



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

FENOTIPO Y CAPACIDAD DE RESPUESTA DE LAS
CÉLULAS DENDRÍTICAS DEC-205 EN ÓRGANOS
LINFOIDES SECUNDARIOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ROSA CAMACHO SANDOVAL



MÉXICO, D.F.

2007



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.

JURADO

Presidente	Prof. Saturnino de León Chapa
Vocal	Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
Secretario	Prof. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
1 ^{er} Suplente	Prof. Mónica Berenice Heras Chavarría
2 ^o Suplente	Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia

El presente trabajo fue realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes. Hospital de Especialidades, Centro Medico Nacional Siglo XXI.

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
ASESOR

Rosa Camacho Sandoval
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a su comunidad y ser parte fundamental de mi formación académica y personal.

Agradezco a la Facultad de Química y a cada uno de sus profesores por compartir sus conocimientos y brindarme la formación académica necesaria para seguir adelante.

A la Dra. Laura Bonifaz por confiar en mí, guiarme, ayudarme y asesorarme en el desarrollo de este trabajo. Por enseñarme el interés por la investigación.

A Gibran, David, Paty y Luzma por apoyarme en la realización de este trabajo, por su paciencia, enseñanza y consejos. Principalmente por brindarme su amistad.

Al Sr. Ricardo y al Sr. Daniel por darme todas las facilidades para trabajar en el bioterio y por proporcionarme los ratones para la realización de este trabajo.

A mis sinodales por mejorar este trabajo.

DEDICATORIAS

A mis padres, Rosa y Erasmo, por su cariño, comprensión y apoyo incondicional. Por alentarme y darme la oportunidad de realizar mis metas.

A mis hermanos, cuñados y sobrinos porque siempre han estado conmigo para escucharme y apoyarme, aunque no me entiendan. Porque sin ustedes llegar a esta meta hubiera sido más difícil, los quiero a todos.

A Mamina porque siempre creyó en mí y me alentó a seguir adelante, espero este satisfecha con este trabajo.

A Cuauhtemoc, Arturo, Fabiola, Felipe, Eva y Rogelio por apoyarme, escucharme y brindarme su amistad durante tanto tiempo. Por ser parte importante de mi vida.

A los telerines (Iliana, Gustavo, Rosario, Salomón, Lilian, Toño, José y demás anexos), a Hector, Adriana y Gabriel por su amistad incondicional, por escucharme, apoyarme y ayudarme en este difícil y agradable trayecto que es la formación profesional.

A la Dra. Bonifaz, Dr. Moreno, Gibran, David, Paty, Luzma, Ricardo, Alejandro, Gaby, Evita y Rosario por su amistad, consejos y compañerismo. Por enseñarme lo que es un equipo de trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Páginas
Abreviaturas	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	
- Generalidades	5
- Origen y características generales de las células dendríticas	7
- Subtipos	9
- Células dendríticas inmaduras	10
- Migración constitutiva y migración en presencia de infección	11
- Maduración de células dendríticas	12
- Inducción de TI o RI por CD	14
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	
- Animales	22
- Estímulos	22
- Preparación de células de ganglio linfático	23
- Preparación de células de bazo	23
- Citometría de flujo	24
RESULTADOS	
- Identificación de las poblaciones DEC-205 positivas en órganos linfoides secundarios	25
- Cinética de activación de las CD DEC-205 positivas después de la administración de distintos estímulos.	26
- Cinética de activación de las CD DEC-205 positivas después de la administración de distintos estímulos en ratones libres de patógenos.	34
- Estímulos combinados en ratones libres de patógenos	40
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50

Abreviaturas

BCR	Receptor de células B
CD	Célula dendrítica
CDp	Célula dendrítica plasmacitoide
CL	Células de Langerhans
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTLA-4	Proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4
Fc	Fracción constante
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
IFN-γ	Interferón γ
IL	Interleucina
ITAM	Motivos de activación del inmunorreceptor basado en tirosina
ITIM	Motivos de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocítica
LG	Lisozima de gallina
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MO	Médula ósea
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PD-1	Muerte programada-1
Poly I:C	Poliribonucleotido poly(I)·poly(C)
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RI	Respuesta inmune
SSC-A	Complejidad
TCR	Receptor de células T
Th	Células T cooperadoras
TI	Tolerancia inmunológica
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSLP	Linfopoyetina de estroma tímico

INTRODUCCIÓN

La inducción de respuesta inmune (RI) celular mediada por linfocitos T específicos contra un antígeno determinado depende de una serie de mecanismos que finalmente llevan a la formación de células efectoras con la capacidad de reconocer al agente inductor. Para la inducción de una respuesta mediada por linfocitos T es necesaria su interacción, a través de su receptor específico (TCR), con células presentadoras de antígeno profesionales (CPA), capaces de presentar péptidos antigénicos unidos a moléculas clase I y clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Para esta interacción, es importante que las CPA sean capaces de proporcionar señales adicionales a través de las moléculas co-estimuladoras (CD86/CD80), que llevan a la activación de linfocitos T, que en el caso de los CD4⁺ implica la diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas tipo Th1, Th2 y posiblemente otros. Para los linfocitos T CD8⁺, su diferenciación a células T citotóxicas efectoras. La inducción de respuesta inmune culmina con la generación de células de memoria.

Las células dendríticas (CD) son las CPA más importantes en el inicio de una RI, pero también participan en el proceso opuesto que es la no respuesta o inducción de tolerancia inmunológica (TI) e inclusive, dependiendo de las condiciones de su activación, pueden polarizar la RI a Th1 o Th2. En términos generales se considera que las CD inmaduras o en reposo inducen TI y posterior a un estímulo de maduración, cambian su fenotipo y adquieren la capacidad de inducir RI.

El proceso de maduración de las CD involucra la expresión de moléculas MHC clase II en la superficie así como un incremento en su capacidad de procesar y presentar antígenos. Un punto que a la fecha se considera crucial durante la maduración de las CD es la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citocinas las cuales son importantes para la inducción de RI.

Una propuesta para la inducción de RI contra TI es la maduración de CD con el incremento de procesamiento de antígeno en presencia de inducción de moléculas co-estimuladoras (RI) o en ausencia de estas (TI). Así, se considera que si una CD expresa moléculas MHC clase II en superficie pero no expresa adecuadamente moléculas co-estimuladoras y más importante si no es capaz de secretar citocinas esta célula sería inductora de TI y no de RI. Por otra parte dependiendo de la expresión de moléculas de superficie y del patrón de expresión de citocinas es posible que pueda polarizar la RI. Recientemente se ha sugerido, que para la inducción de tolerancia inmunológica es importante la expresión de moléculas inhibitoras como son B7-DC y/o B7-H1 ligandos de la molécula PD-1 y CD80 ligando de CTLA-4, que son capaces de mandar señales negativas durante la interacción entre la CPA y los linfocitos T.

Las CD pueden encontrarse en el organismo en tejido periférico como células inmaduras con MHC clase II intracelular y prácticamente sin expresión de moléculas co-estimuladoras. Después de migrar a los órganos linfoides estas células adquieren características de CD maduras sobre todo si la migración es acompañada de estímulos inflamatorios. Una complejidad adicional para determinar el fenotipo maduro o inmaduro de las CD de acuerdo a los criterios mencionados es que en los órganos linfoides existen CD de distintos orígenes y con expresión diferencial de marcadores de superficie, que posiblemente reflejen diferentes funciones. Sin embargo, aparentemente la función de las CD de los órganos linfoides secundarios en reposo es la inducción de tolerancia inmunológica. En los ganglios linfáticos existen al menos cinco poblaciones de CD con expresión diferencial de marcadores de superficie y con distintos grados de diferenciación o maduración. Se ha sugerido que algunas CD en reposo pueden poseer un fenotipo más tolerogénico que otras (mayor expresión de moléculas inhibitoras), haciendo más difícil su conversión a células con capacidad de inducir RI.

En los órganos linfoides secundarios se encuentran CD positivas para el receptor tipo lectina DEC-205, algunas son provenientes de periferia y otras son residentes. Los antígenos dirigidos *in situ* por medio de DEC-205 a CD en reposo inducen tolerancia periférica. Se ignora si las células responsables son las provenientes de periferia o las residentes del tejido linfoide o ambas.

La activación o maduración de las CD se da por estímulos de la inmunidad innata como los ligandos de los receptores tipo Toll (TLR) o por estímulos de inmunidad adaptativa como la interacción de la moléculas CD40 en la CD con su ligando en la célula T.

A la fecha no se ha determinado el fenotipo inmunogénico o tolerogénico de las CD DEC-205 positivas en los órganos linfoides en condiciones de reposo o después de la inoculación de estímulos de inmunidad innata (ligandos de receptores tipo Toll) o de un anticuerpo agonista para la molécula CD40, que simularía el estímulo por las células T activadas de la inmunidad adaptativa. Esto es de suma importancia para entender las condiciones bajo las cuales una CD tendría el potencial o no para iniciar una RI o en su caso de inducir TI.

ANTECEDENTES

Generalidades

La defensa frente a microorganismos está mediada por la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. La inmunidad innata comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y están preparados para responder con rapidez a ésta. Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en: barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias anti-microbianas sintetizadas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos). Componentes del sistema del complemento y otros mediadores de inflamación; citocinas que regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata. Las células dendríticas (CD) son parte de la inmunidad innata pero que tienen la capacidad mediante la presentación de antígeno de hacer un puente de conexión con la inmunidad adaptativa (Abbas, 2003).

La inmunidad adaptativa es estimulada generalmente por la exposición a agentes infecciosos y aumenta en magnitud y capacidad de defensa con cada exposición sucesiva a un microorganismo determinado. Los componentes de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y linfocitos B, los cuales median la inmunidad celular y humoral respectivamente a través de la expresión de receptores de superficie TCR y BCR (Abbas, 2003). Los linfocitos B reconocen el antígeno directamente a diferencia de los linfocitos T los cuales requieren la presentación de péptidos unidos a moléculas del MHC por una célula presentadora de antígeno (CPA).

Existen otras células que son importantes en la conexión entre los dos tipos de inmunidad: las células asesinas naturales NK, los linfocitos NKT y $T\gamma\delta$.

Para la activación de los linfocitos T se requiere del reconocimiento de péptidos derivados de proteínas unidos a moléculas del MHC en la superficie de una CPA profesional. La célula dendrítica es la CPA más importante en el inicio de una respuesta inmune (RI) mediada por linfocitos T ya que tiene la capacidad de expresar moléculas adicionales o co-estimuladoras necesarias para la activación adecuada de los linfocitos T.

Por otra parte para prevenir la autoinmunidad y evitar el daño colateral durante una RI, existen mecanismos de tolerancia inmunológica (TI), que es un estado fisiológico de ausencia específica de RI. En los linfocitos T puede ocurrir a nivel central, durante su ontogenia en el timo, o en la periferia, a través de diversos mecanismos que aseguran un estado de no respuesta. A la fecha se conocen tres mecanismos esenciales que son la delección clonal, que es el mecanismo principal de tolerancia central que también puede ocurrir en la periferia (Green, 2003); anergia clonal, que ocurre predominantemente en la periferia (Schwartz, 2003) y regulación por diferentes tipos de linfocitos T reguladores, que se generan en el timo pero también pueden ser inducidos de *novo* en la periferia (Fehervari, 2004. Yamazaki, 2003). Para la inducción de TI mediada por linfocitos T es también necesaria de la presentación de antígeno pero en este caso en ausencia de señales co-estimuladoras o inclusive en presencia de otras moléculas capaces de mandar señales que regulen negativamente la activación de los linfocitos T.

Además de las CD, los macrófagos y los linfocitos B son también considerados como CPA profesionales. Las CD por su localización en la zona T del órgano linfoide son muy importantes en el inicio de una RI mediada por linfocitos T. Los linfocitos B son muy importantes en respuesta secundaria y presentan eficientemente péptidos derivados de antígenos reconocidos por el BCR, receptor de membrana específico. A pesar de que existen múltiples evidencias *in vitro* de que los macrófagos son células capaces de presentar

antígeno no existe a la fecha ninguna evidencia *in vivo* de su papel como CPA en la inducción de RI.

Las CD además de ser las CPA más importantes en el inicio de una RI celular participan también en el control de ésta, ya que además de presentar antígenos muy eficientemente por moléculas MHC clase I y II, dependiendo del tipo de moléculas expresadas en su superficie y de la secreción de citocinas pueden controlar y dirigir el tipo de RI. Por otra parte participan también en la inducción de TI.

Para entender como una misma célula puede participar en dos mecanismos opuestos RI o TI e inclusive modular el tipo de RI iniciada, es importante revisar algunas características en cuanto al origen, sub-poblaciones, fenotipo, localización y activación/maduración de las CD.

Origen y Características Generales de las CD

De acuerdo a conceptos actuales, las CD se originan de células progenitoras hematopoyéticas en médula ósea. Los precursores de CD migran de la médula ósea al torrente sanguíneo, distribuyéndose ampliamente en tejidos linfoides y no-linfoides.

Por estudios en ratones adultos, se sabe que en condiciones de reposo las CD epidermales (subtipo de CD en piel) tienen la capacidad de renovarse a partir de precursores locales. Pero en condiciones de inflamación también se induce su proliferación por el reclutamiento de monocitos y precursores de CL de la sangre (Kissenpfennig, 2006).

Los precursores de CD dan origen a CD “inmaduras” que se localizan en tejido periférico y su función principal es capturar antígenos del medio que los rodea así como patrullar la presencia de agentes externos. Estas células expresan

abundantemente receptores endocíticos, moléculas MHC clase II en el interior de la célula y tienen baja o nula expresión de moléculas co-estimuladoras. Las células de Langerhans (CL) expresadas en la capa epidérmica de la piel son el prototipo de CD inmaduras. Muchas de las CD localizadas en la periferia tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos cercanos a su localización. La migración de las CD se da constitutivamente y puede incrementarse por la presencia de receptores en su superficie capaces de cambiar fenotípica y/o funcionalmente a un estado “maduro” e incluso generar sub-poblaciones con distinto fenotipo con el potencial de realizar funciones distintas y diversas (Steinman, 1997).

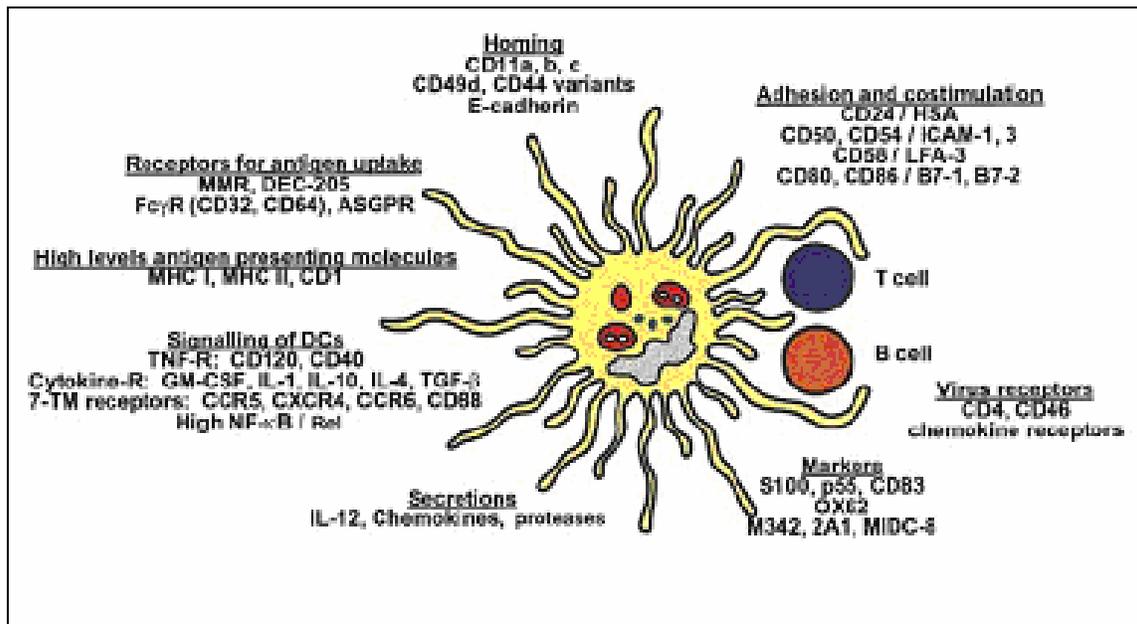


Figura 1. Algunas características de CD (Banchereau & Steinman, 1998).

Subtipos de CD

Dentro de tejidos linfoides, las CD pueden subdividirse en varias subpoblaciones basadas en la expresión de marcadores de superficie celular.

Actualmente, el mejor marcador de CD murinas en tejidos linfoides es CD11c (Steinman, 1991). Sin embargo, dependiendo de su ubicación dentro de estos órganos, y/o origen o estado de activación, las CD pueden también expresar combinación de marcadores linfoides CD4 y CD8 α ; marcadores mieloides CD11b y F4/80, y los receptores de tipo lectina como DEC-205, 33D1 y langerina que son relativamente restringidos a poblaciones de CD (del Hoyo, 2002; Shortman, 2002; Steinman, 1991).

Las CD que tienen un fenotipo: CD4⁻CD8 α ⁻CD11b⁺F4/80⁺DEC205⁻33D1⁺, CD4⁺CD8 α ⁻CD11b⁺F4/80⁺DEC205⁻33D1⁺, son localizadas principalmente dentro de la zona marginal del bazo, mientras que las CD CD4⁻CD8 α ⁺CD11b⁻F4/80⁻DEC205⁺33D1⁻, son localizadas principalmente en las áreas paracorticales ricas en células T del bazo y son llamadas CD interdigitales (del Hoyo, 2002; Shortman, 2002). Las CD con fenotipo CD4⁻CD8 α ⁺CD11b⁻DEC205⁺ también parecen ser subtipo dominantes en timo murino.

En ganglios linfáticos además de la población CD8 α ⁺DEC205⁺ y las poblaciones CD8 α ⁻ similares a las de bazo, consideradas poblaciones residentes del órgano linfoide; se encuentran también CD con fenotipo CD4⁻CD8 α ^{bajo}CD11b⁺DEC205^{bajo} langerina negativa, así como CD CD4⁻CD8 α ^{bajo}CD11b⁺DEC205⁺ langerina positiva. Estas dos últimas poblaciones son emigrantes de la piel, provenientes de la dermis y epidermis respectivamente (Shortman, 2002).

Otro subtipo de CD son las CD plasmacitoides (CDp), se distinguen por la expresión de B220 y niveles intermedios de CD11c (Barchet, 2005). Son células relativamente duraderas y circulantes, que después de un estímulo viral u otra infección microbiana producen grandes cantidades de interferones tipo I (Liu, 2005; O`Keeffe, 2002).

Células Dendríticas Inmaduras

En la mayoría de tejidos, las CD se encuentran en lo que se denomina estado inmaduro, incapaz de estimular células T. Aunque estas células carecen de señales accesorias requeridas para la activación de células T, como CD40, CD54 y CD86; se encuentran extremadamente bien equipadas para capturar antígenos. Algunos de los receptores que utilizan estas células para captar antígeno son capaces de inducir su maduración y migración sin embargo muchos receptores endocíticos no afectan el estado de maduración de la CD y por lo tanto, se necesitaría de la presencia de señales adicionales, que se mencionaran más adelante, para inducir la maduración y la movilización de las CD a los órganos linfoides (Banchereau, 1998).

Las CD inmaduras tienen varias características que permiten la captura de antígenos:

- Pueden tomar partículas y microbios por fagocitosis (Innaba, 1993; Moll, 1993).
- Pueden formar grandes vesículas pinocíticas en las cuales toma fluidos extracelulares y solutos, proceso llamado macropinocitosis (Sallusto, 1995).
- Expresan receptores mediadores de endocitosis, que incluyen receptores de lectina tipo-C como el receptor de manosa de macrófagos (Sallusto, 1995), DEC-205 y langerina (Jiang, 1995) así como receptores Fc γ y Fc ϵ (Sallusto, 1994).

Las CD inmaduras residentes de tejido pueden identificar patógenos directamente por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) usando receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) altamente conservados como los receptores tipo Toll (TLRs) (Medzhitov, 1997).

Migración Constitutiva y Migración en Presencia de Infección

Una vez activadas o aún en condiciones de reposo, las CD viajan a tejidos linfoides como son el bazo y nodos linfáticos; en donde puede completar su maduración (Kitajima, 1996), localizarse en la zona T del ganglio linfático e interactuar con los linfocitos T para mantener su viabilidad (proliferación homeostática) (Broker, 1997), inducir TI o RI (Adema, 1997).

Las CL de la epidermis son el modelo de CD migratorias, tienen la función de sentinelas para detectar patógenos y antígenos propios en piel y transportar la información a células T presentes en ganglios linfáticos drenantes.

Usando modelos experimentales en ratón, ha sido posible monitorear a las CL en condiciones de reposo e inflamación. Se ha observado que en condiciones inflamatorias las CL experimentan modificaciones morfológicas y migran de la epidermis. Citocinas inflamatorias como TNF- α (producida por queratinocitos) e IL-1 β (producida por CL) regulan negativamente la adhesión a queratinocitos favoreciendo la migración (Kissenpfennig, 2006).

En contraste, bajo condiciones de reposo las CL permanecen en epidermis y sólo una pequeña fracción es capaz de migrar (Kissenpfennig, 2006). Dentro de los ganglios linfáticos estas CL tienen vida media corta y se piensa que son continuamente remplazadas por las células emigrantes de la piel (Kamath, 2002; Salomon, 1998).

Por otro lado, se ha encontrado que en condiciones inflamatorias las CD dermales migran a los ganglios linfáticos drenantes más rápidamente que las CL. Probablemente esto se debe a que las CL necesitan primero separarse de los queratinocitos vecinos (Kissenpfennig, 2006).

Maduración de Células Dendríticas

La maduración de una CD es un proceso complejo que inicialmente implica modificación de sus marcadores de superficie, especialmente de moléculas que participan en la activación de los linfocitos T (MHC clase II, CD80, CD86, CD40), así como la secreción de citocinas importantes en la inducción de respuesta inmune (IL-12, TNF, IFN α). La maduración de las CD se ha asociado también con un aumento en su capacidad de procesar y presentar antígenos, principalmente de origen exógeno, por MHC clase I (transpresentación) (Gil-Torregrosa, 2004).

Finalmente un proceso relevante en la maduración de las CD es la expresión y secreción de citocinas las cuales son cruciales en la inducción de RI, en la polarización de la RI e inclusive en la inducción de TI como es la inducción de linfocitos T reg.

Los inductores de maduración de CD mejor caracterizados incluyen componentes de patógenos, como los ligandos de los receptores tipo Toll (TLRL) (Iwasaki, 2004. Reis e Sousa 2001), citocinas, células de la inmunidad innata como NKT (Fujii, 2003; Hermans, 2003), NK (Zingoni, 2005. Lanier, 2005), y linfocitos T $\gamma\delta$ (Leslie, 2002. Conti, 2005), además de moléculas inducidas por la interacción de las CD con los linfocitos de la inmunidad adaptativa principalmente CD40 en CD, con su ligando en linfocitos T CD4⁺, CD40L (Fujii, 2004). Los distintos estímulos de maduración definen además el tipo de respuesta del linfocito T. Por ejemplo, la maduración dependiente de CD40 lleva a la diferenciación de una CD que permite la inducción de linfocitos T tipo Th1, mientras que la

exposición de CD a citocinas derivadas de epitelios como TSLP (linfopoyetina de estroma tímico) genera una CD que induce células T "inflamatorias" Th2 secretoras de IL-4 (Watanabe, 2005).

Aunque el cambio de marcadores de superficie en CD tratadas con CD40L o TSLP es similar, las CD tratadas con uno u otro estímulo difieren notablemente en la producción de citocinas, quimiocina y finalmente en el tipo de RI que inducen.

En la actualidad se sabe que todos los estímulos antes mencionados son capaces de remodelar los marcadores de superficie en las CD, pero no todos son capaces de inducir RI. En algunos casos se requiere de la combinación de distintos estímulos para inducir una RI adecuada (Ahonen, 2004).

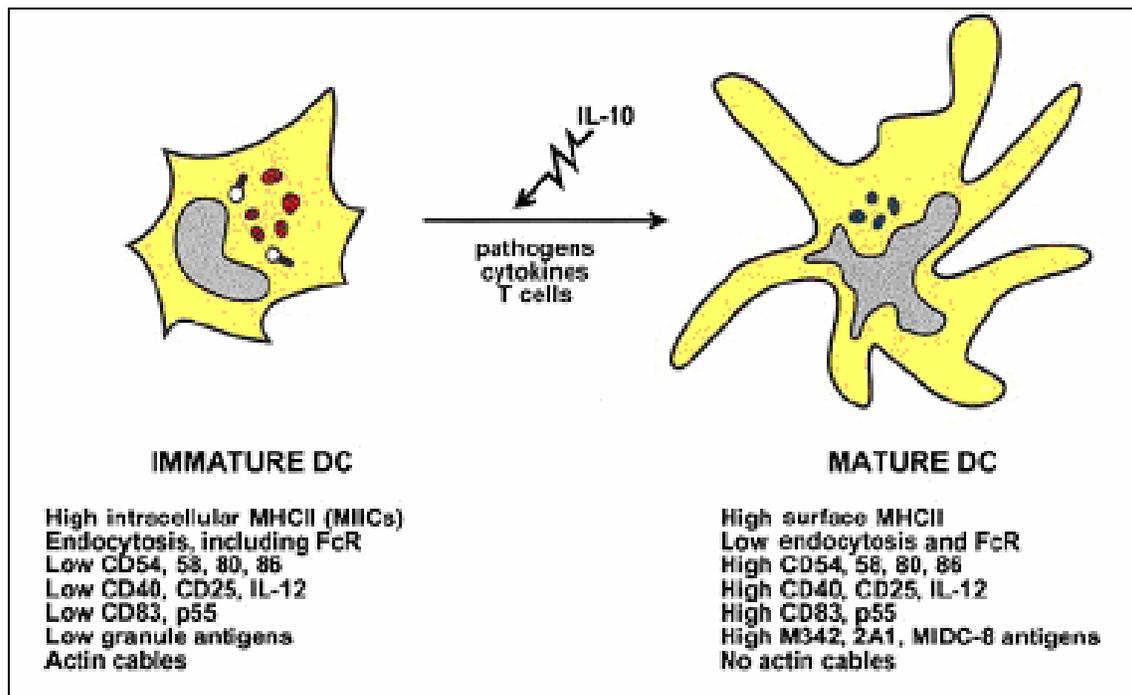


Figura 2. Efecto de la maduración de CD (Banchereau & Steinman, 1998).

Inducción de TI o RI por CD

Pese a la complejidad de lo descrito, la existencia de por lo menos dos poblaciones de CD con características fenotípicas distintas, permitió diseñar estudios dirigidos a entender si la capacidad de una CD para inducir tolerancia o inducir respuesta inmune ocurren en la misma célula dependiendo de si su fenotipo es inmaduro (de reposo) o maduro, respectivamente.

Los primeros estudios para dirigir antígenos *in situ* a CD en reposo utilizaron como estrategia la unión covalente de ovalbumina (OVA) como antígeno modelo que genera péptidos presentados por MHC clase I, o un péptido de lisozima de gallina (LG), presentado por MHC clase II, a un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor DEC-205 o CD205 (DEC-OVA o DEC-LG). (Hawiger, 2001; Bonifaz, 2002) DEC-205 es un receptor endocítico expresado en altos niveles por CD, proteína de 205-KD que consta de 10 dominios contiguos de lectina tipo C (Jiang, 1995. Mahnke, 2000). Los anticuerpos anti-DEC-205 son selectivos para estas CD en ratón (Hawinger, 2001).

Las ventajas de dirigir el antígeno a este receptor son: 1) es expresado en forma abundante por CD en la zona T del tejido linfóide; 2) su dominio citoplásmico no tiene motivos de señalización, por lo que no perturba el estado de reposo de las CD y 3) permite la presentación eficiente de antígenos unidos a MHC clase I y II (Bonifaz, 2002). Este modelo experimental permitió concluir que la presentación de antígeno por CD en reposo tiene como consecuencia la inducción de tolerancia periférica, tanto en células CD4 (DEC-HEL), como CD8 (DEC-OVA). El mecanismo aparente de tolerancia fue delección, ya que a pesar de que hubo una eficiente expansión inicial de linfocitos T antígeno específicos, no fue posible detectarlos 7-14 días después de la inyección del antígeno acoplado a anti-DEC-205. La coinyección de un anticuerpo agonista anti-CD40, como estímulo de maduración, fue suficiente para romper la TI e inducir RI, que en modelos

tumorales, es protectora, lo que sugiere que, dependiendo de su estado de reposo o activación, la misma célula es capaz de inducir TI o RI, respectivamente.

Estos estudios se confirmaron en ratones transgénicos que expresan péptidos derivados de proteínas del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en forma inducible en CD en reposo, bajo el promotor de CD11c. La presentación de antígeno por estas CD indujo tolerancia periférica, que nuevamente viró a RI con la inyección de anti-CD40 como estímulo de maduración (Probst, 2003). En el primer trabajo el antígeno se dirigió a células DEC-205 positivas, quienes son las únicas que lo presentan. Sin embargo, en el segundo trabajo los péptidos del LCMV se expresan en células CD11c positivas sin restricción a ninguna subpoblación lo cual permite ampliar la conclusión a todas las CD en reposo y sugiere que la inducción de tolerancia no es función de una célula especializada, sino de todas las CD en reposo.

Lo anterior indica que las CD en reposo participan en la inducción de tolerancia y una explicación simple podría relacionarse con el clásico dogma de la “segunda señal”, por falta de la expresión adecuada de moléculas co-estimuladoras. No obstante, diversos estudios señalan que la ausencia de segunda señal no necesariamente lleva a la tolerancia periférica. Así, cuando los linfocitos T son estimulados solamente a través del TCR en ausencia de la interacción mediada por CD86 y su receptor CD28 no responden adecuadamente, pero las células que sobreviven no son tolerantes, ya que son capaces de responder a estímulos subsecuentes (Perez, 1997). Esto sugiere, que más que falta de moléculas co-estimuladoras, la inducción de tolerancia depende de receptores inhibidores capaces de señalar negativamente.

Estudios recientes han demostrado que CD80 es ligando preferente de CTLA-4 sobre CD28 y que la consecuencia de esta interacción es un freno, más que de activación para el linfocito T (Pentcheva-Hoang, 2004; Collins, 2002). Otras moléculas que inhiben la RI son B7-H1 y/o B7-DC, ligandos de PD-1 en linfocitos T (Nishimura, 2001; 1999).

En el mismo modelo transgénico que expresa péptidos derivados de proteínas del LCMV en CD en reposo, el bloqueo tanto de la interacción CTLA-4-CD80 como B7-H1-PD1 durante la presentación de antígeno favoreció la inducción de RI, indicando que la expresión de moléculas inhibitoras en CD en reposo es crucial para la inducción de tolerancia (Probst, 2005). De acuerdo con lo anterior, las CD aparentemente aportan señales negativas en forma constitutiva. Esto no excluye la posibilidad de que el fenotipo tolerogénico de una CD podría profundizarse con algunos estímulos.

Las CD expresan receptores endocíticos que señalizan negativamente a través de motivos ITIM. La endocitosis a través de éstos podría profundizar el fenotipo tolerogénico. Diversos receptores con motivos ITIM (algunos pertenecientes a la familia de las integrinas) participan en la endocitosis de células apoptóticas o detritus celulares por CD (Nauta, 2003; Albert, 1998), lo cual ocurre en forma continua en los tejidos, después las CD migran a los órganos linfoides, donde podrían presentar antígenos propios a linfocitos T (Huang, 2000; Scheinecker, 2002). La consecuencia de esto es nuevamente la inducción de tolerancia más que RI, como un mecanismo para evitar autoinmunidad (Legge, 2002; Liu, 2002). Otros receptores de endocitosis que llevan a una eficiente presentación de antígenos son los receptores para la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas, uno de los cuales (FcR γ IIb) tiene también ITIM y señala negativamente. (Ravetch, 2000)

La ausencia o bloqueo de los receptores Fc inhibidores aumenta el potencial de las CD de inducir RI y se asocia a autoinmunidad (Kalergis, 2002; Dhodapkar, 2005). Dentro de los receptores tipo lectina, además de DEC-205, existen otros que han sido implicados en la endocitosis y presentación de antígeno eficiente, especialmente por MHC clase II (Tan, 1997; Jiang, 1995; Engering, 2002). Algunos de estos tienen residuos ITAM potenciales, que podrían señalar negativamente durante la endocitosis (Neil, 2005). Sin embargo, la consecuencia en la generación de CD con fuerte fenotipo tolerogénico no ha sido estudiada.

Un aspecto importante es la conversión de CD tolerogénicas a inmunogénicas. En el modelo de DEC-OVA, la tolerancia inmunológica sólo puede romperse en presencia de estímulos de maduración fuertes, como anti-CD40, pero no con ligandos de TLR. Incluso, para antígenos de patógenos, como la proteína P24 de HIV acoplada al anticuerpo anti-DEC-205, la inducción de RI necesita la combinación de ligandos de TLR y anti-CD40. Por el contrario, hallazgos preliminares indican que cuando el antígeno es OVA no acoplada a anti-DEC-205, aparentemente endocitada por CD DEC-205 negativas, sí es posible inducir RI con ligandos de TLR sin necesidad de anti-CD40. Esto sugiere que las CD en los órganos linfoides tienen distintos requerimientos para su conversión a CD capaces de inducir RI. Estos podrían estar relacionados con el fenotipo tolerogénico sobre el inmunogénico o a la expresión diferencial de TLR u otros receptores involucrados en la maduración en las distintas poblaciones de CD.

Lo anterior sugiere que la conversión de CD tolerogénicas a inmunogénicas podría estar relacionado con la existencia de CD con fuerte fenotipo tolerogénico y a una mayor dificultad para su conversión a células inductoras de RI pero ¿existen CD cuya función sea exclusivamente la inducción de tolerancia inmunológica y CD especializadas cuya función sea la inducción de respuesta inmune?

La existencia de células dendríticas especializadas en la inducción de tolerancia inmunológica se describió hace algún tiempo como una forma simple de explicar la participación de las CD tolerogénicas sobre inmunogénicas. Se propuso entonces que las CD CD8⁻ derivadas de bazo eran mejores inductoras de RI que las CD CD8⁺ (Suss, 1996; Kronin, 2001). Esto llevó a la hipótesis de que las CD CD8⁺ participaban en la inducción de tolerancia. En contraste, múltiples estudios recientes demostraron que las CD CD8⁺ son las principales productoras de IL-12 (Iwasaki, 2001; Maldonado-Lopez, 1999). Además, otros reportes han demostrado la participación de esta sub-población en la activación de células T productoras de IFN- γ y RI de tipo protector. De hecho, ahora es claro que las CD CD8⁺ son capaces de inducir tanto tolerancia como respuesta inmune (Liu, 2002), pero es todavía posible que, como se mencionó, las CD CD8⁺, tengan un fenotipo más tolerogénico que inmunogénico y por lo tanto sea más difícil convertirlas a iniciadoras de RI.

Además, las CD CD8⁺ participan en la endocitosis de material apoptótico que, como se mencionó, podría ocurrir acompañado de señalización negativa. De esta manera, es posible que estas células expresen más moléculas inhibitoras que co-estimuladoras, comparadas con otras sub-poblaciones de CD.

Otros reportes recientes sugieren la existencia de CD con un fuerte fenotipo tolerogénico, a las que se ha denominado como CD “reguladoras” por su capacidad para diferenciar células T vírgenes a células T reguladoras. Los primeros estudios se realizaron en cultivos *in vitro* con CD derivadas de MO pero se han podido encontrar poblaciones similares *in vivo*. En presencia de IL-10, estas células expresan niveles bajos de CD11c y CD45RB, se han identificado en el bazo de ratones transgénicos para IL-10 e incluso en ratones normales. Estas células inducen tolerancia a través de la diferenciación de linfocitos T reguladores tanto *in vitro* como *in vivo* (Wakkach, 2003).

Otros estudios demostraron el potencial de células de estroma de bazo para inducir diferenciación a CD y también de inducir tolerancia periférica mediada por células T reguladoras. Estas células fueron también identificadas *in vivo* y se propuso que existen de manera natural como un mecanismo de control de la inducción de RI (Zhang, 2004; Svensson, 2004). La principal pregunta por responder es: ¿Estas células están especializadas en la inducción de tolerancia inmunológica o son simplemente células con un profundo fenotipo tolerogénico que tienen requerimientos especiales para convertirse en inductoras de RI?

Finalmente queda otra pregunta ¿existe una CD especializada en la inducción de respuesta inmune? Las CL se localizan en la epidermis y son las CD de tejido periférico más estudiadas *in situ*. Por sus características fenotípicas, son consideradas como células con un alto potencial inmunogénico (Gorbachev, 2004). Algunos reportes sugieren que al introducir un antígeno directamente a la epidermis por inoculación epicutánea, después de remover el estrato corneo, se logra una respuesta de anticuerpos tipo Th2 en ausencia de adyuvante (Strid, 2004), lo cual sugiere que estas células podrían tener la capacidad de secretar citocinas Th2 sobre Th1. Otros trabajos describen que, a diferencia de los trabajos descritos para CD en reposo, después de migrar al ganglio linfático, las CL inducen una eficiente RI con secreción de IFN- γ (Mayerova, 2004), sugiriendo que la función de estas células, incluso en reposo, es la inducción de RI. Sin embargo, por su alta capacidad fagocítica deberían estar tomando continuamente células muertas y detritus de la piel. Si el resultado de esto fuera la inducción de RI, sería un riesgo continuo de autoinmunidad.

En el ganglio linfático existen al menos cinco sub-poblaciones de CD en reposo. Las poblaciones de CD positivas para el receptor DEC-205 pueden diferenciarse por la expresión de langerina y E-caderina. La población CD11c⁺, CD8 $\alpha^{+/-}$, langerina⁺, E-caderina⁺ corresponde a células que migran continuamente de la epidermis y la población CD11c⁺, CD8 $\alpha^{+/-}$, langerina⁻ son células

provenientes de la dermis. Por otra parte, la población CD11c⁺, CD8α⁺, langerina⁺, E-caderina⁻ son células residentes del órgano linfoide. Estas sub-poblaciones podrían participar en distintas funciones durante la inducción de tolerancia y respuesta inmune.

El dirigir antígenos *in situ* a las CD utilizando el receptor DEC-205 es una estrategia muy prometedora tanto para inducir TI profunda en modelos de autoinmunidad (Hawiger, 2004) como para inducir RI protectora en el desarrollo de nuevas vacunas (Bonifaz, 2004). Las ventajas de explotar el potencial de estas células *in situ* utilizando este modelo son: 1) No dejar al azar la llegada del antígeno al nódulo linfático (área T) y su captura por las CD. 2) Llevar al antígeno al organismo a todos los sitios de inicio de RI, simulando lo que sucede durante una infección sistémica. 3) Presentación de antígeno eficiente tanto por MHC clase I como por MHC clase II. En el caso de ovalbumina acoplada a anti-DEC-205, el incremento en la presentación de antígeno es de 1000 veces para MHC clase I y 100 veces para MHC clase II, comparada con la ovalbumina soluble. 4) Inducción de una tolerancia periférica profunda después de la presentación por CD en reposo. 5) Inducción de RI protectora, incluyendo memoria después de una inoculación única de dosis muy bajas de antígeno. Este último punto en presencia de anti-CD40 o incluso utilizando combinaciones de anti-CD40 y Poly I:C (ligando de TLR3).

En cuanto a las poblaciones antes mencionadas, DEC-205 positivas, sería importante estudiar su fenotipo y capacidad de respuesta a diferentes estímulos de maduración de CD en el ganglio para determinar el predominio del fenotipo tolerogénico o inmunogénico.

HIPÓTESIS

El fenotipo y la capacidad de respuesta de las células dendríticas DEC-205 positivas en los órganos linfoides secundarios determinará su papel potencial en la inducción de tolerancia o respuesta inmune.

OBJETIVOS

General

- Evaluar el fenotipo y la capacidad de respuesta de las células dendríticas DEC-205 positivas en los órganos linfoides secundarios, para determinar su papel potencial en la inducción de tolerancia o respuesta inmune.

Particulares

- Determinar el fenotipo de las poblaciones DEC-205 positivas en órganos linfoides secundarios en condiciones basales.
- Determinar el fenotipo de las poblaciones DEC-205 positivas después de estímulos de maduración de inmunidad innata (LPS y Poly I:C).
- Determinar el fenotipo de las poblaciones DEC-205 positivas después de estímulos de inmunidad adaptativa (estimulo a través de CD40).
- Establecer si existe efecto aditivo al combinar los estímulos de inmunidad innata y adaptativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Animales

Se usaron ratones hembra C57BL/6 de 8 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, Hospital General. Y ratones hembra C57BL/6 libres de patógenos, 8 semanas de edad, adquiridos en Harlan México.

• Estímulos

A los ratones se les aplicaron diferentes estímulos de maduración de CD, vía subcutánea en el cojinete plantar de las cuatro extremidades. A los ratones control basal no se les aplicó estímulo.

En la siguiente tabla se muestran las características de cada estímulo:

Estímulo	Dosis	Tiempo de estímulo
Anti-CD40 (producido en el laboratorio)	50 µg/ratón	6 h, 18h, 36-48h
LPS de E. coli (Sigma)	25 µg /ratón	6 h, 18h, 36-48h
Poly I:C (Amersham Biosciences)	25 µg/ratón	6 h, 18h, 36-48h
LPS + anti-CD40	25 µg , 50 µg /ratón	36-48 h
Poly I:C + anti CD40	25 µg , 50 µg /ratón	36-48 h

• Preparación de células de ganglios linfáticos

Una vez transcurrido el tiempo del estímulo se sacrificó a los ratones por dislocación cervical, y se extrajeron los ganglios de drenaje (pupliteos, inguinales, axilares y braquiales).

Los ganglios se disgregaron en HBSS sin Ca^{2+} , Mg^{2+} (Gibco) en presencia de colagenasa 400 unidades/mL, y se incubaron por 30 min a 37°C . En los últimos 5 min de la incubación se agregó EDTA 0.5 M (concentración final 10mM-EDTA).

Posteriormente la suspensión celular se filtró para eliminar impurezas, y se pasó a tubos falcon para obtener el paquete celular por centrifugación (1500 rpm por 10 min).

• Preparación de células de bazo

Una vez transcurrido el tiempo del estímulo se sacrificó a los ratones por dislocación cervical, y se extrajo el bazo.

El bazo se perfundió con HBSS sin Ca^{2+} , Mg^{2+} (Gibco) y colagenasa 400 unidades/mL y se disgregó en la misma solución; se prosiguió la incubación y la obtención del paquete celular de igual forma que con los ganglios.

La eliminación de los eritrocitos contaminantes se realizó mediante lisis usando amortiguador ACK (NH_4Cl , KHCO_3 , Na_2EDTA), 1 mL por 1 min, parando la reacción con exceso de PBS/SFB 2%.

• Citometría de Flujo

El paquete celular se resuspendió y pasó a una placa de 96 pozos, para realizar las tinciones correspondientes. Inicialmente se incubó por 20 min a 4°C con solución PBS/ suero de caballo 2%/ EDTA 5mM/ azida de sodio 0.05% para bloquear receptores Fc y evitar pegado inespecífico.

Se realizaron las tinciones incubando con diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales en solución PBS/ suero de caballo 2%/ EDTA 5mM/ azida de sodio 0.05% por 20 min a 4 °C, se hicieron dos lavados posteriores con la misma solución para eliminar el exceso de anticuerpos.

En el siguiente cuadro se muestra la tinción realizada:

Anti-CD11c	Biotina	CD86	PE
Anti-DEC205	Alexa 647	CD80	PE
Anti-CD8 α	PE-Cy7	CD40	PE
		B7-H1	PE
		B7-DC	PE
		IgG2a	PE

Para la identificación de las poblaciones de interés se usaron los anticuerpos anti-CD11c biotina (BD Biosciences), anti-DEC205 marcado con Alexa 647 y anti-CD8 α (BD Biosciences) marcado con PE-Cy7 (Ficoeritrina-Cy7), la variante en la tinción fueron las moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras (BD Biosciences) marcadas con PE (Ficoeritrina). El revelado de los anticuerpos conjugados con biotina se llevó a cabo utilizando estreptavidina-Alexa 488 (Molecular Probes).

Después de la tinción, se realizó un lavado con PBS y se agregó paraformaldehído al 4% para fijar las células. Se incubó por 20 min a 4°C. Las células se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4°C para su posterior análisis.

El análisis de las células se realizó por citometría de flujo de 5 colores usando citómetro FACS Aria.

RESULTADOS

Identificación de las Poblaciones DEC-205 Positivas en Órganos Linfoides Secundarios.

Las células dendríticas se aislaron en reposo y después de la inoculación de estímulos de inmunidad innata (LPS o Poly I:C) o de un anticuerpo agonista para la molécula CD40, estímulo similar al que realizan las células T activadas expresando transitoriamente ligando de CD40 en la inmunidad adaptativa. El análisis de estas células se realizó mediante citometría de flujo de cinco colores.

De las células totales adquiridas, eliminando autofluorescencia, se identificó a las CD por el marcador CD11c. De la región SSC-A y CD11c⁺ se identificaron las poblaciones de CD de interés: DEC-205^{alto}CD8α^{+/-} población 1 de ganglios linfáticos proveniente de periferia, DEC-205⁺CD8α⁺ población 2 de ganglios linfáticos y la población DEC-205⁺CD8α⁺ en bazo, estas últimas poblaciones residentes de los órganos linfoides. En dichas poblaciones se evaluaron moléculas involucradas en la inducción de respuesta inmune como CD86, CD40 y CD80, así como moléculas que estarían involucradas en la inducción de tolerancia inmunológica como B7-H1 y B7-DC.

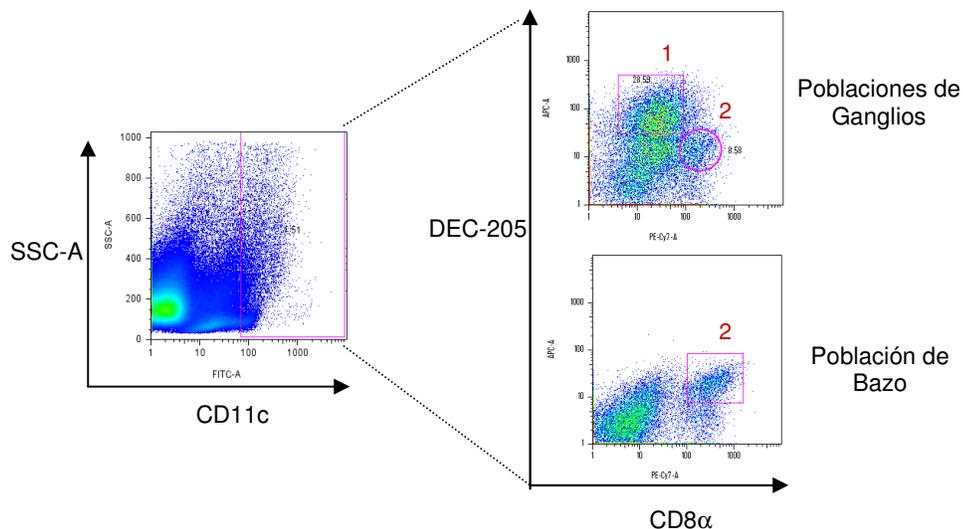


Figura 3. Identificación de las poblaciones de CD DEC-205 positivas. En la figura se muestra la selección de las células en la región SSC-A y CD11c⁺. A partir de estas, se identificaron las poblaciones DEC-205^{alto}CD8α^{+/-} y DEC-205⁺CD8α⁺, correspondientes a CD provenientes de periferia (1) y residentes del órgano linfoide (2) respectivamente.

Cinética de Activación de las CD DEC-205 Positivas Después de la Administración de Distintos Estímulos.

Para evaluar el fenotipo inicial de las poblaciones de interés así como su capacidad de cambiar ante estímulos tanto de inmunidad innata como inmunidad adaptativa, se administraron por vía subcutánea 25µg de LPS, 25µg de Poly I:C y 50µg de anti-CD40 a ratones C57BL/6.

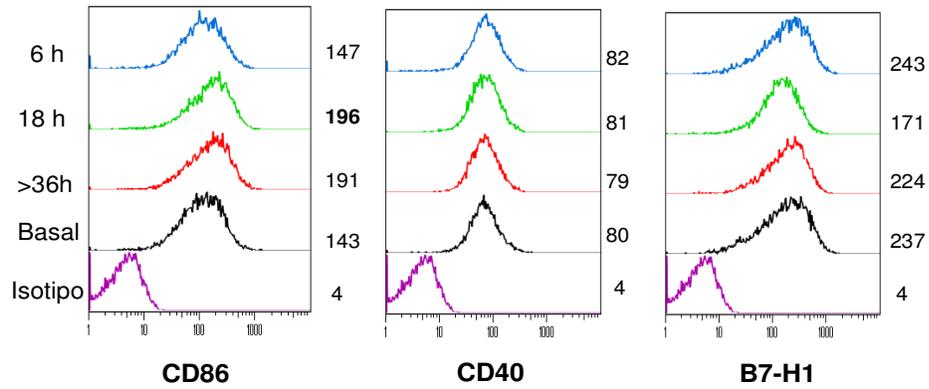
Después de 6, 18 y 36-48 h, los animales fueron sacrificados. Se cosecharon los ganglios linfáticos periféricos y el bazo. De las poblaciones celulares obtenidas se realizó inmunofluorescencia y por citometría de flujo se evaluó la expresión basal, así como la expresión mediada por los estímulos de maduración, de los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 en las CD DEC-205 positivas.

Como se puede observar en la figura 4 la población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8α^{+/-}) expresa niveles basales elevados, comparado con el control de isotipo, de los tres marcadores estudiados. Después de 18h de la administración de LPS o Poly I:C se observa un ligero incremento en la expresión de CD86 (figura 4a y 4b). CD40 y B7-H1 prácticamente no muestran cambios en esta población en respuesta a los ligandos de TLR estudiados.

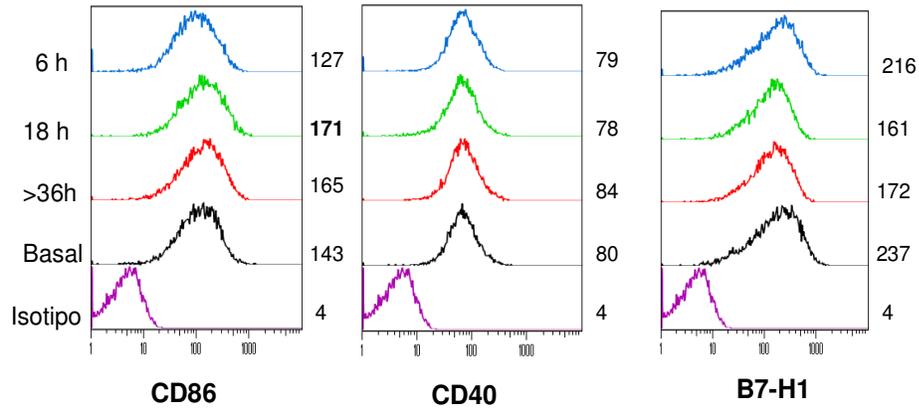
El incremento en la expresión de CD86 después del estímulo de anti-CD40 se observa tardíamente (más de 36h). Nuevamente no se observa ningún cambio significativo en la expresión de CD40 y B7-H1 (figura 4c)

Población 1 (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-})

a) Estímulo LPS



b) Estimulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

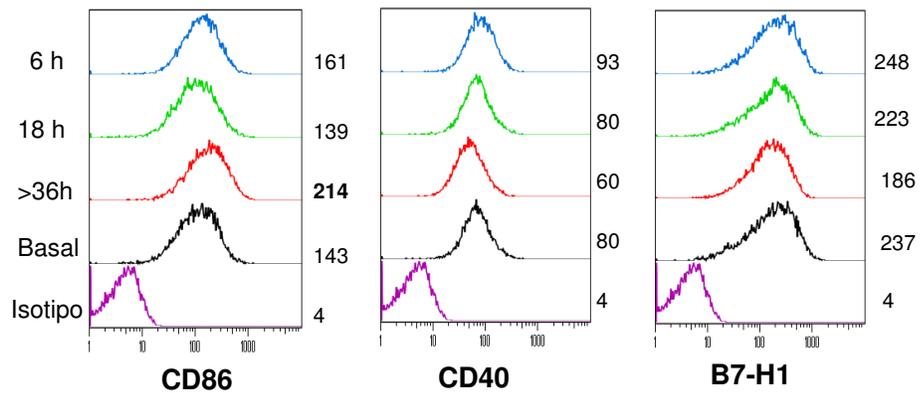


Figura 4. Cinética de los estímulos de maduración en la población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-}). Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

Al analizar la población 2 de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺) se observa una diferencia importante en la expresión basal de los marcadores estudiados, estos son bajos en comparación con la población 1. Además esta población es susceptible a incrementar la expresión de todos los marcadores estudiados después del estímulo por ligandos de TLR. El cambio se observa desde las 6h y es transitorio para las moléculas CD86 y CD40 ya que regresa a niveles basales a las 36h. La molécula B7-H1 permanece expresada aún después de 36h de la administración del estímulo de LPS, pero con Poly I:C el mayor cambio se observa a las 6h (figuras 5a y 5b).

Después del estímulo con anti-CD40 no se observan cambios importantes en la expresión de CD86, CD40 y B7-H1 (figura 5c).

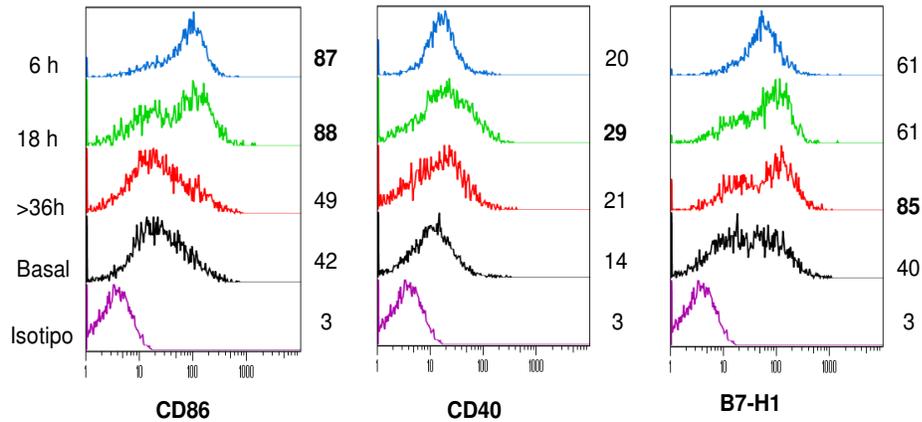
Los niveles basales de los marcadores estudiados en la población de bazo son todavía menores a los observados en las poblaciones 1 y 2 de ganglios linfáticos.

La población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺) presenta cambios notables con los estímulos de LPS y Poly I:C después de 6h de la administración (figuras 6a y 6b). La expresión de CD86 aumenta con el estímulo de LPS a 6h al igual que con Poly I:C, de éste último estímulo el pico de expresión es a 18h. Ambos estímulos de TLR muestran un ligero incremento en la intensidad de CD40 a 6h y B7-H1 presenta cambios desde 6h siendo el pico de expresión a 18h.

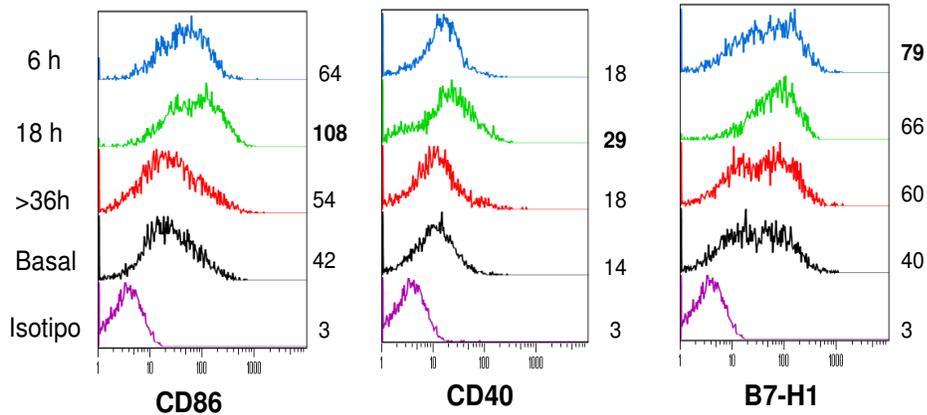
El estímulo por anti-CD40 en la población de bazo muestra sólo un ligero aumento en la expresión de las moléculas estudiadas. El incremento en CD86 se observa desde las 6h hasta 18h, CD40 a las 6h y B7-H1 aumenta ligeramente a las 18h (figura 6c).

Población 2 (DEC-205⁺CD8α⁺)

a) Estímulo LPS



b) Estímulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

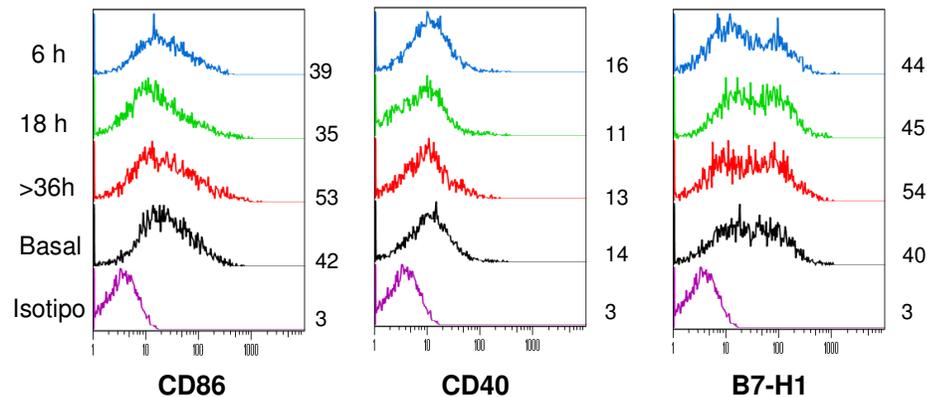
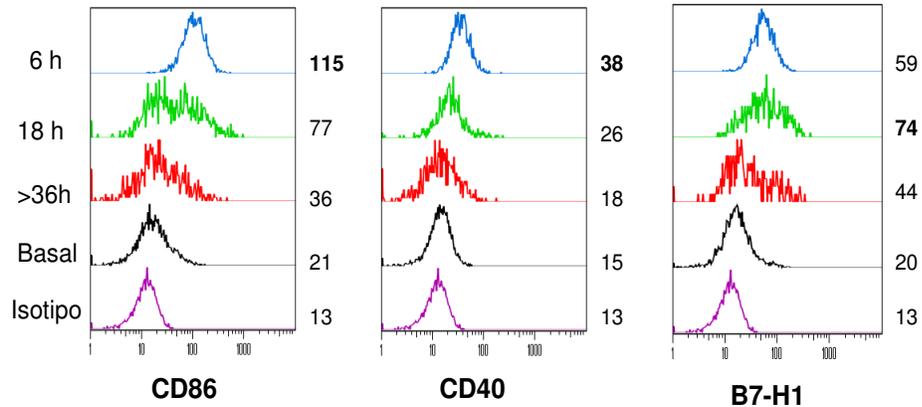


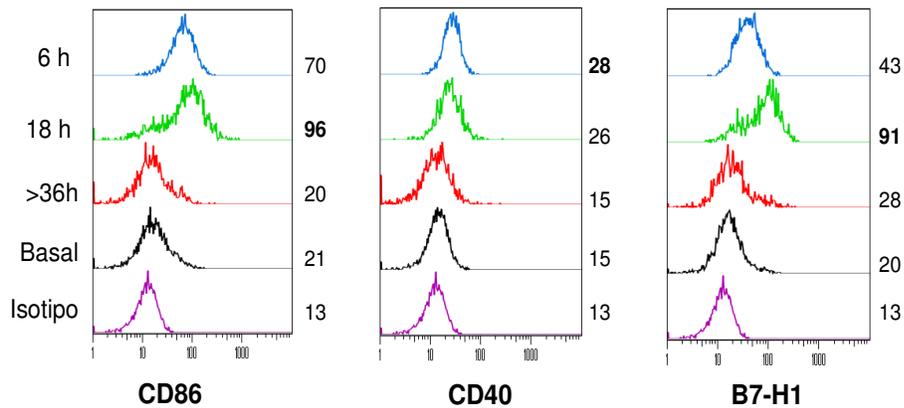
Figura 5. Cinética de los estímulos de maduración en la población 2 de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8α⁺). Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

Población de bazo (DEC-205⁺CD8α⁺)

a) Estímulo LPS



b) Estímulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

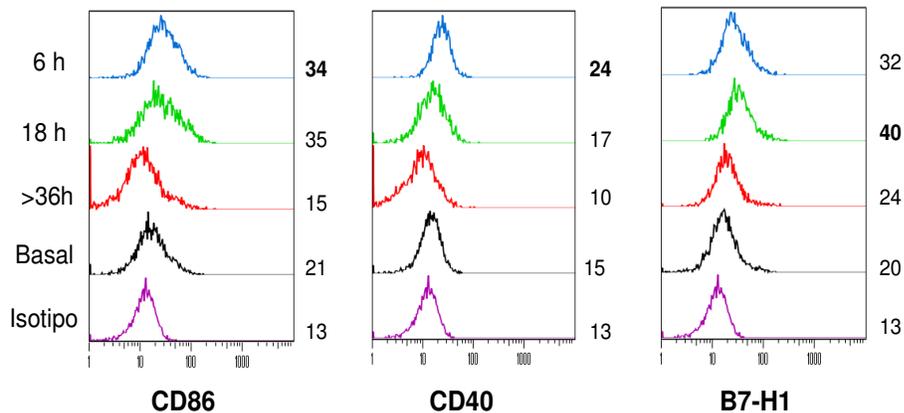


Figura 6. Cinética de los estímulos de maduración en la población de bazo (DEC-205⁺CD8α⁺). Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

Los resultados descritos hasta el momento nos indican que la población de bazo y la población 2 del ganglio linfático (poblaciones residentes) tienen un fenotipo basal inmaduro o menos activado en comparación con la población 1 del ganglio linfático, que son CD inmigrantes de la periferia.

Además la población inmigrante es menos susceptible a cambiar por estímulos de ligandos de TLR comparada con las otras poblaciones, sin embargo responde al estímulo de anti-CD40 incrementando los niveles de CD86. Las dos poblaciones residentes muestran cambios mínimos con el estímulo de anti-CD40 en los marcadores estudiados.

Finalmente el estímulo con anti-CD40 tiene un efecto tardío y los estímulos de TLR tienen efecto a tiempos cortos.

Tomando en cuenta que los cambios con ligandos de TLR son notables a tiempos cortos (6h) y anti-CD40 (36-48h) a tiempos tardíos se realizaron experimentos a estos tiempos evaluando otras moléculas que participan en la activación o inhibición de la RI.

En las figuras 7, 8 y 9 se muestra el promedio de los índices de fluorescencia para las moléculas CD86, CD40, B7-H1 en la parte a y CD80 y B7-DC en la parte b. Estos datos son el resultado de tres y dos experimentos independientes respectivamente.

Estos datos indican nuevamente que en condiciones basales las CD DEC-205⁺ que provienen de la periferia tienen un fenotipo activado incluyendo alta expresión de moléculas activadoras e inhibitoras (CD86, CD40, CD80, B7-H1 y B7-DC). Esta población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 $\alpha^{+/-}$) responde eficientemente al estímulo a través de anti-CD40 modificando CD86 (figura 7a) y CD80 (figura 7b), y prácticamente no responde a estímulos por ligandos de TLR.

Población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-})

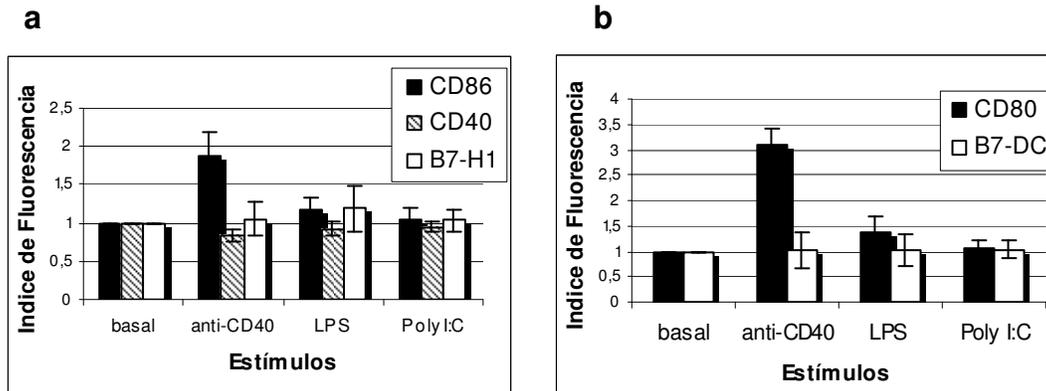


Figura 7. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar diferentes estímulos de maduración. En la gráfica se muestra el promedio de índice de fluorescencia para a) CD86, CD40 y B7-H1, b) CD80 y B7-DC en la población DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-} de ganglios linfáticos aplicando diferentes estímulos de maduración. Resultados de a) 3 y b) 2 experimentos individuales.

La población 2 de ganglios linfáticos en condiciones basales tiene una menor expresión de las moléculas estudiadas comparada con la población 1 de ganglio. Esta población de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺) responde tanto al estímulo de anti-CD40 como a los ligandos de TLR. Los cambios en todos los marcadores son mayores con el estímulo de anti-CD40.

Población 2 de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

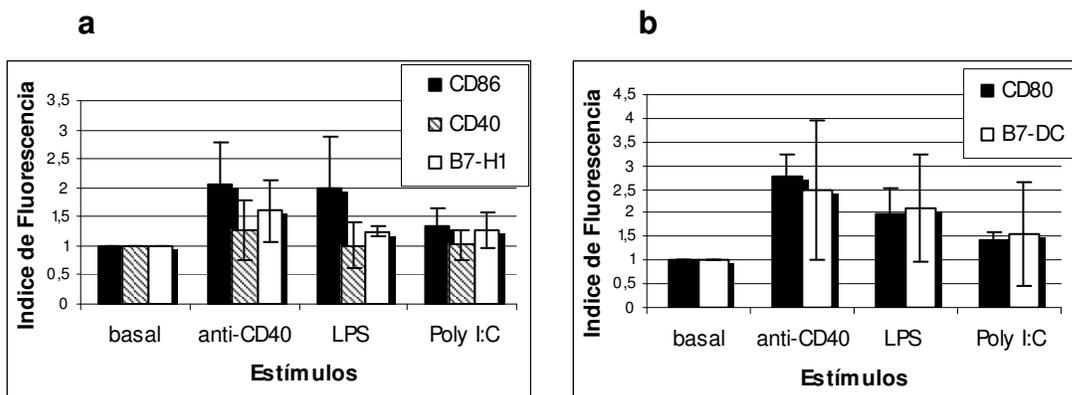


Figura 8. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar diferentes estímulos de maduración. En la gráfica se muestra el promedio de índice de fluorescencia para a) CD86, CD40 y B7-H1, b) CD80 y B7-DC en la población DEC-205⁺CD8 α ⁺ de ganglios linfáticos aplicando diferentes estímulos de maduración. Resultados de a) 3 y b) 2 experimentos individuales.

A diferencia de lo descrito para las poblaciones de ganglio linfático los niveles basales de las moléculas estudiadas en la población de bazo son muy bajos. Esta población (figura 9) responde más eficientemente a los ligandos de TLR comparado con anti-CD40, se observan aumento en la expresión de todos los marcadores. Los cambios son más notorios después del estímulo con LPS.

Población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

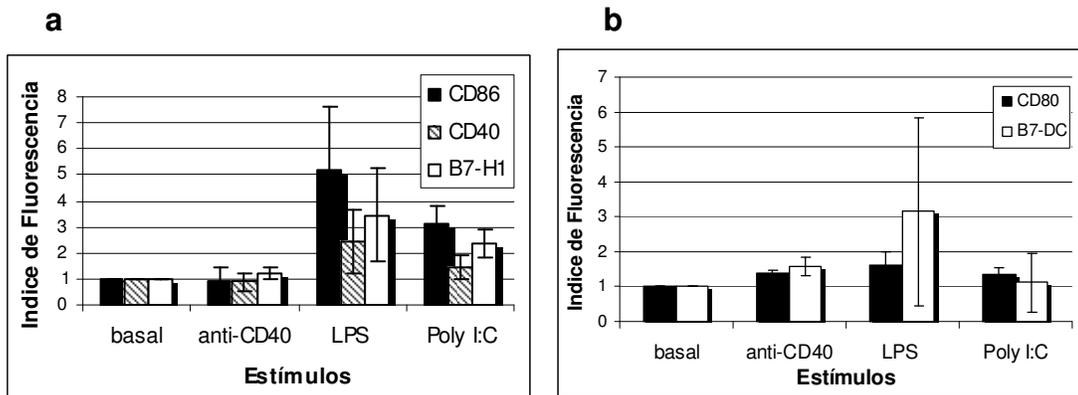


Figura 9. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar diferentes estímulos de maduración. En la gráfica se muestra el promedio de índice de fluorescencia para a) CD86, CD40 y B7-H1, b) CD80 y B7-H1 en la población DEC-205⁺CD8 α ⁺ de bazo aplicando diferentes estímulos de maduración. Resultados de a) 3 y b) 2 experimentos individuales.

Cinética de Activación de las CD DEC-205 Positivas Después de la Administración de Distintos Estímulos en Ratones Libres de Patógenos.

Para determinar si la expresión basal de los marcadores estudiados en las poblaciones de ganglio que correspondería a un fenotipo de CD activado, no es debido a la exposición de los animales al ambiente del bioterio o a posibles gérmenes, se realizó la misma cinética de activación en ratones libres de patógenos.

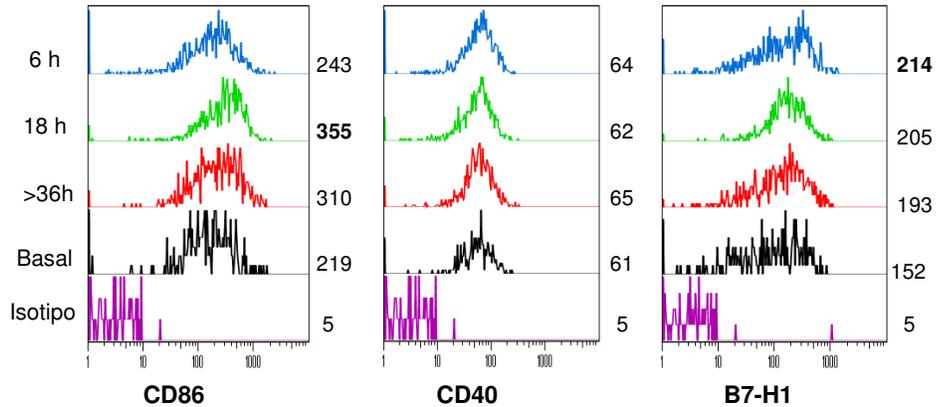
Como se puede observar en la figura 10, la expresión basal de los marcadores estudiados en la población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 $\alpha^{+/-}$), en animales libres de patógenos, se mantiene elevada similar a lo observado anteriormente. En los resultados anteriores la población 1 de ganglio prácticamente no respondía al estímulo por ligandos de TLR. Los resultados en ratones libres de patógenos muestran que el estímulo de LPS, aumenta ligeramente la intensidad de CD86 a 18h y B7-H1 a 6h (figura 10a). Con el estímulo de Poly I:C, la molécula CD86 cambia ligeramente a 18h y se mantiene hasta más de 36h y B7-H1 aumenta un poco a 18h. Los cambios en la molécula B7-H1 difieren con los resultados anteriores, pues dichos cambios no eran evidentes.

Los resultados obtenidos para el marcador CD40 en los ratones libres de patógenos son consistentes con los obtenidos anteriormente ya que no se observa incremento en el nivel de expresión con ninguno de los estímulos.

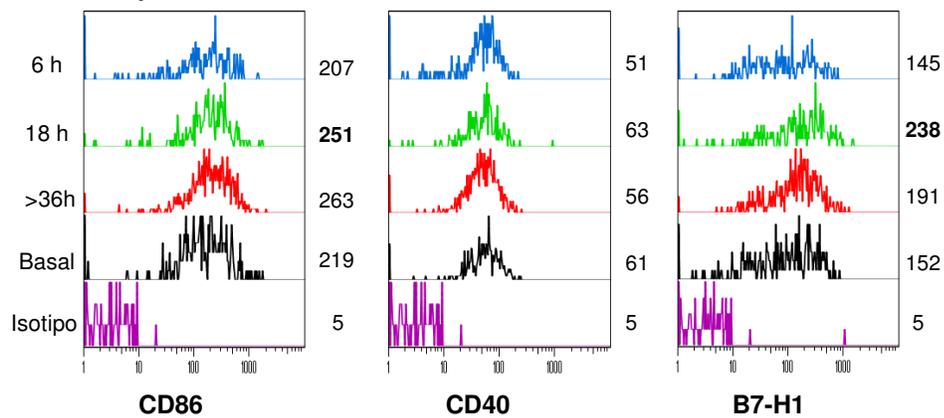
Esta población responde al estímulo de anti-CD40 (figura 10c) presentando un claro aumento en la intensidad de la molécula CD86 al igual que lo observado en los experimentos anteriores. Se observa además un incremento en la expresión de B7-H1 el cual no se observó anteriormente. El efecto con anti-CD40 nuevamente es a tiempos largos (>36h).

Población 1 (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-})

a) Estímulo LPS



b) Estímulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

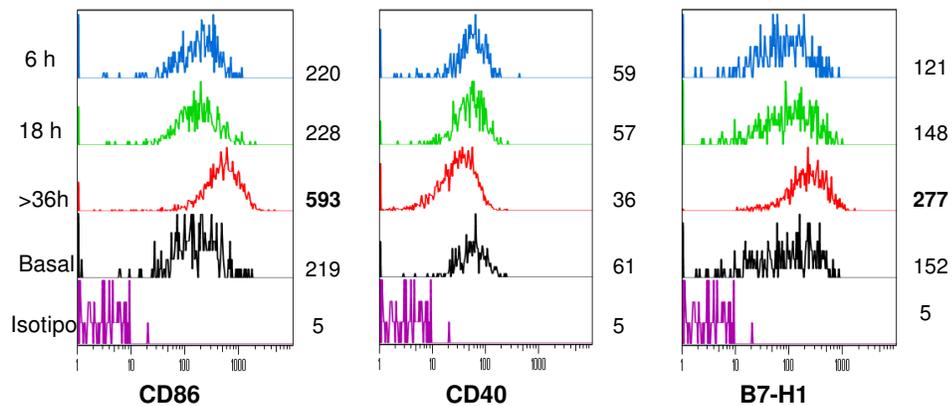


Figura 10. Cinética de los estímulos de maduración en la población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-}) en ratones libres de patógenos. Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

La expresión basal de las moléculas estudiadas en la población 2, residente de los ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺) en animales libres de patógenos, disminuye considerablemente con respecto a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

Los cambios debidos a los ligandos de TLR en esta población son más notables en los animales libres de patógenos. En la figura 11a, se muestra que con el estímulo de LPS las moléculas CD86 y B7-H1 presentan cambios desde 6h hasta 18h. El aumento en CD40 es menor e inicia a las 6h permaneciendo hasta las 36h. Con el estímulo de Poly I:C se observa que la expresión de las moléculas CD86, CD40 y B7-H1 incrementan con el tiempo, siendo el pico de expresión a tiempos tardíos (figura 11b).

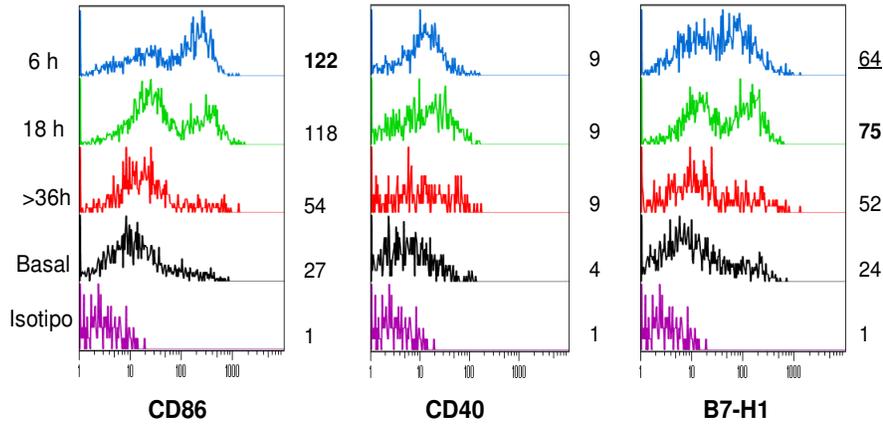
Después del estímulo con anti-CD40 se observa incremento en la intensidad de las moléculas CD86, CD40 y B7-H1 a tiempos largos (>36h), figura 11c, estos cambios no fueron evidentes en la cinética anterior realizada con animales normales de bioherio.

Los niveles de expresión basal de las moléculas estudiadas en la población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺), en ratones libres de patógenos, es baja y similar a lo observado en los experimentos iniciales. Con los estímulos de ligandos de TLR, figuras 12a y 12b, se observan cambios notables en la intensidad de las moléculas CD86 y B7-H1 a 6h, llegando a un máximo a las 18h y posteriormente regresando a niveles basales. El cambio en CD40 es menos notable e inicia entre (6-18h).

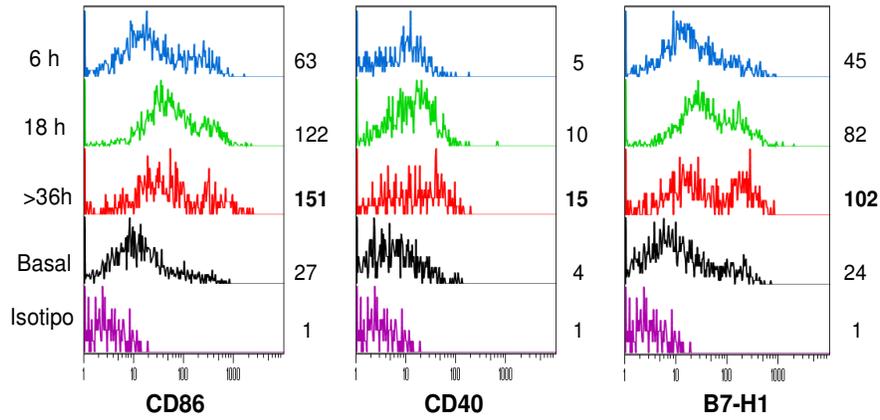
El estímulo de anti-CD40, aumenta la intensidad de CD86 y B7-H1 a tiempo largo (>36h) a diferencia de los resultados anteriores en los que no cambiaban. La molécula CD40 con el estímulo de anti-CD40 prácticamente no cambia (figura 12c).

Población 2 (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

a) Estímulo LPS



b) Estímulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

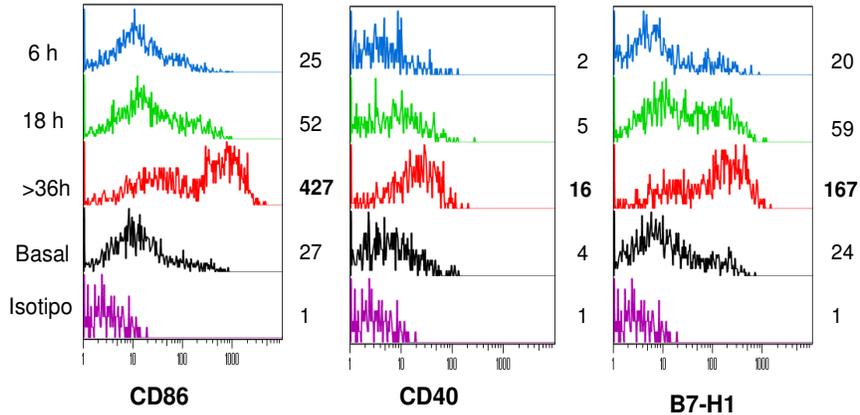
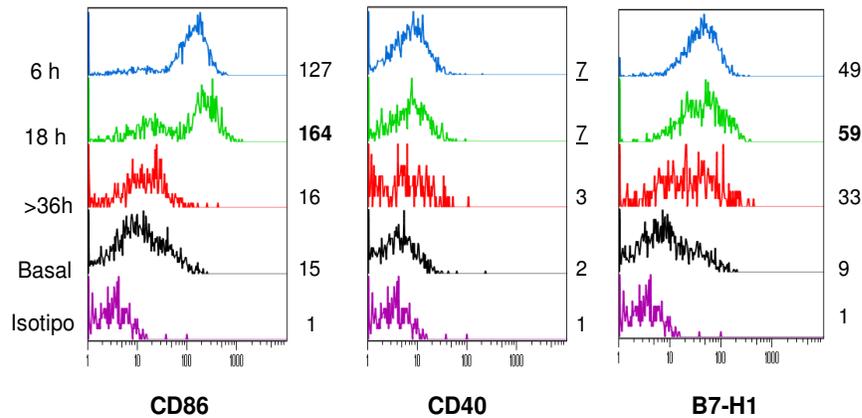


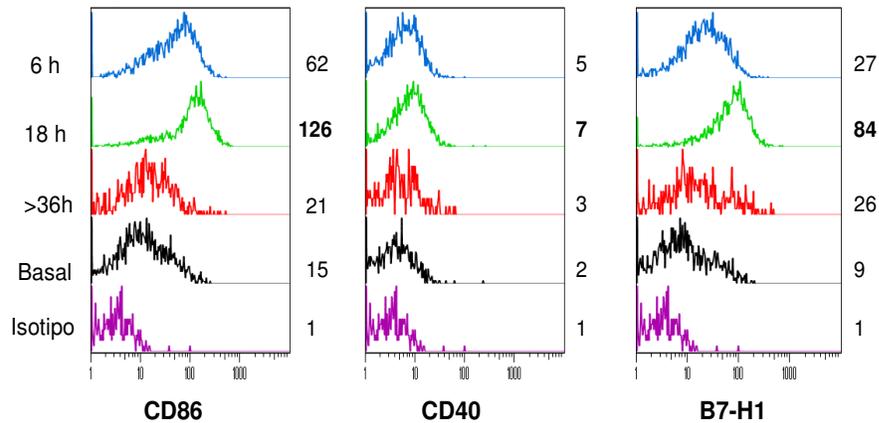
Figura 11. Cinética de los estímulos de maduración en la población 2 de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺) en ratones libres de patógenos. Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

Población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

a) Estímulo LPS



b) Estímulo Poly I:C



c) Estímulo anti-CD40

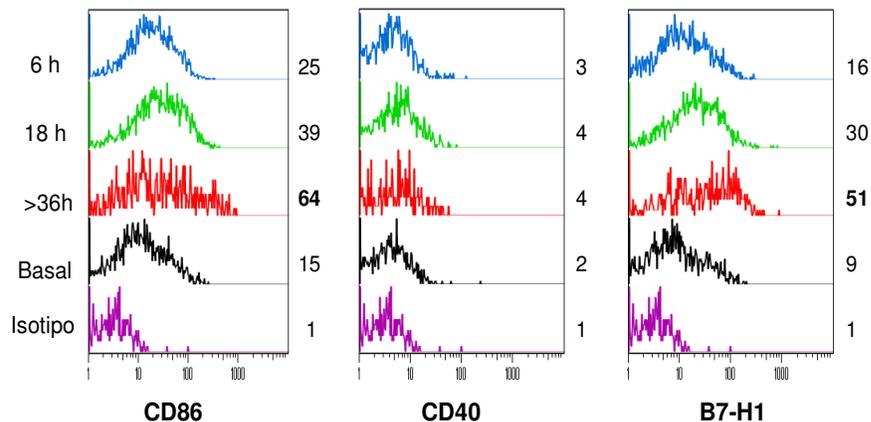


Figura 12. Cinética de los estímulos de maduración en la población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺) en ratones libres de patógenos. Se analizaron los marcadores CD86, CD40 y B7-H1 a diferentes tiempos de cada estímulo a) LPS, b) Poly I:C y c) anti-CD40. En cada histograma se muestra de arriba hacia abajo el tiempo del estímulo 6h, 18h y 36-48h, el basal y el control de isotipo; el valor que se muestra a la derecha corresponde a la intensidad media de fluorescencia.

Los resultados en animales libres de patógenos confirman el fenotipo basal activado de la población inmigrante en ganglios linfáticos. También su capacidad de incrementar la expresión CD86 y de no modificar la expresión de CD40. Sin embargo, indican que la molécula B7-H1 es también susceptible a cambiar.

Los cambios más notables al realizar los experimentos en animales libres de patógenos fueron que la población residente de ganglio linfático en estos ratones mostró un comportamiento similar a la población de bazo con un fenotipo basal no activado y capacidad de responder de manera importante a los ligandos de TLR. La población de bazo se comportó similar tanto en los ratones normales de bioterio como en los libres de patógenos

Estímulos Combinados en Ratones Libres de Patógenos

Tomando en cuenta las diferencias observadas al utilizar ratones libres de patógenos se continuaron los experimentos con estos animales. Para determinar la capacidad de respuesta de las poblaciones de interés a la combinación de estímulos de inmunidad innata (LPS o Poly I:C) y de inmunidad adaptativa (anti-CD40), se probaron tanto los estímulos individuales como los combinados para observar si existe o no un efecto aditivo.

De acuerdo a los resultados anteriores, la población proveniente de la periferia del ganglio linfático responde a estímulos de inmunidad adaptativa y en menor grado a los estímulos de inmunidad innata. Por otra parte, la población residente del ganglio y la de bazo responde eficientemente a estímulos de inmunidad innata con cambios en la expresión de CD40 y responden en menor grado al estímulo por anti-CD40. Lo que sugiere que para activarse por la inmunidad adaptativa necesitan estas dos últimas poblaciones una previa activación de inmunidad innata.

La población 1 de ganglios linfáticos responde más efectivamente a la combinación de estímulos que a los estímulos individuales aumentando la intensidad de CD86 (figura 13a) y en menor grado de B7-H1 (figura 13c). CD40 prácticamente no cambia con ningún estímulo (figura 13b).

Población 1 (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-})

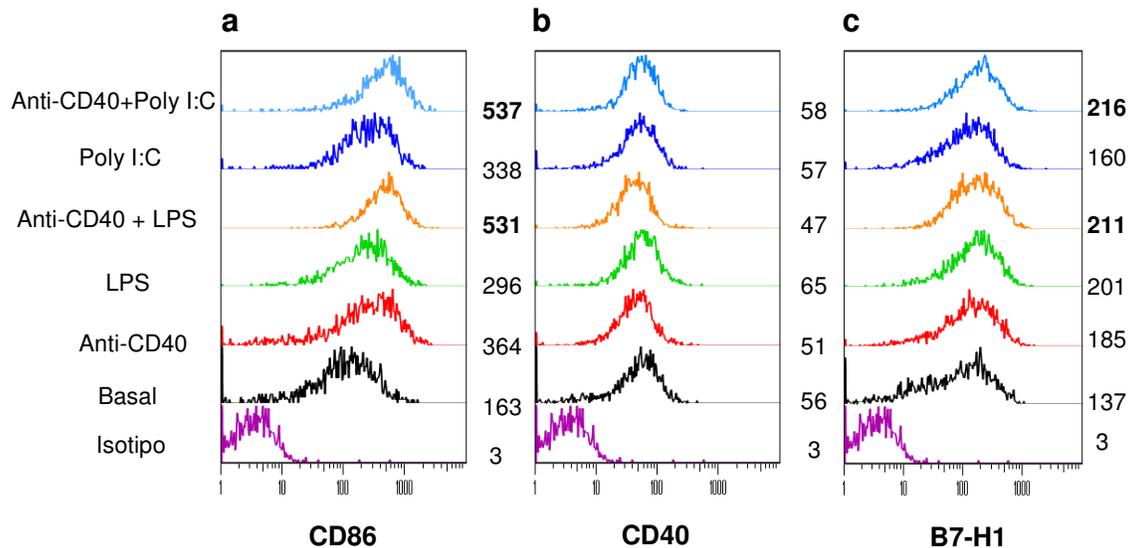


Figura 13. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar estímulos de inmunidad innata y adaptativa en la población 1 de ganglios linfáticos (DEC-205^{alto}CD8 α ^{+/-}). En la figura se muestran los histogramas comparativos de los estímulos de maduración de CD individuales y la combinación anti-CD40+LPS o anti-CD40+Poly I:C; analizando los marcadores a) CD86, b) CD40 y c) B7-H1. El experimento se realizó en ratones libres de patógenos, el tiempo de todos los estímulos fue 36-48h. El valor que se muestra a la derecha de cada histograma es la intensidad media de fluorescencia.

La población residente de ganglios linfáticos responde muy eficientemente a la combinación de estímulos aumentando la intensidad de CD86 en comparación con los estímulos individuales (figura 14a). Para la molécula B7-H1, no hay prácticamente diferencias entre los estímulos individuales y las combinaciones de estímulos, pero en comparación con el basal, todos los estímulos presentan cambios, figura 14c. La molécula CD40 aumenta en intensidad respecto al basal tanto con los estímulos de TLR individuales como con la combinación de estímulos. Se observa un efecto aditivo en la expresión de esta molécula por la combinación de estímulos (figura 14b).

Población 2 (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

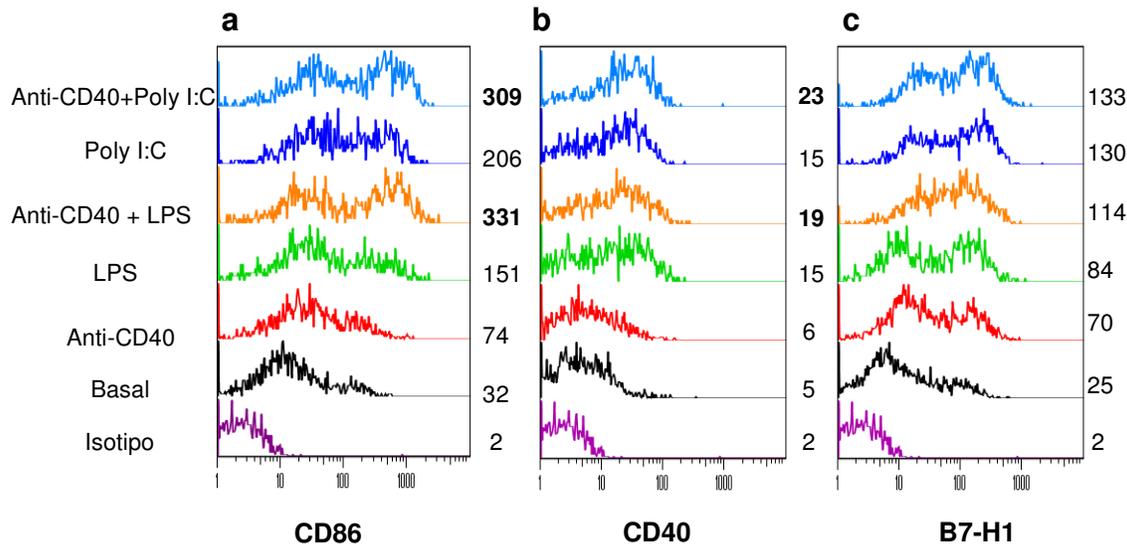


Figura 14. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar estímulos de inmunidad innata y adaptativa en la población 2 de ganglios linfáticos (DEC-205⁺CD8 α ⁺) En la figura se muestran los histogramas comparativos de los estímulos de maduración de CD individuales y la combinación anti-CD40+LPS o anti-CD40+Poly I:C; analizando los marcadores a) CD86, b) CD40 y c) B7-H1. El experimento se realizó en ratones libres de patógenos, el tiempo de todos los estímulos fue 36-48h. El valor que se muestra a la derecha de cada histograma es la intensidad media de fluorescencia.

En la población de bazo, la combinación de estímulos muestra un claro aumento en la intensidad de CD86 (figura 15a), la moléculas B7-H1 aumenta su expresión con respecto al basal tanto con los estímulos por ligandos de TLR así como con la combinación de estos, pero el incremento no es mayor al mostrado por los estímulos individuales (figura 15c).

En la figura 15b, se observa que la molécula CD40 aumenta en intensidad respecto al basal tanto con los estímulos de TLR individuales como con la combinación de estímulos, no presentando diferencias significativas entre estos.

Población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺)

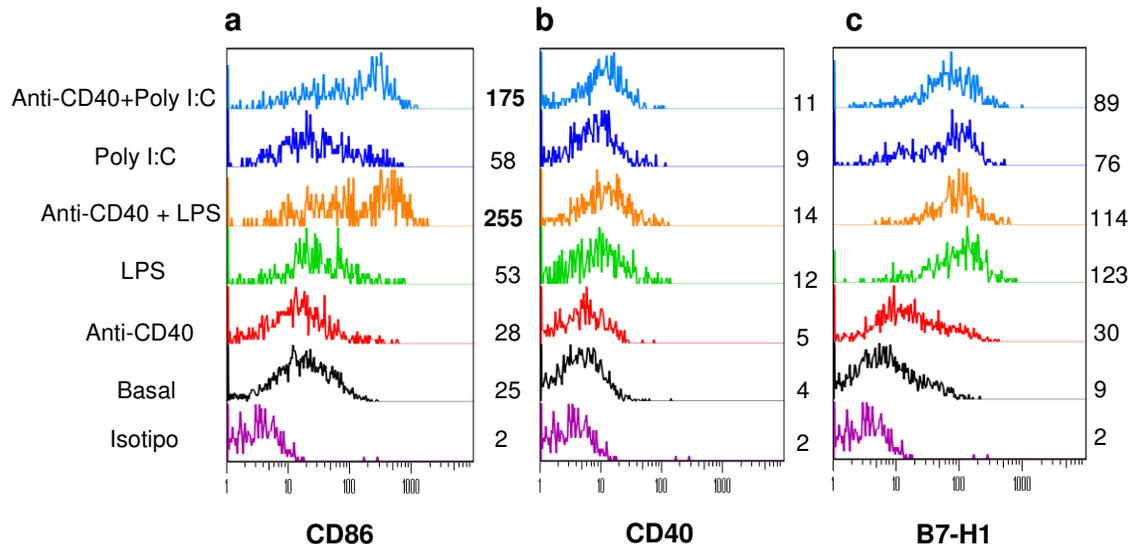


Figura 15. Cambio en el fenotipo de CD al aplicar estímulos de inmunidad innata y adaptativa en la población de bazo (DEC-205⁺CD8 α ⁺) En la figura se muestran los histogramas comparativos de los estímulos de maduración de CD individuales y la combinación anti-CD40+LPS o anti-CD40+Poly I:C; analizando los marcadores a) CD86, b) CD40 y c) B7-H1. El experimento se realizó en ratones libres de patógenos, el tiempo de todos los estímulos fue 36-48h. El valor que se muestra a la derecha de cada histograma es la intensidad media de fluorescencia.

En las figuras 16 a, b y c se muestra una comparación de las tres poblaciones estudiadas y su capacidad de responder a estímulos combinados de inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Al evaluar la molécula CD86, figura 16a, se observa que las poblaciones más susceptibles de cambiar por los estímulos combinados son la población residente del ganglio linfático y la población de bazo. Este mismo resultado se observa aunque en menor grado para la molécula CD40 (figura 16b) y no se observa para B7-H1 ya que los estímulos combinados no incrementan su expresión por arriba del efecto observado para los ligandos de TLR (figura 16c). La población de bazo es la que expresa mayor intensidad de la molécula B7-H1.

Estímulos combinados e individuales en las tres poblaciones de estudio

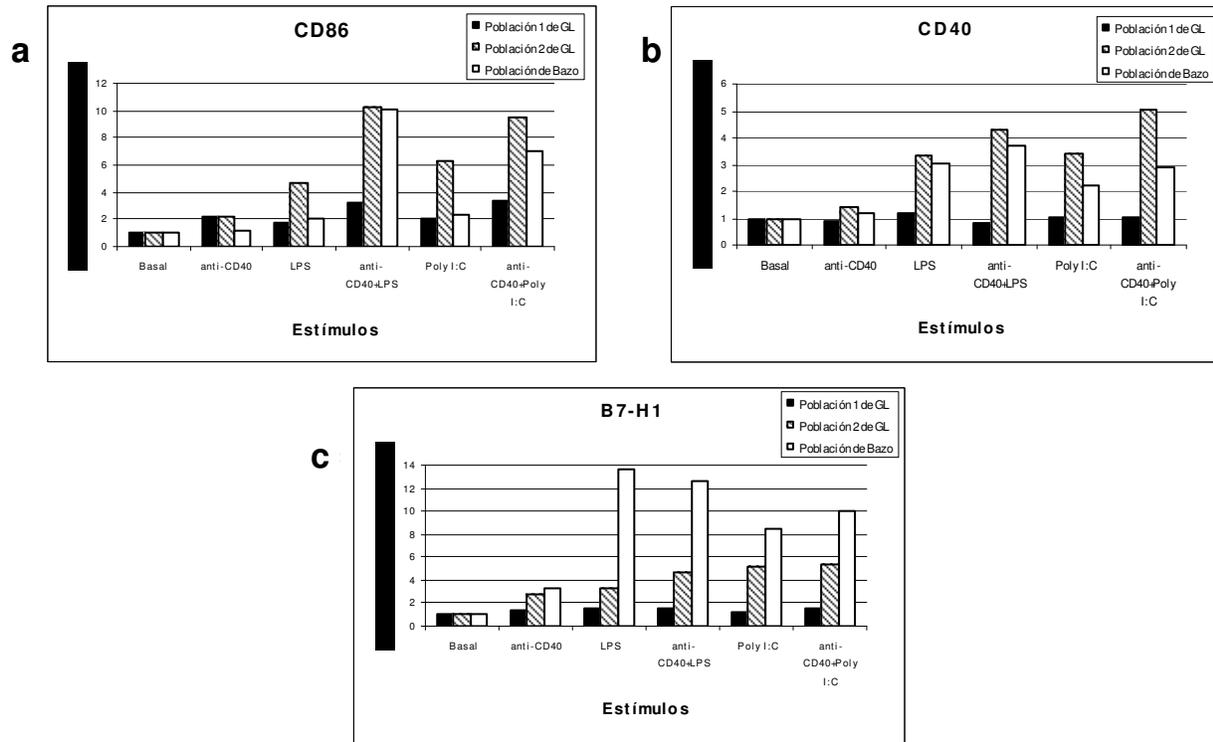


Figura 16. Cambio en el fenotipo de CD debido a la aplicación de estímulos de inmunidad innata y/o adaptativa en las poblaciones de estudio. En cada gráfica se muestra el índice de fluorescencia de los marcadores a) CD86 b) CD40 y c) B7-H1 en las poblaciones 1 y 2 de ganglios linfáticos y la población de bazo comparando los estímulos individuales con los estímulos combinados.

DISCUSIÓN

El dirigir antígenos a las CD *in situ* utilizando el anticuerpo anti-DEC-205 es una estrategia prometedora en el diseño de nuevas vacunas. Sin embargo, es muy importante conocer la función de las células DEC-205 positivas en los órganos linfoides secundarios ya que existen tres poblaciones, las residentes en ganglio linfático y bazo y las provenientes de la periferia en los ganglios linfáticos. En este trabajo se estudió el fenotipo de estas poblaciones en condiciones de reposo o después de estímulos de inmunidad innata (ligandos de TLR) o con un anticuerpo agonista para la molécula CD40. También se estudio el efecto producido por estímulos combinados de inmunidad innata y adaptativa.

Los principales hallazgos del trabajo fueron: 1.- En condiciones de reposo las CD provenientes de la periferia tiene un fenotipo activado, con elevada expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras. A diferencia, las CD residentes de los ganglios linfoides presentan un fenotipo menos activado con menor expresión de las moléculas estudiadas. El fenotipo de esta población es similar al de la población residente del bazo. 2.- La población proveniente de la periferia es menos susceptible a cambiar por estímulos de inmunidad innata (ligandos de TLR) comparada con las poblaciones residentes del ganglio y de bazo. 3.- El estímulo con anti-CD40 tiene un efecto importante en la población proveniente de la periferia y este efecto es menor en las poblaciones residentes cuando se compara con los cambios mediados por los ligandos de TLR. 4.- Finalmente, la combinación de los estímulos tiene un mayor efecto en las poblaciones residentes de los órganos linfoides que en la población que migra de la periferia.

Las poblaciones de interés se identificaron mediante la expresión de DEC-205 y CD8 α de una región CD11c positiva. Esto permitió identificar a la población residente de los ganglios linfáticos y del bazo, y la población proveniente de la periferia. A pesar de que se tomaron para el análisis, las células DEC-205^{altas} y CD8 α intermedias (potencialmente células provenientes de la epidermis), no es

posible discriminar entre las CD que provienen de la epidermis (CL) y de la dermis ya que ambas expresan DEC-205 y expresan bajos niveles de CD8 α . Otros marcadores como langerina nos permitirían discriminar entre estas dos poblaciones. Por lo anterior el análisis se limitó al estudio de la población proveniente de la periferia y la población residente de los órganos linfoides secundarios.

Inicialmente se realizaron experimentos en condiciones basales y después de la administración de LPS o Poly I:C (ligandos de TLR-4 y TLR-3 respectivamente) o un anticuerpo agonista dirigido contra CD40 que simula la interacción entre CD40 expresado en la CPA y el linfocito T activado. Se evaluaron tres moléculas de superficie importantes en la activación o inhibición de la respuesta inmune. La molécula co-estimuladora CD86, la cual en múltiples experimentos (Keir, 2005) ha sido considerada como la segunda señal para la activación de los linfocitos T. CD40 la cual es indispensable para la diferenciación a linfocitos T efectores (Fujii, 2004; Watanabe, 2005) y B7-H1 la cual es el ligando de PD-1 que es una molécula que manda señales negativas a los linfocitos T y por lo tanto ha sido implicada en la no activación de los linfocitos T. Los resultados de estos experimentos permitieron identificar en los ganglios linfáticos dos fenotipos de CD DEC-205 positivas. Las CD provenientes de la periferia expresan en condiciones basales altos niveles de todas las moléculas estudiadas lo que sugiere que aún en condiciones de reposo estas células tienen un fenotipo activado incluyendo la expresión de B7-H1. Este fenotipo no es consistente con el estado inmaduro reportado para las CD en reposo (Banchereau, 1998). Sin embargo es consistente con los resultados de Kissenpfennig y colaboradores, que en estado de reposo las CL en ganglios linfáticos expresan en superficie moléculas co-estimuladoras (MHC clase II, CD86 y CD40) de forma similar que en presencia de infección. La expresión de altos niveles de moléculas importantes en la activación de la RI sugiere que esta población podría aún en condiciones de reposo iniciar RI, sin embargo el hecho de que también exprese altos niveles de

moléculas inhibitoras como B7-H1 y B7-DC deja nuevamente abierta la posibilidad de su participación en tolerancia inmunológica.

Por otra parte, estos resultados difieren de lo encontrado para las CD residentes del bazo en las cuales el nivel basal de expresión de las moléculas estudiadas es muy bajo. Esto coincide con el estado inmaduro reportado para las CD inmaduras y su papel en condiciones de reposo de inducir tolerancia inmunológica (Steinman, 2003). En la población residente del ganglio linfático se observó un nivel intermedio de expresión basal de las moléculas estudiadas entre la población que migra de la periferia y la población de bazo. Sin embargo en los experimentos iniciales se trabajo con animales normales de bioterio los cuales están expuestos al ambiente y posiblemente a gérmenes. Al realizar los mismos experimentos con animales libres de patógenos el fenotipo basal de la población residente de ganglio es muy similar a la residente de bazo. Es posible que el contacto con el ambiente del bioterio pueda explicar la diferencia en estos resultados. Al estimular con ligandos de TLR y con anti-CD40 se encontraron también algunas diferencias al realizar los experimentos en ratones de bioterio y ratones libres de patógenos. Algunos cambios no observados en los ratones de bioterio como los incrementos en la molécula B7-H1 en la población que migra de la periferia y los cambios por anti-CD40 en la población de bazo. Por esta razón se continuaron los experimentos con animales libres de patógenos y las conclusiones del trabajo se basaron en los experimentos con estos animales.

Los resultados al estimular con ligandos de TLR indican que las poblaciones residentes de los órganos linfoides son más susceptibles a cambiar con estímulos de la inmunidad innata comparado con la población que migra de la periferia. A diferencia esta última población responde incrementando la expresión de CD86 con el estímulo de la inmunidad adaptativa. Estos resultados junto con el fenotipo basal encontrado en las distintas poblaciones indican que la población de la periferia adquiere un fenotipo activado al migrar, similar al que se adquiere por estímulos de inmunidad innata, sobre todo con una expresión elevada de CD40.

Los niveles elevados de CD40 sugieren que esta población estaría lista para interactuar con el ligando de CD40 expresado en los linfocitos T activados. Por el contrario, las poblaciones residentes de los órganos linfoides de acuerdo a nuestros resultados, necesitarían para poder interactuar con los linfocitos T activados de una previa activación por estímulos de inmunidad innata. Lo anterior se confirmó al combinar estímulos de inmunidad innata y adquirida ya que las poblaciones residentes de los ganglios linfáticos incrementaron de manera notable la expresión de moléculas importantes en la inducción de RI como CD86 y CD40.

Basado en lo reportado en la literatura (Su-Kil Seo, 2005; Pentcheva-Hoang, 2004; Collins, 2002) la expresión de moléculas co-inhibidoras como B7-DC, B7-H1 y CD80 (que es preferentemente ligando de CTLA-4) podría indicar un fenotipo tolerogénico sobre inmunogénico en la célula estudiada. En nuestro estudio la única población que claramente expresa moléculas inhibidoras en condiciones de reposo es la población proveniente de la periferia comparada con las otras poblaciones en las que los niveles de estas moléculas son prácticamente no detectables. Sin embargo, este no es un criterio suficiente para determinar su posible papel en la inducción de tolerancia o RI. Sería necesario realizar experimentos de activación de linfocitos T *in vivo* o *in vitro* para poder determinar si este fenotipo es indicativo de la función final de estas células en el control de la RI. Al estimular a las poblaciones de interés con estímulos de inmunidad innata y adquirida se observó en todas expresión de moléculas inhibidoras con algunas diferencias en el tiempo esto podría indicar que estas moléculas son también importantes en frenar una respuesta inmune.

El hallazgo más importante del trabajo que da pie a continuar el estudio de las poblaciones de CD DEC-205 positivas es la presencia de dos poblaciones claramente distintas tanto en condiciones basales como en su capacidad de responder a estímulos de inmunidad innata y adaptativa, así como a las combinaciones de estos. Esto podría indicar funciones distintas y por lo tanto para el diseño de vacunas y terapias utilizando esta población sería de suma

importancia determinar su función individual para el diseño de la estrategia más adecuada.

CONCLUSIONES

- En condiciones de reposo las CD provenientes de la periferia tiene un fenotipo activado, con elevada expresión de moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras. A diferencia, las CD residentes de los ganglios linfoides presentan un fenotipo menos activado con menor expresión de las moléculas estudiadas, al igual que su equivalente en bazo.

- La población que migra de la periferia tiene un fenotipo activado capaz de responder a estímulos de inmunidad adaptativa (anti-CD40) y con menor intensidad a estímulos de inmunidad innata.

- Las poblaciones residentes de ganglios linfáticos y de bazo responde eficientemente a estímulos de inmunidad innata (ligandos de TLR) en comparación con anti-CD40.

- La combinación de los estímulos tiene un mayor efecto en las poblaciones residentes de los órganos linfoides que en la población que migra de la periferia.

REFERENCIAS

- Abbas. A. Lichtman A. Inmunología celular y molecular. 5ª edición, España, Elsevier, 2004.
- Adema, G. J. et al. (1997) A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387, 713–717.
- Ahonen, C.L. et al. (2004) Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN. *J Exp Med* 199, 775-84.
- Albert, M.L. et al. (1998) Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359-1368.
- Allan, R.S. et al. (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-8.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52.
- Barchet, W. et al. (2005) Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol. Res.* 32, 75-84.
- Bolland, S. & Ravetch, J.V. (2000) Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-85.
- Bonifaz, L. et al. (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-38.
- Bonifaz, L.C. et al. (2004) In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-24.
- Brocke, T. (1997) Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on MHC class II expressing dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186, 1223–1232.
- Collins, A. et al. (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17, 201.
- Conti, L. et al. (2005) Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* 174- 252-60.
- del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C. (2002) Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature*; 415: 1043–7.
- Dhodapkar, K.M. et al. (2005) Selective blockade of inhibitory Fcgamma receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2910-5.
- Engering, A. et al. (2002) The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J. Immunol.* 168, 2118-2126.
- Fehervari, Z. & Sakaguchi, S. (2004) Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16, 203-8.

Fijii, S. Et.al. (2003) Activation of natural killer t cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadjuvanted protein. *J Exp Med* 198, 267-79.

Fijii, S. et.al. (2004) The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation.. *J Exp Med*.199, 1607-18.

Gil-Torregrosa, B.C. et al. (2004) Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 34, 398-407.

Gorbachev, A.V. & Fairchild, R.L. (2004) CD40 engagement enhances antigen-presenting langerhans cell priming of IFN-gamma-producing CD4+ and CD8+ T cells independently of IL-12. *J Immunol* 173, 2443-52.

Green, D. R., Droin, N.& Pinkoski, M. (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193, 70-81.

Hawiger, D. et al. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-79.

Hawiger, D., Masilamani, R.F., Bettelli, E., Kuchroo, V.K. & Nussenzweig, M.C. (2004) Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20, 695-705.

Hermans, I.F. et al. (2003) NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 5140-47.

Huang, F.-P. et al. (2000) A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191, 435-444.

Inaba, K. et al. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176, 1693-702.

Inaba, K., M. Inaba, M. Naito, R.M. Steinman. (1993) Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479–88

Iwasaki, A. & Kelsall, B.L. (2001) Unique functions of cd11b(+), cd8alpha(+), and double-negative peyer's patch dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 4884-90..

Iwasaki, A. & Medzhitov, R. (2004) Toll like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 5, 987-95.

Jiang, W., W.J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig. (1995) The receptor DEC- 205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151–55

Kalergis, A.M. & Ravetch, J.V. (2002) Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med* 195, 1653-9.

Kamath, A.T. et al. (2002) Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100, 1734–1741

Keir, M.E. & Sharpe, A.H. (2005) The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol. Rev.* 204, 128–143.

Kissenpfennig, A. and Malissen, B. (2006) Langerhans cells- revisiting the paradigm using genetically engineered mice. *Trends Immunol.*;27(3):132-9.

Kitajima, T., Arizumi, K., Bergstresser, P. R. & Takashima, A. (1996). A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: The inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *J. Clin. Invest.* 98, 142–147

Kronin, V. et al. (2001) Differential effect of CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in the stimulation of secondary CD4(+) T cells. *Int Immunol* 13, 465-473.

Lanier, L.L. (2005) NKG2D in innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 560, 51-6.

Legge, K.L. et al. (2002) On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 196, 217-27.

Leslie, D.S. et al. (2002) CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 196, 1575-84.

Liu, K. et al. (2002) Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 196, 1091-7.

Liu, Y.J. (2005) IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306.

Maldonado-Lopez, R. et al. (1999) CD8a+ and CD8a- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189, 587-92.

Mayerova, D., Parke, E.A., Bursch, L.S., Odumade, O.A. & Hogquist, K.A. (2004) Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state. *Immunity* 21, 391-400.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway Jr., C.A (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.

Moll, H., Fuchs, H., Blank, C., Rollinghoff, M. (1993) Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur. J. Immunol.* 23, 1595-1601.

Nauta, A.J., Daha, M.R., van Kooten, C. & Roos, A. (2003) Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol* 24, 148-54.

Neil, C. et al. (2005) Syk –Dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity*, vol.22, 507-517.

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. (1999) Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-51.

Nishimura, H. et al. (2001) Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-22.

O 'Keeffe, M. et al (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8 + dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196, 1307–1319.

Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K. & Allison, J.P. (2004) B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21, 401-13.

Perez, V.L. et al. (1997) Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* 6, 411-7.

Probst, H.C., Lagnel, J., Kollias, G. & van den Broek, M. (2003) Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity* 18, 713-20.

Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den Broek, M. (2005) Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-6.

Ravetch, J.V. & Lanier, L.L. (2000) Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-9.
Reis e Sousa, C. (2001) Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* 14, 495-8.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109–18
interferon. *Nat. Med.* 5:919–23

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389–400.

Salomon, B. et al. (1998) Three populations of mouse lymph node dendritic cells with different origins and dynamics. *J. Immunol.* 160, 708–717

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M. & Germain, R.N. (2002) Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196, 1079-90.

Schwartz, R.H. (2003) T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-34.

Shortman K, Liu YJ. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*; 2: 151–61.

Steinman RM. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.*; 9: 271–96.

Steinman, R.M., Pack, M. & Inaba, K. (1997) Dendritic Cell Development and Maturation. in *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*, Vol. 4 (ed. Riccardi-Castagnoli, P.) 1-6 (Plenum Publishing Co., N.Y.,N.Y.).

Steinman, R.M. et al. (2003) Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987, 15-25.

Strid, J., Hourihane, J., Kimber, I., Callard, R. & Strobel, S. (2004) Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. *Eur J Immunol* 34, 2100-9.

Su-Kil Seo, et.al. (2006) Co-inhibitory role of T-cell-associated B7-H1 and B7-DC in the T-cell immune response. *Immunology letters* 102 (2), 222-228.

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

Svensson, M., Maroof, A., Ato, M. & Kaye, P.M. (2004). Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity* 21, 805-16.

Tan, M.C. et al. (1997) Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 2426-35.

Wakkach, A. et al. (2003) Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18, 605-17.

Watanabe, N. et al. (2005) Human TSLP promotes CD40 ligand-induced IL-12 production by myeloid dendritic cells but maintains their Th2 priming potential. *Blood* 105, 4749-51.

Yamazaki, S. et al. (2003) Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198, 235-47.

Zhang, M. et al. (2004) Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 1124-33.

Zingoni, A. et al. (2005) NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Mol Immunol* 42, 451-4