



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

CITOMETRÍA DE FLUJO DE SIETE COLORES PARA LA  
IDENTIFICACIÓN Y FENOTIPO DE SUBPOBLACIONES DE  
CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

LUZ MARÍA MORA VELANDIA



MÉXICO, D.F.

2008.



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 <sup>er</sup> Suplente	Prof. Enrique Ortega Soto.
2 <sup>o</sup> Suplente	Prof. Sonia Mayra Pérez Tapia.

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

---

Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo.

ASESOR

---

Luz María Mora Velandia

SUSTENTANTE

## **AGRADECIMIENTOS:**

En primer lugar agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran institución.

A la Facultad de Química, a todo el personal que la conforma, a mis maestros por todas las enseñanzas y por darme las bases de mi formación académica.

A la Dra. Laura Bonifaz por todo el apoyo, consejos y tiempo dedicados al proyecto, por darme la oportunidad de ser parte de un gran equipo de trabajo, por toda la confianza y guía durante este tiempo.

A todos los integrantes de la UIMEA por el apoyo, la convivencia, los ánimos y el hacer de este trabajo algo más sencillo y divertido, en especial a Gibrán, David, Alex, Ricardo, Paty, Gaby, Ely y Rosita por brindarme su amistad.

Al personal del área de Fraccionamiento del Banco de Sangre del Hospital Infantil Federico Gómez por las facilidades brindadas para la obtención de las muestras de sangre.

A mis sinodales por sus comentarios para mejorar este trabajo.

## **DEDICATORIAS:**

A mis papás por brindarme todo el apoyo y cariño necesarios para poder realizar un sueño más en mi vida, por estar ahí en cada paso.

A mis abuelitos porque sé que desde donde estén me siguen cuidando, por todo su cariño y enseñanzas.

A mi hermano, por ser mi cómplice durante toda mi vida, porque se que lo que nos une es más fuerte de lo que nos separa, te adoro.

A mis otros papás, mis padrinos Guille y Kitty, a Memo, Angie y Manoli; gracias por estar ahí en todos los momentos importantes y por todo el cariño.

A Hazlet, y al MJC por ser parte fundamental de mi vida, a todas las personas que ahí conocí y que de cierto modo cambiaron mi vida; a mis otras hermanas de corazón de las que he aprendido tanto, muy en especial a Elia y Libertad por todo lo que hemos compartido y por estar siempre ahí.

A Lety, Julio, Iliana, Marianita, Joyce, Rodrigo y Diego por su amistad incondicional desde la prepa, por darme siempre ánimos para seguir adelante y por lo compartido con cada uno.

A todos los amigos de la Facultad por todo lo vivido y lo que nos queda, porque sin ustedes esto hubiera sido simplemente mucho más difícil de realizar, a todos los Pochac@s, creo que no hubiera sobrevivido ni el primer semestre sin ustedes jeje, también en especial a Itzel, Noemí y Roger por esos últimos semestres de la carrera y por su gran amistad.

A Pilar Granada y Alejandro Paredes por ser dos personas muy especiales en mi vida, gracias por su amistad, por todo el cariño y apoyo brindado siempre que lo he necesitado.

A todos los integrantes de la UIMEA y anexos por el apoyo, los consejos y por enseñarme lo que es un gran equipo de trabajo.

## INDICE GENERAL

	Páginas
Abreviaturas	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	
• Generalidades	4
• Origen	5
• Estado de Maduración	7
• Subpoblaciones	10
1. Células dendríticas plasmacitoides como pre-dendríticas (pre-CDs).	10
2. Células dendríticas convencionales (CDc).	12
Células dendríticas migratorias.	
Células dendríticas residentes de tejidos linfoides.	
3. Poblaciones de células dendríticas en sangre periférica.	13
4. Células dendríticas inflamatorias (CDin).	15
5. NKDCs.	15
• Citometría de flujo.	16
OBJETIVOS.	18
MATERIALES Y MÉTODOS.	
• Muestras de sangre periférica.	19
• Obtención de células mononucleares.	19
• Conteo de células mononucleares.	19
• Citometría de flujo.	19
RESULTADOS.	
• Estandarización de la citometría de siete colores.	21
• Eliminación de células muertas.	22
• Elección de células linaje negativas.	23
• Poblaciones de CD analizadas.	24
• Distribución de las CDp con respecto a las CDc.	25
• Expresión del marcador BDCA-2.	27
• Porcentajes y números absolutos de las diferentes poblaciones de CD analizadas.	28
• Fenotipo de las poblaciones estudiadas.	33
• Expresión de TLR-2 y TLR-4.	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS	

## Abreviaturas:

<b>BCR</b>	Receptor de células B.
<b>BDCA</b>	Antígeno de células dendríticas presentes en sangre periférica.
<b>CD</b>	Célula dendrítica.
<b>CDc</b>	Célula dendrítica convencional.
<b>CDp</b>	Célula dendrítica plasmacitoide.
<b>CLA</b>	Antígeno linfocítico cutáneo
<b>CLP</b>	Precursor linfoide común
<b>CMP</b>	Precursor mieloide común
<b>CPA</b>	Célula presentadora de antígeno.
<b>CTLA-4</b>	Proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos 4
<b>Flt3</b>	Receptor clase III de tirosina-cinasa
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
<b>IDO</b>	Indolamina 2,3-dioxigenasa
<b>IKDC</b>	Célula dendrítica-natural killer productora de interferón
<b>IL</b>	Interleucina.
<b>ILT</b>	Transcrito tipo Inmunoglobulina.
<b>iNOs</b>	Sintasa inducible de óxido nítrico.
<b>INF</b>	Interferón.
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido.
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad.
<b>NK</b>	Natural Killer
<b>NKDC</b>	Célula dendrítica-Natural Killer.
<b>NL</b>	Nódulo linfático.
<b>PAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a patógenos.
<b>PD-1</b>	Receptor de muerte programada-1.
<b>PBS</b>	Solución amortiguadora de fosfatos.
<b>RI</b>	Respuesta Inmune.
<b>TGF-β</b>	Factor de crecimiento transformante beta.
<b>TI</b>	Tolerancia Inmunológica.
<b>TCR</b>	Receptor de células T.
<b>TLR</b>	Receptor tipo Toll.
<b>TNF</b>	Factor de Necrosis Tumoral.

## INTRODUCCION

Las células dendríticas (CD) son células de la inmunidad innata que sirven de puente con la inmunidad adaptativa se originan en la médula ósea, se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo y juegan un papel muy importante dentro de la iniciación y dirección de la respuesta inmune (RI). Las CD son las encargadas de capturar, procesar antígenos y transportarlos a los órganos linfoides para iniciar una respuesta mediada por linfocitos T (Banchereau et. al 2002). La interacción entre las CD y los linfocitos T puede llevar tanto a la inducción RI, como al proceso contrario denominado tolerancia inmunológica (TI), y dependiendo de las condiciones de activación de las CD pueden polarizar la RI hacia  $T_H1$ ,  $T_H2$  y otras sub poblaciones de linfocitos T.

Por su función tan importante en la regulación del sistema inmune en los últimos años se ha incrementado el número de estudios acerca de las distintas sub poblaciones de CD, principalmente con la intención de entender su participación en la patogenia de distintas enfermedades con el objetivo final de utilizarlas en el desarrollo de nuevas terapias que resulten menos tóxicas y más eficientes para su tratamiento, tal es el caso de cáncer, trasplantes, autoinmunidad, hipersensibilidades, así como también en el diseño de vacunas contra agentes infecciosos.

En contraste con los numerosos estudios que identifican a distintas sub poblaciones de CD en modelos murinos en órganos linfoides, en humanos existe la limitación para obtener los órganos y la mayoría de los trabajos se enfocan al estudio de sub poblaciones de CD en sangre periférica (Shortman & Liu 2002). Las CD en sangre periférica se dividen en CD denominadas convencionales (CDc) y plasmacitoides (CDp) las primeras aparentemente pueden tener un origen tanto mielóide como linfóide y se caracterizan por la expresión de clase II y CD11c. Las CDp son de origen linfóide y son  $CD11c^- CD123^+$ . (O'Doherty U. et al. 1994; Olweus J. et al. 1997; Robinson SP. et al. 1999).

A pesar de que los marcadores mencionados pueden definir dos sub poblaciones de CD es posible que en distintas patologías existan cambios en su expresión y que adicionalmente se expresen algunos otros marcadores importantes en la patogénesis de la enfermedad, por lo cual es necesario desarrollar y mejorar los métodos que permitan además de realizar la identificación y caracterización de las sub poblaciones determinar su estado de activación y su capacidad de responder a distintos estímulos para de este modo poder establecer su participación en diversas enfermedades; además de evaluar como varían las distintas poblaciones de CD bajo estados de inflamación o infección *in vivo* e *in vitro*.

La citometría de flujo es una técnica ampliamente utilizada tanto en laboratorios de diagnóstico clínico como en laboratorios dedicados a la investigación ya que posee la ventaja de analizar un gran número de células en muy poco tiempo, así como de realizar un análisis multiparamétrico de cada una de las células, por esto resulta una técnica muy atractiva para realizar el estudio de sub poblaciones de CD obtenidas a partir de sangre periférica utilizando distintos anticuerpos que permitan la evaluación simultánea de marcadores en la superficie de las CD.

En este trabajo se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos, se tiñeron con una variedad de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos marcadores de superficie de las CD, se eliminaron las células muertas utilizando el colorante vital Hoechst y las células positivas para linajes específicos diferentes a las CD. El análisis se realizó en un citómetro FACS Aria con la posibilidad de analizar simultáneamente 11 parámetros. Se obtuvieron con las combinaciones de marcadores utilizadas tres poblaciones de CD en la sangre periférica de individuos normales una que corresponde a las CDc , y dos que están contenidas en la población de CDp y que se distinguen por la expresión de HLA-DR y BDCA-2. Se determinó además la expresión de marcadores de activación y de moléculas que participan en la inhibición o freno de la RI; así como también la expresión de TLR-2 y TLR-4 en las diferentes poblaciones estudiadas.

## ANTECEDENTES

### • Generalidades

El sistema inmune (SI) se divide en innato y adaptativo, el primero se caracteriza por su rapidez para detectar agentes patógenos y/o daño a tejidos. Las células de la inmunidad innata expresan receptores muy conservados y poco diversos que reconocen estructuras en los microorganismos y tienen la capacidad de activarse y expresar moléculas que indican la presencia de infección o de daño tisular. Entre las células de inmunidad innata se encuentran los polimorfonucleares, los monocitos, los macrófagos, las células NK y las células dendríticas (Banchereau et al. 2000). El SI adaptativo se caracteriza por su gran diversidad y especificidad antigénica así como por la generación de memoria inmunológica; se compone por los linfocitos T y B que son los encargados de mediar la inmunidad celular y humoral respectivamente a través de la expresión de receptores clonales de superficie TCR y BCR (Abbas, 2003). Las CD participan en la conexión de los dos tipos de inmunidad principalmente por su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T e iniciar una respuesta inmune adaptativa. Las CD participan también en la inducción de TI y se ha propuesto que dependiendo del microambiente en el que presentan el antígeno pueden polarizar a  $T_H1$ ,  $T_H2$  y otras sub poblaciones de linfocitos T.

Las CD son capaces de capturar y procesar una gran variedad de antígenos de naturaleza proteica y presentar péptidos derivados de estos unidos a moléculas clase I y clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC I y MHC II) a los linfocitos T. Como se mencionó las CD son capaces de dirigir el tipo de respuesta efectora de los linfocitos T. El tipo de respuesta adaptativa antígeno específica resulta crítica para la resistencia contra infecciones y tumores. Sin embargo, las CD pueden también inducir tolerancia inmunológica en la periferia por distintos mecanismos: delección clonal, anergia clonal e inducción de linfocitos T reguladores, que son capaces de suprimir la actividad de linfocitos T activados, esto es muy importante en autoinmunidad y rechazo de trasplantes.

En humanos las CD se dividen en dos subpoblaciones: Las CD convencionales y plasmacitoides. Además de la expresión diferencial de marcadores de superficie estas sub poblaciones se distinguen también por la expresión de receptores tipo toll (TLRs) y por las citocinas que producen después de su activación. Así las CDc expresan TLR-2,3,4,5,7,8 y 9 y producen principalmente IL-12 y TNF- $\alpha$ . Las CDp expresan exclusivamente TLR-7, 8 y 9 y producen grandes cantidades de Interferones tipo I (Kadowaki et al. 2001). La liberación de

estas citocinas además de servir como puente de conexión entre los dos tipos de inmunidad son importantes para la activación de otras células de la inmunidad innata como NKs y de otras subpoblaciones de linfocitos con receptores TCR poco diversos como las NKT o los linfocitos T $\gamma\delta$ . (Mellman & Steinman 2001).

Iniciar una RI no es la única función de las CD, actualmente se encuentra claramente descrito que las CD también son capaces de capturar antígenos contra los cuales normalmente no se monta una RI, esto incluye a proteínas ambientales encontradas en el tracto respiratorio y digestivo, así como auto antígenos derivados de diversos tejidos (Huang et al. 2000). Se ha propuesto que la captura de dichos antígenos en el estado normal o de reposo permite a las CD dar origen a la tolerancia hacia tales antígenos. La capacidad de inducir tolerancia inmunológica ha sido propuesta tanto para las CDc como para las CDp. Para entender como una misma célula es capaz de realizar funciones que parecieran opuestas RI o TI es necesario revisar algunas características importantes propias de las CD, como lo es su origen, subpoblaciones, fenotipo y estado de maduración.

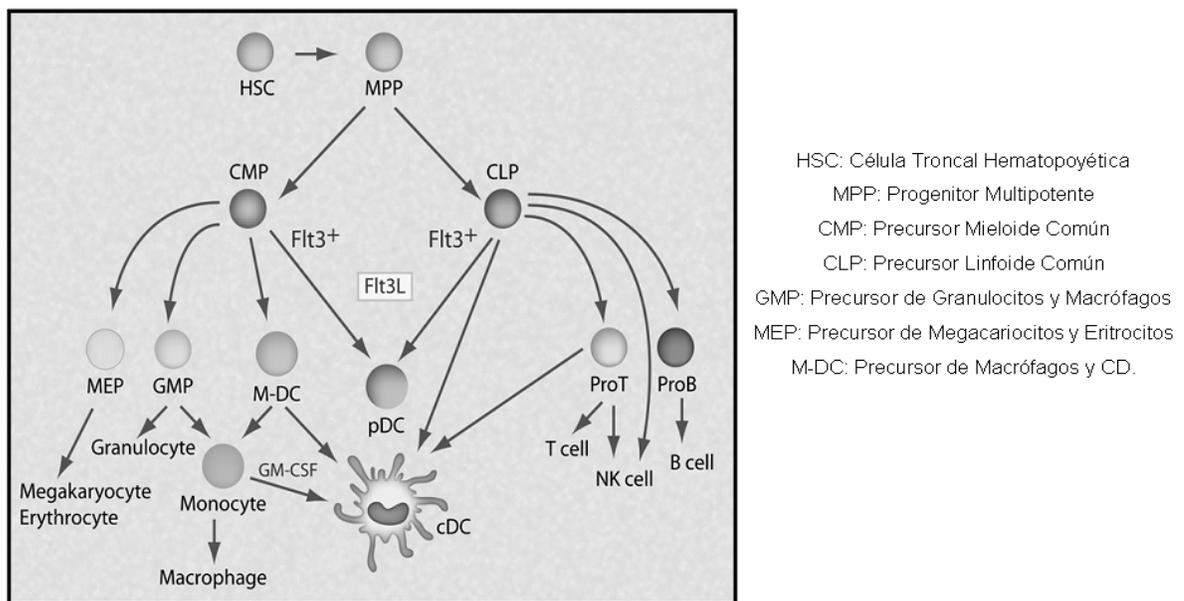
- **Origen:**

El origen de las CD al igual que el de las demás poblaciones celulares sanguíneas, son las células troncales hematopoyéticas, que son capaces de producir poblaciones de precursores mieloides (CMP) y linfoides (CLP), los cuales tienen el potencial de dar origen a distintas líneas celulares. Inicialmente se consideraba que las CDc tenían un origen mieloides ya que se pueden diferenciar a partir de monocitos de sangre periférica además de compartir algunas características con células de la línea monocito-macrófago en términos de morfología, fenotipo, potencial endocítico y actividad enzimática. Actualmente se sabe que los precursores muy tempranos que originan células mieloides como linfoides pueden producir a las CDc, de ahí la denominación. Las CDc pueden generarse tanto de precursores en la médula ósea, cordón umbilical CD34<sup>+</sup> o monocitos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica, dichos precursores son conocidos como pDC1. El cultivo de estos precursores en presencia de GM-CSF e IL-4 genera CD inmaduras con expresión de CD11c y moléculas MHC II (Reid et al. 1992; Szabolcs et al., 1996). Estas CD son capaces de madurar en presencia de distintos estímulos como LPS, TNF, anti-CD40 y otros ligandos de receptores tipo Toll (TLRs).

En estudios hechos en ratón y en humano se ha observado que también pueden derivarse CD a partir de precursores linfoides provenientes de médula ósea, las células que se originan son capaces de adquirir características de CDc. En el bazo y timo algunas CD con características de CDc expresan marcadores linfoides como CD8, CD2 y CD25; esto apoya fuertemente el origen de algunas CD a partir de precursores linfoides. (Wu & Dakic 2004). A la fecha se desconoce si estas poblaciones de CDc tienen funciones diferentes.

Las CD representan un sistema celular compuesto por subpoblaciones que son fenotípica y funcionalmente distintas. Interesantemente se ha observado que las CD a diferencia de otras líneas celulares derivadas de precursores hematopoyéticos, pueden derivar tanto de precursores mieloides como linfoides partiendo de un progenitor que expresa Flt3 (Receptor clase III de tirosina-cinasa) (Figura 1), lo cual sugiere que los precursores tienen plasticidad. Se ha visto que el ligando de Flt3 (Flt3L) actúa como factor de crecimiento para los precursores hematopoyéticos y puede promover la expansión de CD tanto *in vivo* como *in vitro* (Karsunky et al. 2003).

Diversas citocinas y factores de transcripción juegan un papel muy importante para el desarrollo de diferentes tipos de CD con distintas capacidades funcionales; y aunque tal vez el origen de cada subpoblación de CD dicte su capacidad funcional, se ha observado que el estado final de maduración, así como la función que desempeñaran se ven influenciados por el microambiente que las rodea y por el tipo de células con el que interactúan, lo cual es una evidencia de la plasticidad con que cuentan los precursores (Wu & Liu 2007).



**Figura 1. Origen de las células dendríticas (Wu & Liu 2007).**

Aunque hay trabajos que sugieren que las CDp tienen un origen linfoide, y que son generadas durante la linfopoyesis temprana a partir de un progenitor linfoide con potencial para generar linfocitos B y T además de otras células de inmunidad innata como NK's (precursor denominado CLP); y aunque se ha observado que las CDp comparten algunos marcadores con los linfocitos B como inmunoglobulinas re arregladas y expresión de B220, aún existe cierta controversia acerca de su origen, ya que también hay trabajos en los que se sugiere que las CDp pueden derivarse de precursores de tipo mieloide; también se ha descrito que estas células pueden diferenciarse *in vitro* a partir de precursores de médula ósea en presencia de Flt3-L e IL-3, dichos precursores son conocidos también como pDC2. Estas células tienen características fenotípicas y funcionales distintas a las convencionales por lo que representan una subpoblación distinta de CD.

A pesar de la existencia de CDc y CDp con características bien definidas no existe, en el humano, un marcador exclusivo que permita identificar estas poblaciones así la mejor forma de hacerlo es como células linaje negativas (CD3<sup>-</sup>, CD14<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD56<sup>-</sup>) HLA-DR<sup>+</sup> (O'Doherty et al.,1994), CD11c<sup>+</sup> para las CDc y CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> para las CDp. La búsqueda de marcadores de superficie exclusivos de CD que permita su identificación es una de los retos más importantes en el estudio de estas células.

- **Estado de Maduración:**

Las CD se diferencian o maduran en respuesta a un amplio espectro de estímulos ambientales o endógenos. El proceso de maduración está directamente relacionado con la inducción de TI, RI y con el tipo de RI efectora mediada por linfocitos T.

El modelo clásico del estado de maduración de las CD en la inducción de TI o RI, parte de que éstas existen básicamente en dos estados funcionales: CD inmaduras que, aparentemente son las encargadas de inducir la TI hacia lo propio, y las CD maduras que son las responsables de la inducción de una RI contra antígenos extraños (Steinman R. 1991). Este modelo aunque aplica principalmente para las CDc se aplica también a las CDp. A pesar de que este modelo explica bajo qué condiciones una CD induce RI o TI existen algunos trabajos que indican que existen fenotipos de CD inductoras de TI que dependen del microambiente en el que maduran, por lo tanto el hecho de que es una CD inmadura la que induce tolerancia es retado por los trabajos que sugieren que cambios fenotípicos sobre todo relacionados con la expresión de moléculas involucradas en mandar señales negativas son cruciales en la inducción de TI. Tradicionalmente el término de maduración se ha asociado a

cambios fenotípicos que involucran un incremento en la expresión de moléculas del MHC en la superficie de las CD así como con la expresión de moléculas co-estimuladoras y moléculas de adhesión (Reis e Sousa 2006).

En la mayoría de los tejidos las CD se encuentran en estado “inmaduro”, son células con una gran capacidad endocítica y en este estado no son capaces de estimular a los linfocitos T. Las CD inmaduras tienen una baja expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86 y CD80 así como baja de moléculas de adhesión como CD54 y también tienen una expresión baja o nula de la molécula CD40 la cual es fundamental en el inicio de una RI mediada tanto por linfocitos T como B.

Las CD inmaduras tienen la capacidad de entrar rápidamente en un proceso de maduración al recibir una señal de activación como lo es el caso de una infección microbiana; éstas células expresan receptores tipo Toll (TLRs) lo que les permite reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), de este modo las células son capaces de hacer la transición de un estado inmaduro a maduro el cual se caracteriza por su capacidad inmunogénica. Las CD al madurar pierden rápidamente su alta capacidad endocítica, incrementan la expresión y estabilidad de los complejos péptidos-MHC en la membrana, incrementan también la expresión de moléculas como CD40, de moléculas de adhesión y de moléculas co-estimuladoras (CD54, CD80 y CD86) y son capaces de secretar citocinas proinflamatorias como la IL-1, IL-6, IL-18 e IL-23 IL-12 o interferones tipo I (CDc o CDp respectivamente). Además las CD en tejido periférico expresan el receptor de quimiocinas CCR7 lo que dirige su migración hacia nódulos linfáticos para realizar la presentación de antígenos a los linfocitos T (Liu Y.J. 2001).

En cuanto a la expresión de moléculas involucradas en la inducción de TI se ha propuesto que las CD expresan B7-H1 y B7-DC los cuales son ligandos de PD1 (Receptor de muerte programada-1) (Probst H.C. et al. 2005). Se ha propuesto también la expresión de receptores del tipo ILT-3 y 4 (Transcritos tipo Inmunoglobulina) y también la expresión de CD80 el cual es ligando preferencial de CTLA-4. Finalmente se han reportando algunas otras moléculas en sub poblaciones de CD que podrían participar en TI como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) que es una enzima encargada de realizar la degradación del triptofano. IDO participa en RI contra algunos patógenos, sin embargo, también participa en la supresión de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Hwu P. et al. 2000), se ha demostrado además que esta enzima expresada en algunas CD no cuenta con actividad, hasta que es activada por la presencia de IFN- $\gamma$  y los ligandos de CD80 y CD86 (Munn et al.,2004). Otra enzima importante es la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS), se ha visto que esta enzima se encuentra presente en cierta población de CD, la producción de iNOS está relacionada con

suprimir la proliferación de linfocitos T (Albina et al. 1991; Lu et al. 1996), así como también con la inducción de apoptosis en CD (Natalya et al., 2003), por lo cual la expresión de estas dos enzimas en ciertas subpoblaciones de CD se ha relacionado con la capacidad para inducir tolerancia inmunológica.

A diferencia de las CD que adquieren ciertas características y que participan en la inducción de TI las CD durante el proceso de maduración pueden adquirir características que las convierten en inductoras de RI ya que activan eficientemente a los linfocitos T, los cuales pueden interactuar a su vez con otras células del sistema inmune como los linfocitos B para promover la producción de anticuerpos, con macrófagos para la producción de citocinas o actuar directamente sobre blancos determinados para lisarlos (T CD8<sup>+</sup>) (Banchereau & Steinman 1998). Adicionalmente la CD madura, mediante la expresión de otras señales aun no bien establecidas y en presencia de citocinas, es capaz de dirigir el tipo de respuesta efectora del linfocito T (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, o T<sub>H</sub>17). Así se ha reportado en modelo murino que las CD inmaduras pueden madurar de acuerdo al microambiente en donde se encuentren y generar distintos tipos de RI. Las CD que polarizan a Th1 expresan el ligando de Notch Delta-1 y expresan IL-12 la cual en presencia de INF- $\gamma$  como citocina primaria inducen polarización a Th1 los cuales producen predominantemente INF- $\gamma$ . Por otra parte las CD que maduran en un microambiente en el que predomina IL-4 expresan el ligando de Notch Jagged (Amsen D. et al. 2004) y polarizan hacia Th2 los cuales producen predominantemente IL-4 e IL-5. Finalmente aunque no se ha determinado la expresión de un ligando de Notch determinado, las CD que maduran en un ambiente en el que predomina TGF- $\beta$  e IL-6 pueden polarizar a Th17 produciendo principalmente IL-17 en esta polarización participa de manera importante la Dectina tipo 1.

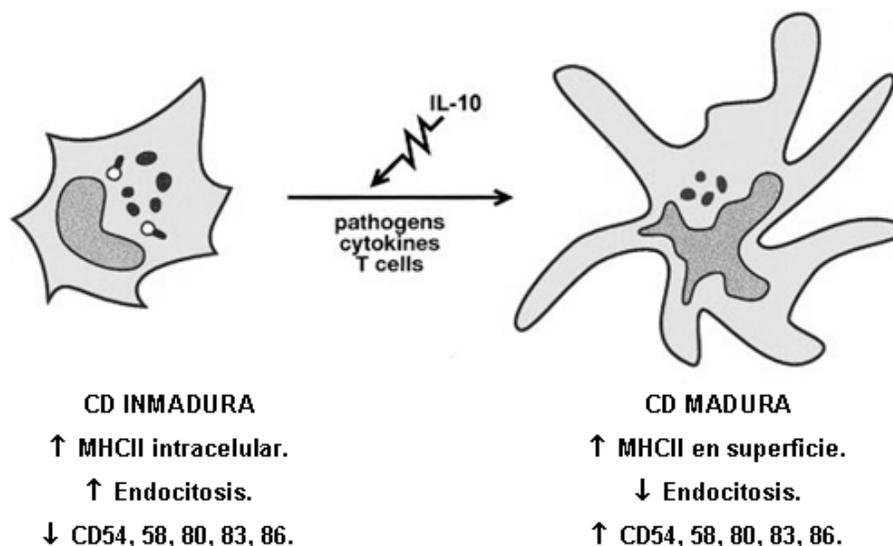


Figura 2. Proceso de maduración de las CD. (Banchereau & Steinman 1998)

- **Subpoblaciones:**

Aunque todas las CD son capaces de realizar la captura, procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T, las diferentes subpoblaciones de CD difieren entre ellas en cuanto a su localización, patrones de migración, función, así como requerir de diferentes tipos de estímulos para su generación y maduración; es por esto que para su estudio se han clasificado en subpoblaciones.

Las sub poblaciones de CD encontradas en el estado normal tanto en humano como en ratón incluyen a las CDp (principales productoras de interferones tipo I) y a las CDc las primeras se localizan en sangre periférica y órganos linfoides secundarios y no son muy abundantes en tejido periférico; las segundas pueden ser encontradas tanto en sangre periférica, órganos linfoides primarios y secundarios como NL, bazo y timo así como en órganos no linfoides y tejidos periféricos. Esto permite hacer una subdivisión de las CDc dependiendo del tejido en el que residen, como por ejemplo las CD de la piel que incluye a las células de Langerhans (CL) en la epidermis y CD dérmicas, así como las CD asociadas a mucosas, y CD asociadas a tejido linfoide principalmente (Wu & Liu 2007).

### **1. Células dendríticas plasmacitoides como pre-dendríticas (pre-CDs):**

Este término se utiliza para referirse a células que todavía no tienen morfología propiamente de CD, pero que tienen la capacidad de dar origen a una, para lo cual probablemente requieran de un estímulo de tipo inflamatorio o microbiano. Hasta este momento se sabe que diferentes tipos de pre-CDs pueden dar origen a diferentes subpoblaciones de CD. Un ejemplo de esto son las células dendríticas plasmacitoides (CDp).

Las CD plasmacitoides fueron descritas por primera vez en 1958, se les denominó así por su semejanza morfológica con células plasmáticas y aunque han pasado por diversas clasificaciones como linfocitos T plasmacitoides y monocitos plasmacitoides, actualmente se sabe que son CD que en su estado normal presentan una morfología similar a una célula plasmática como se menciona anteriormente, que al someterse a los estímulos de maduración adecuados adoptan la forma y función de una CDc. De acuerdo con esto existen evidencias que demuestran la conversión de CDp a CDc bajo diferentes estímulos sobre todo del tipo viral.

En el humano las CDp se encuentran en circulación en la sangre periférica tanto de adultos como de neonatos, además pueden ser localizadas también en distintos órganos linfoides como NL, bazo, timo y placas de Peyer (Yoneyama et al. 2004); se ha observado que en algunas enfermedades como en el lupus eritematoso sistémico, psoriasis, entre otras, suelen acumularse en sitios de inflamación, sugiriendo que éstas células contribuyen a la respuesta inflamatoria montada mediante la producción de citocinas, quimiocinas y activación de linfocitos; o alternativamente que estas células son muy importantes para mantener tolerancia inmunológica y que su activación se traduce en la inducción de RI.

Las CDp representan alrededor de un 0.2 – 0.8 % de las células mononucleares periféricas, en cuanto a fenotipo se refiere se ha descrito que expresan marcadores como CD4, CD123 (IL-3R $\alpha$ ), HLA-DR, y no expresan marcadores propios de linfocitos T o B como son CD3 o CD19 y CD21 respectivamente, ni tampoco marcadores de estirpe mieloide tales como CD13, CD14 y CD33 (Zhang & Wang 2005). Estas células son las principales productoras de interferones tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) en respuesta a infecciones de tipo viral y bacteriano.

Aunque prácticamente cualquier célula del sistema inmune es capaz de producir IFN- $\alpha/\beta$  en respuesta a la presencia de virus, se ha descrito que las CDp son las productoras profesionales de IFN tipo I, por la rapidez en que lo hacen y por las grandes cantidades que llegan a producir en comparación con otras células, las CDp son capaces de producir IFN- $\alpha/\beta$  no solo en respuesta a virus, sino también a algunos parásitos y bacterias, cabe mencionar que las CDp no necesitan ser infectadas por los virus para ser activadas, además de que no todos los virus tienen la capacidad de realizar dicha activación. La producción de IFN- $\alpha/\beta$  es importante para la modulación de varios aspectos de la respuesta inmune incluyendo: la supervivencia de las CDp, diferenciación de los precursores de CDc, el incremento en la regulación de moléculas co-estimuladoras y moléculas del MHC, activación de células NK, en la inducción de respuesta mediada por anticuerpos y la inducción de linfocitos T citotóxicos.

Las CDp a diferencia de las CDc, expresan solamente los receptores tipo Toll (TLRs) 7, 8 y 9, los cuales se sabe que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estos TLRs se localizan en compartimentos intracelulares; y reconocen RNA de cadena sencilla derivado de virus y oligonucleótidos (ODN) CpG respectivamente, se ha demostrado que después de la activación con ligandos de estos TLRs, las CDp son capaces de secretar IFN- $\alpha$ , además de citocinas proinflamatorias como la IL-8 y TNF, además de que pasan por un proceso de “maduración” que incluye el incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD40, expresan también CCR7, y el marcador de

maduración CD83, y se ha visto que éstas células durante el proceso de maduración incrementan su capacidad de estimulación de linfocitos T. Por otra parte se cree que la expresión de los TLRs, puede estar modulada por la producción de IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$ , y la exposición a virus (Mc Kenna et al. 2005).

Además de la expresión de TLRs, las CDp también expresan receptores tipo lectina (CLRs), este tipo de receptores se han identificado en diferentes subpoblaciones de CD, entre ellos se encuentran DC-SIGN (CD209), DEC-205 (CD205), langerina (CD207), el receptor de manosa (CD206), BDCA-2 y dectina-1, este tipo de receptores reconocen estructuras ricas en carbohidratos presentes en microorganismos y también en auto-antígenos; han sido relacionados en fenómenos de adhesión, migración, captura y procesamiento de antígenos para su posterior presentación en el contexto de moléculas de clase II a linfocitos T, entre otros. Las CDp expresan BDCA-2, BDCA-4, y dectina-1. La expresión de DEC-205 no está bien estudiada y carecen de DC-SIGN y langerina. La función de BDCA-2 y 4 en estas células no se encuentra claramente descrita. Se ha observado que los anticuerpos anti-BDCA-2 se internalizan rápidamente y son presentados eficientemente a linfocitos T específicos, lo que sugiere su participación en la captura y presentación de antígenos.

El aislamiento de estas células se puede realizar directamente a partir de sangre periférica, obteniendo las células mononucleares, eliminando las poblaciones que expresan algún marcador de linaje, y seleccionando aquellas que son CD123<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, adicionalmente la identificación de otros dos marcadores (BDCA-2 y BDCA-4) ha facilitado su aislamiento mediante selección positiva utilizando perlas magnéticas acopladas con anticuerpos monoclonales anti-BDCA-4. (McKenna et al. 2005).

**2. Células Dendríticas Convencionales (CDc):** Se denominan de este modo por expresar los marcadores característicos de CD, además de que en el estado normal ya cuentan con la morfología y funciones clásicas descritas para las células dendríticas, y a su vez pueden ser divididas en varias categorías como son:

**2.1 Células Dendríticas Migratorias:** Son las CD clásicas descritas en la literatura, actúan como centinelas en tejidos periféricos, migran a los nódulos linfáticos (NL), capturan antígenos presentes en la periferia y a su vez los presentan a los linfocitos T en los NL; un ejemplo de esto son las células de Langerhans (LC) y las CD dérmicas. En el humano se ha visto que los progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> se pueden diferenciar tanto a LC como a

CD dérmicas cuando se cultivan en presencia de GM-CSF y TNF (Caux et al. 1992), estos progenitores CD34<sup>+</sup> dan origen a los precursores linfoides y mieloides (CLP y CMP), los precursores mieloides se diferencian a su vez en CLA<sup>-</sup> y CLA<sup>+</sup> (CLA: antígeno linfocítico cutáneo) los cuales dan origen a células CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> y CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> respectivamente (Strunk et al. 1997). Las CD CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>+</sup> migran a la epidermis y se convierten en LC, mientras que las células CD11c<sup>+</sup>CD1a<sup>-</sup> migran a la dermis y a otros tejidos y se convierten en CD intersticiales (Ito et al. 1999). Los estudios más recientes muestran que el CMP que expresa Flt3, al igual que los monocitos pueden dar origen a las LC *in vivo* (Mende et al. 2006; Ginhoux et al. 2006), estos estudios sugieren que tanto las células de Langerhans como las CD dérmicas son de la estirpe mieloide.

2.2 Células Dendríticas Residentes de Tejidos Linfoides: Estas células no migran, su función y desarrollo se ven restringidos a un órgano linfoide en específico, en el cual presentan tanto antígenos propios como extraños a los linfocitos T, y a su vez se han descrito subpoblaciones de esta clase de CD en ratón como lo son las CDc CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. Esta clasificación incluye a las CD de timo y bazo. Los pocos reportes que hay acerca de las poblaciones de CD en bazo de humano señalan que las CD ubicadas en la zona marginal, en la zona B y zona T del bazo presentan un fenotipo CD11c<sup>+</sup> HLA-DQ<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>bajo</sup> CD16<sup>-</sup> CD54<sup>+</sup>, lo cual no ha podido correlacionarse con las poblaciones de CD encontradas en bazos de ratón (McIlroy et al. 2001). Por otra parte se encuentra reportado en el humano que la mayoría de CD en el timo son CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> CD45RO<sup>bajas</sup> y carecen de la mayoría de marcadores de la estirpe mieloide, lo cual las asemeja a las CD CD8<sup>+</sup> de timo de ratón; por otra parte se encuentra otra población en menor proporción cuyo fenotipo es CD11c<sup>altas</sup> CD11b<sup>+</sup> CD45RO<sup>altas</sup>, además de que expresan muchos de los marcadores de la estirpe mieloide, lo cual las asemeja a las CD CD8α<sup>-</sup> mieloides de ratón (Vandenabeele S. et al. 2001; Bendriss-Vermare N. et al. 2001).

### **3. Poblaciones de CD en sangre periférica.**

Los métodos para la detección y aislamiento de CD a partir de sangre periférica se basan comúnmente en un amplio criterio inmunofenotípico, el principal criterio a tomar en cuenta como ya se ha mencionado es la ausencia de expresión de marcadores específicos de otros linajes como por ejemplo CD3, CD14, CD19 y CD56, y la presencia de marcadores como CD4, CD11c y HLA-DR principalmente. Se ha visto en estudios hechos a partir de CD aisladas de sangre periférica, que éstas representan una población bastante heterogénea, y que al menos se encuentra una mezcla de dos poblaciones (O'Doherty et al., 1994): la primera

población caracterizada corresponde a las CDc (CD123<sup>int</sup>CD11c<sup>+</sup>), a las cuales se les denomina también como CD1, las cuales expresan CD45RO, y pueden rápidamente dar lugar a una CD madura, aún al ser cultivadas sin la presencia de ninguna citocina o estímulo, comúnmente se consideraba a esta población como de origen mielóide sin embargo como se menciono CD1 o convencionales pueden ser originadas también a partir de precursores linfoides. La segunda población corresponde a las CDp (CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>), denominada también como CD2, éstas células expresan adicionalmente CD45RA, y dependen de la presencia de la IL-3 para su supervivencia y posterior diferenciación a CD maduras, con morfología típica de CD y una alta capacidad para estimular linfocitos T, éstas son consideradas de origen linfóide principalmente, y se encuentran escasamente en tejidos periféricos (Strobl et al. 1998; Bruno L. et al.1997).

Adicionalmente hay trabajos en los que se ha descrito una tercer población presente en sangre periférica, dicha población ha sido identificada con la ayuda del anticuerpo M-DC8 (Schäkel et al.,1998). Las células M-DC8<sup>+</sup> característicamente carecen del CLA en el ligando de la P-selectina (PSGL-1), lo que impide su unión a la P-selectina y a la L-selectina, además éstas células expresan el receptor de baja afinidad para IgG (FcγRIII), así como también los receptores para quimiotaxinas C3a y C5a, los cuales se sabe que se encargan de regular la migración de distintas células a sitios de inflamación, también se ha visto que las células M-DC8<sup>+</sup> después de estimularlas con LPS son capaces de producir TNF en grandes cantidades, incluso pueden producir más que los monocitos o las CDc bajo las mismas condiciones (Schäkel et al.,2002), esta población ha sido relacionada únicamente con estados de inflamación.

Cabe mencionar también que ante la falta de marcadores específicos para las distintas poblaciones de CD en sangre periférica y como un esfuerzo más para caracterizarlas se ha desarrollado un panel de anticuerpos monoclonales diseñados para reconocer a los denominados BDCAs (Blood Dendritic Cell Antigens), entre los cuales destacan: BDCA-2, BDCA-3 y BDCA-4. Se ha descrito que la población de CDp (CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>) presente en sangre bajo condiciones normales expresa BDCA-2 y BDCA-4; por otra parte BDCA-3 es expresado por una pequeña población descrita como CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>-</sup>, además de que una tercera población descrita como CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>hi</sup> CD123<sup>int</sup>, se caracteriza por la ausencia en la expresión de estos marcadores. Se ha observado que la expresión de estos BDCAs cambia rápidamente después del proceso de maduración de las CD, después del cual aumenta la expresión de BDCA-3 tanto en la población de CDp, como en la descrita como CD1c<sup>+</sup> CD11c<sup>hi</sup> CD123<sup>int</sup>, en esta última población también se ha visto un aumento en la expresión de BDCA-4 (Dzionek et al.,2000).

### **Células Dendríticas Inflamatorias (CDin).**

Se trata de una nueva población descrita que no se ha encontrado en el estado normal y que aparentemente aparece como consecuencia de un estado de inflamación o infección, un ejemplo de esto son las CD productoras de TNF y de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOs), denominadas como CD Tip. Los monocitos de tipo inflamatorio CCR2<sup>+</sup> son las células capaces de dar origen a este tipo de CD (Shortman & Naik 2007). Esta población se describió en un modelo murino utilizando monocitos inflamatorios Ly6C<sup>+</sup>, los cuales bajo un estado de inflamación se observó que eran capaces de dar lugar a una población de CD, y que requieren de GM-CSF para la producción de tal población de CD.

Estas CD inflamatorias derivadas de monocitos se pueden distinguir de las CDc presentes en bazo, por ejemplo, por su expresión intermedia más que alta de CD11c, por su alta expresión de CD11b y por la expresión de MAC3 (una glicoproteína que se encuentra también en macrófagos activados), además de la ausencia de la expresión de CD4 y CD8. Finalmente el fallo al encontrar esta población de CD en NL humanos en condiciones no inflamatorias, hace pensar que son productos transitorios que se deben únicamente a un proceso de inflamación (Shortman & Shalin 2007). La población más parecida descrita en el humano por su similitud en las funciones que desempeña es la que se menciona anteriormente como M-DC8<sup>+</sup>, presente en sangre periférica, aunque aún hacen falta más estudios para caracterizar a esta nueva población y definir cual es su participación en la respuesta inmune.

### **Natural Killer Dendritic Cells (NKDCs).**

Las NKDCs son una población descrita en los últimos años en modelos murinos, también llamada IKDC (Interferon-producing Kill Dendritic Cell), estas células tienen un patrón de expresión de marcadores de células NK y CD presentan en el ratón el fenotipo CD11c<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> (Taieb et al. 2006; Chan et al. 2006). Después de ser activadas mediante diferentes estímulos las IKDCs pueden producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y lisar directamente blancos típicos de las NKs, además de presentar cierta actividad como células presentadoras de antígeno (CPA) (Chan et al. 2006).

En cuanto al origen de estas células se ha visto que al igual que las NKs las IKDCs requieren de Id2 (proteína inhibitoria de la unión a ADN-2), aunque el principal precursor de ellas parece ser el progenitor de tipo linfoide LIN<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>alto</sup> Thy1.1<sup>-</sup> L-selectina<sup>+</sup>. Se ha sugerido también que este tipo de células comparten la misma vía de desarrollo con algunas CD aunque también se ha sugerido que se originan a partir de una vía de diferenciación única la cual parte de un CLP pero que muy tempranamente se diferencia para dar lugar exclusivamente a las IKDCs. (Welner R. et al. 2007).

Mediante la búsqueda de esta población en el humano se ha encontrado que células NK recién aisladas, así como líneas celulares de NK clonadas son capaces de procesar ciertos antígenos como es el caso del toxoide tetánico y presentarlos a linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Rocanrolo et al. 1991). Por otra parte se ha visto que tanto células NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup> CD16<sup>++</sup> son capaces de presentar funciones de una CPA. A pesar de esto hay aún muy pocos estudios en el humano que caractericen a esta población así como sus posibles funciones.

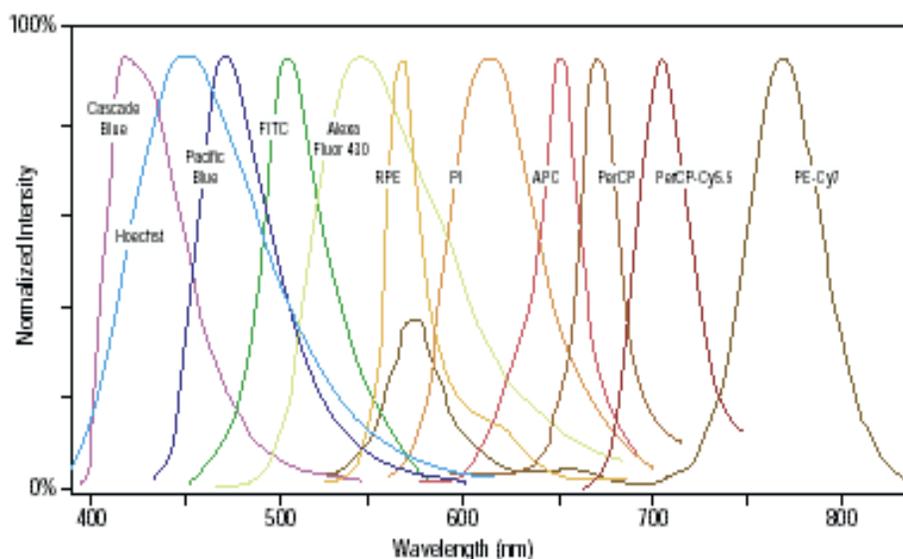
## **CITOMETRIA DE FLUJO.**

La citometría de flujo es una técnica que se desarrolló a finales de los años 60's, actualmente es muy utilizada tanto en la clínica como en la investigación; entre las principales ventajas que presenta es que se puede realizar el análisis de un gran número de células en poco tiempo, además de que brinda información de varios parámetros de cada una de las células.

Con la citometría de flujo a partir de una suspensión celular y el uso de anticuerpos monoclonales conjugados a diferentes fluorocromos es posible analizar la expresión de una amplia gama de marcadores extra e intracelulares, que junto con los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad o complejidad celular (SSC), permiten hacer la distinción entre diferentes poblaciones celulares, así como analizar la expresión de ciertos marcadores que como en el caso de las CD, hacen referencia al estado de activación de las células.

Actualmente las aplicaciones de la citometría de flujo incluyen no solo la identificación de diferentes poblaciones celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales, sino también abarcan muchas más aplicaciones entre las cuales se encuentran el análisis de ciclos celulares, la medición de actividad enzimática, y entre las más importantes se encuentra el “sorting” proceso mediante el cual a partir de una mezcla que contiene diversas sub poblaciones celulares, es posible elegir una o varias poblaciones de interés para separarlas, colectarlas y posteriormente realizar más estudios sobre ellas.

Es importante resaltar que al realizar un ensayo multicolor para la identificación de poblaciones celulares mediante el uso de anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos, es necesario tomar en cuenta las combinaciones de fluorocromos a utilizar, así como también incluir los controles individuales de compensación adecuados, ya que como se muestra en la figura 3, los fluorocromos presentan espectros de absorción y emisión que se traslapan, y al no realizar una correcta compensación del equipo, se pueden obtener resultados erróneos.



**Figura 3. Espectros de Absorción de distintos fluorocromos.**

## **OBJETIVOS:**

- ✓ Estandarizar la técnica de citometría de flujo de siete colores para la identificación de subpoblaciones de CD de sangre periférica.
- ✓ Identificar las distintas sub poblaciones de CD presentes en sangre periférica en un grupo de individuos control.
- ✓ Realizar un estudio cuantitativo de las sub poblaciones encontradas, para establecer los valores de referencia de dichas poblaciones en un grupo de individuos control.
- ✓ Determinar el fenotipo de cada una de las poblaciones encontradas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

- **Muestras de sangre periférica:**

Para la obtención de células mononucleares se utilizaron concentrados de leucocitos de 17 sujetos sanos obtenidas del Banco de Sangre del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

- **Obtención de Células Mononucleares.**

Se partió de un volumen inicial de sangre entre 5 y 10 mL, se diluyó 1:1 con PBS, posteriormente por medio de un gradiente de Ficoll (Lymphoprep), el cual se centrifugó a 2000 rpm durante 30 minutos, se realizó la separación de las células mononucleares, las cuales se colectaron y se sometieron a tres lavados con PBS y centrifugación por 10 minutos, dos a 1500 rpm y el otro a 700 rpm (eliminación de plaquetas); después de esto se resuspendieron nuevamente en PBS y se procedió a hacer el conteo de células en cámara de Neubauer.

- **Conteo de células Mononucleares.**

De la suspensión de células obtenida, se tomó una pequeña alícuota, se hizo una dilución (1:10) con azul tripano (colorante vital), de modo que fuera posible distinguir entre células vivas y muertas; de ésta dilución se tomó nuevamente una alícuota (10 $\mu$ L) y se colocó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de cada una de las muestras en el microscopio.

- **Citometría de flujo.**

El paquete celular obtenido se resuspendió y se pasó a una placa de 96 pozos, en la que posteriormente se realizaron las tinciones correspondientes. Como primer paso se incubaron las células a 4°C/ 20 minutos con la solución que tiene como componentes PBS, suero de caballo 2%, EDTA 5mM, azida de sodio 0.05%; esto con la finalidad de bloquear los receptores Fc para evitar el pegado inespecífico.

Posteriormente se realizaron las tinciones incubando con las diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos, en solución PBS/suero de caballo 2%/EDTA 5mM/azida de sodio 0.05% a 4°C / 20 minutos, después de cada incubación se realizaron dos lavados con la misma solución para eliminar el exceso de anticuerpos.

La combinación de marcadores utilizada para realizar la tinción fue la siguiente:

<b>Marcador</b>	<b>Conjugado a:</b>
LINAJE (CD3, CD19, CD14, CD56) * eBioscience	PE (Ficoeritrina)
CD11c * Caltag	FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)
HLA-DR *BDBioscience.	APC-Cy7 (Alofocianina-Cy7)
CD123 *BD Bioscience	PE-Cy5 (Ficoeritrina-Cy5)
BDCA-2 Miltenyi Biotec	APC (Alofocianina)
CD80 <sup>1</sup> , CD83 <sup>2</sup> , CD86 <sup>1</sup> , B7-H1 <sup>2</sup> * 1: BDBioscience 2:eBioscience	Biotina
TLR-2, TLR-4	Biotina

\* El revelado de los anticuerpos conjugados con biotina se llevó a cabo utilizando estreptavidina-PE-Cy7 (BD Bioscience).

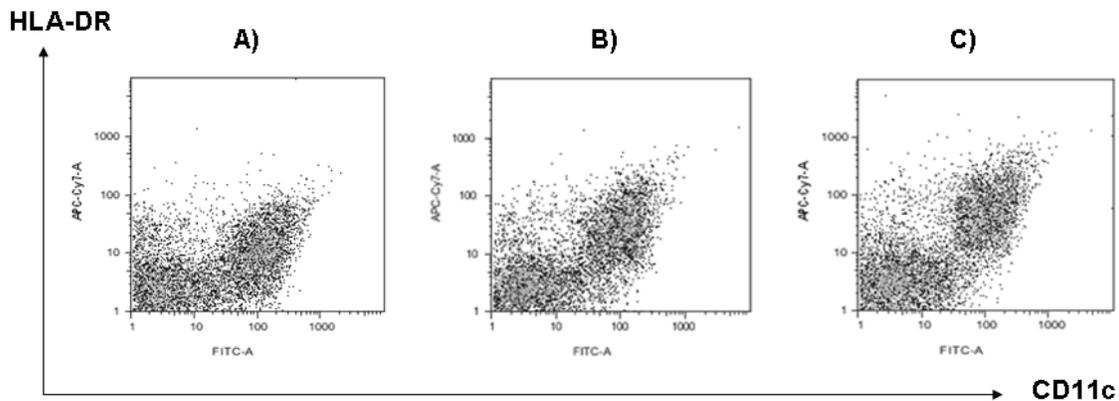
Después de realizar la tinción, se hizo un lavado y se agregó el colorante Hoechst 3342, se incubó a 4°C/ 5 minutos, para posteriormente poder evaluar la viabilidad de las células analizadas, después de esto nuevamente se realizaron dos lavados más con PBS, para eliminar el exceso de colorante; y finalmente se agregó paraformaldehído al 4%, con el cual se incubó nuevamente a 4°C / 20 minutos con el objetivo de fijar las células, transcurrido este tiempo se centrifugó para eliminar el paraformaldehído, las células se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4°C para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

El análisis de las células se realizó por citometría de flujo de 7 colores, utilizando el citómetro FACS Aria.

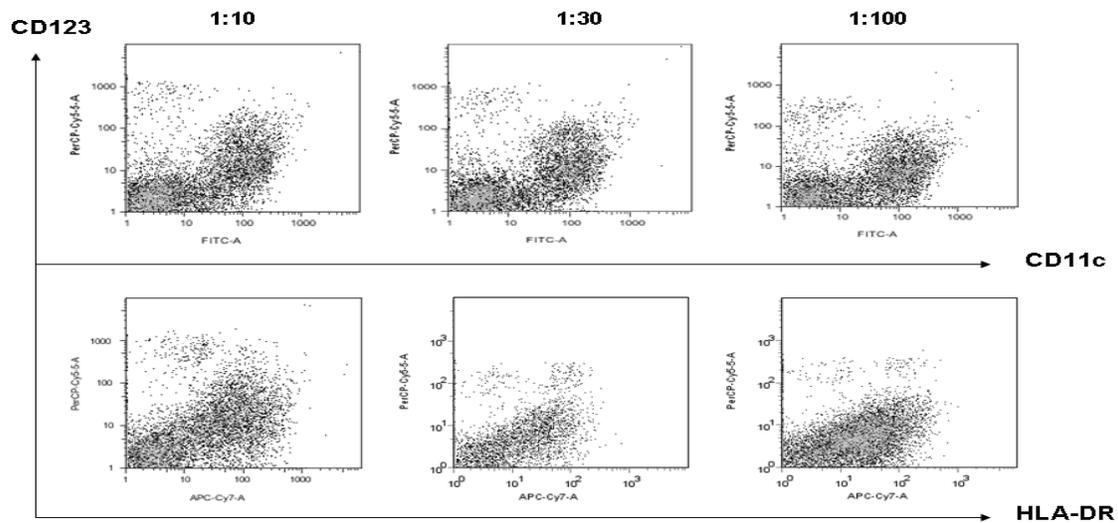
## RESULTADOS:

- **Estandarización de la Citometría de Flujo de siete colores.**

La primera parte del trabajo consistió en determinar la combinación de marcadores que se incluiría en el estudio, así como la combinación de fluorocromos más adecuada que permitiera definir las poblaciones de interés. Del mismo modo fue necesario determinar la concentración óptima a utilizarse de cada anticuerpo, por lo que se realizó la titulación de cada uno, en las figuras 4 y 5 se muestran algunos ejemplos de esto para los marcadores HLA-DR y CD11c (Fig. 4), de los cuales se eligieron las diluciones 1:200 y 1:100 respectivamente (Fig. 4C) y para el marcador CD123, del cual se eligió la dilución 1:100 (Fig. 5); cada uno conjugado a diferentes fluorocromos. Este paso fue crucial para poder seguir adelante, ya que aunque idealmente se puede utilizar cualquier anticuerpo conjugado a cualquier fluorocromo, es necesario comprobar que la combinación a utilizarse, así como la cantidad de cada uno de los anticuerpos empleada sea la más adecuada; y de este modo obtener resultados confiables y reproducibles. Finalmente al determinar la combinación de marcadores-fluorocromos, y diluciones óptimas, fue posible seguir adelante con el estudio de poblaciones de CD en un grupo de individuos control.



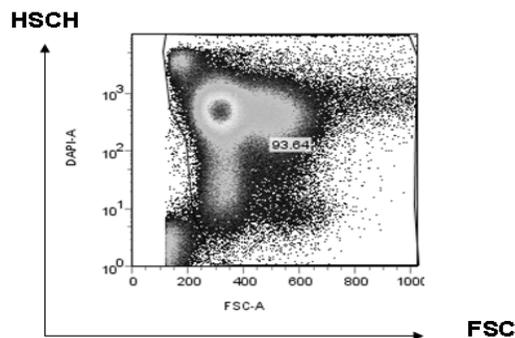
**Figura 4. Titulación de los anticuerpos HLA-DR-APC-Cy7 (1:20 (A), 1:50 (B), 1:200 (C)) y CD11c-FITC (1:10 (A), 1:30 (B), 1:100 (C)).** La titulación de los anticuerpos monoclonales anti-HLA.DR y anti-CD11c se realizó para determinar la concentración óptima a utilizarse durante los experimentos. De izquierda a derecha se muestran en orden creciente las diluciones utilizadas para los dos anticuerpos.



**Figura 5. Titulación del anticuerpo CD123-PE-Cy5 (1:10, 1:30, 1:100).** La titulación del anticuerpo monoclonal anti-CD123 se realizó de igual forma para determinar la concentración óptima a utilizarse en los experimentos. De izquierda a derecha se muestran en orden creciente las diluciones empleadas.

- **Eliminación de células muertas.**

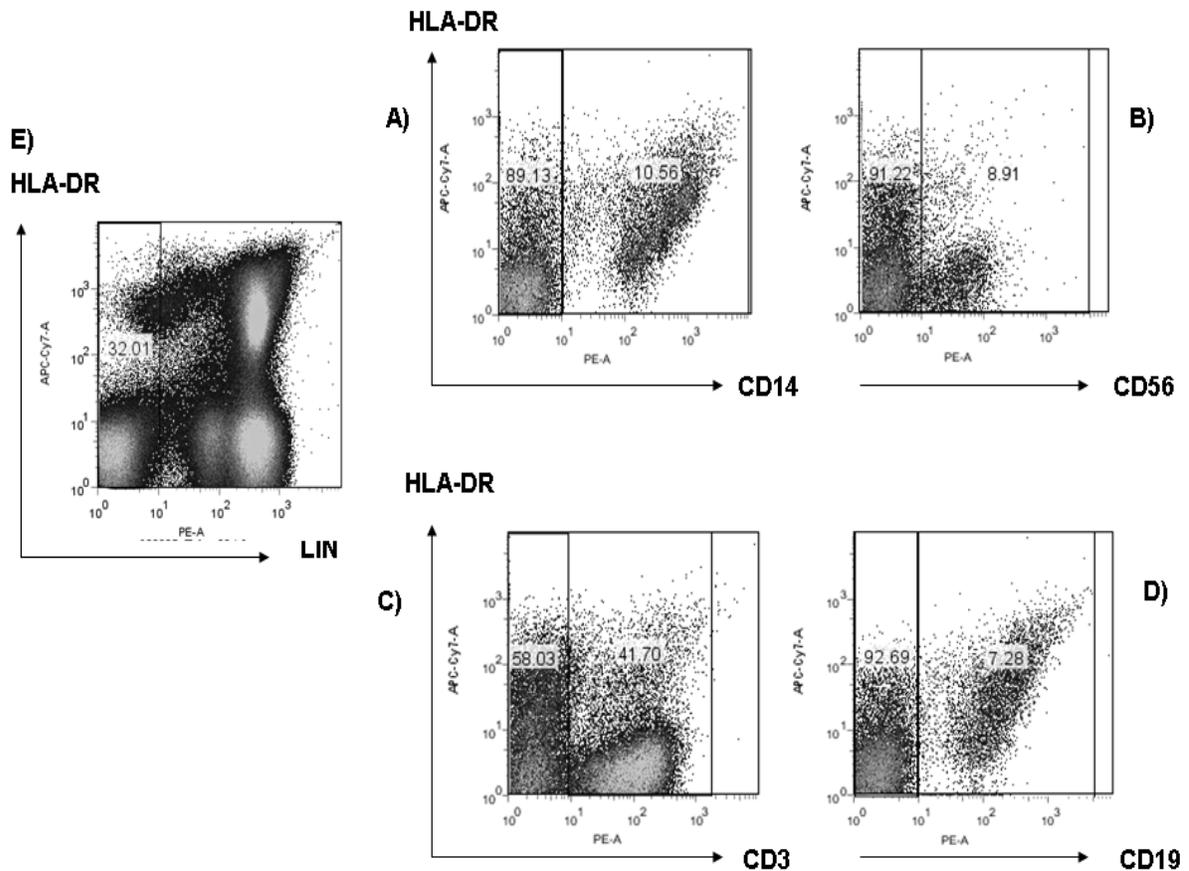
Para asegurar la viabilidad de las células analizadas, se incluyó la utilización del colorante Hoechst 3342, el cual es capaz de teñir el ADN de las células, es por esto que para la elección de la primer región a partir de la cual se realizaría el análisis se tomaron como referencia el tamaño de las células (FSC), así como la incorporación de este colorante, en la figura 6 se puede observar que se discriminó a las células que fueran de menor tamaño y negativas para la presencia del colorante Hoechst 3342, de este modo se aseguró que el análisis realizado se hizo solamente sobre células completamente viables, y que los resultados obtenidos no son debidos a falsas señales que pudieran darse por la presencia de restos celulares. Tomando en cuenta que las CD son una población bastante heterogénea en cuanto a tamaño se refiere, se eligió la región que se muestra en la figura 6; el análisis posterior de las diferentes poblaciones de CD parte de esta primera región.



**Figura 6. Eliminación de células muertas.** Tomando en cuenta como parámetros el uso del colorante Hoechst 33342 y FSC, se eligió la primer región para eliminar células muertas y restos celulares, todo el análisis posterior se realizó partiendo de esta región.

- **Elección de Células Linaje Negativas.**

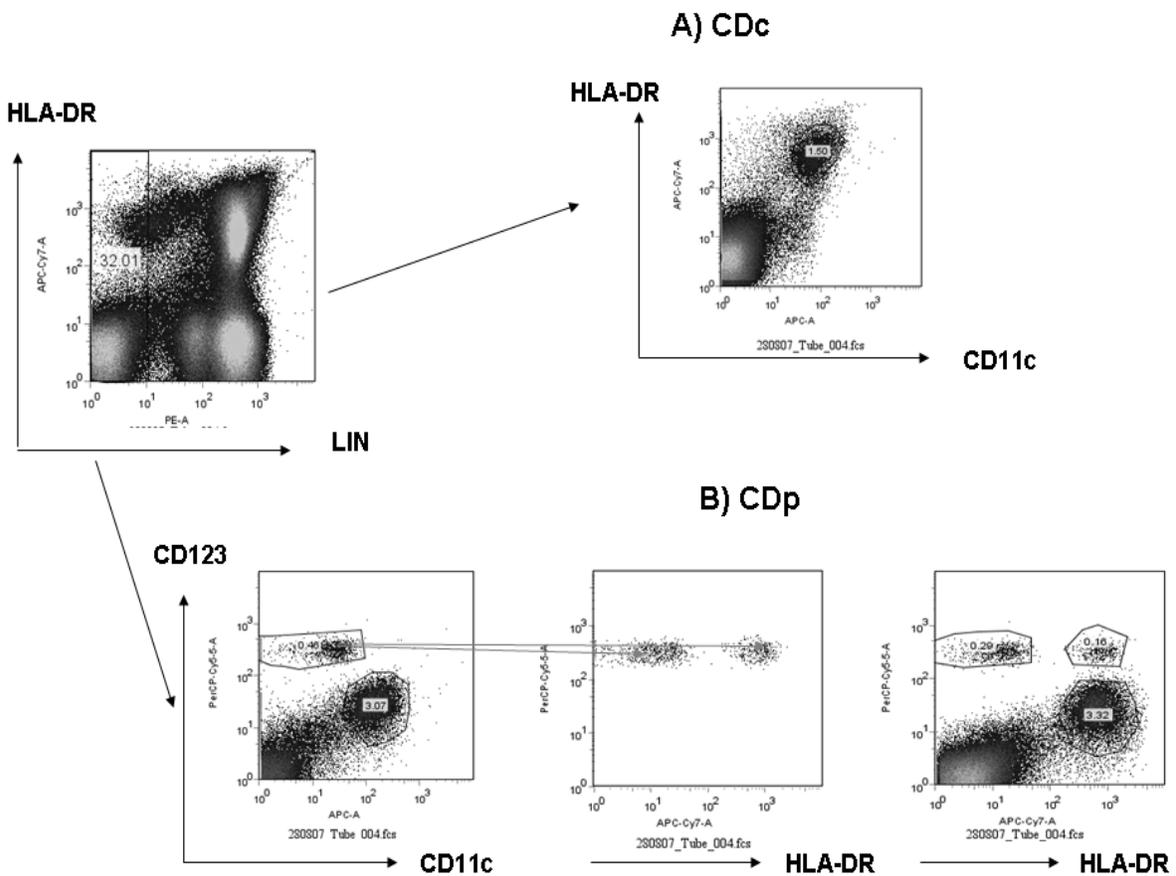
El siguiente parámetro tomado en cuenta para el análisis de las poblaciones de CD fue la ausencia de expresión de marcadores de linaje específicos para monocitos (CD14), células NK (CD56), linfocitos T (CD3) y linfocitos B (CD19), para lo cual se realizaron las tinciones individuales para evaluar la expresión de cada uno de estos marcadores y así poder determinar el porcentaje de cada una de las poblaciones presentes (Figura 7), con esto fue posible delimitar la región de células linaje negativas, cabe mencionar que la región a partir de la cual se realizó el análisis incluye solamente a las células linaje negativas pero abarca a las células HLA-DR positivas y negativas.



**Figura 7. Tinción para determinar células linaje positivas.** Tinciones individuales para poblaciones de Monocitos (A), Células NK(B), Linfocitos T(C) y B (D). El análisis realizado de las diferentes poblaciones de CD se hizo a partir de las células linaje negativas (E).

- **Poblaciones de CD analizadas.**

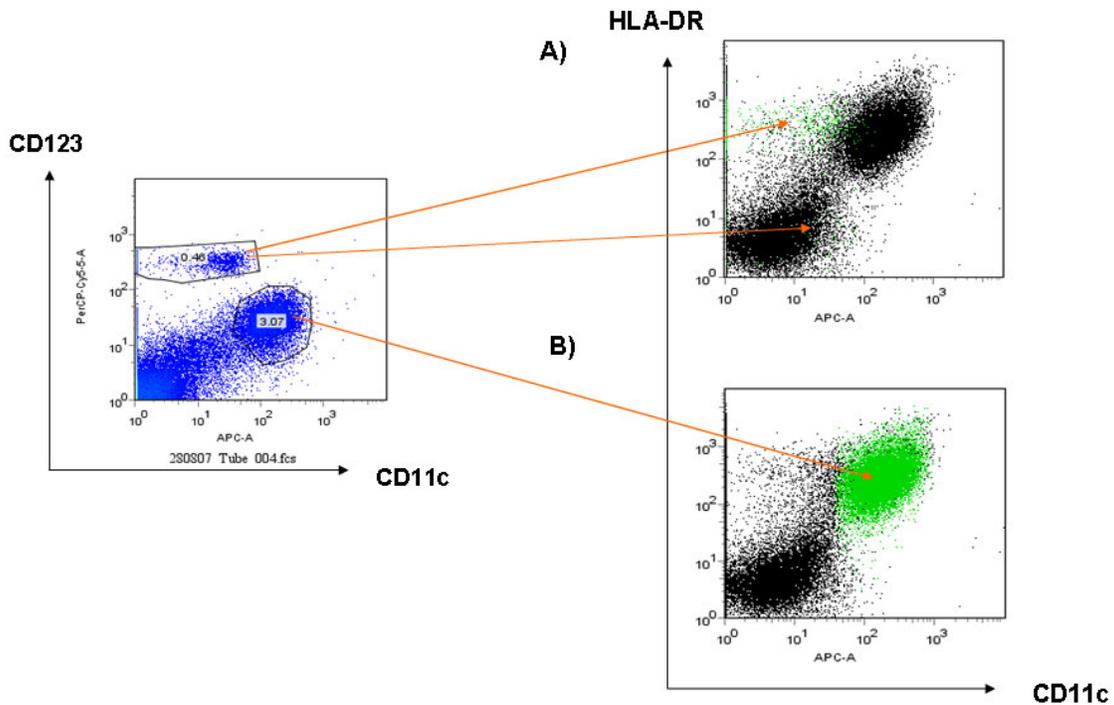
Como se menciona anteriormente el análisis de las distintas poblaciones de CD encontradas en sangre periférica, parte de la elección de las células linaje negativas, las cuales a su vez se analizaron para evaluar la expresión de otros marcadores como lo son CD11c y CD123, con la ayuda de estos fue posible definir a las poblaciones de CDc (CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) y CDp; (CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>), éstas últimas a su vez fue posible subdividirlas con respecto a la expresión de HLA-DR en positivas y bajas (Figura 8). Con esto se definieron tres poblaciones de interés a estudiar, una de CDc y dos contenidas en la población de CDp.



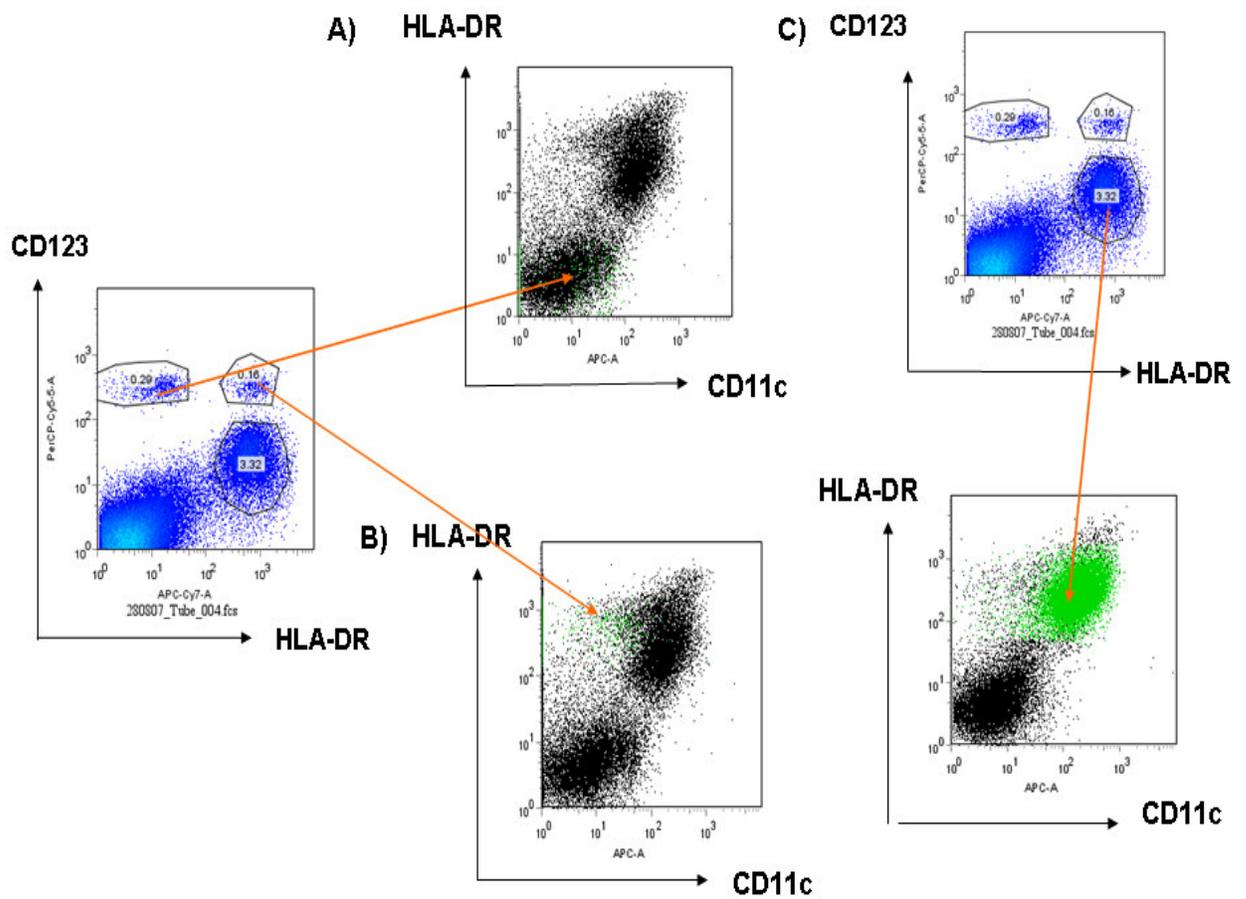
**Figura 6. Poblaciones de CDc y CDp.** Partiendo de la región de células linaje negativas, se analizaron las poblaciones de CDc (CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) (A) y CDp (CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) (B), la población de CDp a su vez se analizó con respecto al marcador HLA-DR lo que hizo posible subdividir a su vez la población de CDp en dos: CD123<sup>+</sup>HLA-DR<sup>baja</sup> y CD123<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>.

- **Distribución de las CDp con respecto a las CDc.**

Como se observa en la Figura 7 se delimitaron dos regiones una que corresponde a la población de CDp descrita como  $CD11c^- CD123^+$  y otra que es  $CD11c^+ CD123^{int}$ , éstas dos poblaciones se analizaron con respecto a la expresión de marcadores relacionados con CDc, de lo cual se observa que las CDp se encuentran distribuidas como HLA-DR positivas y negativas, y la otra población analizada corresponde exactamente a la población de CDc ( $CD11c^+ HLA-DR^+$ ). Adicionalmente al realizar el análisis con respecto a los marcadores CD123 y HLA-DR, fue posible delimitar tres poblaciones como se observa en la Figura 8, una que corresponde a las CDc, y las otras dos incluidas en las CDp que una vez más se diferencian únicamente por la expresión de HLA-DR.



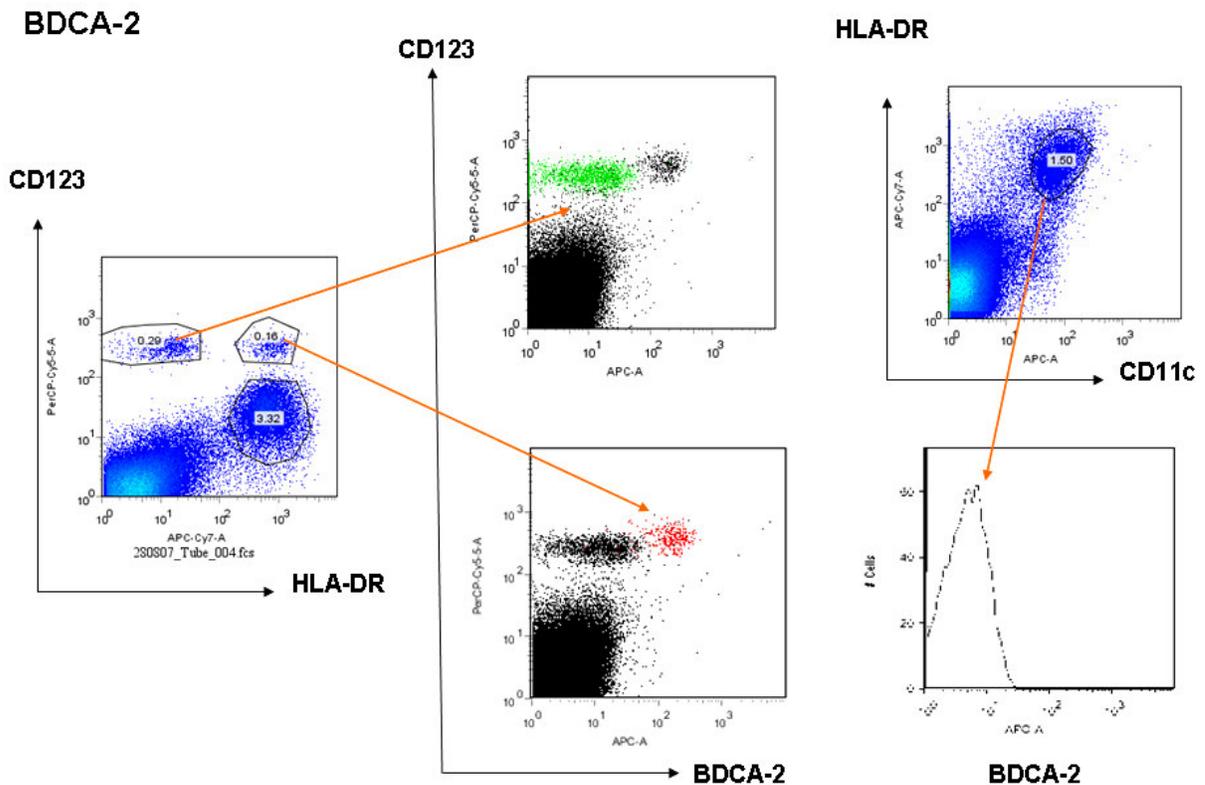
**Figura 7. Distribución de las CDp respecto a las CDc.** A partir de la gráfica de CD11c vs. CD123, es posible observar la ubicación de las dos poblaciones marcadas en la gráfica de CD11c vs. HLA-DR; se observa que las CDp se distribuyen como HLA-DR positivas y negativas (A) mientras que la otra población marcada corresponde a las CDc (B).



**Figura 8. Distribución de las CDp respecto a las CDc.** Al subdividir la población de CDp con respecto al marcador HLA-DR, se puede ver su distribución en la gráfica de CD11c vs. HLA\_DR (A y B); así como la distribución de la tercer población marcada que corresponde nuevamente a las CDc.

- **Expresión del Marcador BDCA-2.**

Como se ha mencionado se encuentra descrito que las CDp también expresan el marcador BDCA-2, por lo que en el estudio realizado se incluyó la utilización de este marcador con la finalidad de caracterizar mejor las poblaciones encontradas, de lo cual se puede observar claramente en la Figura 9 que se distinguen dos poblaciones, ambas son CD123<sup>+</sup> y se diferencian por la presencia o ausencia de la expresión de BDCA-2, las cuales además correlacionan con la expresión de HLA-DR, es decir tenemos una población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> y otra CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> BDCA-2<sup>-</sup>, además se observa como las CDc no expresan como era de esperarse este marcador, el cual está descrito que se expresa únicamente en las CDp.



**Figura 9. Expresión del marcador BDCA-2.** Evaluación de la expresión del marcador BDCA-2 en las diferentes poblaciones analizadas.

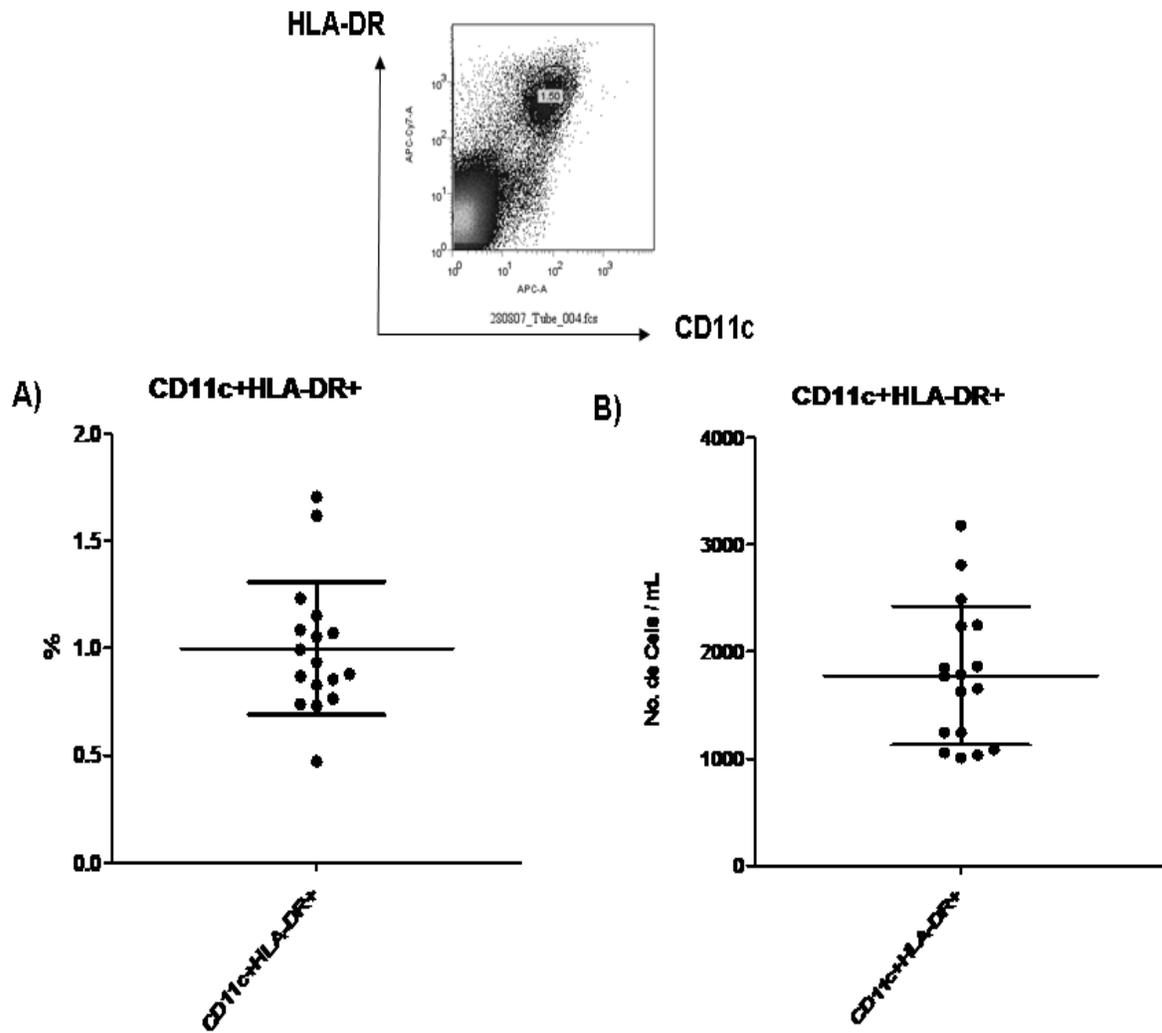
- **Porcentajes y Números Absolutos de las diferentes poblaciones de CD analizadas.**

A partir del número inicial de células obtenidas de cada muestra analizada, además del volumen de sangre inicial fue posible determinar el número de células por mililitro de sangre de cada una de las poblaciones así como el porcentaje que representan dentro de las células mononucleares totales.

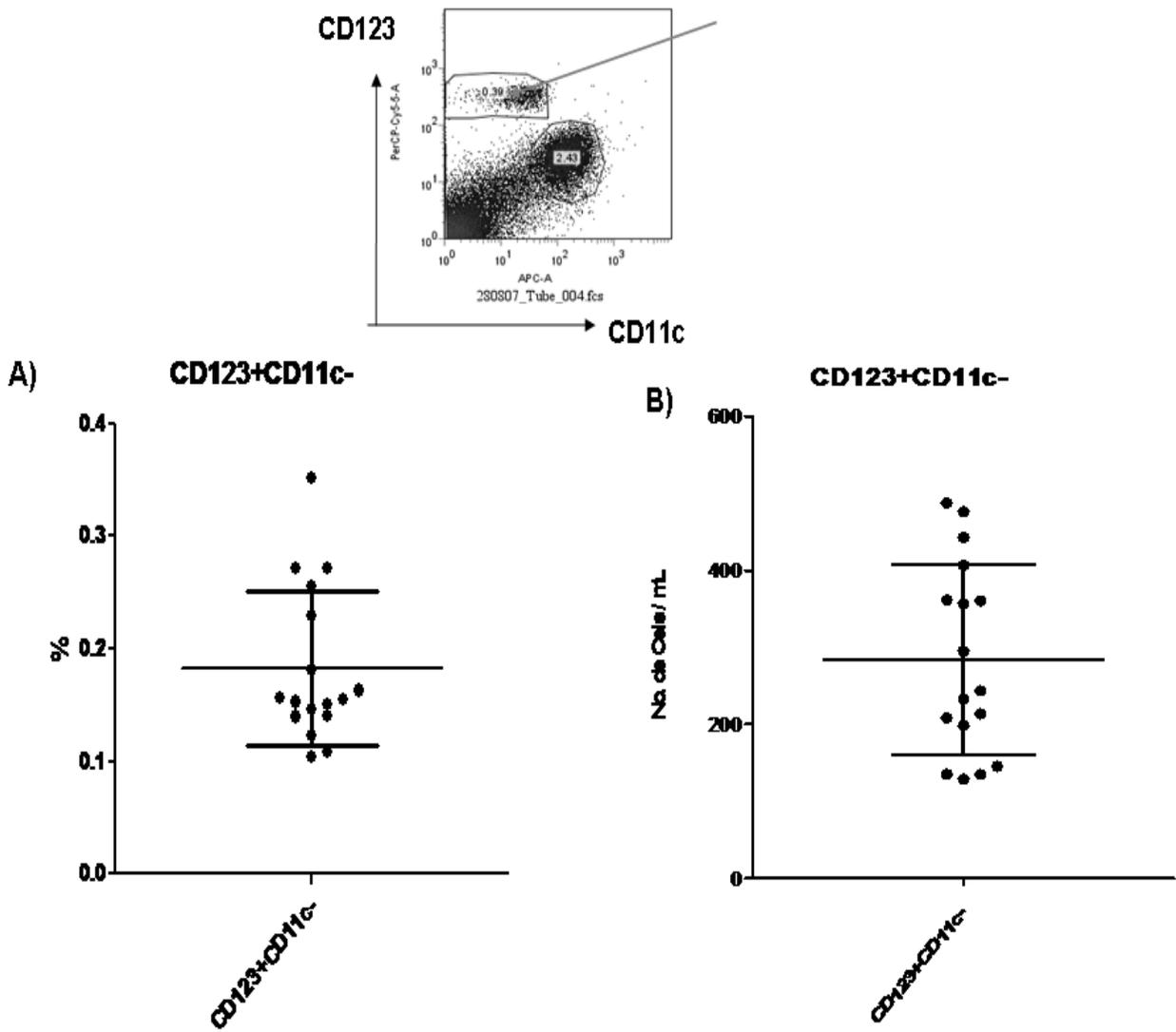
De este modo se determinaron dichos valores para cada una de las poblaciones estudiadas de lo cual se encontró que para la primera población, reportada como CDc representa alrededor de un 0.5 – 1.8 % de las células mononucleares totales, lo cual corresponde entre 1000 y 3000 células aproximadamente (Gráfica 1A y 1B).

Para la población de CDp considerada como CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> se encontró que representa un 0.1 – 0.4 % de las células mononucleares totales que corresponde a un valor de entre 100 y 500 células por mililitro de sangre (Gráfica 2A y 2B). Al subdividir las poblaciones de CDp con respecto al marcador HLA-DR, los valores encontrados fueron los siguientes: para la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> se encontró que representa entre 0.04 y 0.25 % de las células mononucleares, lo que corresponde a un valor de entre 100 – 400 células por mililitro de sangre (Gráfica 3A y 3B), es importante recordar que esta población corresponde a aquella que no expresa BDCA-2.

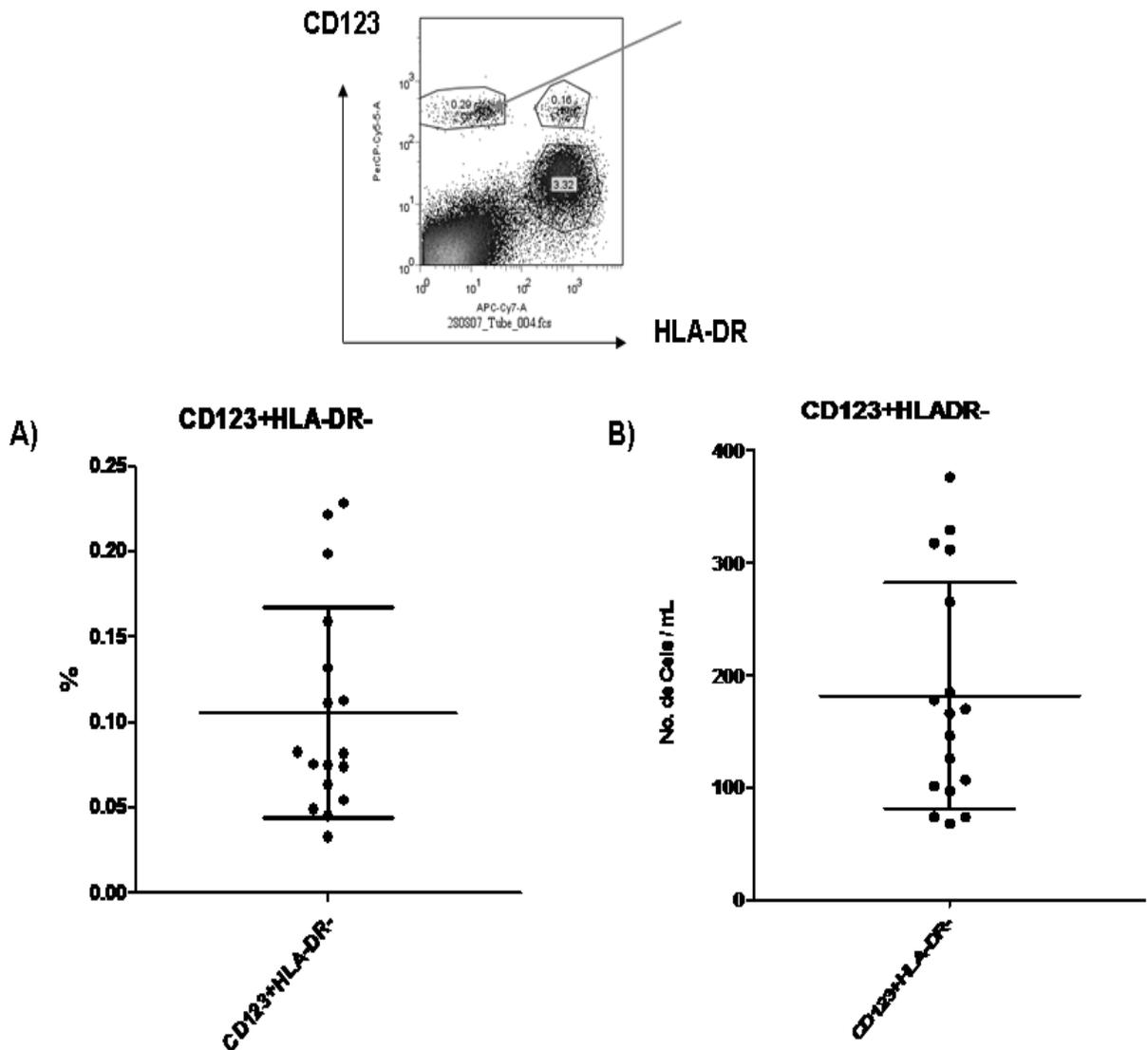
Finalmente para la última población que expresa CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> y BDCA-2<sup>+</sup> los valores encontrados fueron: 0.05-0.2 % del total de células mononucleares, lo que corresponde a un valor de entre 90 – 380 células por mililitro de sangre (Gráfica 4A y 4B), como se puede observar estas dos últimas poblaciones en las que abarcamos a las CDp presentan valores muy similares y considerablemente menores a las CDc, lo que claramente indica que se encuentran en menor proporción en el grupo de individuos analizado. De este modo se establecieron estos datos como valores de referencia para las poblaciones estudiadas en un grupo de individuos control.



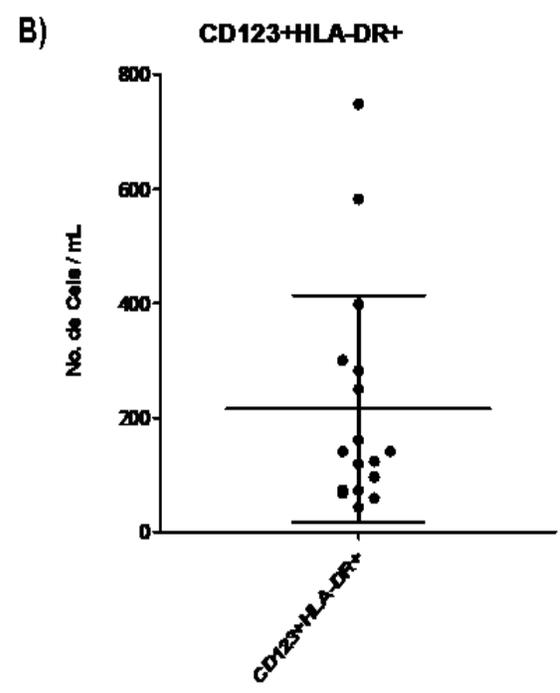
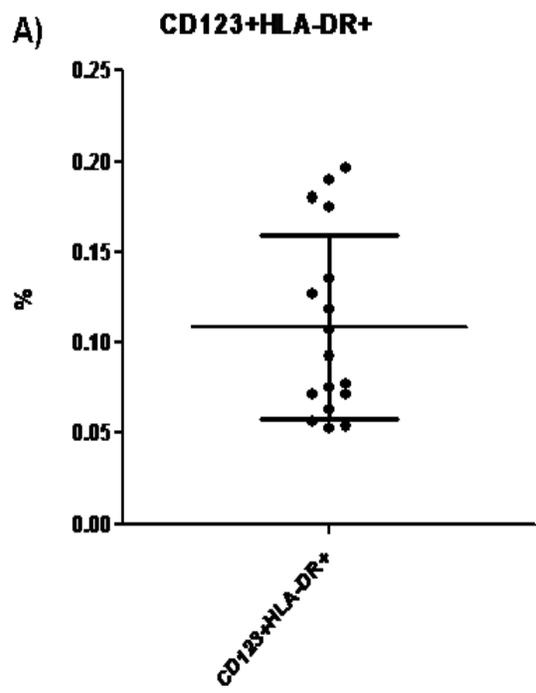
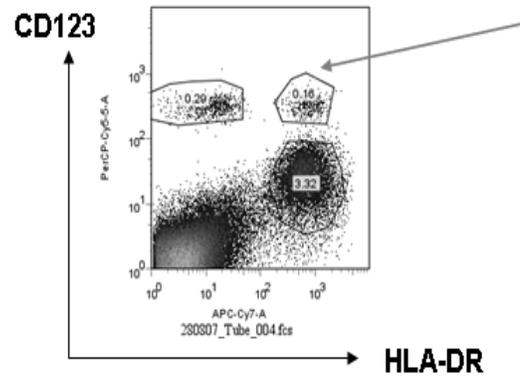
**Gráfica 1. Porcentajes y números absolutos de CDc.** Estudio de la población de CDc en un grupo de 17 individuos para determinar el porcentaje promedio de células (A), así como el valor promedio del número de células por mililitro de sangre (B).



**Gráfica 2. Porcentajes y números absolutos de CDp.** Estudio de la población de CDp (CD123+CD11c<sup>-</sup>) en un grupo de 17 individuos, para determinar el porcentaje promedio de células (A), así como el valor promedio de células por mililitro de sangre (B).



**Gráfica 3. Números Absolutos y Porcentajes de la población CD123+HLA-DR<sup>-</sup>.** Estudio de la población CD123+HLA-DR<sup>baja</sup> en un grupo de 17 individuos para determinar el porcentaje promedio de células (A), así como el valor promedio de células por mililitro de sangre (B).

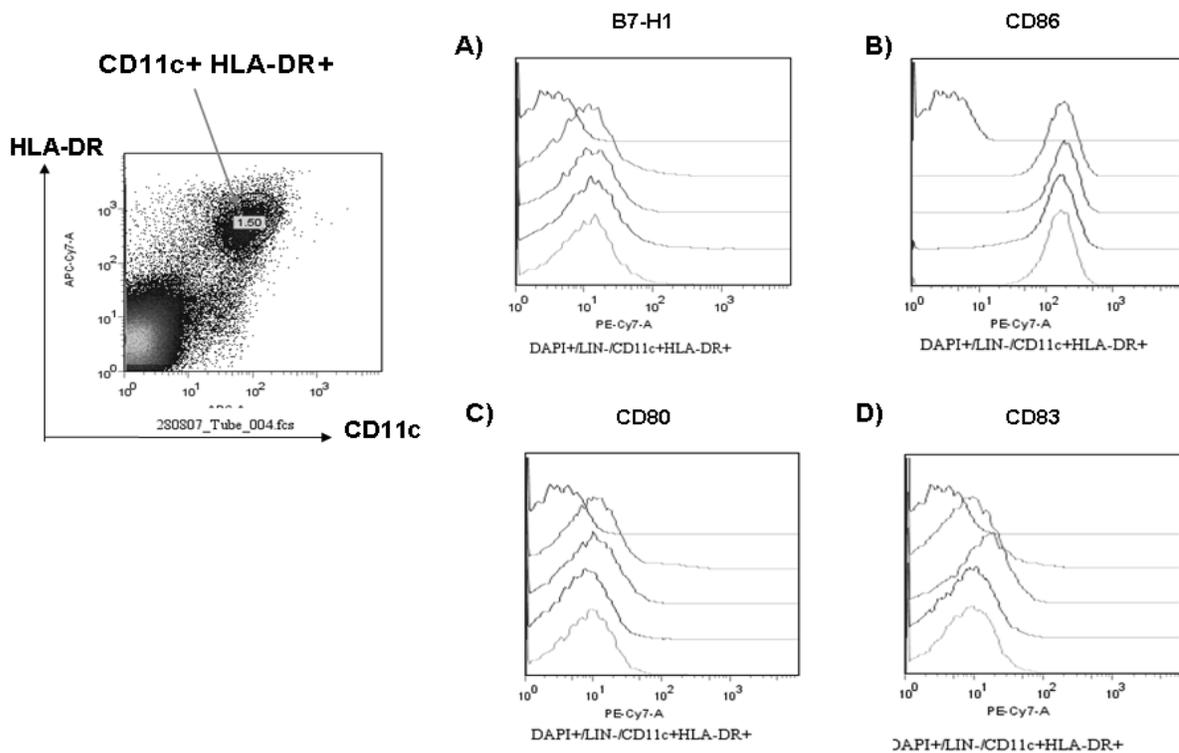


**Gráfica 4. Números Absolutos y Porcentajes de la población CD123+HLA-DR+.** Estudio de la población CD123+HLA-DR+ en un grupo de 17 individuos para determinar el valor promedio de células por mililitro de sangre (A), así como el porcentaje de las mismas (B).

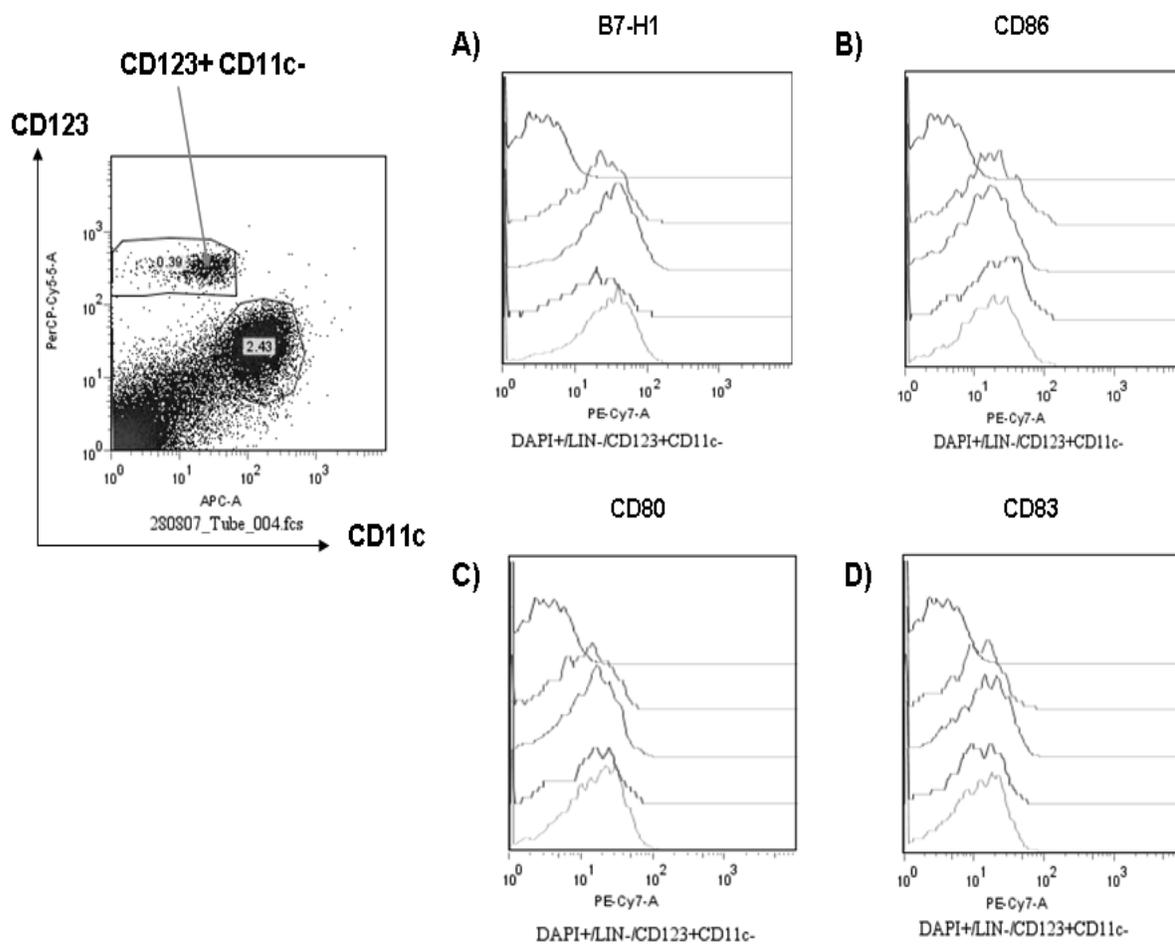
- **Fenotipo de las poblaciones estudiadas.**

La primer población analizada correspondiente a las CDc, mostró una expresión basal baja y muy similar para los marcadores B7-H1, CD80 y CD83, y una expresión basal más elevada del marcador CD86 (Figura 10). Por otra parte el análisis del fenotipo de las CDp (CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>) mostró una expresión basal baja de los marcadores CD80, CD83, y CD86; la expresión de este último es claramente menor con respecto a las CDc, por otra parte se encontró que la expresión de B7-H1 en esta población, es mayor con respecto a los otros marcadores, así como también con respecto a las CDc (Figura 11).

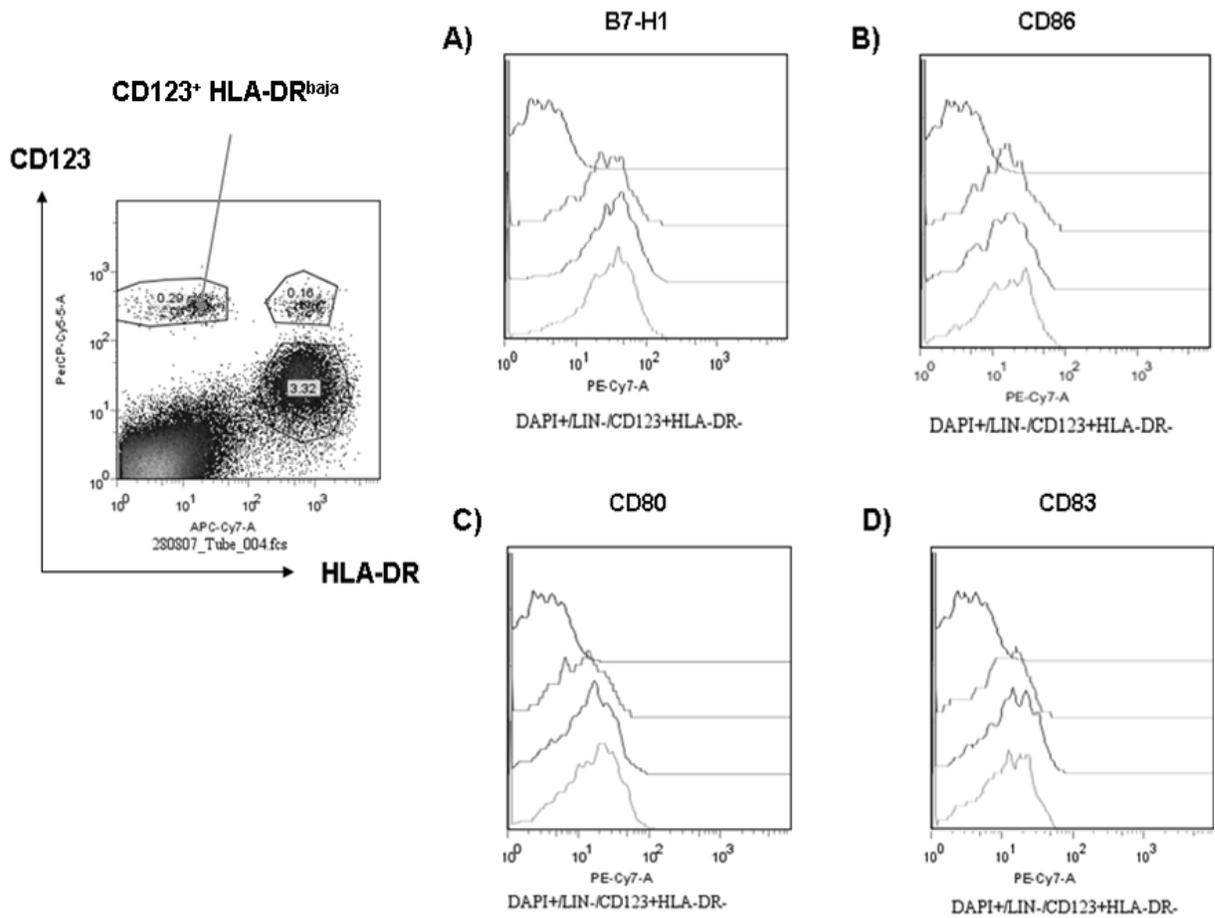
Finalmente se analizó el fenotipo de las poblaciones contenidas dentro de las CDp para ver si se encontraba alguna diferencia que permitiera caracterizarlas mejor (Figuras 12 y 13), los resultados encontrados para las dos poblaciones muestran una expresión basal baja de los marcadores CD86, CD80 y CD83. En el caso de B7-H1 es posible observar una mayor expresión por parte de la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> (Figura 12) en comparación con la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> (Figura 13).



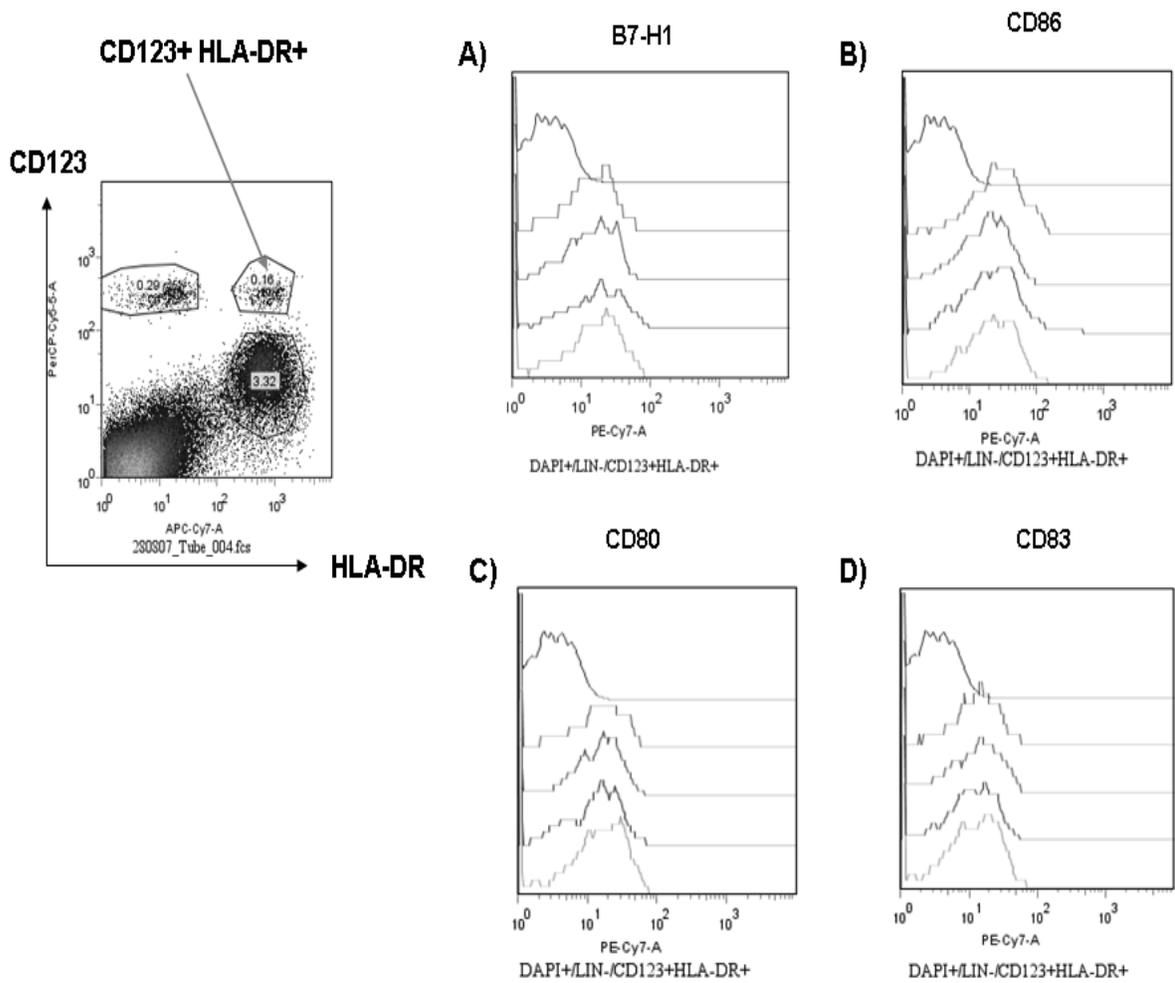
**Figura 10. Fenotipo de la población de CDc.** Análisis de la expresión de los marcadores: B7-H1 (A), CD86 (B), CD80 (C) y CD83 (D); para la población de CDc en un grupo de individuos control. Los histogramas muestran de arriba hacia abajo el control de isotipo y los resultados de 4 individuos diferentes obtenidos para cada marcador.



**Figura 11. Fenotipo de la población de CDp.** Análisis de la expresión de los marcadores: A) B7-H1, B) CD86, C) CD80 y D) CD83, para la población de CDp estudiada en un grupo de individuos control. Los histogramas muestran de arriba hacia abajo el control de isotipo y los resultados de 4 individuos diferentes obtenidos para cada marcador.

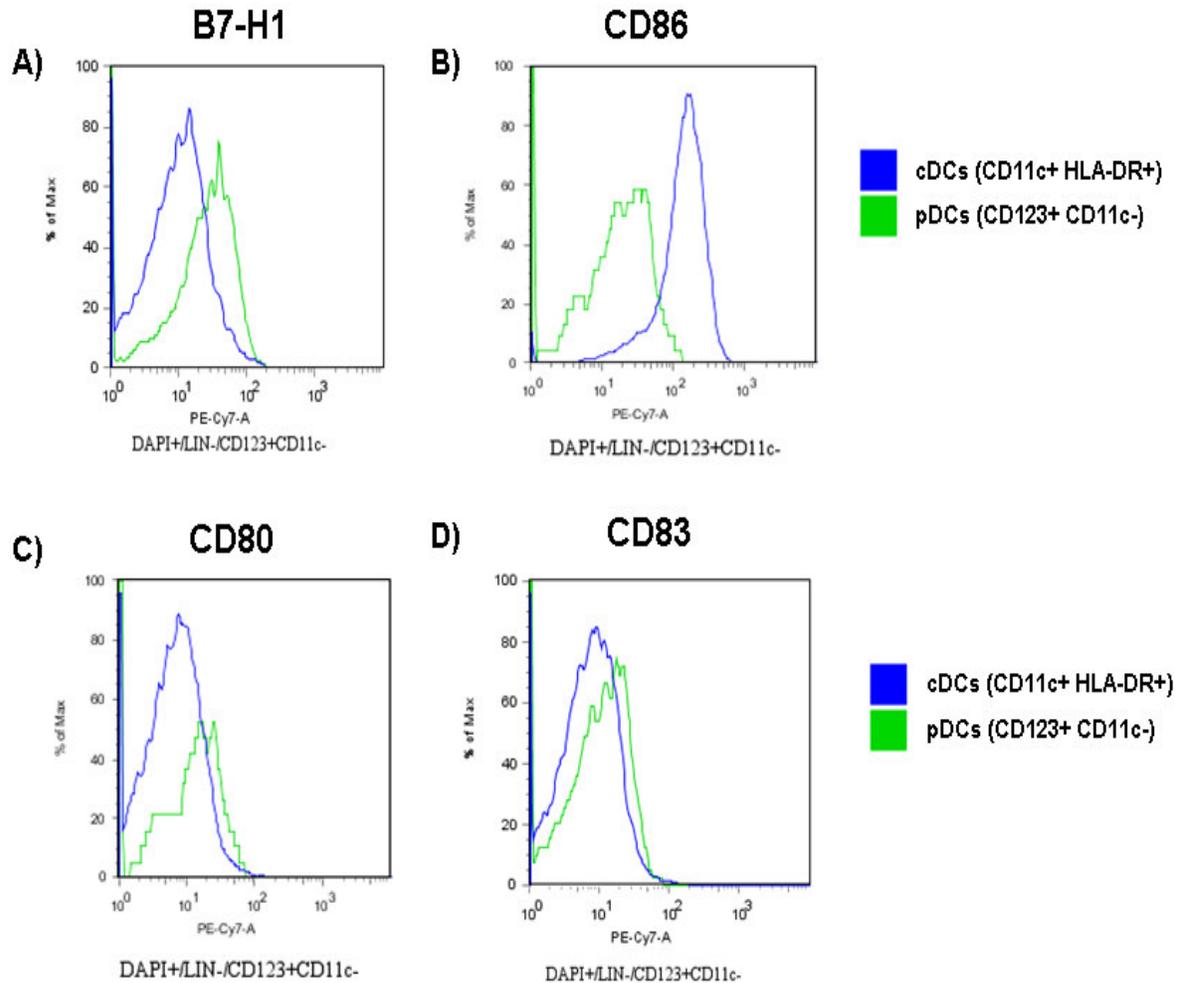


**Figura 12. Fenotipo de la población CD123+HLA-DR<sup>-</sup>.** Análisis de la expresión de los marcadores: B7-H1 (A), CD86 (B), CD80 (C) y CD83 (D), para la población de CDp (CD123+HLA-DR<sup>-</sup>) en un grupo de individuos control. Los histogramas muestran de arriba hacia abajo el control de isotipo y los resultados de 3 individuos diferentes obtenidos para cada marcador.



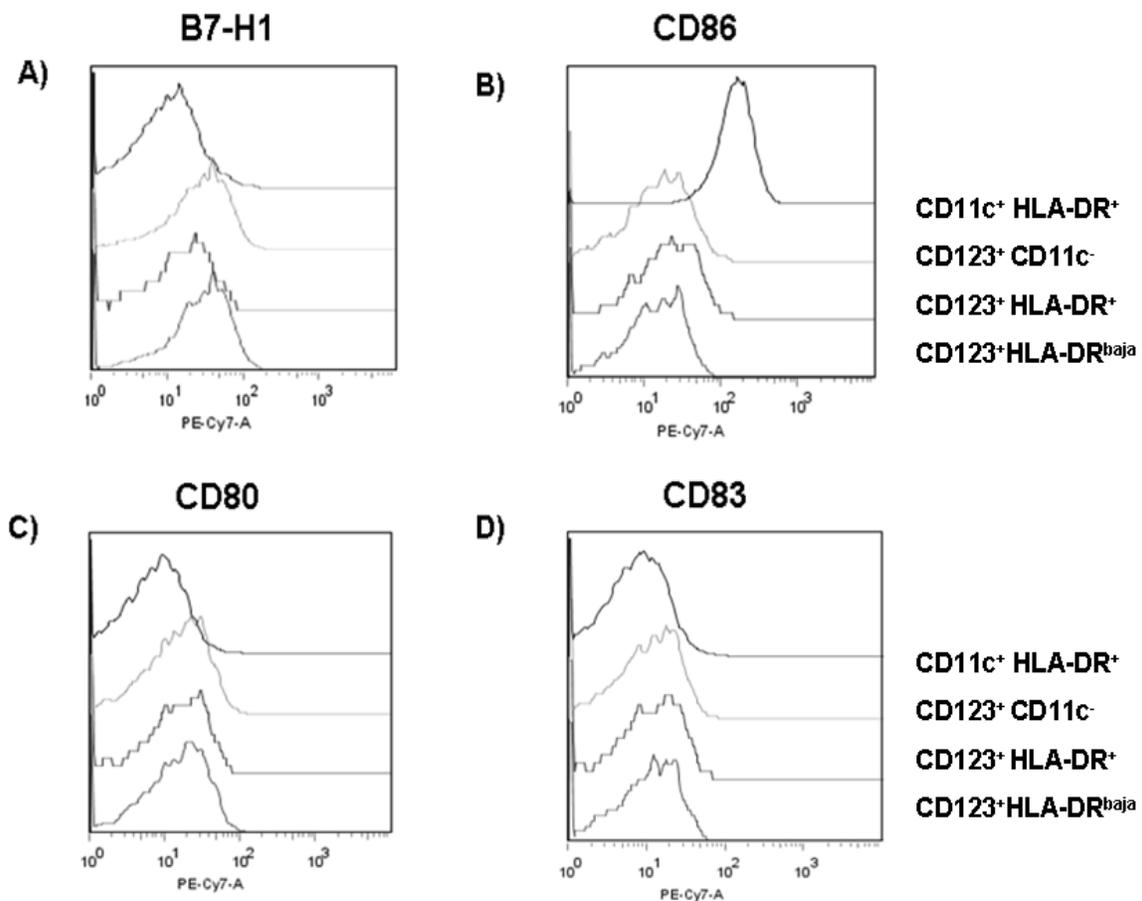
**Figura 13. Fenotipo de la población CD123+HLA-DR+.** Análisis de la expresión de los marcadores: B7-H1 (A), CD86 (B), CD80 (C) y CD83 (D), para la población de CDp (CD123+HLA-DR+) en un grupo de individuos control. Los histogramas muestran de arriba hacia abajo el control de isotipo y los resultados de 4 individuos diferentes obtenidos para cada marcador.

Posteriormente al realizar la comparación entre los fenotipos generales de las CDc y las CDp, fue posible observar una expresión basal más alta para CD86 en la población de CDc, y una expresión basal más alta para B7-H1 en la población de CDp. En cuanto a los marcadores CD80 y CD83 aunque en las dos poblaciones su expresión es baja, se observa aunque ligera, una mayor expresión en la población de CDp en comparación con las CDc (Figura 14).



**Figura 14. Comparación de Fenotipos entre las poblaciones de cDCs y pDCs.** Se observa la comparación de la expresión basal de los marcadores: B7-H1 (A), CD86 (B), CD80 (C) y CD83 (D) entre las poblaciones de CDc y CDp.

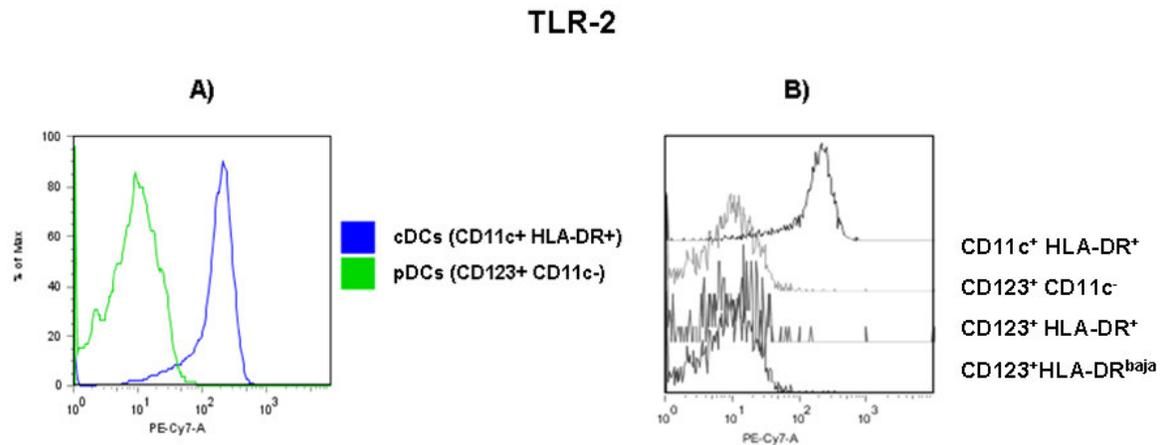
Finalmente al realizar la comparación general entre las tres poblaciones estudiadas es posible definir que el fenotipo de estas poblaciones es el siguiente: para las CDc una expresión basal baja de CD80, CD83 y B7-H1, que en general es más baja que para las CDp, así como una expresión alta de CD86. En cuanto a las CDp su fenotipo corresponde a un nivel basal bajo de CD80, CD83 y CD86 y una expresión ligeramente mayor de B7-H1, y la única diferencia apreciable en cuanto a las poblaciones CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> y CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>-</sup> BDCA-2<sup>-</sup> incluidas como CDp, es que la última parece expresar niveles ligeramente más altos de B7-H1 (Figura 15).



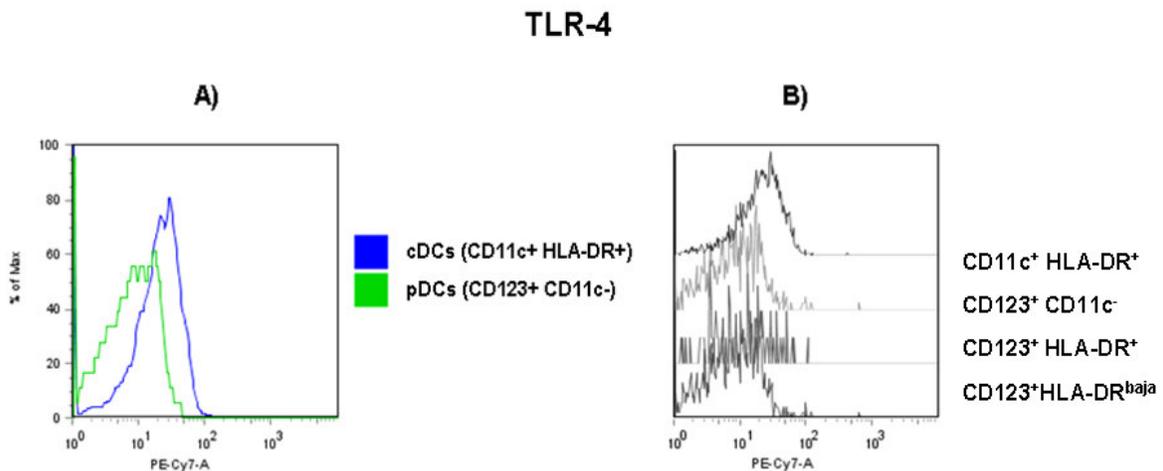
**Figura 15. Comparación de Fenotipo de las poblaciones analizadas.** Se observa la comparación de la expresión de los marcadores: B7-H1 (A), CD86 (B), CD80 (C) y CD83 (D) entre las diferentes poblaciones estudiadas.

- **Expresión de TLR-2 y TLR-4.**

Finalmente en la última parte del estudio fue posible evaluar la expresión de TLR-2 y TLR-4 en las poblaciones previamente descritas, de lo cual pudo confirmarse como se encuentra descrito en la literatura que las CDc expresan TLR-2 y TLR-4, en comparación con las CDp que son negativas para la expresión de estos TLRs. Como se puede observar en las Figuras 16 y 17, las CDc expresan niveles altos de TLR-2, y aunque también expresan TLR-4 su expresión es mucho más baja.



**Figura 16. Expresión de TLR-2.** Análisis de la expresión de TLR-2 en las diferentes poblaciones estudiadas. En A) se observa la comparación entre las CDc y CDp y en B) la comparación entre todas las poblaciones estudiadas.



**Figura 17. Expresión de TLR-4.** Análisis de la expresión de TLR-4 en las diferentes poblaciones estudiadas. En A) se observa la comparación entre las CDc y CDp y en B) la comparación entre todas las poblaciones estudiadas.

## DISCUSIÓN:

Tomando en cuenta el papel de las CD en el control de la RI su estudio es de vital importancia en distintas condiciones patológicas así aprovechando las ventajas de la citometría de flujo fue posible diseñar un estudio que permitiera identificar y cuantificar las diferentes subpoblaciones de CD a partir de sangre periférica. Como primer paso se realizó la estandarización de la técnica, lo cual resultó muy importante, ya que a partir de determinar la combinación de marcadores conjugados a distintos fluorocromos, así como las concentraciones óptimas a utilizar de cada uno de ellos, se aseguró que los resultados obtenidos fueran confiables y reproducibles; y fue hasta este punto que entonces se pudo pensar en montar un estudio comparativo de las diferentes poblaciones encontradas en un grupo de individuos control, para realizar su caracterización y cuantificación.

Es importante mencionar que se incluyó la utilización del colorante Hoechst 3342, el cual es un colorante utilizado para teñir el ADN de las células, se excita a 350 nm y por su carácter lipofílico es capaz de teñir el núcleo de células intactas, por lo cual es posible detectar a las células teñidas con este colorante mediante citometría haciendo uso del láser violeta, tomando en cuenta esto además del parámetro del tamaño de las células (FSC), como ya se mencionó anteriormente se eligió la primer región para realizar el análisis de las poblaciones de CD, es decir de este modo se aseguró que la expresión de todos los marcadores analizados corresponde a células totalmente viables. Esto es de suma importancia al analizar poblaciones celulares poco frecuentes como lo son las subpoblaciones de CD.

Las poblaciones encontradas a partir del estudio hecho fueron la descrita como CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> que corresponde a las CDc, otra descrita como CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>, la cual a su vez fue posible subdividir en dos con respecto a la expresión de HLA-DR y BDCA-2, de lo cual la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> correspondería a las CDp reportadas en la literatura, y la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> BDCA-2<sup>-</sup> que no se encuentra descrita, y que por finalidades prácticas del estudio se incluyó como parte de las CDp, aunque en realidad falta caracterizarla mejor lo cual se discutirá más adelante.

Los valores obtenidos para cada una de las poblaciones estudiadas muestran que las CDc se encuentran alrededor de un 0.5-1.8% de las células mononucleares totales; las CDp tomadas como CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup> representan alrededor de un 0.1-0.4%, a su vez la población CD123<sup>+</sup>

HLA-DR<sup>bajas</sup> BDCA-2<sup>-</sup> representan un 0.04-0.25% y la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> un 0.05-0.2%, comparados estos valores con lo que se reporta en la literatura se observó que las CDc están prácticamente dentro del intervalo normal el cual reporta alrededor del 1% de las células mononucleares totales, los valores encontrados para las CDp están ligeramente por debajo de los valores reportados (0.2-0.8%), de las otras dos poblaciones analizadas que se distinguen por su expresión de HLA-DR y BDCA-2 no hay valores reportados, pero ya que se sabe que se encuentran en menor proporción que las CDc; deben de encontrarse por debajo del 1% de las células mononucleares totales, cabe mencionar que los valores encontrados pueden tomarse como referencia para estudios posteriores en los que se analice dichas poblaciones en individuos que presenten diversas patologías en las que puedan verse alteradas.

En cuanto al fenotipo de cada una de las poblaciones encontradas, se observó básicamente que la principal diferencia entre las poblaciones de CDc y CDp analizadas fue la mayor expresión de CD86 para las CDc y de B7-H1 para las CDp, y en general que las CDc expresan niveles ligeramente más bajos de CD80 y CD83 que las CDp. Por otra parte la expresión más elevada de B7-H1, en la población de CDp parece ser debida a la subpoblación correspondiente a CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> BDCA-2<sup>-</sup>, la expresión de este marcador fue la única diferencia encontrada entre las subpoblaciones de CDp analizadas, ya que sus niveles basales de CD80, CD83 y CD86 resultaron ser muy similares.

La relación de la función de estas poblaciones con el fenotipo encontrado, es aún poco claro, por la expresión elevada de CD86 para las CDc pudiera sugerirse que estas células se encuentran listas para actuar ante cualquier estímulo microbiano o inflamatorio y de este modo proporcionar una respuesta rápida y eficiente. Por otra parte la expresión basal de B7-H1 incrementada en la población descrita como CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> BDCA-2<sup>-</sup>, podría sugerir que juega un papel más enfocado hacia la inducción de TI, y que la población CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> BDCA-2<sup>+</sup> se encuentra lista para cumplir con las funciones clásicas descritas para las CDp las cuales ante un estímulo principalmente de tipo viral pueden madurar rápidamente para dar lugar a una CDc, con una gran capacidad de estimular la proliferación de linfocitos T; además de producir grandes cantidades de interferones tipo I; por todo lo anterior hacen falta más estudios de carácter funcional para poder evaluar su capacidad de respuesta ante diferentes estímulos y de este modo poder relacionar el fenotipo encontrado con la función que desempeñan tanto en condiciones de salud como de enfermedad.

En cuanto a la expresión de los TLRs analizados (2 y 4), fue posible confirmar lo que se encuentra descrito en la literatura, ya que se observó claramente que la población de CDc expresa ambos en condiciones normales, y las CDp en cambio no expresan ninguno, lo cual a su vez está relacionado con la función que cumplen, ya que por ejemplo las CDp expresan preferentemente en condiciones normales TLR 7, 8 y 9 lo cual es lógico por su implicación en la respuesta contra virus principalmente, cabe mencionar que es importante realizar la evaluación de la expresión de estos TLRs en estudios posteriores, así como también evaluar como cambia su expresión en las poblaciones estudiadas al someterse a distintos estímulos.

Finalmente uno de los resultados que más llaman la atención es la presencia de la población descrita en todo el trabajo como CD123<sup>+</sup> HLA-DR<sup>baja</sup> BDCA-2<sup>-</sup>, la cual por su expresión de CD123 y la ausencia de la expresión de CD11c, se incluyó dentro de las CDp aunque en realidad como se menciona en los antecedentes, esta población no se encuentra reportada como parte de las CDp, ya que no expresa BDCA-2 el cual se ha descrito como un marcador exclusivo de CDp, además de su baja expresión de HLA-DR, lo cual pareciera indicar que es una población nueva, que aún no se encuentra caracterizada ya que no hay reportes acerca de ella, ni de las posibles funciones que realiza, por lo que hacen falta más estudios de carácter funcional para evaluar por ejemplo la producción de interferones tipo I, por todo lo ya descrito se esperaría que tal vez fueran CDp en proceso de maduración, o que tuvieran una función similar; del mismo modo hace falta ver cual es su morfología en el estado basal, y si después de someterlas a los estímulos adecuados son capaces de dar lugar a una CDc, además de evaluar si hay alguna variación en esta población bajo condiciones de diversas patologías, así como también analizar la expresión de los TLRs descritos para las CDp, y como se ya se ha mencionado deben realizarse más estudios que permitan relacionar su expresión basal de B7-H1 con la posible función de mantenimiento de la tolerancia periférica.

El estudio realizado de estas poblaciones en el estado normal resulta de gran ayuda para poder comparar como pueden variar al presentarse diversas patologías, ya que pueden detectarse cambios en cuanto a número y en cuanto a fenotipo se refiere, lo que pudiera dar una idea acerca de la participación de las CD en determinada enfermedad. El paso a seguir de este trabajo sería enfocarse a realizar los ensayos funcionales para determinar la capacidad de respuesta de cada una de las poblaciones a distintos estímulos; así como también incluir otros marcadores para buscar otras poblaciones que aún no se encuentran realmente bien descritas en el humano, como es el caso de las CD inflamatorias, o las NKDCs, y determinar también cual es su función y su participación en distintos estados patológicos.

## CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar la técnica de citometría de flujo de siete colores mediante la cual fue posible identificar claramente tres poblaciones de CD presentes en la sangre periférica de un grupo de individuos control.
- Se establecieron los valores de referencia de porcentajes y número de células por mililitro de sangre de cada una de las poblaciones estudiadas.
- Se determinó el fenotipo de las poblaciones estudiadas en el estado normal, en un grupo de individuos control.
- Se identificó una nueva población la cual no se encuentra descrita en la literatura, y que al parecer está relacionada con las CDp.



## REFERENCIAS:

Abbas A. Lichtman A. *Inmunología celular y molecular*. 5ª Edición, España, Elsevier, 2004.

Albina et al. (1991). Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J. Immunol.* 144-148.

Amsen D. et al. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen presenting cells. *Cell* 117, 515-526.

Asselin-Paturel C. & Trinchieri G. (2005). Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J. Exp. Med.* 202, 461-465.

Banchereau et al. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

Banchereau J. & Steinman R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bendriss-Vermare N. et al. (2001). Human thymus contains IFN- $\alpha$  producing CD11c<sup>-</sup>, myeloid CD11c<sup>+</sup>, and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 107, 834-844.

Bruno et al. (1997). Identification of a committed cell precursor population in adult human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185 (5), 875-884.

Caux et al. (1992). GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360, 258-261.

Chant C.W. et al. (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat. Med.* 12, 207-213.

Colonna M., Trinchieri G. & Liu Y.L. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5(12), 1219-1226.

Dzionek A. et al. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037-6046.

Ginhoux et al. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat. Immunol.* 7, 265-273.

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, 435-442.

Hwu P. et al. (2000). Indoleamine 2,3-Dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* 164, 3596-3599.

Karsunky H. et al. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3<sup>+</sup> lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3<sup>+</sup> Dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 198 (2), 305-313.

Kadowaki N. et al. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194 (6), 863-869.

Kohrgruber N. et al. (1999). Survival, Maturation and Function of CD11c<sup>-</sup> and CD11c<sup>+</sup> peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 163, 3250-3259.

Liu Y.L. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-262.

Lu L. et al. (1996). Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN- $\gamma$ , endotoxin, and interaction with allogenic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J. Immunol.* 157, 3577-3586.

MacDonald K.P. et al. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.

Mende et al. (2006). Flik2<sup>+</sup> myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells. *Blood* 107, 1383-1390.

McIlroy et al. (2001). Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood* 97, 3470-3477.

McKenna K., Beignon A.S. & Bhardwaj N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J. Virology* 79(1), 17-27.

Mellman I. & Steinman R.M. (2001). Dendritic cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

Mellor A. L. & Munn D.H. (2004). IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*; 4, 762-774.

Munn D. et al. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4<sup>+</sup> T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* 172, 4100-4110.

O'Doherty U. et al. (1994). Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82, 487-493.

Olweus J. et al. (1997). Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94, 12551-12556.

Probst H.C. et al. (2005). Resting dendritic cells induce Peripherals CD8<sup>+</sup> T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* 6, 280-286.

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

Reis e Sousa C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476-483.

Rissoan M.C. et al. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.

Robinson SP. et al. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J Immunol.* 29, 2769-2778.

Serbina N.V. et al. (2003). TNF/iNOS-Producing dendritic cells mediate innate immunity defense against bacterial infection. *Immunity* 19, 59-70.

Schäkel K. et al. (2002). 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* 17, 289-301.

- Shortman K. & Liu Y.L. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*; 2, 151-160.
- Shortman K. & Naik S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.
- Steinman R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.
- Strobl H. et al. (1998). Identification of CD86<sup>+</sup> lin<sup>-</sup> peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J. Immunol.* 161(2), 740-748.
- Strunk et. al (1997). A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J. Exp. Med.* 185, 1131-1136.
- Szabolcs P. et al. (1996). Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood* 87, 4520-4530.
- Taieb J. et al. (2006). A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat. Med.* 12, 214-219.
- Vandenabeele S. et al. (2001). Human thymus contains two distinct dendritic cell populations. *Blood* 97, 1733-1741.
- Welner R. et al. (2007). Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit<sup>Hi</sup> CD62-L<sup>+</sup> lymphoid progenitors. *Blood* 109, 4825-4831.
- Wertheimer A.M. et al. (2004). Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology* 40, 335-345.
- Wu L. & Liu Y.L. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26, 741-750.
- Wu L. & Dakic A. (2004). Development of dendritic cell system. *Cellular & Molecular Immunology* 1(2), 112-118.
- Yoneyama H. et al. (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int. Immunol.* 16, 915-928.
- Zhang Z. & Wang F.S. (2005). Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cellular & Molecular Immunol.* 2(6), 411-417.