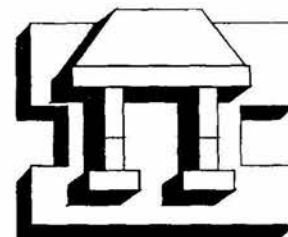




**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS, EN DESPEGAMIENTO EPITELIAL
DE CÉRVIX HUMANO**

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :
OSCAR EDUARDO BALDERAS CARRILLO

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. J. RAFAEL JIMÉNEZ FLORES

APOYO PAPITT (CIN221799)

MMII



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



U.N.A.M. CAMPUS

*“La ciencia debe siempre
explicar la vaguedad y
complejidad mediante ideas más
claras y más sencillas”.*

*Claude Bernard
(1813-1878)*

IN MEMORIAM

*Ma. del Rosario Trujillo, Rosa Ma. Carrillo Trujillo,
Luis Felipe Carrillo Trujillo.*

AGRADECIMIENTOS

A todas aquellas personas e instituciones que colaboraron para la realización del presente proyecto.

Al M en C. Rafael Jiménez Flores, por haberme aceptado como alumno, por apoyarme e impulsarme en la academia, por inculcar un interés en la inmunología, pero sobre todo de hacer ese interés de una manera amena y agradable.

Al Dr. Leopoldo Flores Romo, por todas las facilidades otorgadas durante la estancia en el laboratorio a su cargo, por los consejos y enseñanzas.

Al Jurado Dictaminador de la FES Iztacala (M. en C. Martha Salcedo, M. en C. María Eugenia Heres, M. en C. Leticia Verdín), por las correcciones y sugerencias, por el valioso tiempo dedicado a la revisión del presente escrito.

A los médicos del Hospital de Gineco Obstetricia "Tlatelolco", Rosa Ma. Chi y Jose Montes, por las muestras biológicas otorgadas.

A QBP Juana Calderon Amador, por la ayuda y asesoría en las técnicas realizadas.

A las personas del Laboratorio de Inmunología Celular del CINVESTAV (Mónica, Adriana, Raquel, Selene, Gina, Miguel, Rene y Alex), por su amistad, compañía, bromas y enseñanzas; pero sobre todo por darme la oportunidad de pertenecer a un gran grupo de trabajo.

A Julia Reyes y David González, por sus consejos y enseñanzas.

A Dr. Sem Saeland y Dr. Serge Lebecque por el anticuerpo donado y utilizado en la presente tesis.

A DGAPA (PAPITT IN(221799) por la Beca-Tesis otorgada.

A todos los Maestros que han sido parte de mi formación en todos estos años.

DEDICATORIA

El "librito" que ahora tienen en sus manos ha sido realizado con el esfuerzo de infinidad de personas que a través de los años me han inculcado lo mejor. A todos ustedes les dedico el presente escrito.

A mi Familia, por ser mi inspiración y mis pilares, por el apoyo y confianza, por todo. . .

A Ma' Pime y mis tíos Balderas (Cristina, Gustavo, Jorge y Pepe) y sus respectivas familias, por el apoyo recibido en los momentos difíciles.

A las Carrillo, Cuca y familia, Blanca, por verme crecer, por todo el apoyo, por acompañarme en mis triunfos, por los grandes momentos de alegrías y tristeza juntos.

A Alejandra Rendón y Damaris Reyes, mis hermanas mayores, por todo el apoyo y cariño, por todos los grandes momentos juntos, pero sobre todo por estar.

A Luis Felipe Carillo y Donovan Perales, por ser mis hermanos mayores y acompañarme siempre en las buenas y en las malas.

A Yue por llegar en un momento de entropía, por estar presente y apoyarme, pero sobre todo por lo que viene.

A mi madrina Tete, por ser una gran persona, por sus consejos, pero sobre todo por confiar.

A mi tía Guille, a Monse y Vere, por acompañar me y ser grandes personas.

A mi tío Domingo y mi tío Pepe por sus consejos y apoyo.

A mis amigos y compañeros de carrera; Chibebo, Luja y Antalia por dejarme saber que cuento con ustedes en las buenas y en las malas. Yemo, Agustin, Maese, Buzo, Caro, Chavito, Erica, Mine, Vero, Secre, Isrry, Carla, Corina, Adriana, Benjamin, Gamboa, Mario, Fam. Prangana y los que me faltaron.

A los del Club de Exploraciones México (CEMAC), por todos los ratos compartidos de en la escalada, por dejarme aprender.

A Lucia, Lucy, Manuel, Quique, Erick, Juan Carlos, por todos los años juntos y por enseñarme a estar "Siempre listo".

A la Fam. Salazar-Hernández por el apoyo y cariño durante este tiempo.

A "Salas" por todos esos grandes años. . .

IZT.

INDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	2
<u>RESUMEN</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	3
<u>INTRODUCCIÓN</u>	4
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	17
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	17
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	17
<u>RESULTADOS</u>	19
<u>DISCUSIÓN</u>	33
<u>CONCLUSIONES</u>	38
<u>LITERATURA CITADA</u>	39
<u>APÉNDICE 1</u>	42
<u>APÉNDICE 2</u>	44

Abreviaturas

Ag	Antígeno.
APC	Células presentadoras de antígenos.
BG	Gránulos de Birbeck.
BSA	Albúmina sérica bovina.
CaCu	Cáncer cérvico uterino.
CD	Del inglés " <i>Cluster of Differentiation</i> ".
DAB	3-3' Diaminobenzidina.
DC	Células Dendríticas
DNA	Acido desoxirribonucleico.
FDC	Células Dendríticas foliculares.
HPV	Papiloma virus humano.
HTA	Histerectomía total abdominal.
IHQ	Inmunohistoquímica.
IL	Interleucina.
INFγ	Interferon gama.
Lc B	Linfocito B.
Lc T	Linfocito T.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical.
ORF	Marcos abiertos de lectura.
PAP	Papanicolau.
PBS	Solución amortiguadora salina-fosfatos.
RER	Retículo endoplásmico rugoso.
SAV-POX	Estreptavidina-peroxidasa.
TAP-1 y -2	Proteínas transportadoras de péptidos antigénicos.
TGIF	Tracto genital inferior femenino.
TNF	Factor de necrosis tumoral.
Zona "T"	Zona de transformación.

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS, EN DESPEGAMIENTO EPITELIAL DE CÉRVIX HUMANO.

Oscar Eduardo Balderas Carrillo.

Laboratorio de Inmunología, Unidad de Morfofisiología (UMF), F.E.S. Iztacala, UNAM.

RESUMEN

El cáncer cervicouterino (CaCu) sigue siendo causa de elevada morbilidad y mortalidad, reportándose alrededor de 200 000 muertes mundiales por año. En México en el año de 1998 murieron 4,545 mujeres mayores de 25 años por presentar CaCu. Hay evidencias que asocian la infección por Virus de Papiloma Humano (HPV) con el CaCu. Esta asociación es particularmente frecuente con los tipos virales 16 y 18. Observaciones clínicas y patológicas hacen ver la importancia de la respuesta inmune, sin embargo, conocemos poco sobre la respuesta *in situ*. Las células Dendríticas (DC) son las responsables de la presentación del antígeno a los linfocitos T vírgenes. El propósito del presente estudio consiste en identificar, caracterizar y cuantificar la distribución *in situ* de subpoblaciones potenciales de DC empleando tres marcadores moleculares (MHC-DR, CD1 y Langerina/CD207) en muestras humanas. Para ello tomamos fragmentos de 5 cérvix humanos normales, obtenidos de pacientes a las cuales se les realizó histerectomía y que contaban con estudios citológicos, histológicos, colposcópicos y de biología molecular negativos para infección por HPV. Las DC fueron identificadas por la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales contra MHC-DR, CD1a y Langerina/CD207, encontrando que las densidades promedio para cada marcador (MHC-DR, CD1a y Langerina/CD207) en el epitelio cervical humano normal son de 355 DC⁺/mm², 329 DC⁺/mm², y 210 DC⁺/mm² respectivamente.

PALABRAS CLAVE: Células Dendríticas, MHC-DR, CD1a, Langerina/CD207, Cáncer Cervicouterino.

ABSTRACT

In many parts of the developing world, cervical cancer continues to be a significant cause of both morbidity and mortality, with 200 000 deaths per year worldwide. In Mexico in 1998, 4 545 women died from this pathology. There are many evidences suggesting a causal link between Human Papilloma Virus (HPV) infection and cervical neoplasia. This link is strongest for certain HPV types, particularly types 16 and 18. Many clinical and pathological observations have pointed out the importance of immune responses, but not much is known about immune responses *in situ*. The Dendritic Cells (DCs) are responsible for antigen presentation to the T cells. The purpose of this study was to identify, characterize and quantify the distribution *in situ* of DCs using three molecular markers (MHC-DR, CD1a & Langerin/CD207). For this, 5 biopsies of normal human cervix were obtained from hysterectomized patients with normal cytology, histology, colposcopy and negative molecular biology tests for high-risk HPV infection. DCs were identified by immunohistochemistry using monoclonal antibodies against the MHC-DR, CD1a and Langerin/CD207. We found that the average numerical densities for the MHC-DR⁺, CD1a⁺ & Langerin/CD207⁺ DCs in the normal human cervical epithelium, were 355 DC/mm², 329 DC/mm² and 210 DC/mm², respectively.

KEY WORDS: Dendritic Cells, MHC-DR, CD1a, Langerin/CD207, Cervical cancer.

INTRODUCCIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un importante problema de salud en la mayoría de los países en vías de desarrollo, ya que de esta enfermedad mueren más de 200,000 mujeres anualmente en el mundo (Dell y Gaston, 2001). El CaCu ocupa el segundo lugar mundial en muertes dentro de los cánceres femeninos, afectando a la sociedad por la pérdida de mujeres productivas (Elkas y Farias-Eisner, 1998). En México el CaCu ocupa la segunda causa de morbilidad y mortalidad entre las 20 primeras causas de muerte. En el año de 1998 fallecieron 164,421 mujeres mayores de 25 años, de las cuales 4,545 (2.7%) fueron por CaCu (INEGI, 2000), cifra que se ha mantenido así desde la década de los 80's del siglo pasado.

El CaCu comienza con un largo periodo asintomático antes de que la enfermedad sea clínicamente evidente. La alta incidencia del cáncer cervical comparada con la baja incidencia de otros tipos de cáncer dentro del aparato reproductor femenino inferior (vagina y vulva).

La zona de transformación (zona "T") es una de las regiones más importantes del cérvix ya que es aquí en donde se originan del 80 al 85% de las lesiones precancerosas y cancerosas. En esta zona, ocurre una transformación del epitelio cilíndrico a pavimentoso (Fig 1).

Otra región anatómicamente importante del cérvix es el límite entre el epitelio metaplásico pavimentoso maduro e inmaduro, que resulta ser la línea donde el epitelio escamoso se encuentra con el epitelio cilíndrico, es decir, la unión

escamosocilíndrica, que a pesar de estar tan cercana a la zona "T" tiene una baja incidencia del cáncer dentro del cérvix.



FIG 1. Representación esquemática del cuello uterino a nivel de la unión escamosocilíndrica. El epitelio metaplásico escamoso ha reemplazado una porción del epitelio cilíndrico original, lo que conduce a la nueva zona de transformación. Obsérvese la presencia de quistes de Naboth y orificios glandulares persistentes. (Tomado de Copeland, 1998).

Histológicamente hablando, el cáncer se observa como una serie de complejas anomalías dentro del epitelio cervical (Richart y Barron, 1969). La displasia; lesión que algunas veces es precursora de malignidad, se caracteriza por pérdida de la uniformidad individual de las células epiteliales con cambios en la orientación estructural, variaciones en el tamaño y forma de las células, particularmente el núcleo muestra una desproporción con el citoplasma y es hiper Cromático, hay aumento de células con mitosis y estas se pueden ubicar hacia la superficie epitelial. (Jones, *et al.*, 1991).

En 1969 Richard R. nombró a estos cambios dentro del epitelio cervical como Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) tomando en cuenta tres grados (NIC I, NIC II y NIC III) (Fig 2).

El NIC I tiene por característica la presencia de células llamadas coilocitos, las cuales poseen una zona clara perinuclear de borde definido rodeada por citoplasma pálido de aspecto denso y vacuolado.

El siguiente estadio (NIC II), es caracterizado por presentar atipia en el estrato basal, un crecimiento de los núcleos debido, aparentemente, a un mayor contenido de DNA, se acentúa la característica del coilocito y la relación núcleo-citoplasma, dando así cambios a células atípicas.

Por ultimo, el NIC III, tiene los cambios celulares en todos los estratos del cérvix generando una displasia avanzada, estas alteraciones se consideran como carcinoma *in situ*. Dicho de otra forma, el epitelio plano cambia por células anormales y puede haber una extensión hacia la parte glandular pero nunca rebasa la membrana basal.

Todos estos procesos neoplásicos del cérvix, presentan una evolución muy lenta requiriendo de una década o más para pasar de una displasia leve hasta el cáncer *in situ*.

Cuando una lesión *in situ* progresa más allá de la membrana basal del epitelio se considera que es invasora, con potencial para crecer más y formar depósitos metastásicos. La primera fase de la invasión cervical ha sido denominada *carcinoma microinvasivo*, concepto formulado por Mestwerdt en 1947.

Desde entonces, muchos investigadores han intentado definir un cáncer de cuello uterino incipiente que tenga poco o ningún riesgo de diseminación más allá del cuello uterino y

que pueda ser tratado por un medio más conservador que un cáncer francamente invasor. Las definiciones del carcinoma microinvasivo suelen basarse en la profundidad de la invasión desde la membrana basal y la profundidad máxima varía entre 1 y 5 mm.

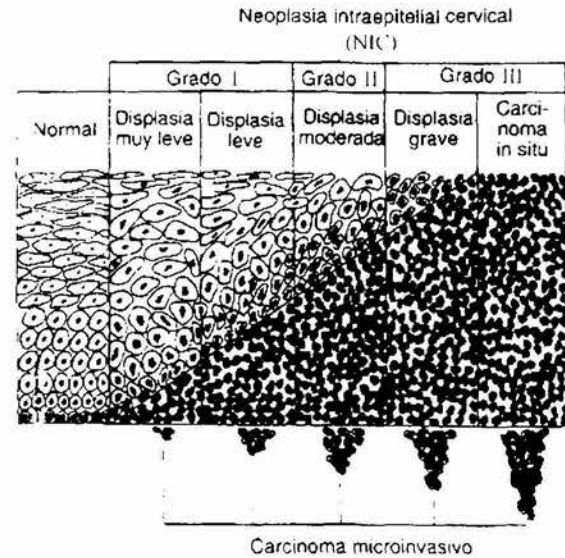


FIG 2. Representación esquemática de los precursores del cáncer del cuello uterino. Los grados I, II y III del NIC corresponden a la displasia muy leve a leve, a la displasia moderada y a la displasia grave hasta el carcinoma *in situ* respectivamente. (Tomado de Copeland, *op cit.*).

Las diferencias en los enfoques terapéuticos y los métodos de medición tumoral hacen difícil la comparación de los resultados de los informes clínicos en la literatura. No obstante, hay información para sugerir que cuando la lesión invade menos de 3 a 5 mm el riesgo de diseminación se encuentra entre el 1 y 13%.

La mayoría de estas displasias son diagnosticadas después de los 20 años de edad. El cáncer *in situ* se presenta de manera significativa entre los 30 y 39 años y el carcinoma microinvasivo después de los 40 años.

En la literatura existen numerosas referencias que asocian a este cáncer con múltiples factores dentro de los cuales podemos mencionar:

- Relaciones sexuales a edad temprana.
- Pareja sexual masculina perteneciente a un grupo de alto riesgo.
- Múltiples parejas sexuales.
- Embarazos múltiples.
- Raza.
- Nivel socioeconómico.
- Dieta (Deficiencia vitamínica).
- Tabaquismo.
- Infecciones por protozoarios, bacterias y virus como el herpes.
- Infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV).

A mediados de los años 70's, Zur Hausen sugirió una asociación entre los papiloma virus y el cáncer genital. La observación hecha por Meisels y colegas indican que la infección del cérvix por papilomavirus humano (HPV) produce NIC de bajo grado (Fields, 1996).

Ahora es claro que las infecciones del aparato reproductor por los diferentes tipos del papilomavirus están entre las infecciones sexuales más prevalentes y los denominados de alto riesgo están relacionados a carcinomas de células escamosas.

Los papilomavirus son agrupados taxonómicamente junto con los poliomavirus en la familia de los papovavirus. Hasta el momento han sido identificados más de 120 tipos diferentes de HPV (Mougin, *et al.*, 2000), pero solo cerca de 25 infectan la mucosa del tracto genital inferior femenino (TGIF), por tal motivo son agrupados de acuerdo a su

patogenicidad en bajo, mediano y alto riesgo (Tabla 1).

Tabla 1. Tipos de HPV, clasificación y su asociación con enfermedades.

Categoría de riesgo	Patología clínica	Tipo de HPV
Bajo	Condiloma cervical, NIC I.	-6,-11,-26,-42,-43,-44,-53,-54,-55,-62,-66.
Medio	Todos los grados del NIC.	-30,-31,-33,-35,-39,-51,-52,-58,-59,-68.
Alto	50-80% de NIC II y III. 90% de los cánceres.	-16,-18,-45,-56.

Modificado de Lorincz, *et al.* 1992; Arends, *et al.* 1998.

Los HPV (Fig 3) son pequeños, miden de 52 a 55 nm de diámetro, con una simetría icosaédrica, compuestos por 72 capsómeros y una doble cadena de DNA circular cerrado, de aproximadamente 8,000 p.b.

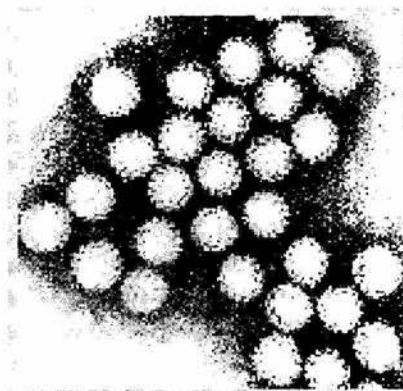


FIG 3. Micrografía electrónica del HPV-16. (Tomado de <http://www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html>).

El genoma viral está dividido en una región de aproximadamente 4.5 k.b. llamada región temprana (early; E), que codifica a los genes que se requieren para la replicación del DNA viral y para la transformación celular; la región tardía (late; L) es la que se encarga de codificar las proteínas de la cápside y está compuesta por 2.5 k.b. También se encuentra una región de regulación (LCR) de cerca de 1 k.b. la cual contiene el origen de la replicación y elementos de control para la transcripción y replicación (Fig 4).

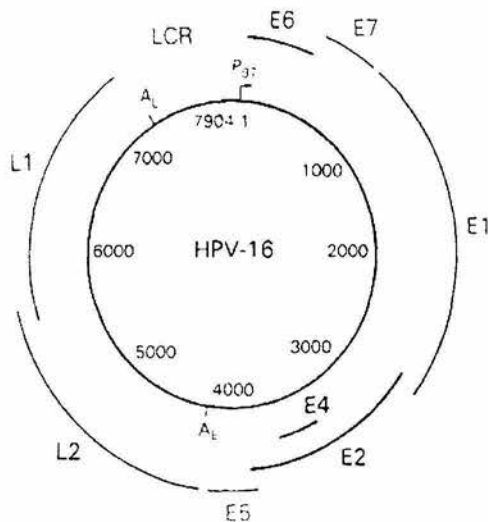


FIG 4. Mapa genómico del HPV-16. La transcripción ocurre en sentido de las manecillas del reloj. Los ORF son designados de E1 a E7, L1 y L2 (Tomado de Fields, *op cit.*).

Así mismo, el genoma viral contiene marcos abiertos de lectura (ORF) que son regiones potenciales para la codificación de proteínas, sabiendo que para la región temprana existen 8 (E1 a E8) y dos para la región tardía (L1, L2) (Fields, *op cit.*); las funciones que presentan los ORF se describen brevemente en la Tabla 2.

Tabla 2. Funciones asignadas a los ORF de los HPV.

ORF	Función
L1	Proteína L1, que constituye el 80% de la cápside.
L2	Proteína L2, constituyente menor de la cápside. Función no clara aún.
E1	Iniciador de la replicación viral.
E2	Proteína reguladora de la transcripción, con un papel auxiliar en la replicación viral.
E3*	Función desconocida.
E4	Proteína tardía, similar a L1. Favorece el ciclo viral en la célula infectada.
E5	Proteína transformadora de membrana.
E6	Proteína de transformación de los HPV, degrada a p53.
E7	Proteína de transformación de los HPV, se une a la proteína del retinoblastoma.
E8*	Función desconocida.

*Reportados únicamente para el conejo cola blanca (cottontail rabbit).

Desde hace varias décadas, cuando se descubrió el vínculo existente entre la infección cervical por HPV y el CaCu, se han realizado numerosos estudios inmunológicos tratando de aclarar la participación de la respuesta inmune en la infección y la progresión hasta carcinomas. Estos abarcan desde la respuesta inespecífica por parte de las células del epitelio, seguido por la búsqueda de anticuerpos contra proteínas del HPV, la respuesta de las células T a la infección del virus y la búsqueda de las células presentadoras de antígenos en el epitelio, todo ello para saber cuál es el papel potencial del sistema inmune, así como su posible modificación con fines terapéuticos.

En los seres humanos este sistema juega un papel primordial, ya que es el encargado de generar múltiples respuestas de alta especificidad, tanto humorales como celulares contra agentes patógenos. Así mismo, este sistema elimina a las células que mueren naturalmente por el proceso de apoptosis e identifica y destruye a las células malignas tumorales, además participa en las enfermedades por inmunodeficiencias, rechazo a tejidos, órganos transplantados, en alergias y en las llamadas enfermedades de hipersensibilidad (Paul, 1999).

Para cumplir con todas estas tareas el sistema inmune se compone de órganos linfoides primarios, como el timo y la médula ósea; los secundarios, que son el bazo, los ganglios y los nódulos, así como por distintos tipos celulares. Todas las células del sistema inmune se originan en la médula ósea a partir de una célula madre totipotencial y maduran en los órganos linfoides primarios; los linfocitos T en el timo, y el resto en la propia médula ósea. Una de las células mononucleares que son de importancia por ser presentadoras de antígeno, mediadoras de la respuesta inmune y además de interactuar con los Linfocitos (Lc) T y B son: los monocitos, los macrófagos y las células Dendríticas (DC). Las células con característica polimorfonuclear originan a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos; por último, los megacariocitos, células que originan a las plaquetas, también participan en la respuesta (Fig 5).

Las células del sistema inmune se encuentran en todo el cuerpo y sus funciones están supeditadas a mediadores bioquímicos llamados citocinas, de las cuales se han descrito un gran número. Por ejemplo los Linfocitos Th1 producen interleucina 2 (IL2), interferón gama

(IFN- γ), factor de necrosis tumoral (TNF); mientras que Th2 produce las interleucinas (IL) 3, 4, 5, 6 y 10, hay otras citocinas de gran importancia y son las que producen los macrófagos, células presentadoras de antígeno, LcB y células endoteliales (Paul, *op cit*).

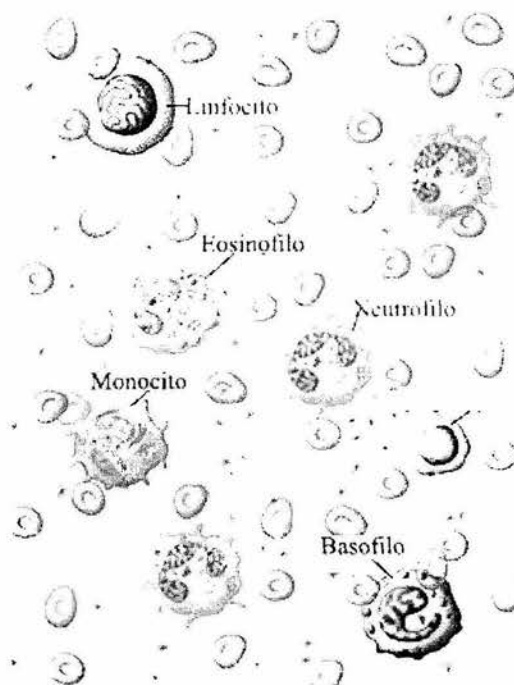


FIG 5. Células que componen el sistema inmune, entre las cuales podemos encontrar a los linfocitos, neutrófilos, basófilos y eosinófilos, entre otros. (Tomado de <http://www.whfreeman.com/immunology/>).

Otra función importante de las citocinas es la de controlar los niveles de expresión de moléculas que participan en la presentación de antígenos, así como el regular la proliferación y activación de las células presentadoras de antígenos (APC).

Las principales APC que se conocen por utilizar diversos mecanismos para presentar en su membrana los epítopos de moléculas extrañas, son células nucleadas infectadas, monocitos/

macrófagos, LcB, células endoteliales, células aberrantes, células dendríticas foliculares y las células Dendríticas que se encuentran diseminadas en todo el organismo.

Descritas por Langerhans en 1868, las células Dendríticas (DC) reciben su nombre por la morfología distintiva que tienen las prolongaciones membranales a las cuales se llama dendritas (Fig. 6). Pero no fue hasta 1973, cuando Steinman y Cohn las establecieron como potentes estimuladoras de la respuesta inmune primaria (Hart, 1997).

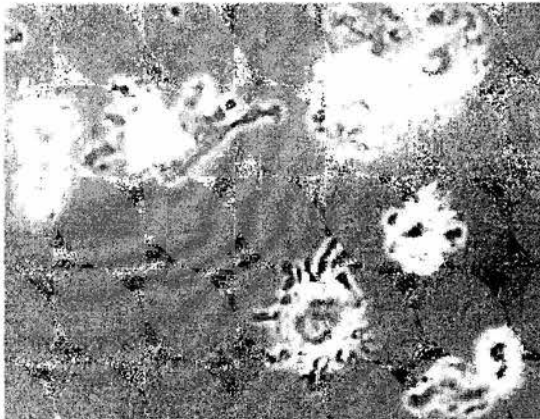


FIG 6. Imagen de células Dendríticas *in vivo* derivadas de monocitos, vistas en un microscopio de contraste de fases (Tomado de <http://www.geocities.com/artscience/idc-1.html>).

Estas células, como todas las demás del sistema inmune, provienen de una célula madre totipotencial de médula ósea, sin incluir a las células dendríticas foliculares (FDC) que tienen un origen mesenquimal. El precursor de las DC se

IZT.

consideró en un principio de origen mieloide (Randolph, 1998), grupo en el cual podemos encontrar a los monocitos/macrófagos y granulocitos; pero evidencias recientes sugieren también otro origen para las DC, las que provienen del linaje linfóide (Fig 7). Basándonos en estas evidencias se puede decir que existen al menos 3 linajes de origen para las DC (Vandenabeele y Wu, 1999).

Las DC ahora son conocidas como las más especializadas o profesionales APC, comparadas con otras como monocitos/macrófagos o LcB; ya que juegan un papel clave en generar la respuesta inmune primaria y secundaria contra antígenos específicos, dando así una eficiente estimulación a los LcT y LcB (Banchereau y Steinman, 1998; Di Nicola y Lemoli, 2000; Steinman, 2000; Stockwin, *et al.*, 2000) estableciendo así una respuesta y memoria inmune.

Estas células cuentan con diversos nombres según su localización en el cuerpo; en la piel y mucosas son llamadas células de Langerhans; en la linfa se llaman células veladas; en órganos como corazón, riñón e intestino, son conocidas como células intersticiales; y a las que se encuentran entre los LcT de los órganos linfoides son llamadas células interdigitantes; representando así del 0.5 al 1% de los leucocitos en sangre circulante (Caux, Yong-Jun y Banchereau, 1995; Hart, *op cit.*, Flores-Romo, 2001).



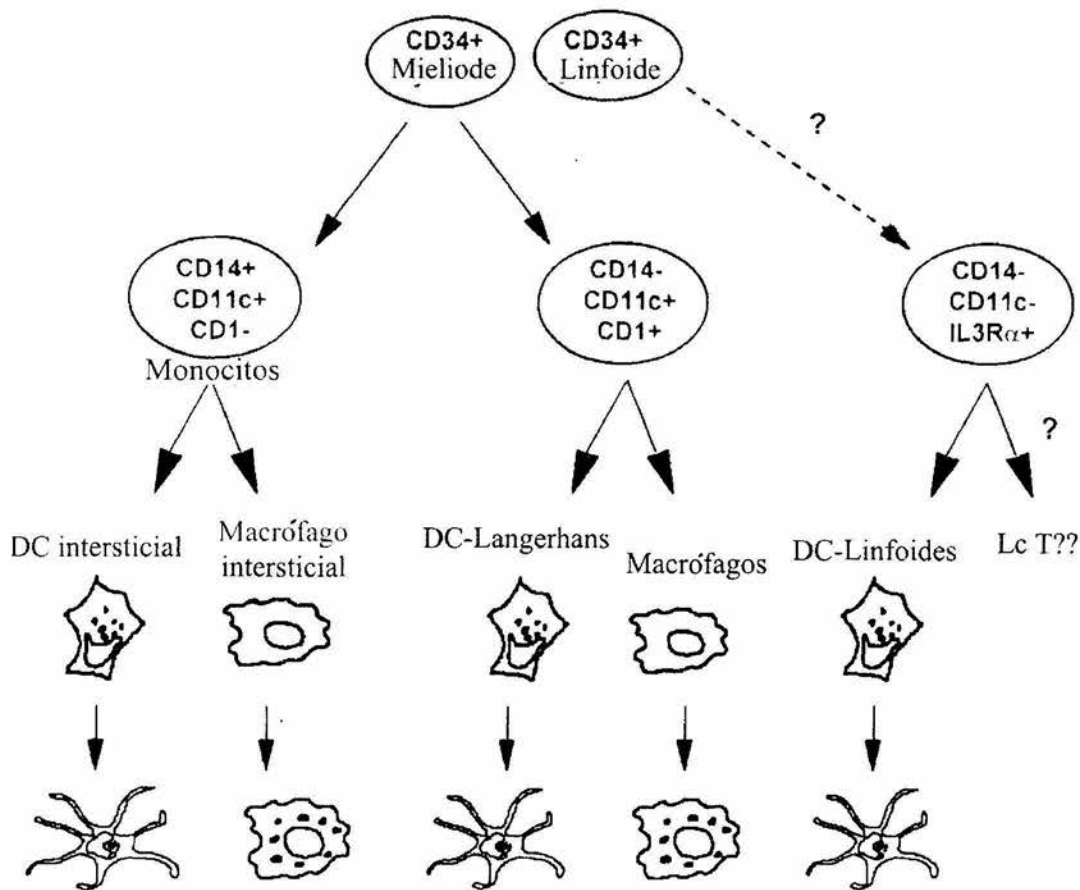


FIG 7. Linajes de origen de las DC y macrófagos (tomado de Banchereau, *op cit.*).

El estadio en el cual podemos encontrar a las DC en estas zonas o tejidos periféricos es el “inmaduro”, y son muy eficientes en capturar antígenos, proceso que pueden hacer por diferentes vías (Tabla 3) como: a) macropinocitosis, b) endocitosis mediada por receptor (Fc ϵ R y Fc γ R), c) receptor de manosa y DEC 205, y d) fagocitosis (Bell, Young y Banchereau, 1999; Banchereau, *et al.* 2000; Clark, *et al.* 2000; Rescigno, *et al.* 1999). En este estadio, las DC son poco eficientes para activar Lc T.

Recientemente se caracterizó otro marcador específico para las DC, denominado Langerina, ahora conocido como CD207. Esta molécula es una lectina transmembranal de tipo II

dependiente de Ca⁺⁺, con un dominio de reconocimiento a un carbohidrato sencillo de unión específica a manosa y con una región intracelular rica en prolina (Valladeau, *et al.*, 2000). La presencia de Langerina/CD207 promueve la aparición de estructuras similares a los gránulos de Birbeck (BG), lo cual sugiere que pudiera ser un receptor fagocítico.

Posterior a la eficiente captura de antígenos, las DC procesan éstos, mientras la célula migra a los órganos linfoides, y los péptidos resultantes de este procesamiento son ensamblados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II y clase I (Rovere, *et al.*, 1998; Saudrais, *et al.*, 1998).

Tabla 3. Diversas vías utilizadas para la captura del antígeno.

Mecanismo	Ag. Capturado
a) Macropinocitosis	Proteínas solubles en el líquido extracelular, embebidas inespecíficamente durante la pinocitosis
b) Endocitosis mediada por receptor (FcεR y FcγR)	Partículas pequeñas o proteínas individuales enlazadas a la superficie celular.
c) Fagocitosis por receptores (Manosa, DEC 205 y Langerina)	Glicoproteínas, partículas pequeñas y bacterias.
d) Fagocitosis	Células apoptóticas

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las moléculas de clase II son glucoproteínas transmembranales y están formadas por un heterodímero de dos cadenas, la cadena α con un peso de 35 kDa y la cadena β con un peso de 28 kDa, ambas cadenas cuentan con dos dominios extramembranales α1-α2 y β1-β2 respectivamente, los cuales se encuentran unidos por puentes disulfuro intracatenarios (Fig 8).

Estas moléculas son sintetizadas por ribosomas y ensambladas en el retículo endoplásmico rugoso (RER), trasladándose hacia la membrana del RER conforme se producen, de tal manera que cuando la síntesis se completa, la mayor

parte de cada proteína hace proyección al interior de la luz del retículo y su carboxilo terminal permanece unido a la membrana.

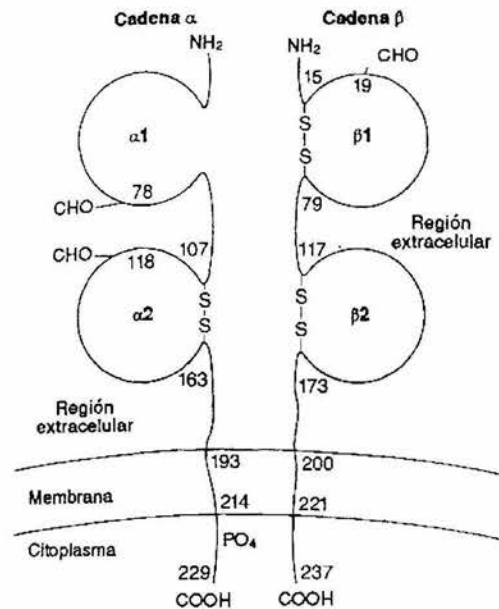


FIG 8. Representación esquemática de la molécula del MHC de Clase II. (Tomado de Stites, 1996).

El procesamiento de antígenos por la vía endocítica y la presentación dentro de las moléculas MHC de clase II (Fig 9), consiste inicialmente en desnaturalizar gradualmente al antígeno por la exposición a un pH ácido y a enzimas proteolíticas celulares dentro del lisosoma. Resultado de esto es que en el nicho formado por α1-β1 de la molécula del MHC II, se pueda contener a un péptido antigénico de 12 a 20 aminoácidos de tamaño.

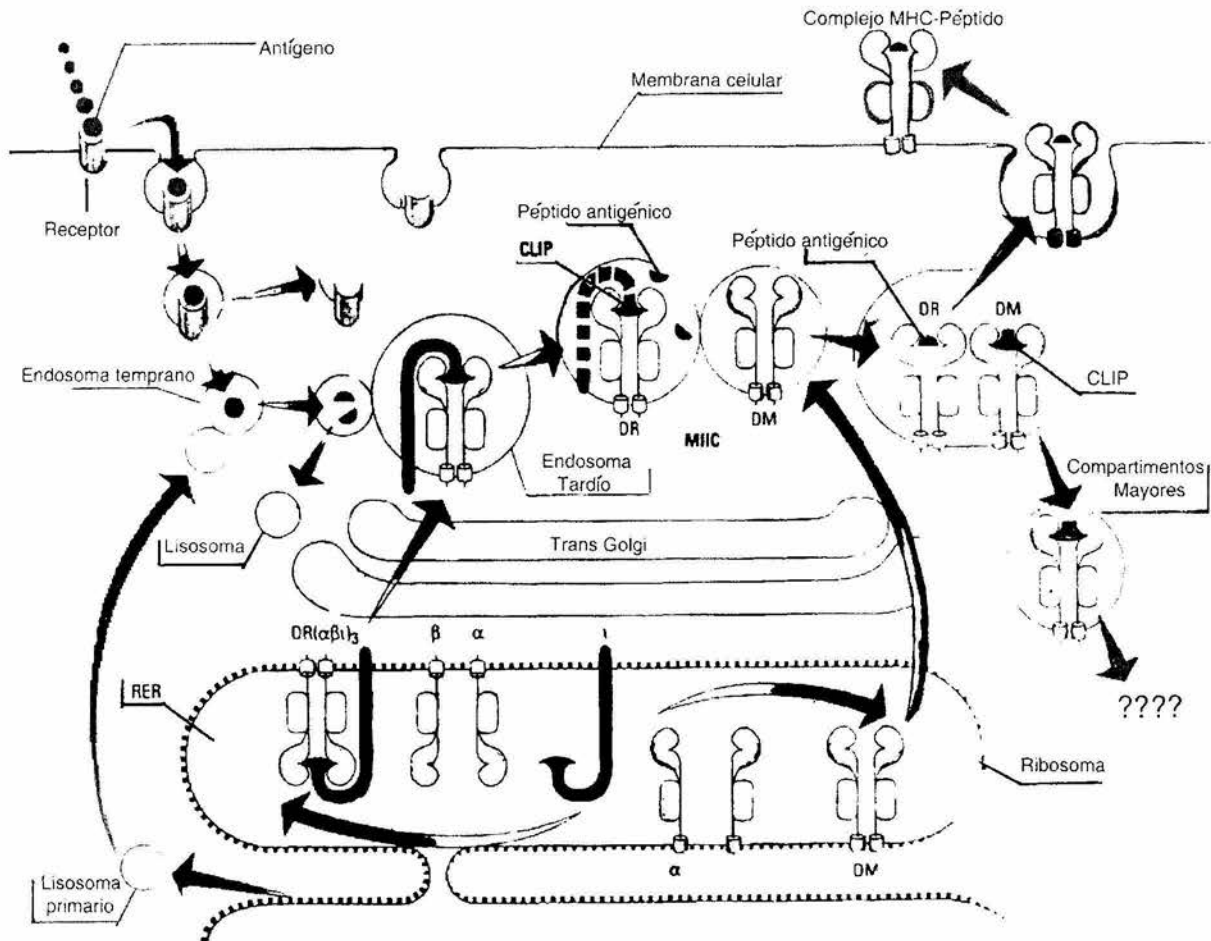


FIG 9. Esquema de eventos ocurridos después de la activación de las DC debido a la captura antigénica, en donde se esquematiza el procesamiento y presentación para la vía endocítica o de clase II (Tomado de Klein, J. y V. Horejsi, 1997).

En las DC, la mayor expresión intracelular de la molécula de clase II se encuentra en las estructuras endosomales tardías, con numerosas vesículas y láminas internas, conocidas conjuntamente como compartimentos mayores del MHC de clase II (MIIC). Estos compartimentos contienen moléculas que han sido recién sintetizadas y que contienen en su estructura a la cadena invariante (Ii), así mismo contienen moléculas DM, las cuales remueven el péptido que es resultado de la degradación de la Ii (CLIP) y que promueven la formación

estable del complejo MHC-péptido (Fig 9).

Este último se expresa en la membrana de la célula, para así ser reconocido por los LcT (vírgenes o de memoria) $CD4^+$ específicos.

Existen también compartimentos menores, en donde se encuentran los endosomas tempranos que se encargan de contener a las moléculas maduras del MHC de clase II, las cuales fueron internalizadas y recicladas de la superficie celular.

Una característica que distingue a las DC como excelentes APC es que una sola célula puede estimular de 100 a 3000 células T vírgenes (Stockwin, *op cit.*; Bhardwaj, *et al.*, 1993); también se sabe que las DC pueden expresar en su superficie 1×10^6 moléculas de clase II (Pierre, *et al.*, 1997).

La otra vía de procesamiento y presentación de antígenos se da por medio de la molécula del MHC de clase I. También es una glucoproteína transmembranal con un peso de 40 a 45 kDa y presenta una región con tres dominios extramembranales ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), y otra región citoplasmática pequeña. Los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ interaccionan sin establecer uniones fuertes, con una proteína llamada β_2 -Microglobulina (Fig 10).

Esta vía es conocida como citosólica y clásicamente se considera que las proteínas antigénicas presentadas son de patógenos que se encuentran dentro de células infectadas. Estos se multiplican dentro del citoplasma utilizando los nutrientes celulares para sintetizar sus antígenos, formando así parte de las estructuras del hospedero. Dichos antígenos no proceden del exterior y por lo tanto no necesitan ser fagocitados para quedar dentro del citoplasma, en esta categoría no sólo se incluye a los virus, sino también algunas bacterias y parásitos intracelulares.

También existen componentes estructurales de la célula que sufren modificaciones por diferentes causas y pueden utilizar esta vía para que sea identificada por células especializadas como los LcT.

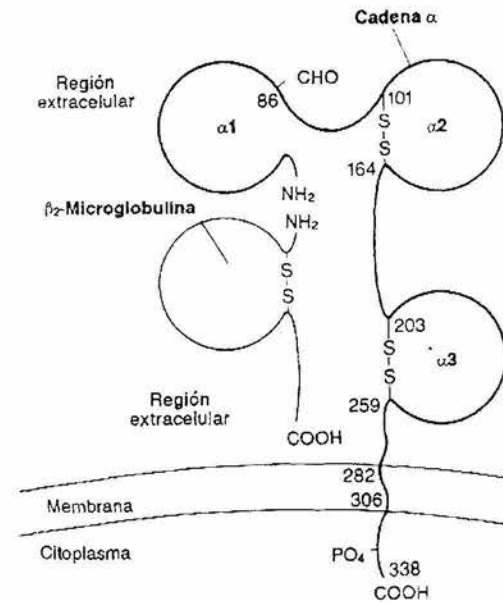


FIG 10. Representación esquemática de la molécula del MHC de Clase I. (Tomado de SITES, *op cit.*)

En este caso, la ruptura de las proteínas antigénicas se produce en el citosol dentro de los proteosomas. Durante el proceso de proteólisis, los proteosomas liberan una cantidad abundante de pequeños péptidos al citosol; después los péptidos son seleccionados y migran hacia el interior del RER junto con proteínas transportadoras de péptidos antigénicos (TAP-1 y TAP-2), estas proteínas bombean una amplia variedad de péptidos; posteriormente estos péptidos se ensamblan en el nicho de la molécula del MHC de clase I, el cual está formado con la estructura del dominio $\alpha 1$ - $\alpha 2$. En este nicho se pueden albergar péptidos que pueden ir de 8 a 12 residuos de aminoácidos. Posteriormente se lleva a cabo su presentación a LcT CD8⁺.

La vía citosólica es la que asegura la muerte de la célula infectada, lo cual ayuda a limitar la propagación del patógeno en su interior.

Respecto a la presentación de antígenos no proteicos, éstos sugieren un mecanismo similar al llevado por el MHC de clase II, pero independiente a las vías de ensamble utilizadas por el MHC. El nicho que se forma en la molécula del CD1 (Fig 11), es de una estructura muy semejante a las moléculas del MHC de clase I, pero sin polimorfismo.

El linaje de la molécula CD1, está filogenéticamente relacionado con las moléculas presentadoras de antígenos, ya que comparando las secuencias de aminoácidos y su estructura con la molécula del MHC de clase I, es muy parecida (Martín, *et al.*, 1986; Porcelli, 1995). Esta similitud hace suponer que ambas familias puedan divergir de un mismo gen ancestral, cercano a los precursores de las moléculas actuales del MHC de clase I y II.

En el humano, la molécula CD1 es una familia de cinco genes que se encuentran en el cromosoma 1, de estos cinco genes, sólo cuatro son expresados como proteínas (Martín, *et al.* 1987; Blumberg, *et al.* 1991; Bilsland y Milstein, 1991). Estas proteínas representan distintas isoformas y son llamadas CD1a, -b, -c y -d. Aunque se ha demostrado que el quinto gen del CD1 en el humano (CD1E) sí se transcribe, no se ha identificado su proteína ni su función.

La expresión de las proteínas de CD1 ha sido estudiada en el humano. El grupo I, que incluye al CD1a, -b, -c, fue identificado con marcadores de diferenciación expresados en timocitos inmaduros corticales. Ahora se sabe que

esas proteínas son también expresadas en una amplia variedad de células presentadoras de antígenos, especialmente en las células dendríticas de la piel (Porcelli, *op cit.*). El grupo II, que incluye al CD1d, se expresa numerosamente en células hematopoyéticas (timocitos). La expresión del CD1d en DC está aún muy poco estudiada, en comparación con CD1a del grupo I.

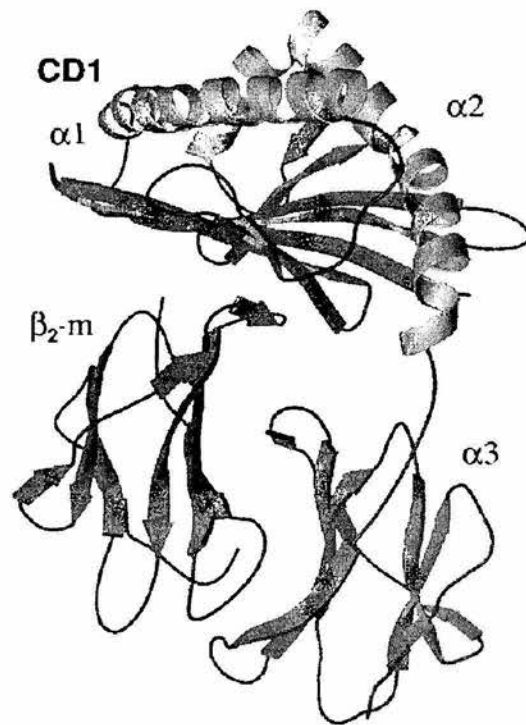


FIG 11. Estructura cristalográfica de la molécula CD1 (Tomado de Porcelli, *et al.* 1998).

A partir de que las DC procesan el antígeno, se inicia un proceso de maduración (Fig 12) entendiéndose que la madurez es un cambio de la captura antigénica a la presentación del antígeno. Durante este proceso estas células migran hacia los tejidos linfoides donde la presentación del antígeno se lleva a cabo en presencia de los LcT (vírgenes o de memoria).

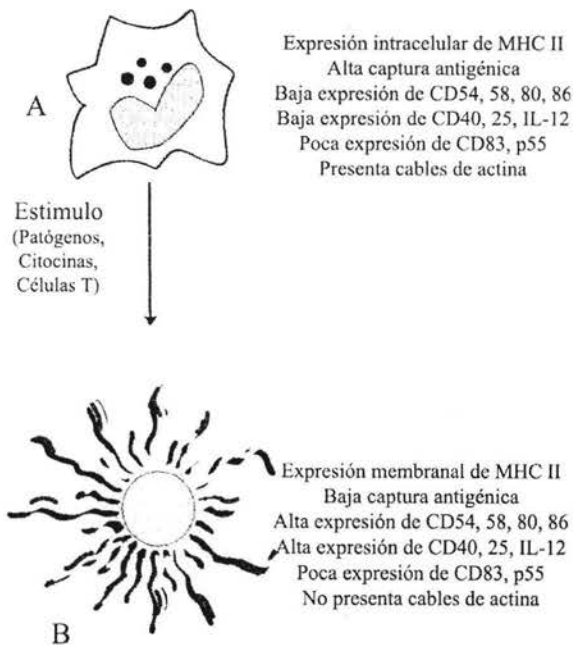


FIG 12. Cambios durante la maduración de la DC. A) Muestra una DC "inmadura", con algunas características distintivas. B) DC madura. Nótese que en el estadio maduro, la DC se vuelve más grande y proyecta varias prolongaciones membranales (Tomado de (b)Banchereau, *op cit*).

Al realizar la interacción con los LcT la DC se vé envuelta en un proceso de cambios producidos por las moléculas de su superficie debido a la reubicación de los antígenos de diferenciación (Fig 13), teniendo como resultado que las células T se activen y se inicie así la respuesta inmune; pero si las DC migran hacia el bazo e interactúan presentando directamente antígenos a los LcB, participan en la inmunidad humoral como una célula mediadora de la misma (Wykes, 1998).

Las DC también tienen la capacidad de estimular una respuesta a otros tipos celulares como macrófagos y células endoteliales. Después de esto, en

su membrana hay un cambio en la reubicación de los antígenos de diferenciación también llamados CD.

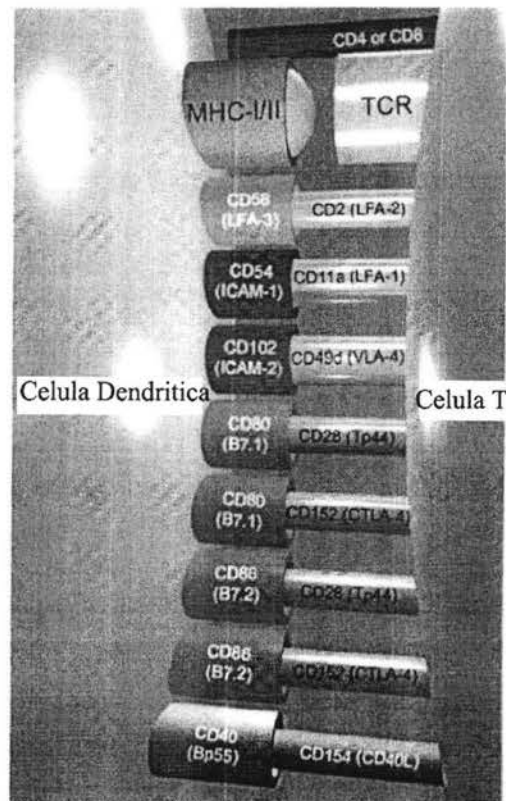


FIG 13. Interacción de DC con LcT. El complejo MHC I/II-Péptido antigénico es reconocido por el LcT, que a su vez es activado por moléculas de estimulación, las cuales comunican a la célula la presencia de un antígeno que "amenaza" al sistema. (Tomado de Stockwin, *op cit*).

Los CD, son un conjunto de glucoproteínas que aparecen como receptores en la membrana celular a medida que van madurando o cuando se activan algunas de sus funciones. Estas moléculas reciben el nombre de CD por sus siglas en inglés *Cluster of Differentiation*, esta nomenclatura se dió por primera vez en Francia durante el primer congreso internacional de antígenos de diferenciación de leucocitos humanos en el año de 1982 (Bernard y

Boumsell, 1984; Mason, 2001). Estas moléculas CD por su producción y expresión en la membrana, nos han ayudado mucho, entre otras cosas, a clasificar o identificar a las células del sistema inmune.

Hasta el momento se conocen más de 200 moléculas CD, todas ellas han sido identificadas, purificadas y utilizadas para obtener anticuerpos monoclonales para así facilitar la identificación de células del sistema inmune. Las funciones biológicas que realizan este tipo de antígenos son muy variadas, algunos son receptores para citocinas, antígenos, anticuerpos y otros son componentes del sistema de complemento. Otros sirven para la comunicación entre células, y otras como moléculas de adhesión.

Las células Dendríticas expresan varias moléculas CD: como CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), CD102 (ICAM-2) (Fong, y Engleman, 2000), CD49a,d,c,f (VLA-1,4,5,6) y CD44 (Shurin, 1996); también presentan moléculas de coestimulación como CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2); así mismo podemos encontrar entre otras moléculas al CD25, CD83, CD1 y CD 207/Langerina.

A ciencia cierta no se sabe qué ocurre con las DC después de que se realiza la presentación en los órganos linfoides; aunque se asume que mueren después de esta acción, se cree que algunas pocas salen del órgano al torrente sanguíneo o simplemente se convierten en otra clase de célula (Flores-Romo, *op cit.*).

Existen pocos trabajos en la bibliografía que usan diferentes técnicas para la detección de DC en el epitelio

cervical, estos trabajos a su vez son controvertidos debido a los diferentes métodos utilizados para calcular la densidad y observar su distribución; teniendo que varios investigadores alrededor del mundo estén interesados en el estudio de la población de DC desde 1980.

En los trabajos de Pope y *cols.* en 1998 observaron la distribución y densidad en células del sistema inmune, entre ellas las células dendríticas. Por inmunohistoquímica (IHQ) en cortes histológicos convencionales de cérvix humano normal de las zonas de ectocérvix, zona "T" y endocérvix utilizando anticuerpos contra MHC-DR y CD1 en 29 pacientes a las cuales se les sometió a histerectomía abdominal (HTA), encontrando que las densidades de las DC son las mismas tanto en ectocérvix como en la zona "T".

Así mismo en 1999 Connor *et al.*, evaluaron células dendríticas en cortes histológicos del cérvix de mujeres normales y con NIC de grados I, II y III; reportan con la técnica de IHQ en cortes histológicos convencionales con el marcador CD1, que no hay parámetros diferentes en el número de células.

La reciente caracterización de Langerina/CD207 en ratón [(b)Valladeau, *et al.* 2002] y en humano (Valladeau, *op cit.*), da la pauta para entender la función de los gránulos de Birbeck (BG); pero sólo los estudios en el 2002 por Mc Dermott y sus colaboradores, reportan la relación de la Langerina/CD207 con los BG en DC humanas epidermales, sin existir reportes sobre la expresión de esta molécula en otras partes del cuerpo humano incluyendo el cérvix.

El papel de las DC como APC profesionales aún se desconoce en la mayoría de las enfermedades, lo que ha dado la pauta para estudiar su función y posiblemente en el futuro puedan ser utilizadas en terapéutica.

Respecto a infecciones virales, la función de las DC radica en modular la respuesta de los LcT para así producir una respuesta inmune. Hasta el momento no hay trabajos en la bibliografía que reporten la técnica de IHQ para identificar células dendríticas en capas epiteliales en la zona del cérvix, de ahí el interés en buscar las DC en láminas epiteliales durante la ausencia del HPV de alto riesgo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *in situ* las diferentes poblaciones de DC empleando tres marcadores moleculares (MHC-DR, CD1a y Langerina/CD207), en muestras de cérvix humano normal, sin infección con HPV.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica de separación epitelial en capas mediante colagenasa-dispasa.
2. Estandarizar la técnica de IHQ en capas epiteliales del cérvix.
3. Cuantificar la densidad de DC por área de tejido (mm²), para cada marcador.

Para el cumplimiento de estos objetivos se realizó el siguiente protocolo metodológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de cérvix fueron obtenidas de mujeres portadoras de miomatosis uterina asintomática, a las cuales se les realizó histerectomía total abdominal (HTA), en el Hospital de Ginecología y Obstetricia "Tlatelolco" según los criterios descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Criterios para la obtención de muestras.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN		
Consentimiento del médico tratante y del patólogo.		
	Edad.	18-60
	Histopatología.	*Neg
*MOR	Citología (PAP).	*Neg
	Colposcopia.	*Neg
*MOL	Captura de híbridos II.	*Neg

*MOR (morfológica), *MOL (Molecular), *Neg (negativo para la infección por HPV).

Las muestras se trasladaron al laboratorio en solución amortiguadora salina-fosfatos (PBS) a 4°C (Apéndice 1), para proceder a separar las capas epiteliales. El fragmento de cérvix se cortó en pequeños trozos los cuales se colocaron en colagenasa-dispasa (Apéndice 1) y se incubaron entre 15 y 20 min. a 37°C.

Posteriormente se lavaron las muestras con la solución amortiguadora tres veces durante 10 min. y se separó el epitelio con fórceps fino. Los fragmentos de epitelio que fueron desprendidos se fijaron en paraformaldehído 2%-PBS 1x (Apéndice 1) por un período de 4 hrs a 4°C.

Al termino de la fijación, los tejidos se lavaron con solución amortiguadora tres veces durante 10 min. y se inició la IHQ (Koszik, 1994; Flores, 2001; Heras, 2001; Lopez, 2001) con algunas modificaciones para adecuarlas al tejido cervical. La IHQ se realizó con los marcadores MHC-DR, CD1a y Langerina/CD 207 (Apéndice 1).

El procedimiento fue el siguiente:

- A) A las muestras se les agrega H₂O₂ al 5% durante 60 min. a temperatura ambiente, para bloquear las peroxidases endógenas.
- B) Se lavan las muestras con la solución amortiguadora.
- C) Se agrega la solución de Triton 0.25% durante 60 min. este detergente se utiliza para permeabilizar el tejido.
- D) Se lavan las muestras.
- E) Se agrega solución de BSA al 3% durante 60 min. para bloquear inespecíficamente y así favorecer la unión específica de los anticuerpos utilizados.
- F) Nuevamente se lavan las muestras.
- G) Se agrega el primer anticuerpo diluido en BSA al 0.3%, incluyendo el control de isotipo como lo indica la siguiente tabla y se incuba a 4°C durante la noche (*overnight*).

MHC-DR	CD1a	Langerina	IgG
1:50	1:50	1:50	1:100

H) Después de la incubación se lavan las muestras con BSA 0.3%-Triton 0.25%.

I) Se agrega α -IgG de Ratón Biotinilado a una dilución 1:100 y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente.

J) Se lavan varias veces con BSA-Triton.

K) Se agrega Estreptavidina-peroxidasa (SAV-POX) y se incuba durante 40 min. a temperatura ambiente.

L) Se lavan las muestras.

M) Se agrega 3-3' Diaminobenzidina (DAB) y se observa al microscopio para parar la reacción cuando se vea perfectamente la marca y el control sea negativo.

N) Se lavan las muestras con H₂O destilada.

(NOTA: Los lavados se hacen en tres ocasiones durante un tiempo de 10 min. cada uno).

Las muestras con marca se contratiñeron con *Fast Green* al 30% utilizando una dilución de trabajo de 1:100 durante un período de 2 horas y posteriormente se realizó el montaje de muestras con immu-mount, algunas muestras se montan en dos cubreobjetos para la visualización de las células por ambas caras del epitelio (Nota: las muestras se pueden guardar a 4°C).

Posterior a esto, se cuantificaron las células para obtener la densidad por mm² por el siguiente método.

Se cuantifican los somas de las células con morfología dendrítica en 20 campos al azar, con el objetivo de 40x.

Con el número de células obtenido se calculó la densidad celular por área, para así obtener el número de células por mm². Se consideró la apertura del ocular y el aumento del objetivo utilizando la siguiente fórmula (Flores, *op cit.*; Heras, *op cit.*; Lopez, *op cit.*):

\emptyset = Apertura del ocular/Aumento del objetivo.

$$\emptyset = 18\text{mm}/40x = 0.45 \text{ mm}$$

$$0.45\text{mm} = 450\mu\text{m}.$$

Donde \emptyset = Diámetro.

$$A = \pi r^2$$

$$A = (3.141592654)(225\mu\text{m})^2$$

$$A = 159043.1281\mu\text{m}^2$$

Donde A = Área

Se hace una conversión de μm^2 a mm^2 , tomando en consideración que $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ equivale a 1 mm^2 .

Al obtener la densidad, se graficaron los datos para su interpretación y análisis.

RESULTADOS

Se obtuvieron muestras de 5 cérvix del Hospital de Ginecología "Tlatelolco" con las características antes mencionadas (Tabla 3). La selección de las candidatas a muestra fué realizada por los médicos del hospital. La interpretación de la Histopatología y la Citología (PAP) fueron realizadas por el patólogo del hospital; la determinación molecular de la captura de híbridos para HPV se realizó en el laboratorio de Inmunología Celular del Departamento de Patología Experimental del CINVESTAV. Las muestras se sometieron al protocolo metodológico para el desprendimiento del epitelio y por Inmunohistoquímica se obtuvo lo siguiente:

Al observar los marcadores utilizados (MHC-DR, CD1a y Langerina), se distinguen células con un fenotipo dendrítico (Fig 14). Esta

morfología es muy característica con los marcadores MHC-DR y CD1a, como clásicamente se describe en otros tejidos. Sin embargo las células Langerina⁺ tienen una morfología diferente; son menos largas las dendritas, los somas son más grandes y redondeados.

Al realizar la cuantificación de los somas en 100 campos (Apéndice 2) para cada uno de los marcadores (Fig 15, Fig 16, Fig 17), se obtuvieron las siguientes densidades (Fig 18). Podemos observar que las tres primeras muestras (M1, M2 y M3) tienen un comportamiento similar para los tres marcadores; sin embargo M4 y M5 presentan variación para los marcadores MHC-DR y CD1a.

Si observamos y comparamos individualmente las muestras, la mínima expresión de MHC-DR fue de 147 DC/ mm^2 ; para el marcador CD1a la menor cantidad de células fue de 103 DC/ mm^2 y por último las células Langerina⁺ presentaron su menor número con 110 DC/ mm^2 . Sin embargo las expresiones máximas para cada marcador (MHC-DR, CD1a, y Langerina) fueron de 355 DC/ mm^2 , 329 DC/ mm^2 , y 210 DC/ mm^2 , respectivamente.

Las densidades promedio y la desviación estándar para cada marcador las podemos observar en la Fig 19, lo que se distingue es que MHC-DR tiene un mayor número de DC (244 células por mm^2 , ± 66 DC), le sigue CD1a (197 DC/ mm^2 , ± 55 células) y por último tenemos a Langerina, con 168 DC por mm^2 (± 55 DC).

Como se comentó en la metodología, algunos fragmentos de cérvix fueron montados entre dos cubreobjetos con la finalidad de visualizar

morfologías de las DC con solo voltear 180° el cubreobjetos. En este caso las DC MHC-DR⁺ y CD1a⁺ presentaron dos morfologías diferentes; si se observa la parte superficial del tejido se pueden encontrar pocas células, aunque más grandes y con proyecciones alargadas. Sin embargo, si se observa la cara basal que esta más cercana a la zona

germinativa del epitelio, se puede observar mayor cantidad de DC pero estas células son mas chicas y con proyecciones membranales cortas (Fig 20, Fig 21).

Los tejidos estudiados mostraron grupos o acúmulos de DC, como se observa en la Fig 22.

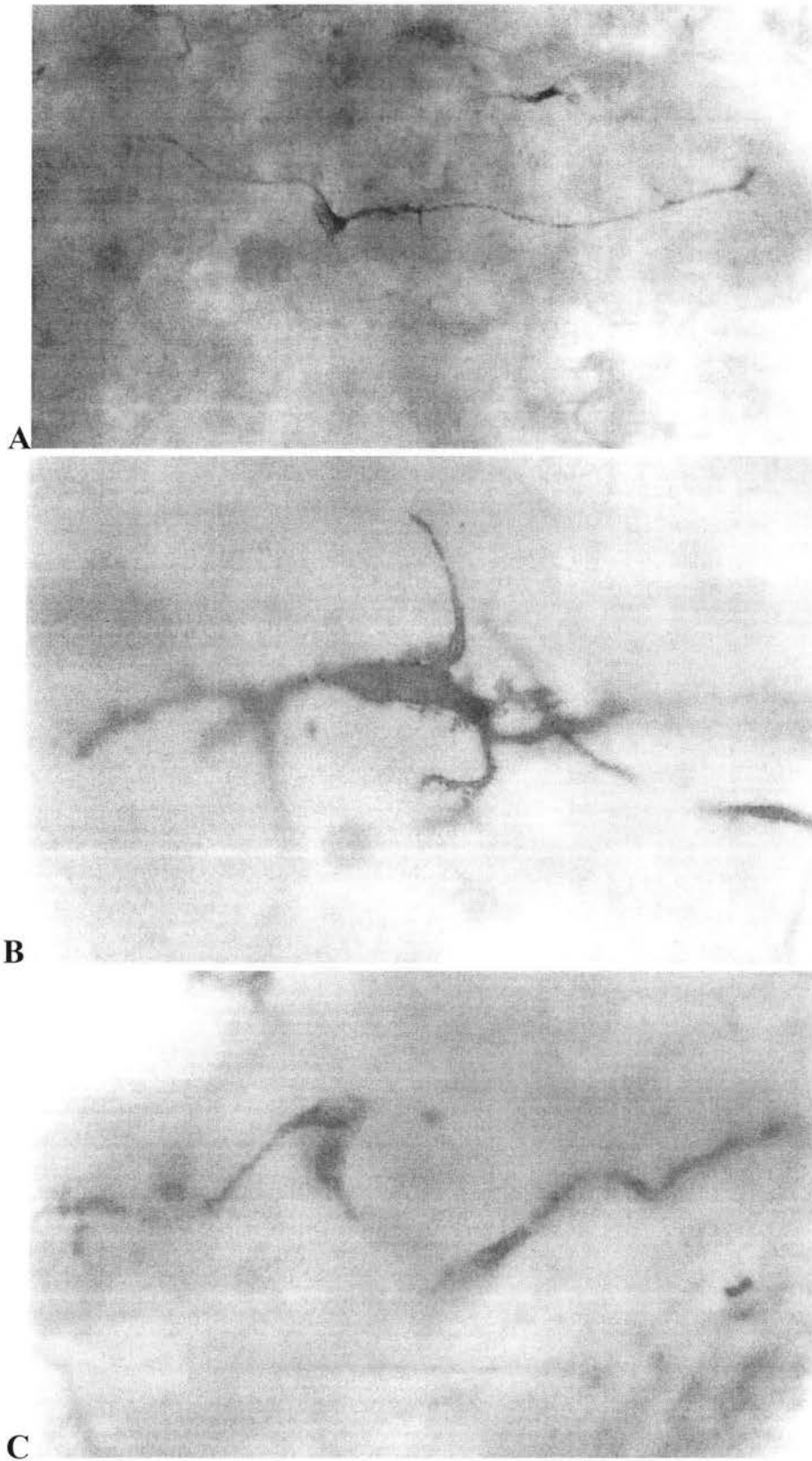
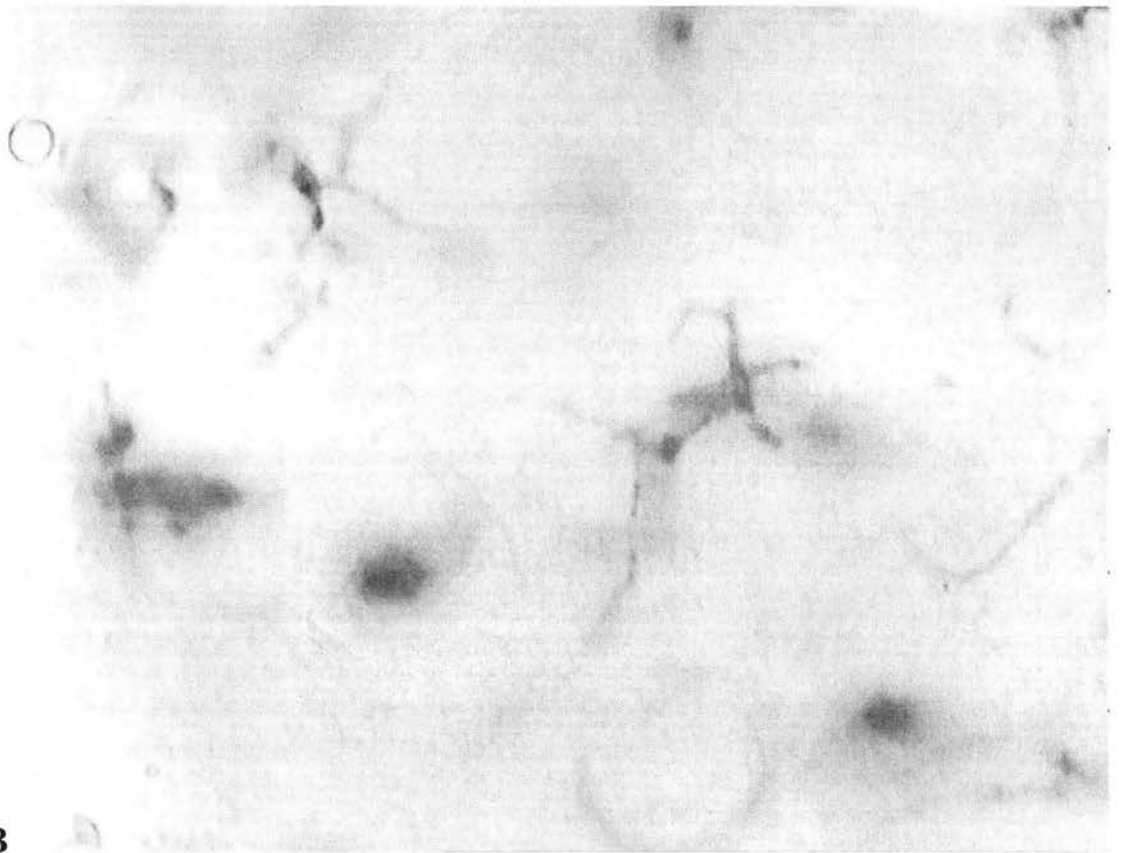
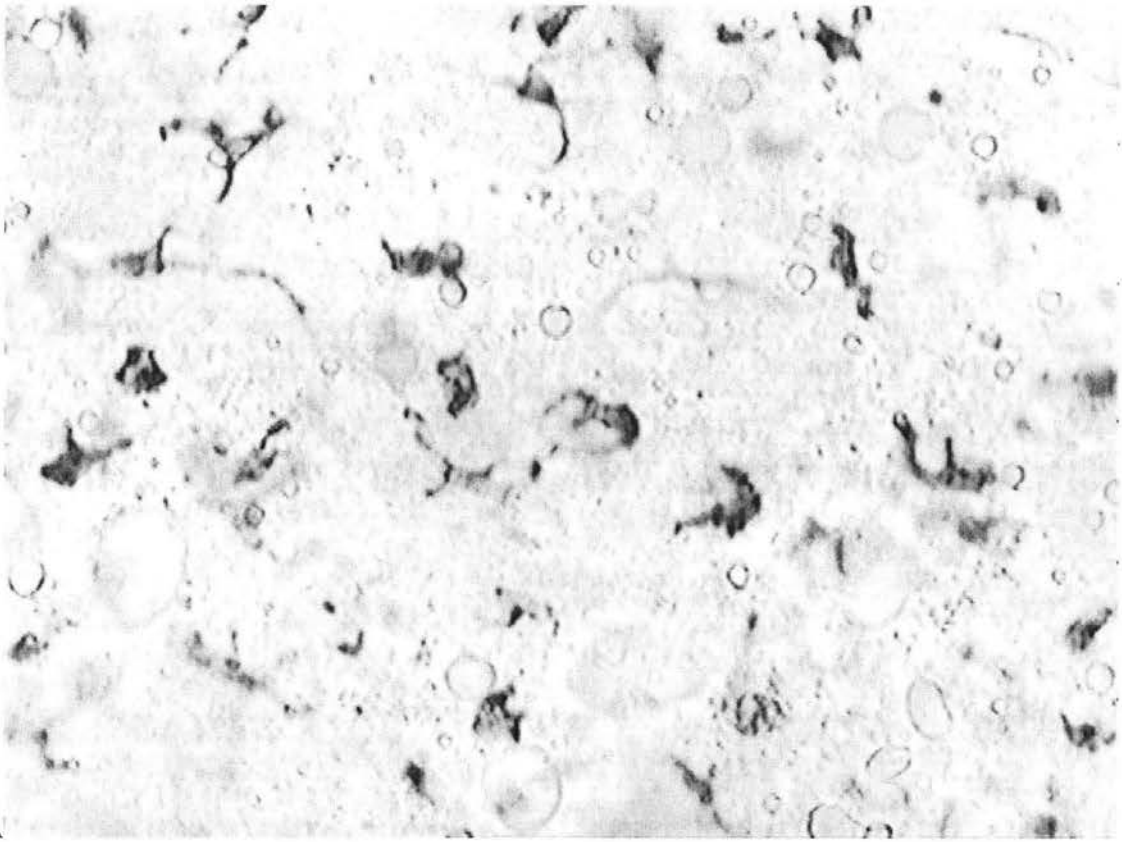


FIG 14. Fenotipo mostrado por los marcadores utilizados para la caracterización de DC en laminas epiteliales de cérvix. (A) MHC-DR⁺ 40x, (B) CD1a⁺ 100x, y (C) Langerina⁺ 100x.



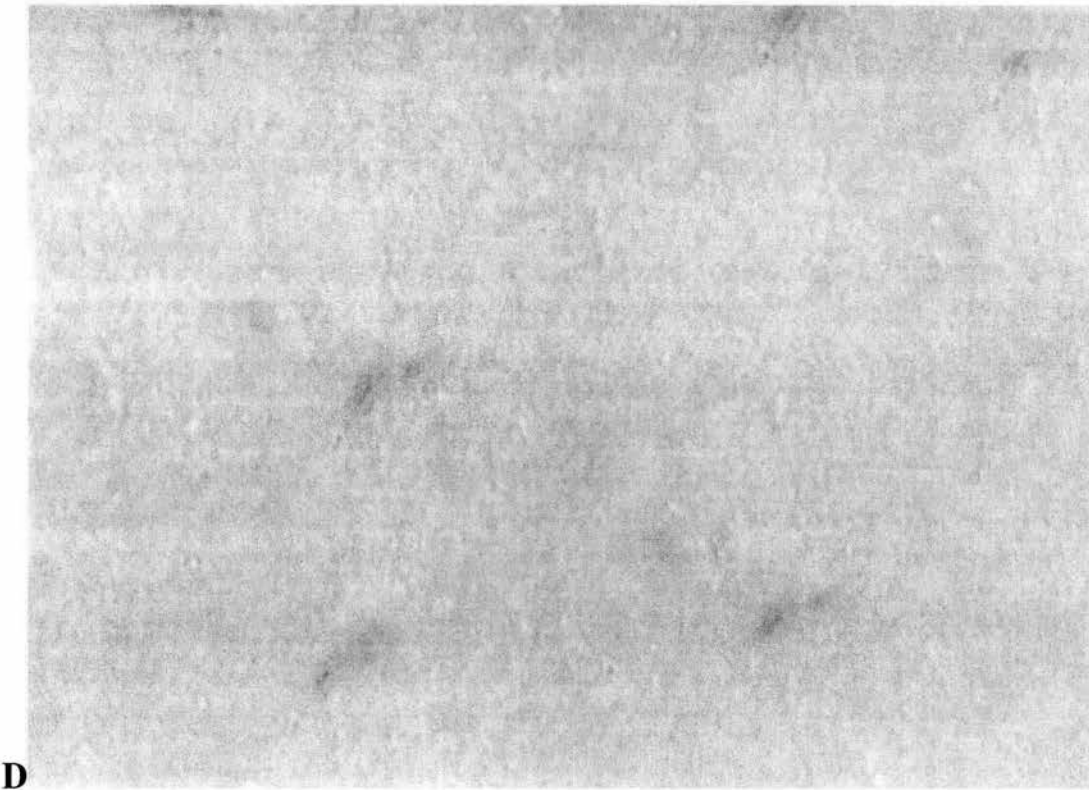
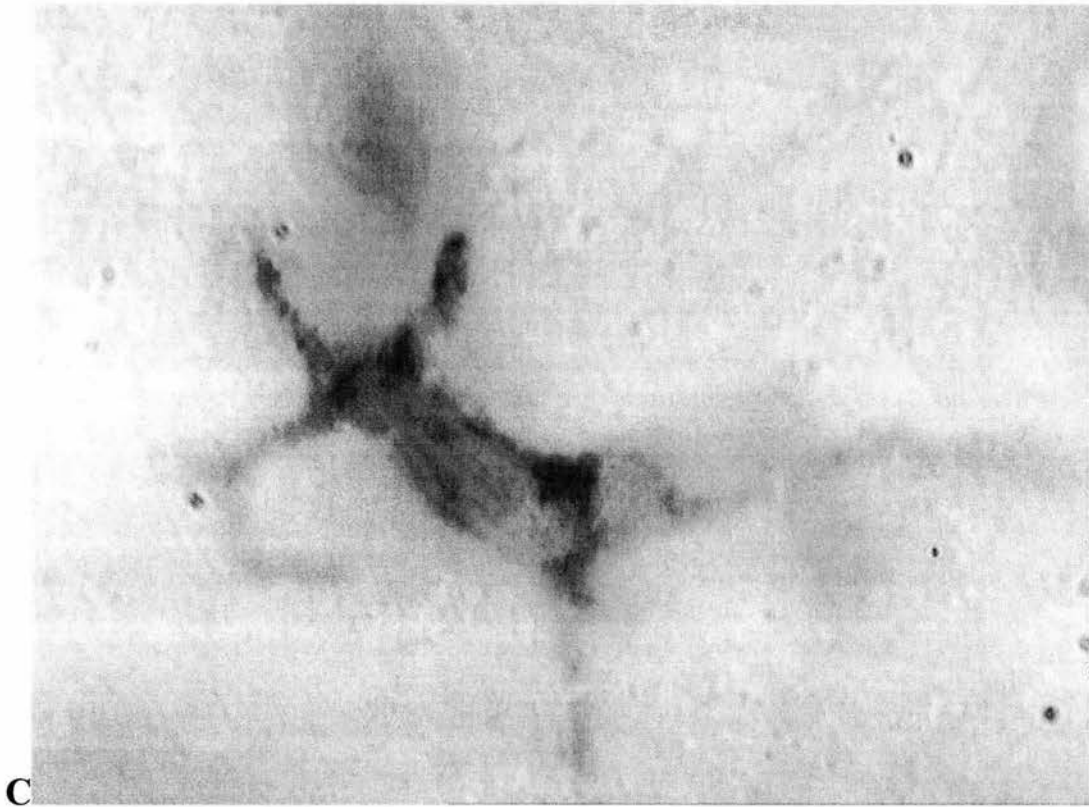
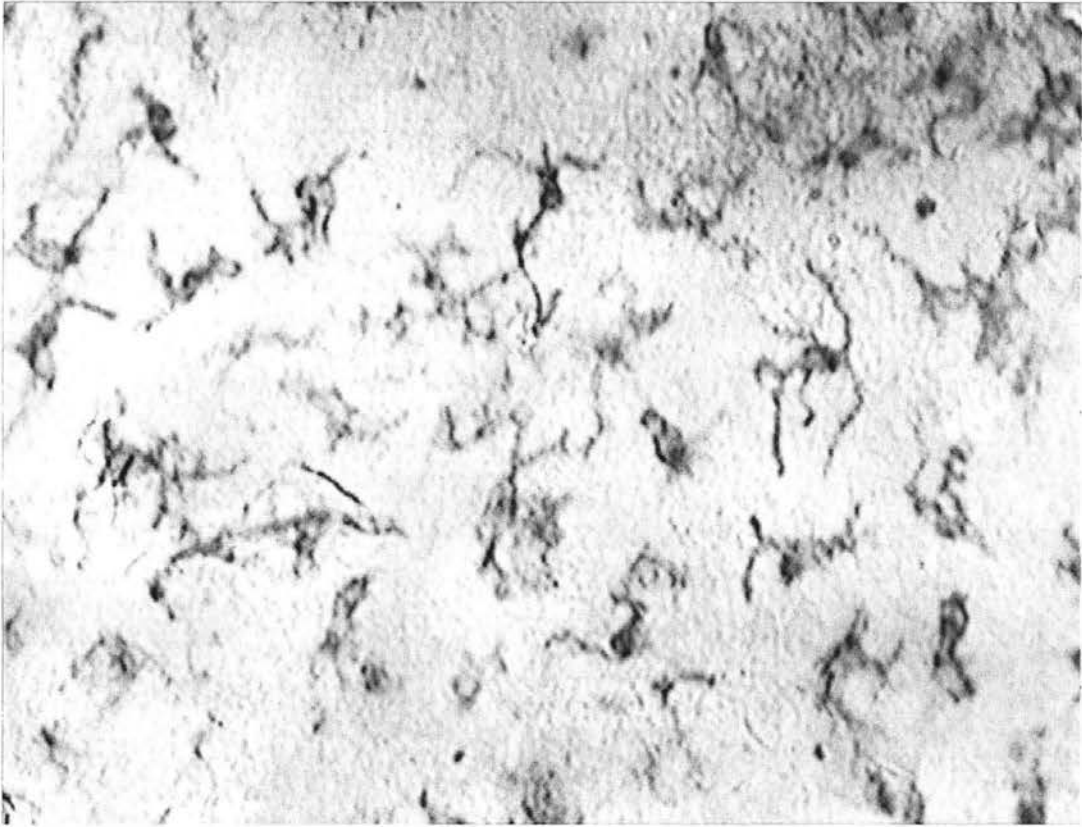
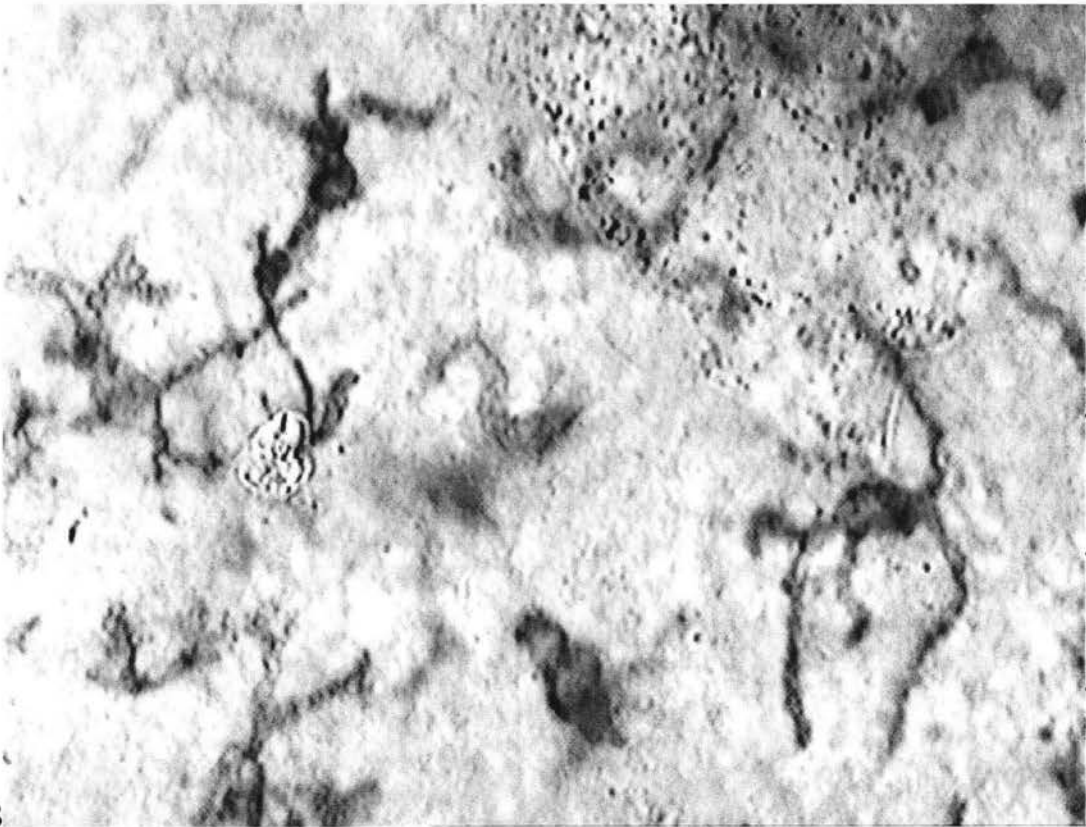


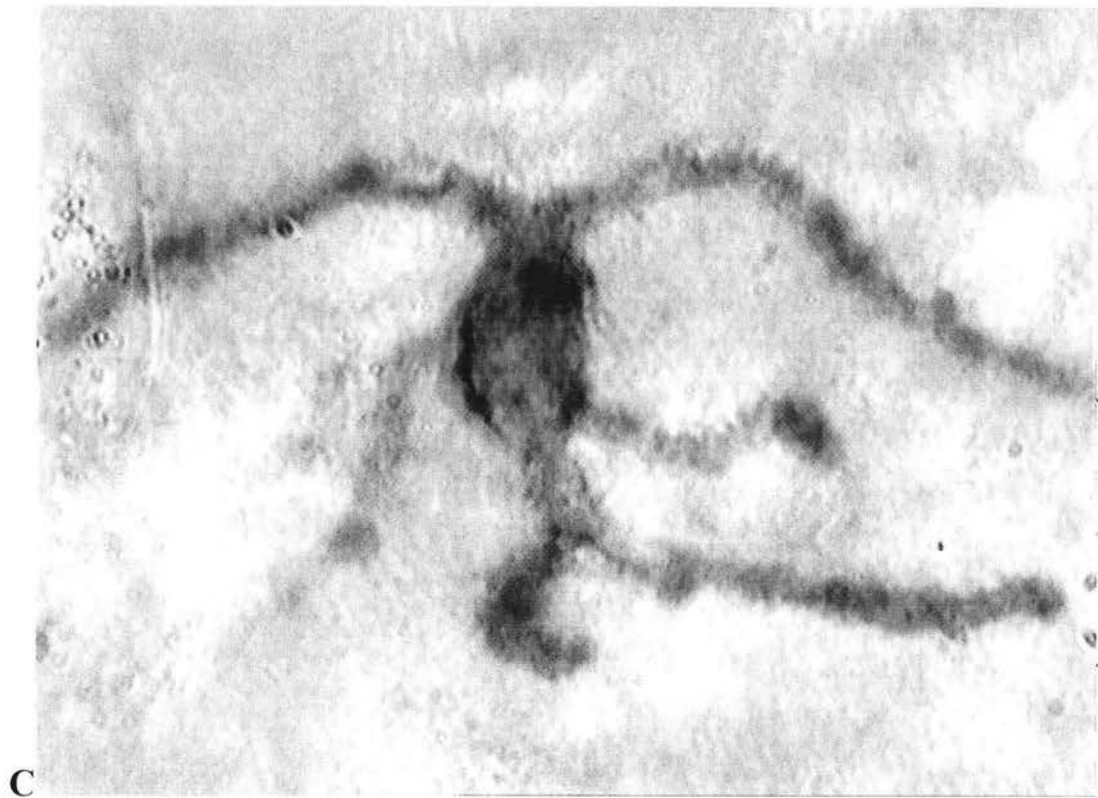
FIG 15. *Expresión de la molécula MHC-DR (Clase II) en DC del epitelio cervical. (A) 20x, (B) 40x, (C) 100x, (D) Control de Isotipo 40x.*



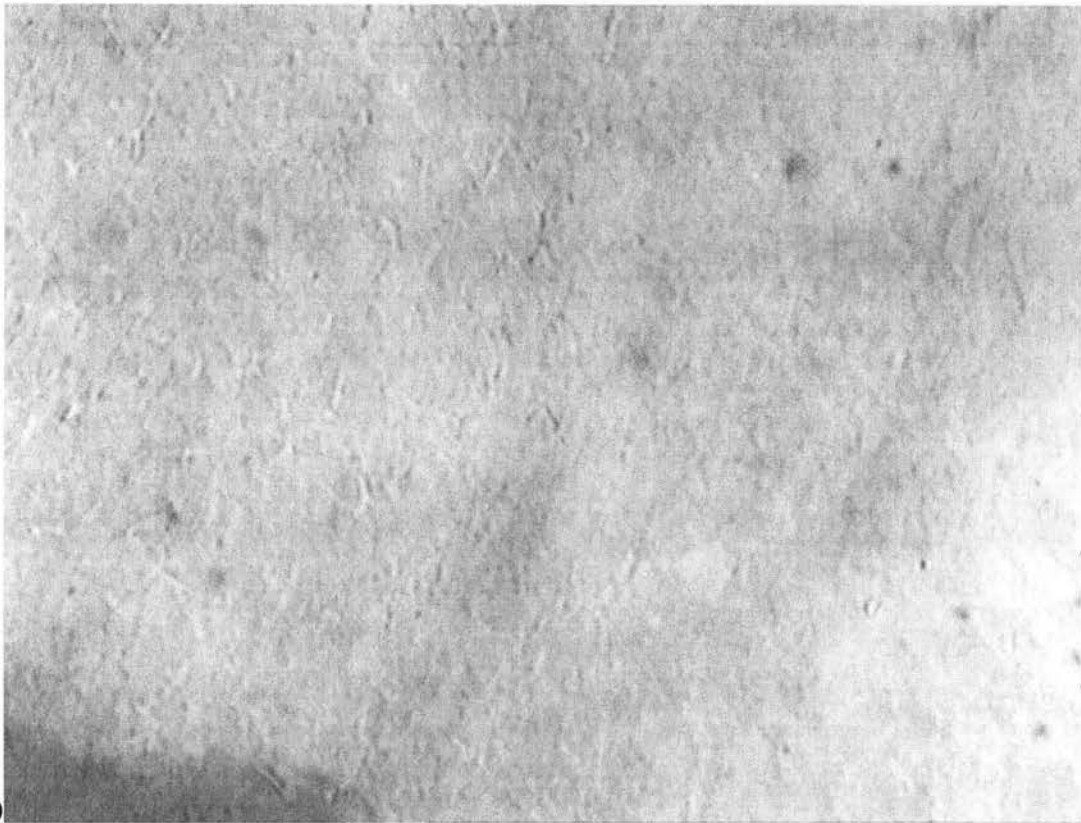
A



B

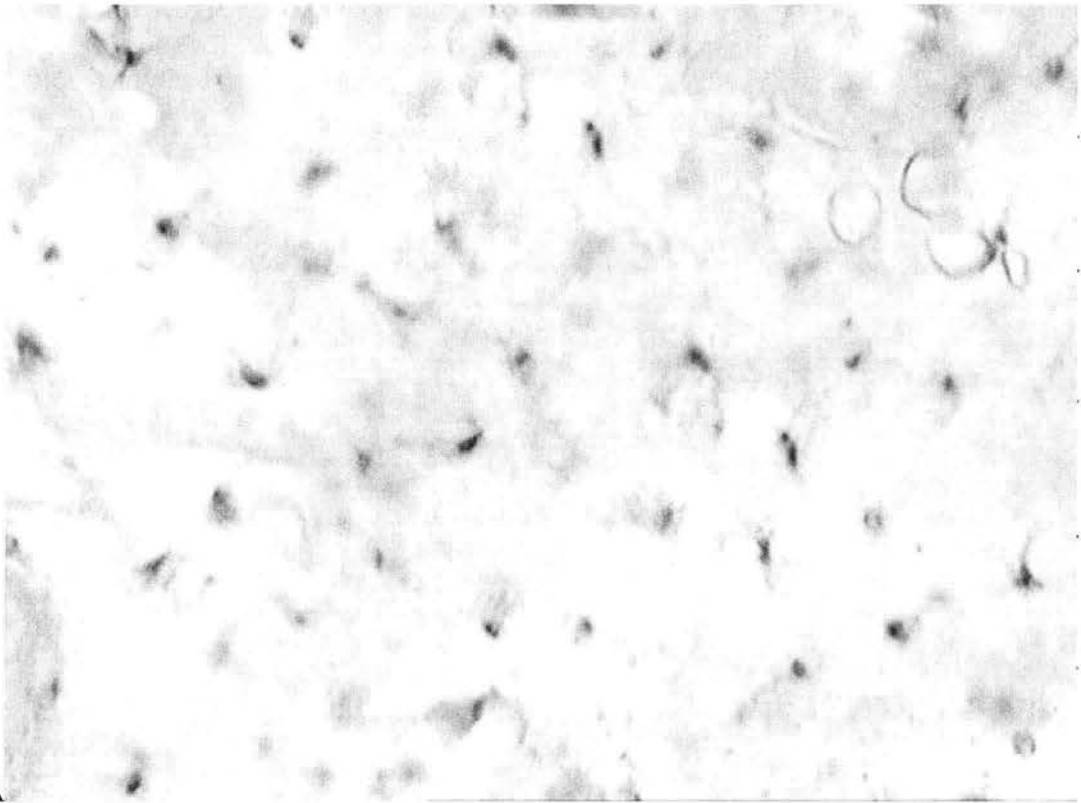


C

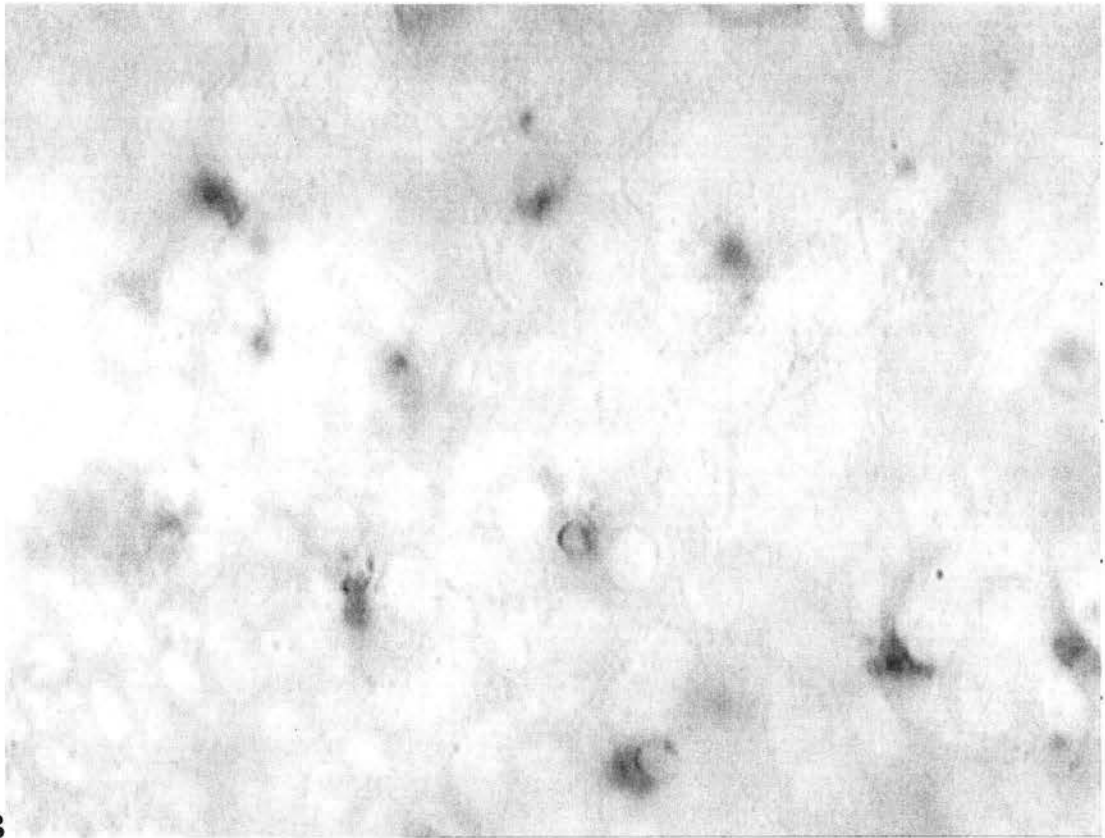


D

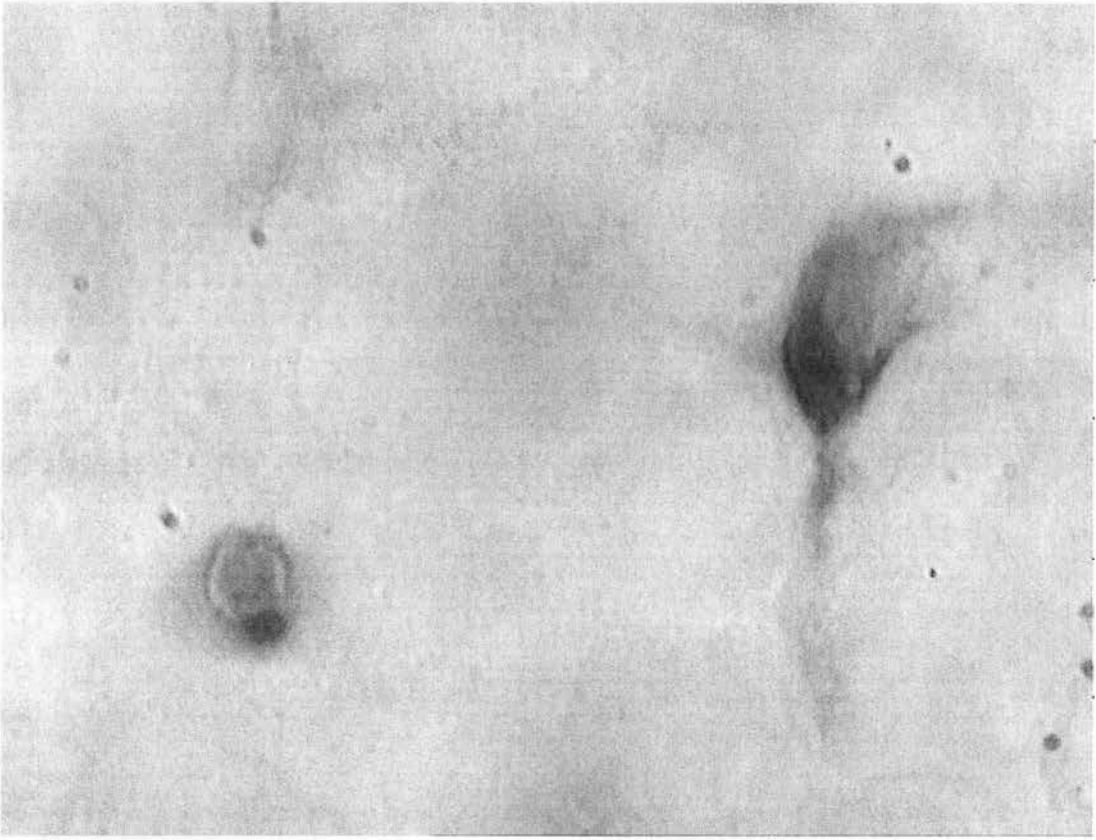
FIG 16. *Inmunohistoquímica en epitelio cervical para células CD1a⁺. (A) 20x, (B) 40x, (C) 100x, (D) Control de Isotipo 40x.*



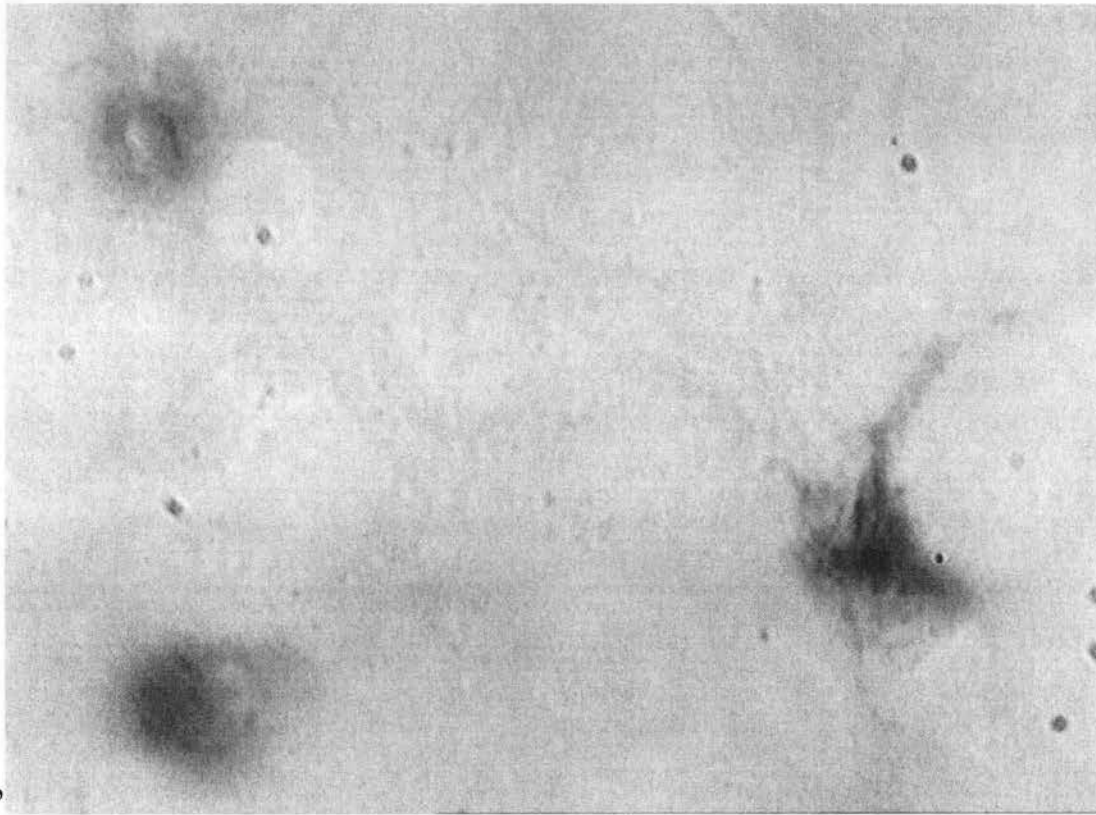
A



B



C



C'



D

FIG 17. DC cervicales en inmunohistoquímica expresando Langerina. (A) 20x, (B) 40x, (C) 100x, (C') 100x y (D) Control de isotipo. (Nota: Las muestras C y C' son tomas del mismo campo con diferente foco).

Comparación de Muestras.

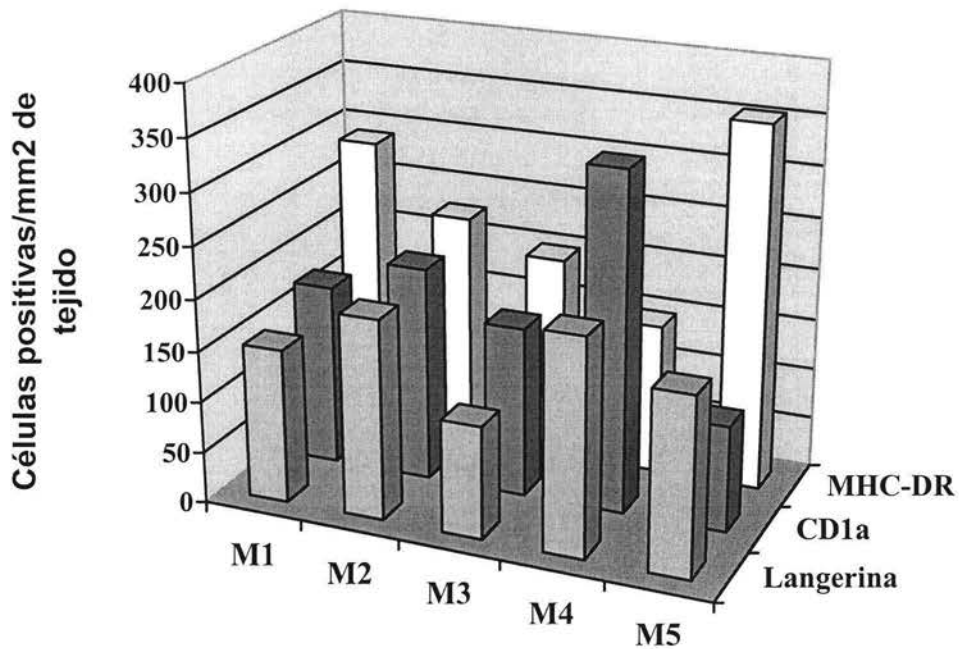


FIG 18. Comparación de densidades (DC/mm²) para cada una de las muestras con los marcadores utilizados.

Densidades Promedio de DC en Epitelio Cervical Humano

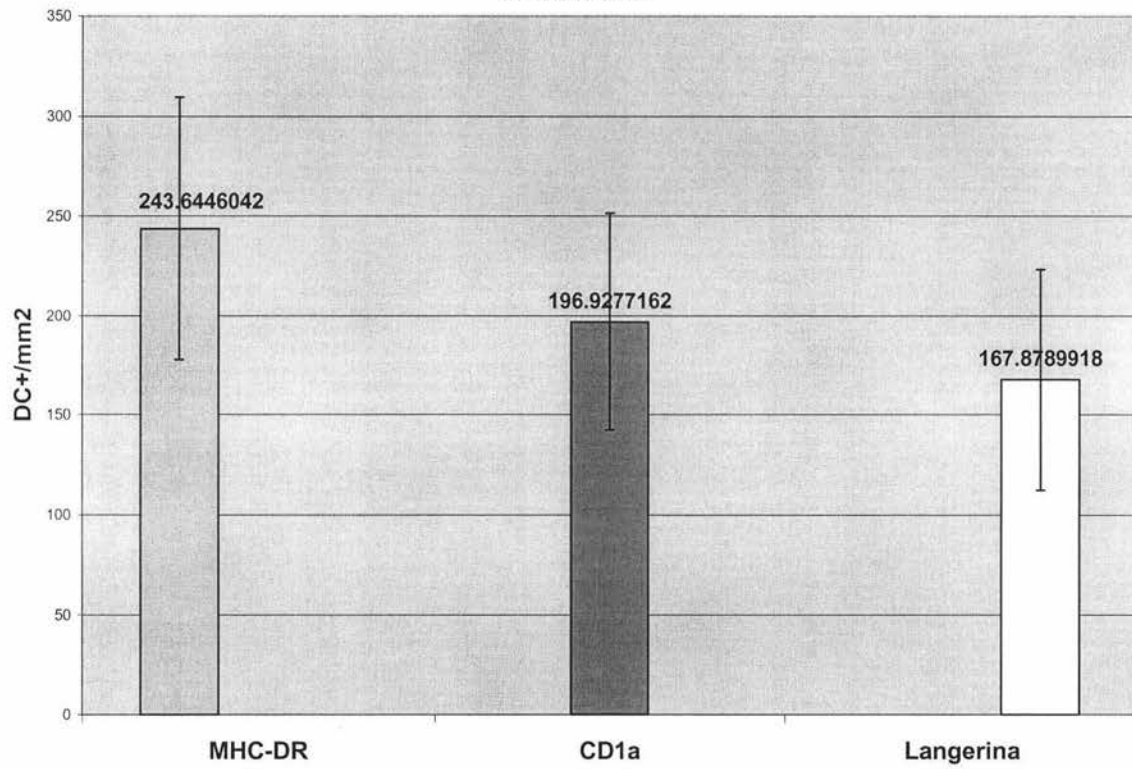
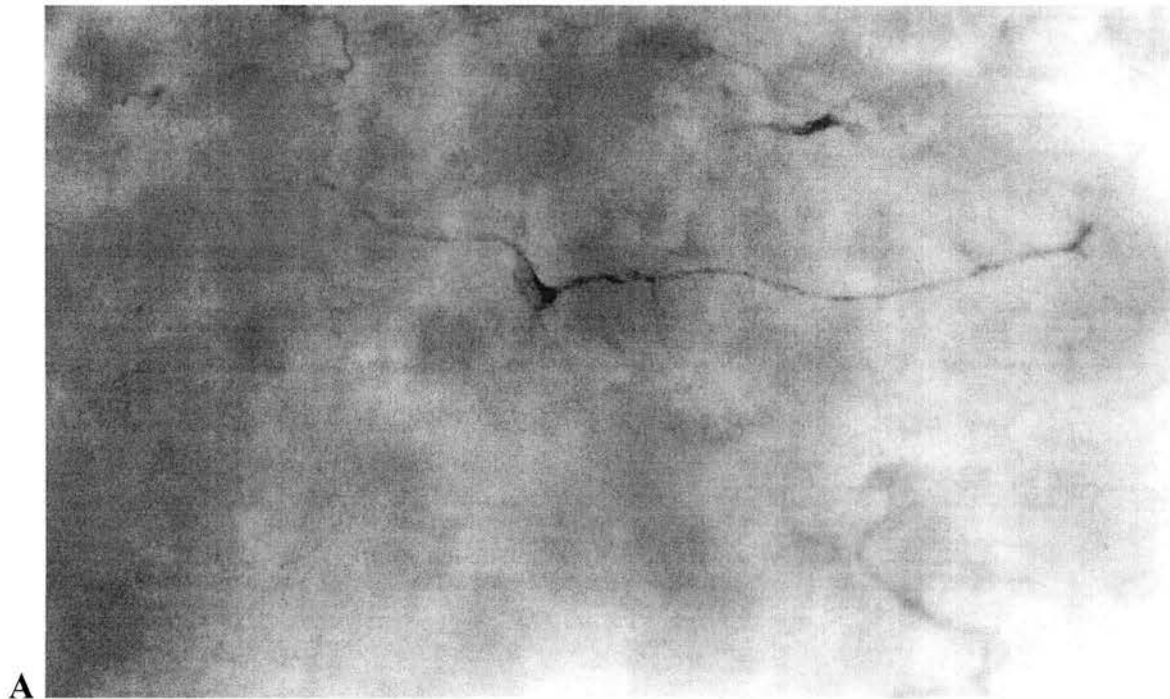


FIG 19. Densidades promedio (DC/mm^2) para los marcadores utilizados (MHC-DR, CD1a y Langerina) en el epitelio cervical humano.

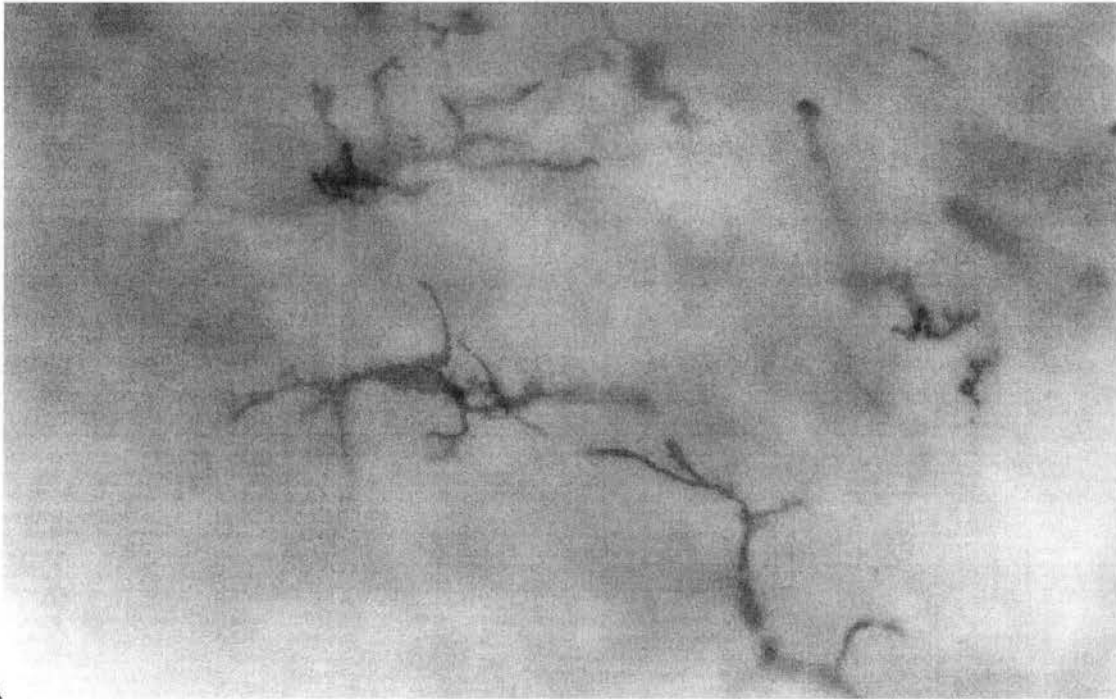


A

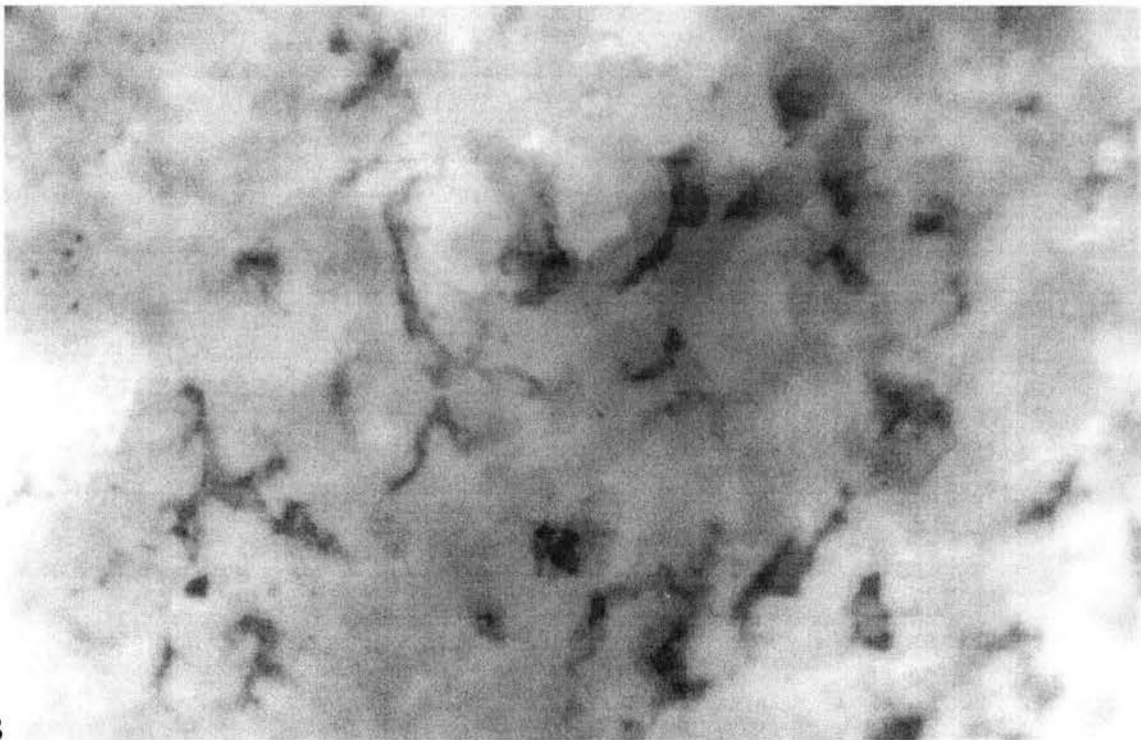


B

FIG 20. *Morfología de DC en las dos caras de la misma muestra del epitelio cervical utilizando el mismo marcador. (A) MHC-DR vista superficial 40x, (B) MHC-DR vista basal 40x.*



A



B

FIG 21. *Expresión de CD1a en DC del epitelio cervical. (A) Vista superficial 40x, (B) Vista basal 40x.*

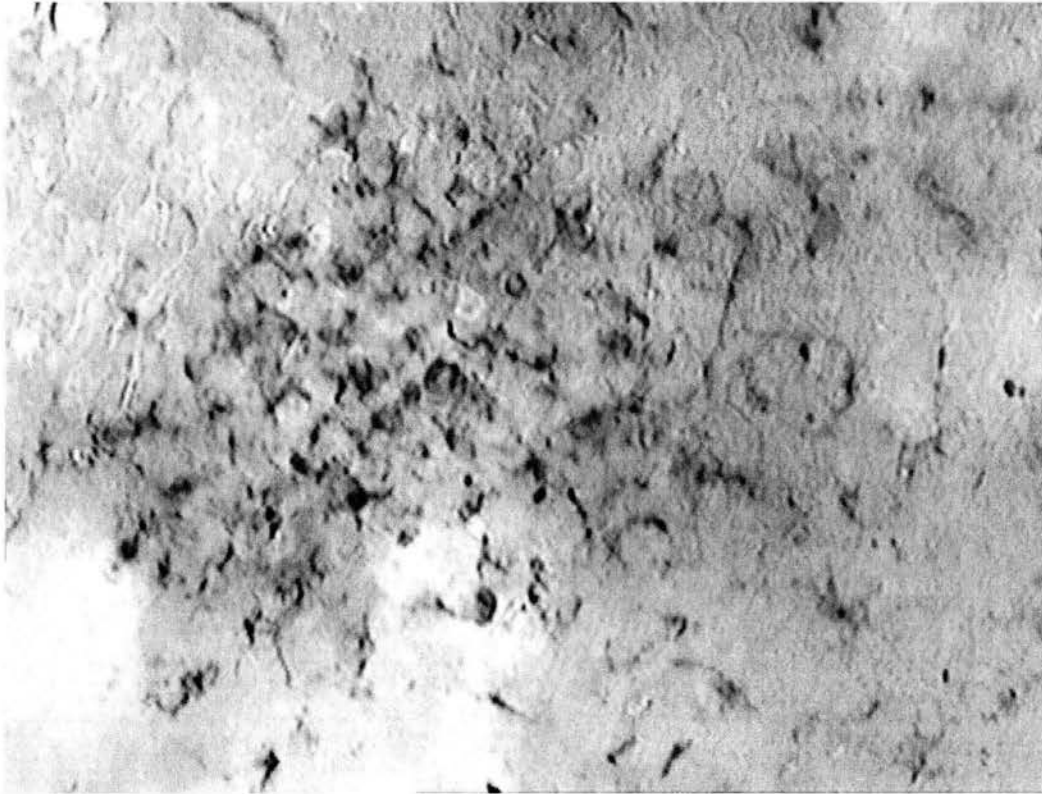


FIG 22. *Grupos o acúmulos de DC expresando MHC-DR en el epitelio cervical (20x).*

DISCUSIÓN

El CaCu, es una patología importante para realzar investigación básica, ya que representa la segunda causa mundial de muerte en mujeres, es uno de los principales problemas de salud en el mundo y la neoplasia que más decesos causa en nuestro país, por enfermedades malignas en el grupo de mujeres entre 15 y 64 años.

Si bien es cierto que la naturaleza multifactorial involucrada en la génesis del padecimiento, tales como la dificultad para establecer medidas de protección específicas, la imposibilidad de un diagnóstico temprano, de un tratamiento certero, la falta de educación para la revisión periódica y el cuidado de la sexualidad, son puntos todos muy importantes para abatir la morbimortalidad.

El conocimiento del fenómeno biológico en el establecimiento de esta neoplasia, involucra necesariamente al HPV de alto riesgo, al mecanismo de respuesta inmune y a otros factores genéticos y del microambiente del TGIF. Con relación al mecanismo de respuesta inmune consideramos primordial es estudio de las DC como células presentadoras de antígeno, por lo tanto estudiamos 5 mujeres en quienes se documentó por varios criterios la ausencia de infección por virus del papiloma humano de alto riesgo, de tal manera que los resultados presentados corresponden a un grupo control de mujeres mestizas mexicanas que son consideradas con cérvix sano, para establecer la densidad de DC en el epitelio cervical normal. Consideramos que estos valores deben ser tomados en cuenta cuando se refiera a

poblaciones con infección del TGIF por HPV.

La naturaleza infecciosa de este proceso actualmente se sigue estudiando para entender mejor la respuesta inmune en el humano, debido a que hay reportes contradictorios en cuanto a ella. Por ejemplo, algunas investigaciones estipulan que las mujeres infectadas por el HPV de alto riesgo, en etapas avanzadas del NIC no desarrollan una respuesta inmune contra el virus (Fields, *op cit.*). En cuanto a las DC, solo existen hipótesis respecto a un decremento en la densidad celular en etapas avanzadas de la neoplasia, que producen una regulación negativa (*downregulation*) por la persistente infección del virus en el epitelio (Lotze y Thompson, 1999). Por estas razones consideramos que es importante establecer apropiadamente la densidad de las DC en el epitelio cervical sin infección por HPV de alto riesgo, en la medida que esta población pueda ser definida con el mayor número de marcadores moleculares, estaremos aclarando el número de DC existentes.

De tal manera que en los casos que presenten infecciones causadas por diferentes patógenos en el TGIF, y particularmente por HPV de alto riesgo, será necesario cuantificar las subpoblaciones de DC que garanticen una buena respuesta inmune *in situ*. Es por eso que la presentación y reconocimiento del antígeno es fundamental para desencadenar una respuesta inmune, en la cual las APC son pieza clave para que se detecten y eliminen células infectadas o transformadas. En el epitelio del cérvix las DC son las APC responsables del reconocimiento, procesamiento y la presentación del Ag a los LcT vírgenes para que estos desencadenen la respuesta inmune apropiada.

Actualmente el estudio de las DC como APC profesionales ha tomado un giro, ya que son una población celular que está siendo ampliamente estudiada en terapias contra el cáncer, con resultados promisorios. Estos estudios fueron demostrados primero en modelos animales (Flamand, 1994; Paglia, 1996; Specht, 1997) y actualmente están siendo estudiadas en humano (Nestle, 1998).

El estudio de la presente tesis se centró fundamentalmente en los marcadores más utilizados para la caracterización de las DC. El primer marcador MHC-DR es altamente expresado en la superficie de estas células (Santambrogio, *et al.*, 1999; Pierre, *op cit.*; Banchereau, *op cit.*; Bell, *op cit.*) y la expresión de molécula CD1a está restringido a pocas células, entre las cuales se encuentran las DC (Porcelli, *op cit.*). La tercer molécula (Langerina) se utilizó por ser específica para las DC, ya que no es expresada en monocitos/macrófagos, LcT, LcB, granulocitos, ni en otras células [Valladeau, *op cit.*; (b)Valladeau, *op cit.*].

Por lo tanto, demostramos que con la técnica de desprendimiento epitelial se puede observar mejor la morfología de las DC en comparación con la técnica de cortes histológicos clásicos (Fig 23). Razón por la cual actualmente continuamos realizando estudios con esta técnica, debido a la optima visualización de las DC, tanto para su morfología, fenotipo y cuantificación.

Con relación al desprendimiento del epitelio es importante concretar que no es uniforme en todos los casos y presenta algunas irregularidades en cuanto al grosor. De tal manera que en zonas donde esté más grueso detectamos mayor número de células que en zonas donde esté un poco más delgado. Otra situación digna de destacar en la separación del epitelio fue que entre más joven era la persona de la cual se obtenía la muestra, requería mayor tiempo de incubación con colagenasa-dispasa.

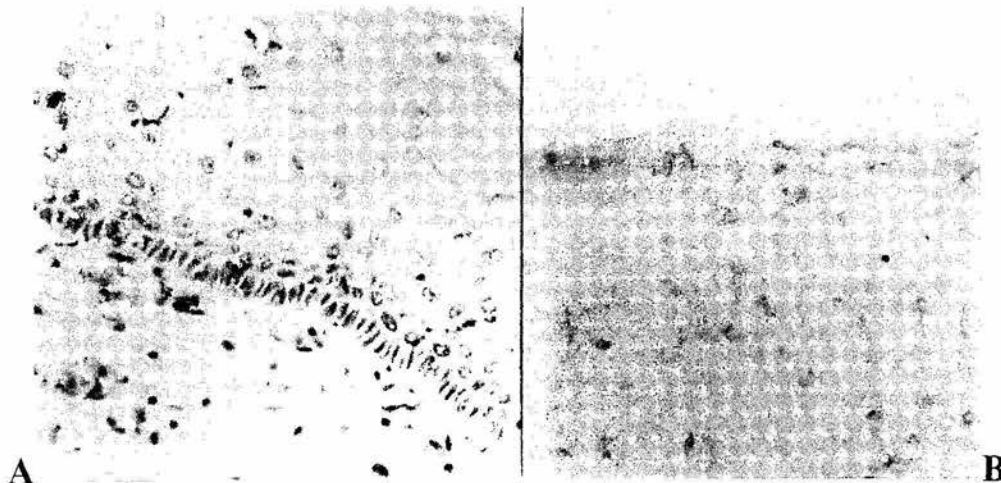


FIG 23. Inmunohistoquímica en cervix expresando MHC-DR. (A) Corte Histológico (Tomado de Jiménez-Flores,1998), (B) Capa epitelial.

En todas las muestras analizadas existe una gran expresión de la molécula MHC-DR (clase II), lo cual concuerda con la escasa literatura al respecto (Santambrogio, *op cit.*; Pierre, *op cit.*).

Cabe recordar que cualquier célula nucleada que pueda expresar en su membrana las moléculas de clase II, puede ser una célula presentadora de antígenos como son: LcB, monocitos/macrófagos, células endoteliales.

En cuanto a las células CD1a⁺, observamos que fue el marcador que ocupó segundo lugar en frecuencia y que nos permitió establecerla densidad celular. Esto podemos atribuirlo a dos factores, 1) Esta molécula puede albergar en su nicho lípidos y glicolípidos, los cuales son presentados a células T, y 2) La expresión de esta molécula se restringe a pocos tipos celulares, de los cuales podemos mencionar a los LcB de sangre periférica y a las DC epiteliales.

La reciente caracterización de Langerina, como molécula específica para las DC, nos da la pauta para estudiar específicamente a las células de Langerhans inmaduras, que son una población de las células dendríticas con una vía diferente de ontogenia. Por esa razón a esta molécula se le está considerando como un marcador de rutina para la caracterización específica de

células de Langerhans (Valladeau, *op cit.*).

Un punto muy importante en la expresión de este marcador, es que sólo se presenta en DC inmaduras, y esta asociado a la endocitosis.

Como se señaló previamente, el desprendimiento irregular del epitelio es un factor importante al cuantificar los somas celulares, porque puede dar una mayor o menor cantidad de células dependiendo el grosor (Fig 24), pero como todas las muestras se sometieron a las mismas condiciones, el margen de error es uniforme.

Posiblemente, las diferencias en cuanto a la cuantificación celular de las moléculas MHC-DR y CD1a en M4 y M5 se deban precisamente a la irregularidad del tejido.

Nosotros hemos cuantificado la densidad de las DC en el epitelio sano y sin asociación a la infección por HPV de alto riesgo, a diferencia de los trabajos de Pope y *cols.* quienes cuantifican también las que se encuentran en la parte del estroma, razón por la cual hay diferencias si se comparan nuestros resultados con los hallados en la literatura. Morelli, *et al.*, utilizan diferentes técnicas y obviamente identifican variación en cuanto a la cuantificación de las células.

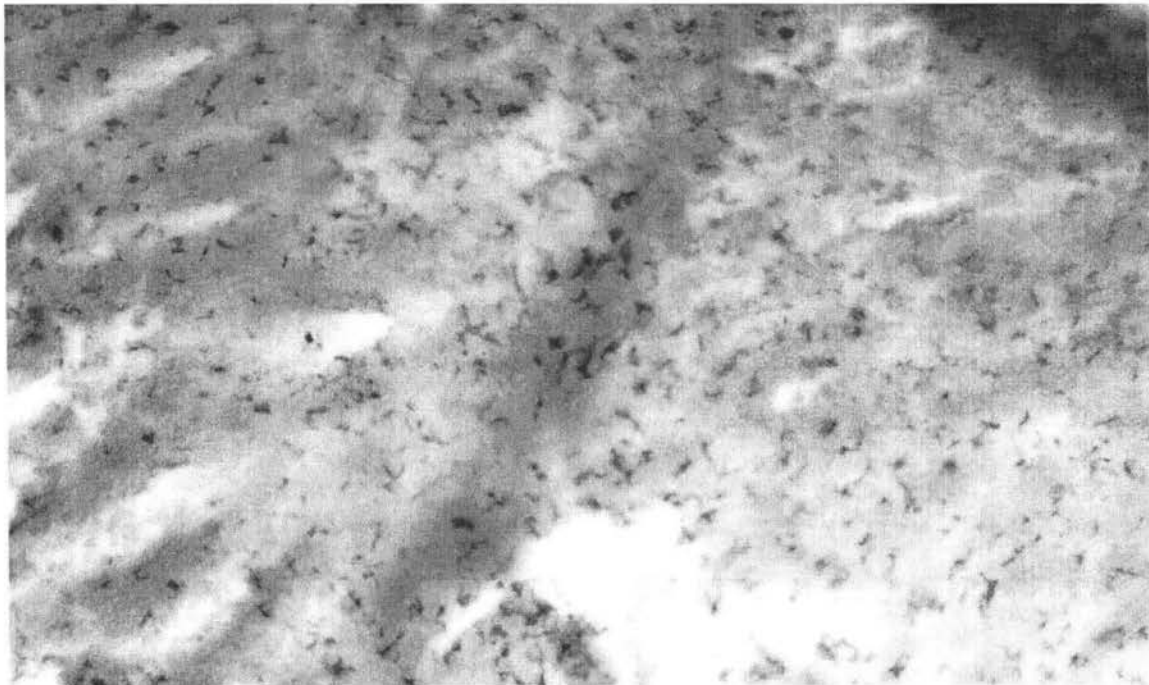


FIG 24. *Inmunohistoquímica de DC expresando CD1a en cérvix (10x). Nótese las zonas claras en donde el grosor del epitelio es menor y existen menos células.*

Los reportes en cortes histológicos de cérvix señalan que las DC únicamente se encontraban en el estrato inferior del epitelio, cerca de la zona germinativa formando una monocapa, al igual que en la piel (Connor, *op cit.*). El presente trabajo demuestra que las DC, en el epitelio cervical, no se hayan como en la piel, sino que constituyen diferentes capas e inclusive con morfologías diferentes (Fig 20 y Fig 21), lo cual nos parece muy interesante por las características que presentan las células en la parte superficial del epitelio con largas prolongaciones membranales, células más grandes y en menor cantidad que las que se encuentran cerca de la zona germinativa. Esto da pauta para proponer que la DC esta en proceso de maduración

distinto al de las DC en la capa basal; y que muy probablemente exista un proceso de migración activa.

Otro resultado interesante, es el hallazgo de grupos o acúmulos de DC con el marcador MHC-DR, lamentablemente en la literatura no existen reportes de los mismos. Sin embargo Jiménez-Flores en 1998 encuentra estos acúmulos, presentes en cortes histológicos de cérvix (Fig 25) con el mismo marcador. También sabemos por comunicación personal (Becerril, 2002. Manuscrito de tesis). que estos acúmulos también se pueden encontrar en epidermis de ratón BALB/c (Fig 26).

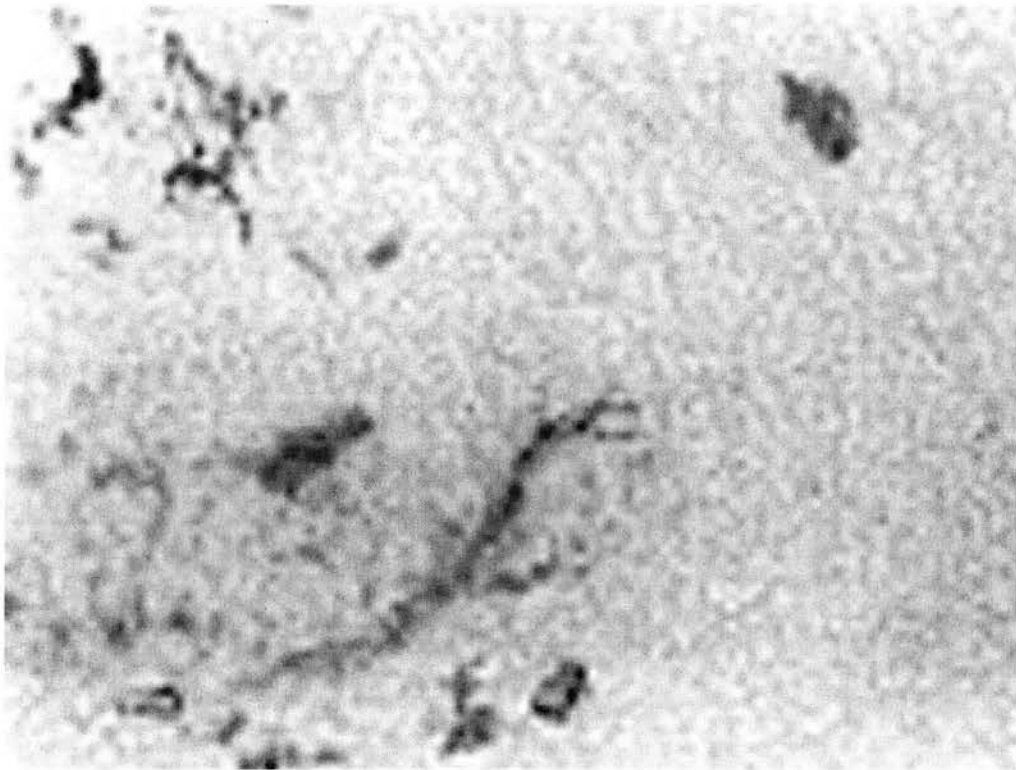


FIG 25. Grupos o acúmulos de DC MHC-DR⁺ visto en cortes por inmunohistoquímica en cérvix, 40x (Tomado de Jiménez-Flores, *op cit.*).

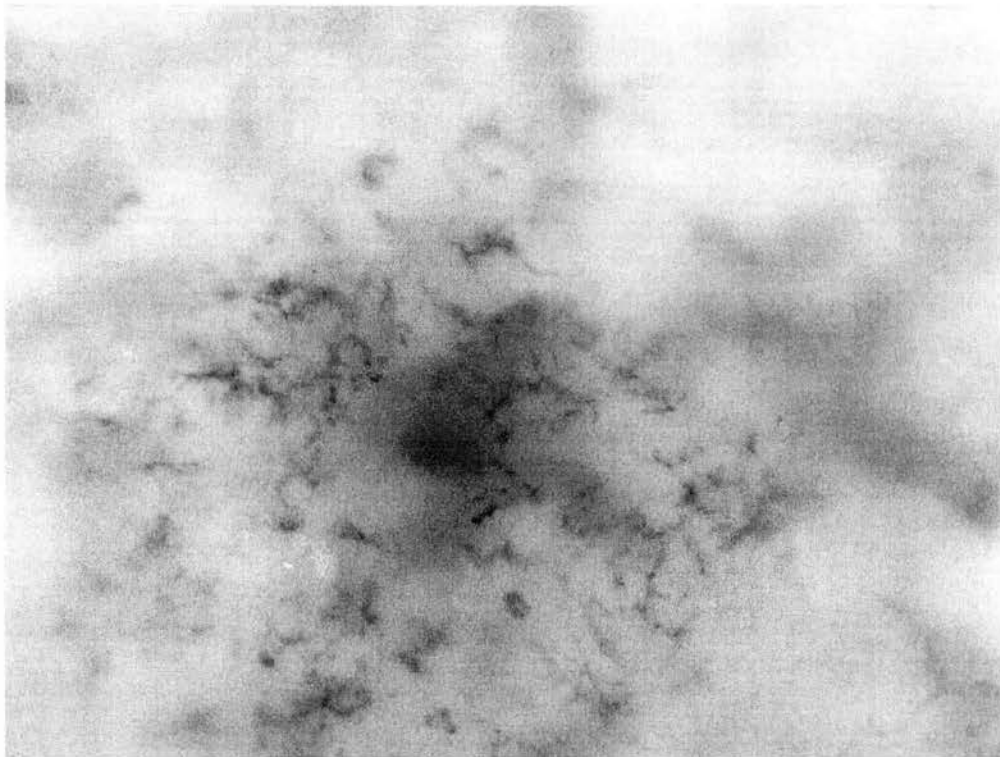


FIG 26. Grupos o acúmulos de DC scavenger receptor⁺ en epidermis de ratón BALB/c recién nacido (0 días) 20x, (Tomado de Becerril, *op cit.*).

IZT.



CONCLUSIONES

- **La técnica de despegamiento epitelial con colagenasa-dispasa permite la visualización más apropiada de células con morfología típicamente dendrítica en el epitelio cervical humano normal.**
- **La identificación de DC con tres marcadores moleculares, permite establecer la densidad promedio por área de tejido, en el epitelio de cérvix humano normal.**
- **La densidad celular que estamos reportando, muestra diferencias respecto a otros resultados de la literatura, debido a que en este trabajo contamos los somas de DC en el espesor de la capa despegada, en comparación con otros reportes que utilizan la técnica de cortes histológicos clásicos, en donde se cuentan las células que se encuentran debajo del epitelio germinativo y los marcajes vecinos que pueden resultar de la misma célula en un corte convencional.**
- **Las imágenes del epitelio cervical, muestran diferencias morfológicas si comparamos los diferentes marcadores utilizados. Las típicamente dendríticas se observan en las muestras tratadas con MHC-DR y CD1a.**
- **Respecto al marcador que identifica a Langerina, habitualmente las células se observan en menor cantidad, menos dendríticas, redondeadas y algunas de ellas muestran una prolongación citoplasmática en un sentido.**

LITERATURA CITADA

- Arends, M. J., Buckley C. H. y M. Wells. 1998. *Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia*. J Clin Pathol. 51(2):96-103.
- Banchereau, J. y R. Steinman. 1998. *Dendritic cells and the control of immunity*. Nat. 392(19):245-52.
- (b)Banchereau, J., et al. 2000. *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol. 18:767-811.
- Becerril, M. A. 2002. *Expresión de receptor de reconocimiento de patrones en células dendríticas epidérmicas murinas durante el período neonatal*. Tesis de licenciatura. FES Cuautitlan, UNAM. Cuautitlan, Estado de México.
- Bell, D., Young, J. W. y J. Banchereau. 1999. *Dendritic cells*. Adv in Immunol. 72:255-324.
- Bernard, A. y L. Boumsell. 1984. *Human leukocyte differentiation antigens*. Presse Med. 13(38):2311-6. (ABSTRACT).
- Bhardwaj N., Young J. W., Nisanian A. J., Baggers J. y R. M. Steinman. 1993. *Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses*. J Exp Med. 178(2):633-42.
- Bilsland, C. A. G. y C. Milstein. 1991. *The identification of the β 2-microglobulin binding antigen encoded by the CD1D gene*. Eur J Immunol. 21:71-8.
- Blumberg, R. S., et al. 1991. *Expression of a non polymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells*. J Immunol. 147:2518-24.
- Caux, C., Yong-Jun, L. y J. Banchereau. 1995. *Recent advances in the study of dendritic cells and follicular dendritic cells*. Immunol Today. 16(1):2-4.
- Clark, G. J., et al. 2000. *The role of dendritic cells in the innate immune system*. Microbes and Infection. 2(3):257-72.
- Connor, J. P., et al. 1999. *Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia*. Gynecol Oncol. 75 (1):130-5.
- Copeland, L. J. 1998. *Ginecología*. Ed. Panamericana. Buenos Aires. 1197 pp.
- Dell, G. y K. Gaston. 2001. *Human papillomaviruses and their role in cervical cancer*. Cell Mol Life Sci. 58(12-13):1923-42.
- Di Nicola, M. y R. M. Lemoli. 2000. *Dendritic cells: Specialized antigen presenting cells*. Hematol. 85:202-7.
- Elkas, J. R. y R. Farias-Eisner. 1998. *Cancer of the uterine cervix*. Curr Opin Obstet Gynecol. 10:47-50.
- Fields, B. N., et al. 1996. *Field's Virology*. 5ª ed. Lippincott-Raven Publishers. E.U.A. 2950 pp.
- Flamand, V., et al. 1994. *Murine dendritic cells pulsed *in vitro* with tumor antigen induce tumor resistance in vivo*. Eur J Immunol. 24:605-10.
- Flores, L. A. 2001. *Identificación y distribución de células MHC CII dendríticas en el intestino de ratones BALB/c, C57BL/6 y CD40L-/-*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.
- Flores-Romo, L. 2001. *In vivo maturation and migration of dendritic cells*. Immunol. 102:255-62.
- Fong, L. y E. G. Engleman. 2000. *Dendritic cells in cancer immunotherapy*. Annu Rev Immunol. 18: 245-73.
- Hart, D. N. J. 1997. *Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood. 90(9):3245-87.
- Heras, Ch. M. 2001. *Estudio fenotípico y funcional de las células dendríticas en la epidermis del ratón en el periodo perinatal*. Tesis de

- Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México, D.F.
- INEGI. 2000. *Estadísticas del sector salud y seguridad social, Cuaderno # 16*. México. 356 pp.
 - Jiménez, F. R. 1998. *Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y II por inmunohistoquímica en mujeres con lesiones cervicales precancerosas y cancerosas asociadas a infección por papiloma virus humano (HPV) 16 y 18*. Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN. México, D.F.
 - Jones, H. W., et al. 1991. *Tratado de Ginecología de Novak*. 11^a ed. Ed. Interamericana-McGraw Hill. México. 821pp.
 - Klein, J. y V. Horejsi. 1997. *Immunology*. 2^o Edición. Ed. Blackwell Science. UK. 722pp.
 - Koszik, F. et al. 1994. *Expression of monoclonal antibody HECA-452-Defined E-selectin ligands on langerhans cells in normal and diseased skin*. J Invest Derm. 102:773-80.
 - Lopez, L. R. 2001. *Caracterización de células dendríticas (DCs) en epidermis de armadillo de nueve bandas (*Dasyurus novemcinctus* Linn.)*. Tesis de Licenciatura. ENEP Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, EDOMEX.
 - Lorincz, A. T., et al. 1992. *Human papillomavirus infection of the cervix*. Obstet Gynecol. 79:328-37.
 - Lotze, M. T. y A. W. Thompson. 1999. *Dendritic cells: Biology and clinical applications*. Academic Press. UK. 733 pp.
 - Martin, L. H., et al. 1986. *Isolation of CD1 genes: a family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens*. Proc Natl Acad Sci. USA. 83:9154-58.
 - Martín, L. H., et al. 1987. *Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b and CD1c*. Proc Natl Acad Sci. USA. 84:9189-93.
 - Mason, D. et al. 2001. *CD antigens 2001: Aims and results of HLDA workshops*. Stem Cells. 19:556-62.
 - Mc Dermott, R. et al. 2002. *Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartment in human epidermal langerhans cells, wich form where langerin accumulates*. Mol Biol Cell. 13:317-35.
 - Mougin, C., et al. 2000. *Human papillomaviruses, cell cycle and cervical cancer*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (PARIS). 29(1):13-20.
 - Nestle, F. O., et al. 1998. *Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate-pulsed dendritic cells*. Nat Med. 4:328-32.
 - Paglia, P., et al. 1996. *Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo*. J Exp Med. 183:317-22.
 - Paul, W. E. 1999. *Fundamental Immunology*. 4^a ed. Ed. Raven Press. USA. 1490 pp.
 - Pierre, P., et al. 1997. *Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells*. Nat. 388(21):787-92.
 - Pope W. A., et al. 1998. *Lymphocytes and dendritic cells in the normal uterine cervix. An immunohistochemical study*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 81(2): 277-82.
 - Porcelli, S. 1995. *The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules*. Adv Immunol. 59:1-98.
 - Porcelli S. A., Segelke B. W., Sugita M., Wilson I. A., Brenner M. B. 1998. *The CD1 family of lipid antigen presenting molecules*. Immunol Today. 19:362-68.
 - Randolph, G. J., et al. 1998. *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of*

- transendothelial trafficking*. Science. 282(5388):480-83.
- Rescigno, M. *et al.* 1999. *Dendritic cells at the end of the millennium*. Immunol and Cell Biol. 77:404-10.
 - Richart, R. M. y B. A. Barron. 1969. *A follow-up study of patients with cervical displasia*. Am J Obstet Gynecol. 105:386-93.
 - Rovere, P., *et al.* 1998. *Cutting Edge: Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function*. J Immunol. 161(9): 4467-71.
 - Santambrogio, L., *et al.* 1999. *Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci. USA. 96(26):15050-55.
 - Saudrais, C., *et al.* 1998. *Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells*. J Immunol 160(6): 2597-2607.
 - Shurin, M. R. 1996. *Dendritic cells presenting tumour antigen*. Cancer Immunol Immunother. 43:158-164.
 - Specht, J. M., *et al.* 1997. *Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases*. J Exp Med. 186:1213-21.
 - Steinman, R. M. y Z. A. Cohn. 1973. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution*. J Exp Med. 137:1142-1162.
 - Steinman, R. M. 2000. *DC- SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells*. Cell. 100(3):491-94.
 - Stites, *et al.* 1996. *Inmunología básica y clínica*. 8ª ed. Ed. Manual Moderno. México. 1099 pp.
 - Stockwin, L. H., *et al.* 2000. *Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease*. Immunol and Cell Biol. 78:91-102.
 - Valladeau, J., *et al.* 2000. *Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules*. Immunity 12:71-81.
 - (b)Valladeau, J., *et al.* 2002. *Identification of mouse Langerin/CD207 in langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues*. J Immunol. 168:782-92.
 - Vandenabeele, S. y L. Wu. 1999. *Dendritic cells origins: Puzzles and paradoxes*. Immunol and Cell Biol. 77:411-19.
 - Wykes, M., *et al.* 1998. *Dendritic cells interact directly with naïve B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response*. J Immunol. 161(3):1313-19.

Apéndice 1 (REACTIVOS Y SOLUCIONES)

- **Solución amortiguadora salina-fosfatos (PBS 1x-pH 7.4).**

- 8 g de NaCl.
- 0.2 g de KCl.
- 1.44 g de Na₂HPO₄.
- 0.24 g de KH₂PO₄.

Se agrega H₂O destilada, se ajusta el pH a 7.4 y se afora a 1000 mL. Se filtra y se guarda a temperatura ambiente.

- **Colagenasa-Dispasa.**

- Colagenasa (Sigma Cat.C-0130, 10 U/ml).
- Dispasa (Gibco Cat. 17105-041, 4 U/ml).

- Pesar 4 mg de colagenasa y diluir en 1 mL de PBS 1x.
- Pesar 99 mg de dispasa, adicionar 240 µL de colagenasa y aforar a 30 mL con PBS 1x.
- Se almacena en el congelador en alícuotas de 1mL y se descongela inmediatamente antes de usar.
- La colagenasa sobrante se congela y se puede utilizar en otra ocasión.

- **Paraformaldehído (Stock de 10 mL).**

- Paraformaldehído (Sigma Cat. P-6148).

- Se pesan 0.4 gr de paraformaldehído.
- Al paraformaldehído se le agregan 6 mL de PBS 2x y se calienta hasta 60°C para poder diluirlo.
- Se afora a 10 mL de PBS 2x.
- Para obtener una concentración final de 2% en PBS 1x se diluye 1:1 con H₂O destilada.

- **H₂O₂ 5% (Stock de 5 mL).**

- Agregar 830 µL de H₂O₂ 30%.
- aforar a 10 mL con PBS 1x.
- Se tiene que preparar en el momento y proteger de la luz.

- **BSA (Albúmina Sérica Bovina) 3%.**

- BSA (Sigma, Cat. A9647).

 - Se pesa 300 µg de BSA.
 - Se afora a 10 mL con PBS 1x.

- **Triton .25%.**

- Triton x100 (Polysciences, Inc., Cat. 4605).

- a) Medir 250 μ l de Triton x100.
- b) Aforar a 100 mL con PBS 1x.

- **Diaminobenzidina (DAB) (10 mL).**

- a) Pesar 6 μ gr de DAB.
- b) Agregar 10 mL de Tris HCl pH 7.4.
- c) Agregar a la solución 10 μ l de H₂O₂.
- d) Se tiene que preparar 30 min. antes de su utilización.

- **Immu-mount.**

- Immu-mount (SHANDON, Cat. 9990402).

- **ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

1) Ratón α -Humano HLA-DR, cadena α .
- Clona: NA 1/34.
- Isotipo: IgG_{2a}.
- Proveedor: DAKO.
- Catálogo: M0721.

2) Ratón α -Humano CD1a, Timocito cortical.
- Clona: Tal.1B5.
- Isotipo: IgG₁.
- Proveedor: DAKO.
- Catálogo: M0746.

1) Ratón α -Humano Langerina/CD 207.
- Clona: DCGM4.
- Isotipo: IgG₁.
- Donado por el Dr. Sem Saeland y el Dr. Serge Lebecque, Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, Schering-Plough. Lyon, Francia.

1) IgG Ratón.
- Clona: Tal.1B5.
- Isotipo: IgG₁.
- Proveedor: DAKO.
- Catálogo: M0746.

5) Caballo α -Ratón Biotinilado.
- Isotipo: IgG₁.
- Proveedor: VECTOR.

6) SAV-POX:
-Proveedor: VECTOR.

Apéndice 2

(CONTEO DE SOMAS PARA LOS MARCADORES DE LAS DC EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS).

Muestra 1			Muestra 2			Muestra 3			Muestra 4			Muestra 5		
MHC-DR	CD1a	Lang.	MHC-DR	CD1a	Lang.	MHC-DR	CD1a	Lang.	MHC-DR	CD1a	Lang.	MHC-DR	CD1a	Lang.
38	26	40	29	53	35	35	23	17	15	38	27	64	15	35
35	30	12	35	43	37	39	26	25	18	47	36	47	26	32
37	36	38	31	45	28	28	19	13	12	17	20	72	14	12
56	32	34	27	49	22	26	35	17	10	38	24	65	25	24
63	28	38	36	32	25	37	29	19	26	45	17	63	3	27
48	26	23	20	36	31	45	32	8	15	43	33	69	17	13
43	32	25	24	23	32	32	30	3	42	53	26	71	21	26
57	27	32	17	37	36	36	22	9	23	46	24	63	9	29
43	22	30	33	26	23	38	34	13	25	48	38	74	4	23
53	26	17	26	13	37	32	28	15	18	63	35	64	3	37
43	23	26	24	38	26	8	26	19	43	70	37	50	18	26
45	24	20	38	33	13	27	36	14	32	63	56	47	11	13
49	28	23	35	30	38	36	28	25	22	83	63	56	28	38
32	32	24	37	29	33	41	15	23	25	76	48	57	23	33
36	23	23	56	35	32	34	27	29	37	66	43	45	19	30
39	36	7	63	37	39	26	32	17	39	52	13	48	14	29
49	29	16	48	28	28	19	17	28	19	56	38	57	11	35
46	29	5	43	22	33	17	27	12	13	48	33	40	31	37
58	26	22	57	25	31	35	24	16	19	63	30	30	21	28
53	28	25	43	31	43	42	18	27	16	32	29	46	16	22

Fido is for Fido.
Fido is against no one.

Fido is Youth.
Fido has no age

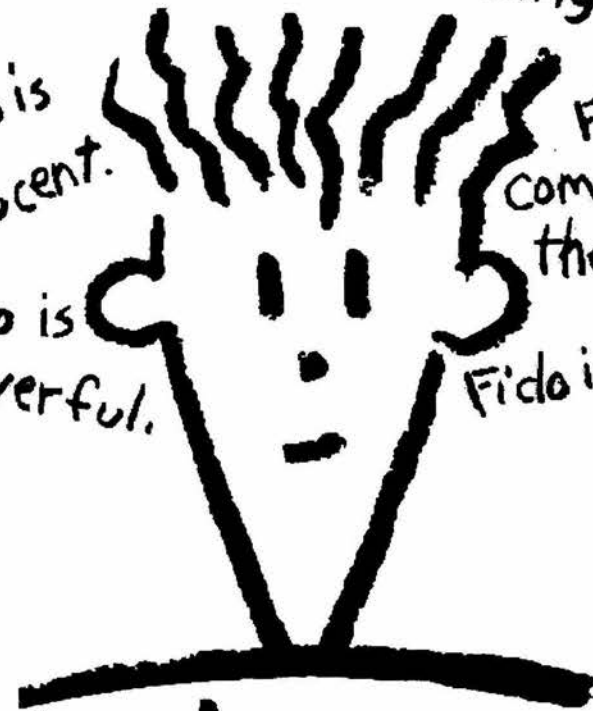
Fido sees everything.
Fido judges nothing.

Fido is
Innocent.

Fido is
Powerful.

Fido
comes from
the past.

Fido is the
future.



Fido Dido

Jusqu'a n'en pouvoir plus.