenos exógenos en contexto de MHC clase I. Hasta hace poco era de común acuerdo el que los antígenos exógenos son procesados siguiendo la vía de presentación en moléculas MHC de clase II. Por su parte, antígenos endógenos siguen un camino distinto y son presentados en moléculas MHC de clase I (Kuby, 1997). Una vez más, las células dendríticas parecen romper esquemas al presentar antígenos exógenos en moléculas de clase I y estimular una respuesta por parte de linfocitos CD8+ (Watts, 1999). Durante los últimos 10 años se han publicado numerosos estudios sobre las posibles vías de procesado y presentación que pudieran seguir antígenos administrados de manera exógena tanto *in vivo* como *in vitro* para su presentación en moléculas de clase I tanto clásicas como no clásicas (Norbury, et al., 1995, Brossart & Bevan, 1997, Rodríguez, et al., 1999; Machy et al., 2000).





*Figura 1. Interacción de células dendríticas y linfocitos.* La célula dendrítica establece contacto con linfocitos CD4+ antígeno-específicos por medio de los complejos MHCII-peptido y moléculas co-estimuladoras en su superficie (CD80/86). El encuentro resulta en la activación del linfocito y la regulación positiva de la expresión de CD40L en la superficie. La célula dendrítica es a su vez activada por la ligación de CD40 en su superficie y comenzará a secretar IL-12. Los linfocitos CD8+ serán seleccionados de la misma manera por medio de los complejos MHCI-peptido/TCR y activados por moléculas de superficie en las dendríticas además de la IL-12 secretada por las mismas. La producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos CD8+ estimula la producción de IL-12 por las células dendríticas. IL-2 será producida por los linfocitos T después de la activación. Los linfocitos CD4+ producirán IL-4 estimulando la proliferación de los linfocitos B. (modificada de Banchereau, et al, 2000).

A la fecha no existe un consenso en los mecanismos precisos, sin embargo, es aceptado que esta capacidad es casi exclusiva de las células dendríticas. Este fenómeno debe ser tomado en cuenta cuando se piensa en el diseño de vacunas cuyo objetivo sea estimular una respuesta de tipo citotóxico.

#### **Células Dendríticas: Vacunación e Inmunoterapia.**

Debido a su papel como potentes estimuladoras de la respuesta inmune, las células dendríticas han sido consideradas para su uso tanto en la producción de vacunas como de terapias inmunogénicas (Shimizu, et al., 2001). Las células dendríticas pulsadas con péptidos inmunogénicos y con sus receptores CD40 ligados podrían ser eficientes en el tratamiento de pacientes infectados con VIH donde la ayuda conferida por los linfocitos T CD4+ se ve drásticamente disminuida. Por otro lado, con el objetivo específico de atacar tumores, se ha pulsado células dendríticas con péptidos ó lisados provenientes del tumor para después ser re-introducidas en pacientes. Los resultados alentadores se han visto menoscabados por el surgimiento de autoinmunidad en diferentes estudios (Roskrow, et al., 1999, Ludewig, et al., 2000). El tratamiento con células dendríticas evitó la formación de nuevos tumores y los ya existentes fueron eliminados; sin embargo, la intensa estimulación de la respuesta inmune resulta en la destrucción de células portadoras de antígenos propios (Roskrow, et al., 1999). Los animales desarrollaron enfermedades como diabetes autoinmune y problemas de miocardio que llevaron a la muerte. Resultados como estos señalan el delicado balance entre la respuesta inmune dirigida contra tumores y la autoinmunidad (Ludewig et al, 2000). El campo de la terapia y vacunación con estas células aún ha sido poco explorado y parece ser muy prometedor.

## ELISA para detectar IL-12 (p70) en sobrenadantes.

### Reactivos

PBS 1x	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
PBS 0.05% Tween 20 (PBST)	NaHCO <sub>3</sub> a 0.1 M pH 8.2
PBS 0.05% Tween 20 + 10% Suero fetal de ternera (FCS).	Anticuerpos (Pharmingen):
TMB (tabletas).	$\alpha$ -IL-12(p70) purificado (9A5).
Acetato de Sodio (NaAc) pH 5.5	$\alpha$ -IL-12 (p40/p70) biotinilado (C17.8).
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 2 M.	IL-12 (alícuota 100 pg/ml).
	DMSO.

### Protocolo

- 1.- Diluir el anticuerpo  $\alpha$ -p70 a 2 $\mu$ g/ml en una solución amortiguadora de carbonato de sodio recién preparada. Colocar 50 $\mu$ l por pozo en placas de ELISA e incubar durante la noche a 4 C.
- 2.- Decantar y bloquear con medio de cultivo (TCM-7) (100 $\mu$ l por pozo) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Lavar con PBST (3x).
- 3.- Realizar diluciones seriadas de los estándares y añadir 50 $\mu$ l por pozo. Incubar durante 24 horas a 4 C. Lavar con PBST (3x).
- 4.- Diluir el anticuerpo  $\alpha$ -p40/p70 a 0.5 $\mu$ g/ml en PBST-10% FCS. Usar 100 $\mu$ l por pozo e incubar durante 24 horas a 4 C. Lavar con PBST (3x).
- 5.- Diluir Streptavidina-HRPO a 1/2000 en PBST/1% BSA. Añadir 100 $\mu$ l por pozo e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Lavar con PBST (3x).
- 6.- Disolver una tableta (1mg) de sustrato (TMB) en 100 $\mu$ l de DMSO. Mezclar 9.4 ml de H<sub>2</sub>O, 0.5ml de NaAc y TMB/DMSO. Añadir 4 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O justo antes de usar. Añadir 100 $\mu$ l por pozo. Detener la reacción con 100 $\mu$ l por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Leer absorbancia a 450nm con 650nm como referencia.

## Apéndice II

### Interleucinas y factores solubles.

Interleucina	Tipo Celular	Funciones
IL- 4	Linfocitos-T activados (sub-población T2). Basófilos.	Descrita por primera vez como un factor de proliferación de linfocitos B. Actúa sobre monocitos, células dendríticas y células endoteliales entre otras. Su receptor se puede encontrar en gran número de tipos celulares (Jacques, et al., 1999).
GM-CSF	Células estromales de médula ósea.	Factor de crecimiento con un papel primordial en la hematopoyesis. Induce la formación de las células blancas no linfoides a partir de precursores de médula ósea (Kuby, 1997).
IL-10	Linfocitos T activados (sub-población T2).	En células dendríticas inhibe la regulación positiva en la superficie de MHC II, CD80 y CD86. Inhibe la secreción de IL-12 favoreciendo una respuesta inmune de tipo T2 (Faulkner, et al., 2000).
IL-12	Monocitos. Células polimorfo- nucleadas. Células dendríticas.	Citocina heterodimérica compuesta por una cadena pesada (p40) y una ligera (p35) que covalentemente unidas forman la proteína biológicamente activa (p70). Actúa como una citocina pro-inflamatoria que activa células NK y gracias a su habilidad de inducir la producción de IFN $\gamma$ , promueve la actividad fagocítica y bactericida en células fagocíticas y su habilidad de producir citocinas pro-inflamatorias, incluida IL-12. Cuando es producida durante las etapas tempranas de la infección favorece la diferenciación y activación de

		<p>células T1. Induce respuestas T1 al presentar antígenos a células T. Además de la producción inducida por agentes infecciosos, la producción de esta citocina puede ser inducida por células T activadas gracias a la interacción de CD40 con su ligando. Las células T y NK en estado de reposo no expresan niveles altos del receptor pero responden rápidamente con la producción de IFN <math>\gamma</math> (el cual a su vez estimula la producción de IL-12) (Trinchieri, et al., 1999).</p>
IL-15	<p>Monocitos Activados. Fibroblastos. Músculo. Riñon. Células Dendríticas. Macrófagos.</p>	<p>Comparte numerosas actividades biológicas con IL-2. Identificada en 1994 por su habilidad de estimular el crecimiento de una línea células dependiente de IL-2. La producción y secreción de esta proteína no es proporcional a la cantidad de mRNA producido. Niveles bajos de IL-15 se pueden encontrar en los sobrenadantes de monocitos activados y células dendríticas de sangre. Una producción óptima de IL-15 se puede obtener estimulando macrófagos con IFN<math>\gamma</math> y LPS. En células dendríticas la secreción de IL-15 es estimulada por fagocitosis. Induce proliferación de células B y T (CD4+ y CD8+), quimiotaxis en células T, actividad citotóxica y proliferación de células NK. Actúa sinérgicamente con IL-12 para incrementar la producción de IFN<math>\gamma</math> y TNF<math>\alpha</math>. Los receptores de IL-15 se encuentran prácticamente en las mismas células que presentan receptor el de IL-2 (Jacques, et al., 1999).</p>

IL-2	Linfocitos T activados.	<p>Aunque los precursores CD4 inmaduros y las células T0 producen IL-2, solo la fracción diferenciada T1 la produce. Algunas clonas de células dendríticas también la producen.</p> <p>Su producción es altamente regulada y requiere un proceso doble de inducción de señales que incluye el ligamiento del TCR con los complejos MHC y la señal de estimulación conferida por la interacción de CD28 y CTLA-4 con las moléculas CD80 y CD86. Su producción puede ser inhibida por IL-4 y IL-10.</p> <p>El blanco principal son linfocitos activados. Las células T vírgenes no poseen un receptor funcional. La activación por el ligamiento del TCR lleva a una fuerte acción autócrina resultante en proliferación. La activación del receptor de células B las hace sensibles a IL-2 también. Las células NK vírgenes son activadas por IL-2. Los monocitos y otras células hematopoyéticas como los neutrófilos incrementan su actividad citotóxica en presencia de IL-2 (Jacques, et al., 1999).</p>
------	-------------------------	---

## Marcadores

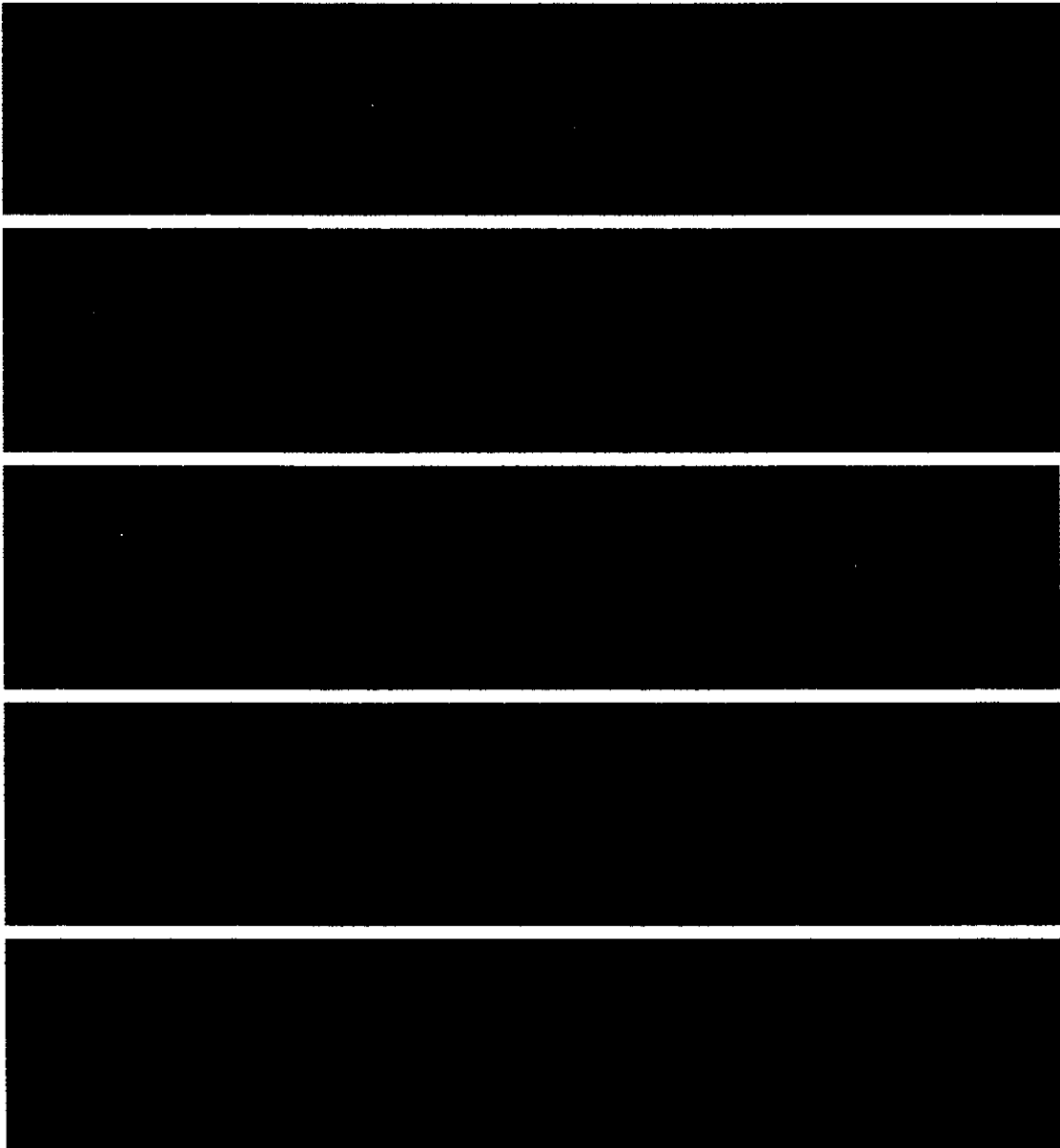
Molécula	Tipo celular	Funciones
MHC I	Todas las células nucleadas.	Glicoproteína de superficie formada por una cadena $\alpha$ asociada de manera no covalente a una molécula $\beta_2$ -microglobulina. Dos de sus dominios forman una cavidad con capacidad para retener un péptido de entre 8 y 10 aminoácidos. (Kuby, 1997).
MHC II	Células profesionales presentadoras de antígeno.	Glicoproteína de superficie formada por dos cadenas polipeptídicas diferentes ( $\alpha$ y $\beta$ ) unidas por interacciones no covalentes. Dos de sus dominios forman una cavidad abierta con capacidad para retener péptidos de diferentes tamaños (por lo general de entre 13 y 18 aminoácidos). (Kuby, 1997).
CD11c	Células dendríticas	Integrina. Molécula de adhesión que forma parte del complejo CD11c/CD18. Se utiliza ampliamente para identificar poblaciones de células dendríticas murinas (Kuby, 1997).
CD40	Linfocitos B Células Dendríticas Monocitos Células epiteliales.	Glicoproteína transmembranal que presenta en su parte extracelular homología con la familia de los TNF/NGF y es conservada entre hombre y ratón. CD40 y su ligando CD40L son moléculas críticas en el desarrollo de la respuesta inmune. La pérdida o ausencia de éstos marcadores resulta en una severa deficiencia inmune. Además de tener importantes funciones durante el <i>priming</i> de células T, CD40 regula la diferenciación y desarrollo de memoria de células B y dirige el cambio de isotipo. Es expresado por células con un alto potencial de proliferación y en aquellas que presentan antígenos.

		<p>Las células dendríticas de tejido linfoide secundario presentan una expresión muy alta. Su expresión esta regulada in vitro por GM-CSF y por varias citocinas pro-inflamatorias como IFN<math>\gamma</math>, IL-1, TNF y probablemente IL-6. Es crucial en la formación de centros germinales gracias a su capacidad de activar células T. Una función importante es su habilidad de activar APC que estimulan respuestas de células T. Regula la expresión de CD80 y CD86. CD40 es importante para respuestas tanto T1 como T2. En células B el espectro de moléculas co-estimulatorias favorece el desarrollo de una respuesta tipo T2 mientras que en células presentadoras como los macrófagos y dendríticas la misma señal promueve una respuesta T1, probablemente por la inducción de IL-12 Su ligando CD40L es expresado principalmente en células T CD4+ aunque también se expresa en otras células activadas (CD8+, basófilos y células dendríticas) (Wallach, et al., 1999)</p>
--	--	---



CD86	Linfocitos B Células Dendríticas.	De estructura similar a CD80, interactúa con CTLA-4 y CD28. Después de la activación de las células B, la expresión de CD86 se incrementa más rápidamente que la de CD80 y su presencia en la membrana es generalmente mayor tanto en células B como dendríticas, en las cuales ha demostrado ser el principal ligando de CD28. El ligamiento de MHC II y CD40 regula positivamente tanto CD80 como CD86. En células B el ligamiento de inmunoglobulinas de superficie induce la expresión de CD86 en la superficie. IL-4 e IFN $\gamma$ parecen estimular también CD86 mas no CD80 . IL-10 bloquea la regulación positiva de CD86 en macrófagos y DC. (Bluestone, et al., 1999)
CD28	Linfocitos T	Glicoproteína de membrana expresada principalmente en células T (50% de CD8+ y casi 100% de CD4+). Su expresión se incrementa con la activación celular y disminuye después de su ligamiento por B7-1 y/o B7-2, el cual estimula producción de IL.2. La interacción de estas moléculas es una vía co-estimuladora de gran importancia ya que su ausencia produce anergia en células T. (Bluestone, et al., 1999)

### Apéndice III



**Figura 11 Células dendríticas; expresión de CD86.** Las células estimuladas con LPS ó anti-CD40 por 24 hrs. fueron marcadas con un anticuerpo anti-CD86 acoplado a ficoeritrina. Las células individuales observadas con el objetivo de 40x muestran la fluorescencia ubicada principalmente en la superficie de la célula. El análisis de las imágenes mostró mayor intensidad de fluorescencia en ciertos sectores de la superficie. Esto puede deberse a la polarización de la expresión superficial de moléculas co-estimuladoras reportada con anterioridad por Turley et al.(2000), con el uso de microscopía confocal. Desafortunadamente, las limitaciones propias de la técnica de microscopía usada en este estudio impiden diferenciar este evento de posibles artefactos derivados de la misma.

## Referencias

Bachman, F., Wong, B., Josien, R., Steinman, R., Oxenius, A., Choi, Y. TRANCE, a tumor necrosis factor family member critical for CD40 ligand-independent T helper cell activation. *J Exp Med* 189, (7) 1025-1031. 1999.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev Immunol.* 18, 767-811. 2000.

Bennet, S., Carbone, F., Karamalis, F., Flavell, R., Miller, J., Heath, W. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480. 1998.

Bluestone, J., Khattri, R., van Seventer, G. Capítulo 13: Accessory Molecules en *Fundamental Immunology*. 4<sup>th</sup> Edition. Editado por W.E. Paul. Lippincott-Raven Pub. USA. 1999.

Borrow, P., Tishon, A., Lee, S., Xu, J., Grewal, I., Oldstone, M., Flavell, R. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8<sup>+</sup> CTL response. *J Exp Med* 183, 2129-2142. 1996.

Brossart, P., Bevan, M. Presentation of exogenous protein antigens on Major Histocompatibility Complex Class I molecules by dendritic cells: Pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90 (4), 1594-1599. 1997.

Carucci, J., Ignatius, R., Wei, Y., Cypess, A., Schaer, D., Pope, M., Steinman, R., Mojssov, S. Calcitonin Gene-Related peptide decreases expression of HLA-DR and CD86 by human dendritic cells and dampens dendritic cell-driven T cell-proliferative responses via the type I calcitonin gene-related peptide receptor. *J Immunol* 164, 3494-3499. 2000.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehman, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., Alber, G. 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. 1996.

Cresswell, P. and Howard, J. Antigen recognition. *Curr Op Immunol* 11, 61-63. 1999.

Faulkner, L., Buchan, G., Baird, M. Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunol* 99 (4), 523-531. 2000.

Garrigan, K., Moroni-Rawson, P., McMurray, C., Hermans, I. Abernethy, N., Watson, J., Ronchese, F. Functional comparison of spleen dendritic cells and dendritic cells cultured in vitro from bone marrow precursors. *Blood* 88 (9), 3508-3512. 1996.

Hartgers, F., Figdor, C., Adema, G. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Trends in Immunology* 21, (11) 542-545. 2000.

Hertz, C., Kiertcher, S., Godowski, P., Bouis, D., Norgard, M., Roth, M., Modlin, R. Microbial Lipopeptides Stimulate dendritic cell maturation via Toll-Like Receptor 2. *J Immunol* 166, 2444-2450. 2001.

Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., O'Keeffe. Differential production of IL-12, IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* 166, 5448-5455. 2001.

Huerta, M., Sciutto, E., García, G., Villalobos, N., Hernández, M., Fragoso, G., Díaz, J., Díaz, A., Ramírez, R., Luna, S., García, G., Aguilar, E., Espinoza, S., Castilla, G., Bobadilla, J., Avila, R., José, M., Larralde, C., Aluja, S. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet Par* 90, 209-219. 2000.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Inaba, K., Steinman, R., Pack, M., Aya, H., Inaba, M., Sudo, T., Wolpe, S., Schuler, G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 175, 1157. 1992.

Ito, D., Ogasawara, K., Matsushita, K., Morohashi, T., Namba, K., Matsuki, N., Kitaichi, N., Inuyama, Y., Hosokawa, M., Nakayama, E., Iwabuchi, K., Onoe, K. Effective priming of cytotoxic T lymphocyte precursors by subcutaneous administration of peptide antigens in liposomes accompanied by anti-CD40 and anti-CTLA-4 antibodies. *Immunobiology* 201 (5), 527-540. 2000.

Jacques, Y., Minty, A., Fradelizi, D., Theze, J. Capítulo II: Interleukins 2, 4, 7, 9, 13 and 15 en *The cytokine network and immune function*. Editado por Theze, J. Oxford University Press. USA. 1999.

Janeway, C. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 54, 1-13. 1989.

Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., Schuler, G. 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*

Kuby, J. Células dendríticas en *Immunology*. 3<sup>rd</sup> Edition. W.H. Freeman and Company. USA. 1997.

Larralde, C., Montoya, R., Sciutto, E., Díaz, M., Govezensky, T., Coltorti, E. Deciphering Western blots of tapeworms antigens (*T. solium*, *E. Granulosus* and *T. Crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatidic disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* 40, 282-290. 1989.

Larsson, M., Messmer, D., Somersan, S., Fonteneau, J., Donahoe, S., Lee, M., Dunbar, P., Cerundolo, V., Julkunen, I., Nixon, D., Bhardwaj, N. Requirement of mature dendritic cells for activation of influenza A-specific memory CD8+ T Cells. *J Immunol* 165, 1182-1190. 2000.

Livingstone, A., Kuhn, M. Dendritic cells need T cell help to prime cytotoxic T cell responses to strong antigens. *Eur J Immunol* 29, 2826-2834. 1999.

Lu, Z., Yuan, L., Zhou, X., Sotomayor, E., Levitzky, H., Pardoll, D. CD40-independent pathways of T cell help for priming of C8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 191 (3), 541-550. 2000.

Ludewig, B., Ochsenbein, A., Odermatt, B., Paulin, D., Hengartner, H., Zinkernagel, R. Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease. *J Exp Med* 191 (5), 795-803. 2000.

Lutz, MB., Kukutsch, N., Ogilvie, ALJ., Rösner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Met*, 223; 77-92. 1999.

Machy, P., Serre, K., Leserman, L. Class I-restricted presentation of exogenous antigen by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur J Immunol* 30, 848-857. 2000.

Mitchel, D., Mair, S., Gilboa, E. Dendritic cell/macrophage precursors capture exogenous antigen for MHC class I presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol* 28, 1923-1933. 1998.

Norbury, C., Hewlett, L., Prescott, A., Shastri, N., Watts, C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3, 783-791. 1995.

Reis e Sousa, C. Dendritic Cells as Sensors of Infection. *Immunity* 14, 495-498. 2001.

Reinhardt, R. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410, 101-105. 2001.

Ridge, J., Di Rosa, F., Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478. 1998.

Rodríguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biology* 1, 362-368. 1999.

Roskrow, M., Dilloo, D., Suzuki, N., Zhong, W., Rooney, C., Brenner, M. Autoimmune disease induced by dendritic cell immunization against leukemia. *Leukemia Res* 23, 549-557. 1999.

Ruedl, C., Kopf, M., Bachmann, M. CD8+ T Cells mediate CD40-independent maturation of dendritic cells In vivo. *J Exp Med* 189 (12), 1875-1883. 1999.

Santra, S., Barouch, D., Sharpe, A., Letvin, N. B7 co-stimulatory requirements differ for induction of immune responses by DNA, protein and recombinant pox virus vaccination. *Eur J Immunol* 30, 2650-2659. 2000.

Schoenberger, S., Toes, R., van der Voort, E., Offringa, R., Melief, C. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483. 1998.

Schulz, O., Edwards, A., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., Reis e Sousa, C. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 13, 453-462. 2000.

Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, Hernández, M., Villalobos, N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Par* 60, 53-67. 1995.

Shimizu, K., Thomas, E., Giedlin, M., Mulé, J. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res* 61, 2618-2624. 2001.

Steinman, RM. Capítulo 16: Dendritic Cells en *Fundamental Immunology*. 4<sup>th</sup> Edition. Editado por W.E. Paul. Lippincott-Raven Pub. USA. 1999.

Steinman, RM. y Banchereau, J. Introducción en *Dendritic Cells*. Editado por M.T Lotze y A.W. Thomson. Academic Press. USA. 1999.

Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., López, F., Kubli, C., Vázquez, R., Terrazas, I., Scitutto, E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67, 2522-2530. 1999.

Toledo, A., Fragoso, G., Gevorkian, G., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., López, F., Terrazas, I., Hernández, B., Huerta, M., Larralde, C., Scitutto, E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. Crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 69, 1766-1773. 2001.

Trinchieri, G. Capítulo VI: Interleukin 12 en *The cytokine network and immune function*. Editado por Theze, J. Oxford University Press. USA. 1999.

Turley, S., Inaba, K., Garrett, W., Ebersold, M., Unternaehrer, J., Steinman, R., Mellman, I. Transport of Peptide-MHC Class II complexes in developing dendritic cells. *Science* 288, 522-527. 2000.

Wallach, D., Bigda, J., Engelmann, H. Capítulo IV: The tumor necrosis factor (TNF) family and related molecules en *The cytokine network and immune function*. Editado por Theze, J. Oxford University Press. USA. 1999.



Watts, C. Dendritic cells spill the beans. *Nature Cell Biology* 1, E152-E154. 1999.

White, A. Neurocysticercosis: Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Annu Rev Med* 51, 187-206. 2000.

Yang, R., Mark, M., Gurney, A., Godowski, P. Signaling events induced by lipopolysaccharide-activated Toll-Like Receptor 2. *J Immunol* 163, 639-643. 1999.