



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Caracterización y evaluación de la función de
una posible subpoblación de células
dendríticas en sangre periférica

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

QFB. Luz María Mora Velandia

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo

COMITÉ TUTOR:
Dr. Enrique Ortega Soto
Dr. Rafael S. Saavedra Durán

MÉXICO, D.F.

Julio, 2010



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.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por la formación brindada y el apoyo otorgado para la realización de los estudios de posgrado.

Al CONACYT por la beca otorgada durante la realización de los estudios de maestría. No. de registro de becario 220348.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) por el apoyo económico brindado para la realización del proyecto.

A la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo por todo el apoyo, tiempo y confianza para la realización del proyecto y la formación brindada.

Al Dr. Enrique Ortega Soto por el tiempo y la asesoría brindada para el enriquecimiento del proyecto.

Al Dr. Rafael Saavedra Durán por el tiempo dedicado al proyecto.

Al jurado revisor por las correcciones y sugerencias hechas para mejorar este trabajo.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano por la asistencia técnica en el uso del citómetro FACS Aria del Centro de Instrumentos del Hospital de Especialidades, CMN SXXI.

Al Banco de Sangre del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" por las facilidades otorgadas para la obtención de muestras de concentrados leucocitarios.

A los integrantes de la UIMEA por todo el apoyo y compañerismo durante la realización del presente trabajo.

DEDICATORIA:

En primer lugar le dedicó este trabajo a mi familia, que ha sido fundamental durante todos estos años de estudio; en especial a mis papás por todo el apoyo y amor que me han dado ya que gracias a ellos he logrado alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padrinos Guille y Kitty, y a mis primos Angie y Memo por estar siempre que lo he necesitado y por todo su cariño.

A mi sobrino Manuel, por ser una personita muy especial dentro de mi vida, por todo el cariño y alegría que has traído a nuestras vidas, te adoro.

A todos mis amigos de la facultad y mis hermanitas de cadena que siempre me han apoyado, brindándome en todo momento cariño y amistad.

A Iliana, Rosita, Ely, Gaby, Paty, Gibrán, David, Abraham, Gustavo y Lorenzo por todo el apoyo, consejos y amistad, que hicieron que la realización de este trabajo fuera más sencilla y sobre todo más divertida.

A la Dra. Laura Bonifaz, por ser además de mi jefa, una gran persona con la que siempre se puede contar. Gracias por todo el apoyo y cariño durante todo este tiempo.

INDICE:**Página**

Abreviaturas.....	1
Lista de figuras y Tablas.....	2
Resumen.....	3
Abstract	5
1. Introducción.....	7
2. Generalidades.....	7
3. Subpoblaciones de Células Dendríticas en sangre periférica.....	8
3.1 Células Dendríticas Convencionales (cDCs).....	10
3.2 Células Dendríticas Plasmacitoides (pDCs).....	11
3.3 DCs y PRR´s.....	11
3.4 DCs y Citocinas.....	12
4. Origen de las Células Dendríticas.....	14
4.1 Identificación de progenitores de DCs en médula ósea.....	15
4.2 Precursor migratorio de DCs.....	16
5. Caracterización de nuevas subpoblaciones.....	17
5.1 Criterios clásicos para la identificación de DCs.....	18
5.2 Criterios “nuevos” (complementarios) para la identificación de DCs.....	18
6. Estímulos de maduración y virus de influenza.....	19
6.1 Virus de influenza como estímulo de maduración.....	20
7. Antecedentes directos del trabajo.....	21
8. Planteamiento del problema.....	22
9. Hipótesis.....	22
10. Objetivos Generales.....	23

11. Objetivos Particulares.....	23
12. Materiales y Métodos.....	24
- Muestras de Sangre Periférica.....	24
- Obtención de Células Mononucleares (PBMC´s).....	24
- Conteo de Células Mononucleares.....	24
- Enriquecimiento de Células Dendríticas.....	24
- Tinción de inmunofluorescencia.....	25
- Separación de las poblaciones celulares por citometría de flujo (cell sorting).....	26
- Cultivo celular.....	26
- Detección de citocinas.....	26
- Análisis de la expresión de marcadores.....	27
13. Resultados.....	28
14. Discusión de resultados.....	50
15. Conclusiones.....	58
16. Referencias.....	59

Abreviaturas:

BCR	Receptor de células B.
BDCA	Antígeno de células dendríticas de sangre periférica.
cDC	Célula dendrítica clásica o convencional (classic/conventional Dendritic Cell).
CDP	Progenitor Común de Células Dendríticas.
CLA	Antígeno linfocitario cutáneo.
CLP	Precursor linfoide común.
CMP	Precursor mieloide común.
CPA	Célula presentadora de antígeno.
DC	Célula dendrítica (Dendritic cell).
FL	Ligando de Flt3
Flt3	Receptor clase III de tirosina-cinasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
IKDC	Célula dendrítica-natural killer productora de interferón.
IL	Interleucina.
iNOs	Sintasa inducible de óxido nítrico.
IFN	Interferón.
LPS	Lipopolisacárido.
MACS	Aislamiento de células asociado a magnetos.
MCS-F	Factor estimulante de colonias de Macrófagos.
MDP	Progenitor de Macrófagos y Células Dendríticas.
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad.
NK	Natural Killer .
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PASI	Índice de Área y Severidad de Psoriasis.
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide (plasmacytoid Dendritic Cell).
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PMA	Forbol-acetato-miristato.
RI	Respuesta Inmune.
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta.
TI	Tolerancia Inmunológica.
TCR	Receptor de células T.
TLR	Receptor tipo Toll.
TNF	Factor de Necrosis Tumoral.

Lista de figuras y tablas:

	Página
Figura 1. Producción diferencial de citocinas en las subpoblaciones de DCs.	8
Figura 2. Subpoblaciones de DC´s en el humano.....	14
Figura 3. Desarrollo hematopoyético de las células dendríticas.....	17
Figura 4. Porcentajes de poblaciones en pacientes con Psoriasis.....	21
Figura 5. Identificación de las poblaciones celulares en estudio.....	29
Figura 6. Fenotipo comparativo cDCs, pDCs y nDCs.....	29
Figura 7. Expresión de marcadores de activación (basal).....	30
Figura 8. Cambios morfológicos en cultivos de cDCs 18h	32
Figura 9. Cambios morfológicos en cultivos de pDCs 18h.....	32
Figura 10. Cambios morfológicos en cultivos de 18h.....	33
Figura 11. Expresión de TLR-2 y 4.....	35
Figura 12. Expresión de TLR-3 y 9.....	36
Figura 13. Expresión de TLR-8.....	36
Figura 14. Expresión de CD11b y CD11c 18h.....	37
Figura 15. Marcadores de activación 18 h.....	39
Figura 16. Producción de citocinas pro-inflamatorias 18 h.....	41
Figura 17. Las nDCs producen IFN- α en respuesta al virus de influenza.....	42
Figura 18. Expresión de c-kit y FL.....	43
Figura 19. Cambios morfológicos en cultivos de cDCs 6d.....	44
Figura 20. Cambios morfológicos en cultivos de nDCs 6d.....	45
Figura 21. Expresión de CD11b y CD11c 6d.....	46
Figura 22. Marcadores de activación 6d.....	47
Figura 23. Producción de citocinas pro-inflamatorias 6 d.....	49
Figura 24. Producción de IFN- α 6d.....	50
Tabla 1. Criterios para la identificación de nuevas subpoblaciones de DC´s.....	19
Tabla 2. Fenotipo Basal cDCs, pDCs y nDCs.....	30

RESUMEN:

Las distintas subpoblaciones de Células Dendríticas (DCs) en sangre periférica humana se identifican a partir de células mononucleares, excluyendo a las células linaje positivas (CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD56⁺) y utilizando marcadores tales como: CD11c, HLA-DR, CD123 y los BDCA's (Blood Dendritic Cell Antigens). En este trabajo se identificó una población linaje negativa (lin-), CD123⁺, MHC-II^{baja} (HLA-DR) presente en sangre periférica, la cual denominamos como "nDCs" que puede ser activada por el virus de influenza y que después de ser aislada y cultivada en presencia de IL-3 es capaz de expresar algunos marcadores típicos de DC.

Inicialmente se analizó mediante citometría de flujo la expresión de un panel de marcadores de superficie, incluyendo distintos marcadores de DCs, con el objetivo de determinar el fenotipo de la población en estudio. En estado basal la población de nDCs presenta una elevada expresión de CD11b, CD62L y del antígeno linfocitario cutáneo (CLA), pero baja expresión de MHCII, CD40 y de moléculas co-estimuladoras tales como CD86 y alta expresión de B7-H1 comparado con lo observado en células dendríticas convencionales (cDCs) y plasmacitoides (pDCs).

Posteriormente se evaluó si la población de interés podía ser activada; para lo cual se aislaron por citometría de flujo las distintas poblaciones (cDCs, pDCs y nDCs) y se cultivaron por 18 horas en presencia de diferentes ligandos de receptores tipo toll (TLR's) (p.ej. LPS, CpG, Poli I:C) o en presencia de IL-3 (la cual se identificó como un factor para la sobrevivencia de la población de nDCs), y adicionalmente IL-3 en combinación con el virus de influenza (A/H3N2 2008) inactivado. A este tiempo de cultivo se observaron cambios morfológicos en las nDCs, pero solo al ser cultivada con IL-3 y el virus; también fue posible detectar la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-8 e IL-6) y de IFN- α como señal de activación. Adicionalmente se observó un ligero incremento en la expresión de MHC-II, CD40 y CD86. La expresión de TLR-2,3 y 4 en las nDCs fue muy semejante a lo observado en la población de cDCs. La expresión de TLR-9 resultó ser menor a la de las pDCs; pero interesantemente la población nDC presentó una mayor expresión de TLR-8 comparada con cDCs y pDCs, lo cual podría explicar la activación observada con el virus de influenza.

Posteriormente con la finalidad de establecer una relación entre células progenitoras, precursoras y las nDCs se analizó la expresión de c-kit y flt3. Los resultados mostraron que la población de interés presenta niveles de expresión semejantes a los obtenidos para la población de cDCs.

Para evaluar el papel de la IL-3 como un factor de diferenciación para las nDCs, se cultivó esta población por un periodo de 5 días en presencia de esta citocina o un cóctel de citocinas (GM-CSF, FL, IL-3), y en las últimas 18 horas de cultivo se añadió el virus de influenza. Bajo estas condiciones de cultivo fue posible observar cambios morfológicos y fenotípicos, tales como la formación de agregados celulares y el incremento en la expresión de MHC-II CD40, CD86 y CD11c. También fue posible detectar la producción de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 e IFN- α aunque en niveles semejantes a lo observado en cultivos de 18 horas en presencia de IL-3 y del virus de influenza inactivado.

En conclusión los resultados indican que la población identificada en sangre periférica definida como CD123⁺ HLA-DR^{baja} (nDCs) expresa TLR-8 y puede ser activada por el virus de influenza indicando su papel potencial en el control de infecciones virales a través de este receptor. Fenotípicamente muestra marcadores compartidos con ambas poblaciones de CD (cDCs y pDCs); también comparte funciones con ambas poblaciones de DCs ya que es capaz de expresar tanto IFN tipo I como citocinas pro-inflamatorias. Finalmente la población en estudio, aunque fue identificada en sangre periférica parece tener el potencial (expresión de CD62L y CLA) para migrar a diferentes órganos periféricos tales como los nódulos linfáticos y la piel.

ABSTRACT:

Dendritic cells (DCs) subsets have been identified in human blood excluding lineage positive cells (CD3⁺,CD14⁺,CD19⁺,CD56⁺) and using markers such as CD11c, HLA-DR, CD123 and BDCA's (Blood Dendritic Cell Antigens). In this study we identified a lineage negative, CD123⁺ MHC-II^{low} (HLA-DR) population, which was denominated as "nDCs". Which after isolation and culture in presence of IL-3 is capable of express some typical markers of DCs.

Initially, we analyzed by flow cytometry the expression of several surface markers, including distinct DCs markers to determine the phenotype of the identified population. In the steady state, nDCs population expresses high levels of CD11b, the cutaneous lymphocyte antigen (CLA) and CD62L but low levels of MHC-II molecules, CD40 and co-stimulatory molecules such as CD86 and high expression of B7-H1 compared with conventional (cDCs) and plasmacytoid dendritic cells (pDCs).

Next, we evaluated if the studied population could be activated. For that we sorted by flow cytometry the distinct populations (cDCs,pDCs and nDCs) and cultured them by 18 hrs. in the presence of different ligands for Toll like receptors (TLR) (e.g. LPS, CpG, Poly I:C) or in presence of IL-3, (which was identified as an important growth factor for the survival of the nDC population), and additionally IL-3 in combination with inactivated influenza virus (A/H3N2 2008).

At this time of culture morphological changes were observed in the nDC population but only in presence of IL-3 and influenza virus; the production of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-1 β , IL-8 e IL-6) and IFN- α were detected as sign of activation. Additionally a slight increment in the expression of MHC-II, CD40 and CD86 was observed. At the steady state the studied population expresses similar levels of TLR-2, 3 and 4 compared with cDCs and lower levels of TLR-9 compared with pDCs; but interestingly the nDC population expresses higher levels of TLR-8 compared with both cDCs and pDCs, which could explain the activation observed with influenza virus.

To establish a possible relationship between progenitors and precursors cells with the nDCs; the expression of c-kit and flt-3 was also evaluated. The results showed that the studied population has a similar expression of this markers compared with cDCs.

Thus to analyze the possible implication of IL-3 as a key factor for the differentiation of the nDCs, we decided to culture the population for a period of 5 days in the presence of IL-3 or a cocktail of cytokines (e.g. GM-CSF, FL and IL-3); and in the last 18 hrs influenza virus was added. Under this culture conditions both morphological and phenotypic changes were observed: cluster formations and increasing levels of CD40, CD86, HLA-DR and CD11c. Also IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8 and IFN- α quantities were detected in supernatants and were similar to the quantities detected at 18 hrs of culture in the presence of IL-3 and inactivated influenza virus.

In conclusion, the results have shown that the population found in peripheral human blood identified as lin- CD123⁺ HLA-DR^{low} (nDCs) expresses TLR-8 and can be activated by influenza virus indicating a possible participation in the control of viral infections mediated by this receptor. Phenotypically the nDC population shares the expression of typical markers of both DC's populations (cDCs and pDCs), and also shares functions with both because it's capable to produce pro-inflammatory cytokines and type I interferons. Finally the nDC population although it was identified in peripheral blood seems to have the potential (CD62L and CLA expression) to migrate to different peripheral organs such as lymph nodes and skin.

1. INTRODUCCION:

En diversos trabajos se considera a las células dendríticas (DCs) como un complejo “sistema inmunológico” [1, 2] ya que se compone de diversas subpoblaciones ampliamente distribuidas en diferentes microambientes dentro del organismo. Las DCs han sido descritas como las principales “orquestadoras” de la respuesta inmune (RI) ya que pueden inducir tanto mecanismos protectores contra diversos agentes patógenos; así como también promover la inducción de tolerancia inmunológica (TI). [1, 3]

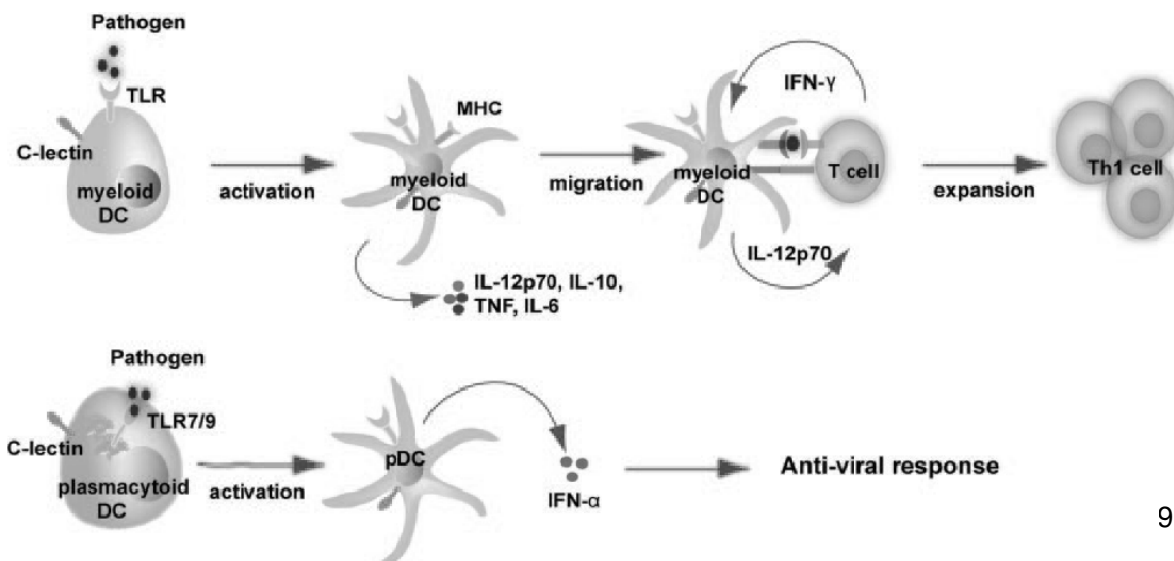
Por otra parte otros estudios han demostrado que la plasticidad que muestran estas células, así como la existencia de diferentes subpoblaciones, son factores que determinan la calidad de la RI efectora. Así, se ha descrito que las diferentes subpoblaciones de DCs expresan diferentes tipos de receptores y moléculas de superficie; así como también diferentes citocinas y quimiocinas [4] por lo cual son capaces de modular distintos aspectos de la RI.

En los últimos años muchos estudios se han enfocado a explicar la razón de la existencia de distintas poblaciones de DCs. Los hallazgos acerca de los diferentes tipos de subpoblaciones de DCs y su especialización funcional proveen nuevos enfoques acerca de su uso en estrategias terapéuticas en diversas enfermedades tales como el cáncer o trastornos autoinmunes; así como también en el desarrollo de vacunas.[5-7]

2. GENERALIDADES.

En estado basal las DCs residen tanto en tejidos periféricos como en órganos linfoides; es posible también encontrar diferentes subpoblaciones de DCs en sangre periférica. Se ha descrito que para que una célula dendrítica sea capaz de iniciar una respuesta inmune es necesario un cambio en su estado de activación; entendido como un proceso de maduración o “metamorfosis” el cual consiste en pasar de una célula que capta antígenos a una célula presentadora de antígenos (CPA)[8, 9]. Este proceso involucra varios factores: 1) cambios en la morfología que incluyen la pérdida de estructuras de adhesión, reorganización del citoesqueleto y la adquisición de mayor motilidad celular [10]; 2) disminución de la expresión de receptores endocíticos/fagocíticos; 3) secreción de diferentes citocinas/quimiocinas para activar y reclutar distintas estirpes celulares [11-13]; 4) aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 así como de CD40; 5) Translocación de compartimentos de

moléculas de MHC clase II hacia la superficie celular [14, 15] y 6) Secreción de citocinas capaces de diferenciar y polarizar células efectoras como es el caso de linfocitos T [16]. Las células dendríticas pueden ser activadas por diversos agentes derivados de microorganismos, células apoptóticas y otras células del sistema inmune innato y adaptativo.



9

Figura 1. Producción diferencial de citocinas en las subpoblaciones de DCs. La expresión de distintas clases de PRR's en las poblaciones de cDCs y pDCs tiene como consecuencia una producción diferencial de citocinas así como la activación de distintas poblaciones celulares. En esta figura es posible observar que las cDCs producen preferentemente citocinas como IL-6, IL-10, IL-12 y TNF en respuesta a distintos estímulos microbianos. Las pDCs por otra parte producen de manera importante grandes cantidades de $IFN-\alpha$ en respuesta a estímulos virales.

3. Subpoblaciones de células dendríticas en sangre periférica.

En contraste con los numerosos estudios que identifican a distintas subpoblaciones de DCs 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 subpoblaciones de DC en sangre periférica (SP)[17]. Aunque también hay diversos estudios en los que se ha caracterizado las poblaciones de DCs en piel como lo son las células de Langerhans y las DC's intersticiales o dermales, en la **figura 2** se muestran algunas diferencias en la expresión de diversos marcadores utilizados para diferenciar las distintas subpoblaciones y que se han relacionado con la función de cada una de ellas, como es el caso de los TLR's, lo cual se discutirá más adelante.

Los métodos para la detección y aislamiento de DCs a partir de sangre periférica se basan en un amplio panel de marcadores que definen su inmunofenotipo; la primera característica a tomar en cuenta para su identificación 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 CD11c, CD123 (IL-3 α R) y MHC-II (HLA-DR) principalmente. Se ha visto en estudios realizados a partir de DC aisladas de sangre periférica, que éstas representan una población heterogénea, y que al menos se encuentra una mezcla de dos poblaciones (O'Doherty et al., 1994): la primera población caracterizada corresponde a las cDCs (HLA-DR⁺ CD123^{int}CD11c⁺), a las cuales se les ha denominado también como DC1, y se ha descrito que pueden rápidamente dar lugar a una DC madura, aún al ser cultivadas sin la presencia de ninguna citocina o estímulo, comúnmente se consideraba a esta población como de origen mieloide sin embargo, hay trabajos en los que se describe que pueden ser originadas también a partir de precursores linfoides [18]. La segunda población corresponde a las pDCs (HLA-DR⁺CD123⁺CD11c⁻), denominada también como DC2, y dependen de la presencia de la IL-3 para su supervivencia y posterior diferenciación a DCs maduras, con morfología típica y alta capacidad para estimular linfocitos T, éstas son consideradas de origen linfocitario principalmente, y se encuentran escasamente en tejidos periféricos [19, 20].

Adicionalmente hay trabajos en los que se ha descrito una tercera población presente en sangre periférica y que está contenida dentro de las cDC, dicha población ha sido identificada con la ayuda del anticuerpo M-DC8 [21]. Las células M-DC8⁺ carecen del Antígeno linfocitario cutáneo (CLA); el cual es una modificación estructural del 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 (Fc γ RIII), 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⁺ después de estimularlas con LPS son capaces de producir TNF en grandes cantidades, incluso pueden producir más que los monocitos u otras poblaciones de cDCs bajo las mismas condiciones [21], por lo que esta población ha sido relacionada con estados de inflamación.

Cabe mencionar también que ante la falta de marcadores específicos para las distintas poblaciones de DCs en sangre periférica y como un esfuerzo más para caracterizarlas se ha desarrollado un panel de anticuerpos monoclonales diseñados para reconocer a los denominados BDCA (Blood Dendritic Cell Antigens), entre los cuales se encuentran: BDCA-1,

BDCA-2, BDCA-3 y BDCA-4. Se ha descrito que la población de pDCs (CD11c⁻ CD123⁺) presente en sangre bajo condiciones normales expresa BDCA-2 y BDCA-4; por otra parte BDCA-3 es expresado por una población descrita como CD11c⁺ CD123⁻, además de que una tercera población descrita como BDCA-1 (CD1c)⁺ CD11c^{hi} CD123^{int}, que se caracteriza por la ausencia en la expresión de los otros tres BDCAs. Por otra parte se ha observado que la expresión de los BDCA's cambia rápidamente después del proceso de maduración de las DCs, después del cual aumenta la expresión de BDCA-3 tanto en la población de pDCs, como en la descrita como CD1c⁺ CD11c^{hi} CD123^{int}, en esta última población también se ha visto un aumento en la expresión de BDCA-4 [22]. En otros trabajos se ha relacionado la falta de expresión de BDCA-1 (CD1c) con una subpoblación de cDCs presentes en piel de pacientes con psoriasis y que pueden producir grandes cantidades de TNF- α y de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) por lo que se les ha denominado también como DCs inflamatorias [23].

Sin embargo a pesar de todos los esfuerzos hechos por caracterizar distintas subpoblaciones de DCs en sangre periférica, hasta el momento las mejor descritas son las cDCs y pDCs, que a su vez pueden agrupar a diferentes subpoblaciones de las que se hablará a continuación.

3.1 Células Dendríticas Convencionales (cDCs):

Las cDCs son la población de DCs más abundante en periferia constituyendo entre el 1-2 % de células mononucleares; es necesario mencionar que a pesar de los múltiples trabajos en los que se habla de cDCs y sus funciones en los distintos tejidos, el papel fisiológico de las cDCs identificadas en sangre periférica como LIN⁻ HLA-DR⁺ CD123^{int} CD11c⁺, no se encuentra muy claro todavía, se ha planteado que podrían ser reservorio de células precursoras, que en caso de ser necesario pudieran migrar a tejidos para repoblarlos; otra función de las cDCs sería como sensor de patógenos presentes en sangre e iniciadoras de RI; así como también podrían estar jugando un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica ya que en términos generales se considera que las cDCs de periferia presentan un estado inmaduro, el cual se ha relacionado con la inducción de TI.

Es importante mencionar también que a pesar de haberse descrito a las cDCs como una subpoblación de DCs hay trabajos en donde se describen subpoblaciones de cDCs mismas que se diferencian por la expresión de marcadores como CD1a, CD16 (MDC-8⁺) o CD34 [24, 25] y de las cuales se cree pudieran tener diferentes funciones, como es el caso de las DCs inflamatorias.

3.2 Células Dendríticas Plasmacitoides (pDCs).

Las pDCs 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 [26], actualmente se sabe que son DCs que en su estado normal presentan una morfología similar a una célula plasmática, 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 pDCs a cDCs bajo diferentes estímulos sobre todo del tipo viral.

Recientemente en humanos ha sido posible describir que existen 2 subpoblaciones de pDCs que se diferencian por la expresión del marcador CD2. Ambas poblaciones CD2⁺ y CD2⁻ son capaces de secretar interferones tipo I en respuesta a estímulos virales; sin embargo las pDCs CD2⁺ las cuales representan entre el 20-30% del total presente en sangre periférica pueden inducir apoptosis dependiente de TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand), se ha observado también que esta subpoblación en comparación con las CD2⁻ induce mayor proliferación de linfocitos T CD4⁺ alogénicos [27].

Recientemente también se ha descrito una población en ratón denominada como NKDC's o IKDC's (Interferon-producing Kill Dendritic Cell), estas células tienen un patrón de expresión de marcadores de células NKs y DCs; presentan en el ratón el fenotipo CD11c⁺ NK1.1⁺ B220⁺ [28, 29]. Después de ser activadas mediante diferentes estímulos las IKDCs pueden producir grandes cantidades de IFN- γ y lisar directamente blancos típicos de las NKs, además de presentar cierta actividad como células presentadoras de antígeno (CPA). Hasta la fecha se desconoce si la población de pDCs descrita en humano como CD2⁺ puede ser el equivalente a estas células identificadas en modelo murino.

3.3 DC's y PRR's

Como se mencionó las DCs expresan receptores que permiten el reconocimiento de microorganismos para su posterior activación y maduración con la finalidad de iniciar una RI protectora, se han descrito distintas clases de receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) para patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) [30]; entre los que se encuentran los RLR's (RIG-1 like receptors) [31], NLR's (Nod-like receptors), CLR's (C-type lectin receptors) [32, 33] y los más estudiados TLR's (Toll like receptors) [30, 34, 35].

Hasta el momento se han descrito 10 TLR's en humano y 13 en el ratón [34, 35], estos receptores pueden dividirse en subfamilias dependiendo del tipo de ligandos que pueden reconocer y de su localización dentro de la célula. De esta manera el TLR-1, 2, 4 y 6 reconocen lípidos; TLR-3, 7, 8 y 9 reconocen ácidos nucleicos. TLR-1, 2, 4, 5 y 6 se encuentran en la superficie celular, mientras que el TLR-7, 8 y 9 se encuentran en compartimentos intracelulares como endosomas-lisosomas tardíos; dicha localización se ha propuesto como un mecanismo mediante el cual las DCs evitan una activación espontánea mediada por ácidos nucleicos propios [36, 37]. Es importante mencionar también que otro mecanismo de regulación propuesto es la expresión diferencial de estos receptores en las distintas subpoblaciones de DC's. Hasta la fecha se ha descrito que las cDCs de sangre periférica expresan TLR-1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10 [38, 39]; y que las pDCs a diferencia de las cDCs, expresan solamente los TLR's 7, 8 y 9, [38, 39] para el reconocimiento de RNA de cadena sencilla derivado de virus y oligonucleótidos (ODN) CpG respectivamente, se ha demostrado que después de la activación con ligandos de estos TLR's, las pDCs son capaces de secretar IFN- α , además de citocinas proinflamatorias como la IL-8 y TNF- α . Por otra parte se cree que la expresión de estos TLR's, puede estar modulada por la producción de IFN- α/β , TNF- α , y la exposición a virus (Mc Kenna et al. 2005).

3.4 DC's y citocinas.





Las citocinas son mediadores fundamentales de la respuesta inmune innata y adaptativa, el puente entre estas dos son las DCs por su capacidad de presentación de antígeno y expresión de diversas citocinas. En cuanto a la producción de citocinas por las DCs, se ha descrito en el humano, al menos para las dos subpoblaciones caracterizadas (cDCs o pDCs) que se presentan diferentes patrones de expresión, y adicionalmente se ha asociado la sobre producción de determinadas citocinas con diversos fenómenos de autoinmunidad [9, 40].

En el caso de las cDCs se ha descrito que después de la activación (maduración) son capaces de secretar una amplia gama de citocinas y quimiocinas con el fin de reclutar otras células efectoras de la inmunidad innata como es el caso de la producción de CXCL1, CXCL2, y CXCL3 para células NK's o CXCL8 para neutrófilos, pero también con la finalidad de activar células de la inmunidad adaptativa como sucede con los linfocitos T; en cuyo caso se ha observado que son capaces de secretar IL-12 para promover la diferenciación de linfocitos T

hacia Th1 [16, 41], así como también otras citocinas parte de la familia de IL-12 como la IL-23 e IL-27 [42, 43] las cuales se han relacionado junto con la IL-17 con la inducción de respuestas tipo Th17 [44]. Las cDCs son capaces también de producir citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 y principalmente TNF- α , en respuesta a una amplia gama de estímulos.

Por otra parte aunque se sabe que prácticamente cualquier célula del sistema inmune es capaz de producir IFN- α/β en respuesta a la presencia de virus, como se mencionó anteriormente se ha descrito que las pDCs son las productoras profesionales de IFN tipo I [45, 46], por la rapidez en que lo hacen y por las grandes cantidades que llegan a producir en comparación con otras células, las pDCs son capaces de producir IFN- α/β no solo en respuesta a virus, sino también a algunos parásitos y bacterias, cabe mencionar que las pDCs 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- α/β es importante para la modulación de varios aspectos de la respuesta inmune incluyendo: la supervivencia de las pDCs, diferenciación de los precursores de cDCs, 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.

Como se mencionó, la sobreproducción de determinadas citocinas y su relación con las DCs se ha considerado como huella característica de diversas enfermedades autoinmunes. En artritis reumatoide y psoriasis se ha relacionado un incremento en la producción de TNF- α con la patogénesis de la enfermedad [47, 48]. Por otra parte también se ha propuesto que los interferones tipo I juegan un rol fundamental en enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y en etapas tempranas de la psoriasis. De hecho, fue el LES, la primera enfermedad autoinmune en la que se reportó una alteración en el sistema de producción de IFN tipo I, estudios recientes han identificado una “marca” de IFN característica en la mayoría de los pacientes con LES activo [49, 50]. También se ha descrito que los antagonistas de TNF- α favorecen la secreción de interferones tipo I, lo que sugiere un rol antagónico para estas citocinas; lo cual resulta de suma importancia para el diseño de tratamientos para estos pacientes.

	Epidermal Langerhans cells	Dermal Interstitial DCs	Blood Myeloid DCs	Blood Plasmacytoid DCs
				
C-type lectin	Langerin	DC-SIGN Mannose Receptor	(DC-SIGN) (Mannose Receptor)	BDCA-2
Specific molecules	CD11c CD1a E-cadherin	CD11c CD1a/CD14 CD11b CD36 Factor XIIIa	CD11c	CD123 ILT7
TLRs	1, 2, 3, 6, (7), (10)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	1, 2, 3, 4, 5, 6, (7), 8, 10	1, 6, 7, 9, 10

Ueno H. et al. 2007

Figura 2. Subpoblaciones de DC's en el humano. En esta figura se muestran las diferentes subpoblaciones de DC's mejor caracterizadas hasta el momento en el humano entre las que se incluyen: las células de Langerhans (LC), las DC's intersticiales (éstas dos últimas presentes en piel) y las cDCs (DCs mieloides) y pDCs presentes en sangre periférica. A manera de resumen se destaca la expresión diferencial de algunos marcadores entre las distintas subpoblaciones. [9]

4. Origen de las Células Dendríticas.

El origen de las DCs al igual que el de las demás poblaciones celulares sanguíneas, son las células troncales hematopoyéticas (HSC), que son capaces de producir poblaciones de precursores mieloides comunes (CMP) y linfoides (CLP), los cuales tienen el potencial de dar origen a distintas líneas celulares incluyendo a las DC's.

Las DC's presentes en los diferentes compartimentos del organismo necesitan renovarse constantemente a partir de células progenitoras. Hace algunos años se describió al GM-CSF como la primera citocina determinante en la diferenciación *in vitro* de DCs [51, 52], se observó que al añadir esta citocina a cultivos de monocitos o células derivadas de médula ósea se incrementaba la diferenciación de DCs, sin embargo estas células mostraban morfología y funciones diferentes a las cDCs aisladas *ex vivo*, las células diferenciadas con GM-CSF son más grandes y contienen una mayor cantidad de gránulos que las cDCs así como también son capaces de producir cantidades más elevadas de TNF- α y óxido nítrico en respuesta a estímulos, por lo que se les ha correlacionado con las denominadas DCs inflamatorias las cuales se sabe pueden derivarse a partir de precursores de monocitos. De manera similar a lo

observado con GM-CSF, la adición de Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligand) a cultivos de médula ósea ha dado como resultado la generación de DCs [53]; aunque en contraste con lo observado con GM-CSF, en los cultivos con Flt3L pudo detectarse la generación tanto de cDCs como pDCs a partir exclusivamente de progenitores de médula ósea y no así a partir de monocitos, las DCs generadas por esta vía asemejan a las aisladas ex vivo en estado basal [54, 55].

Por otro lado estudios hechos ratones con una delección para el gen de Flt3L (FL) o Flt3 (CD135, Flk2) demostraron tener una importante reducción en los números de cDCs, pDCs y células dermales intersticiales [56, 57]. Adicionalmente se ha observado una expansión de cDCs, pDCs y células mieloides pero no de linfocitos T o B tras la administración de FL en ratones [58, 59].

Es necesario mencionar también que en los últimos años además de los estudios hechos con GM-CSF y FL, hay trabajos en los que se describe al M-CSF como una citocina clave en el desarrollo de DC's. El primer indicio de que esta citocina y su receptor (M-CSFR) (CD115) contribuyen al desarrollo de las DC's se determinó gracias a la observación de la disminución de LC en ratones deficientes del receptor de esta citocinas [60]. Otra evidencia de la importancia de esta citocina se observó por la presencia de pDCs y cDCs después de cultivar progenitores de médula ósea en ausencia de Flt3L, pero en presencia de M-CSF [61].

4.1 Identificación de progenitores de DCs en médula ósea.

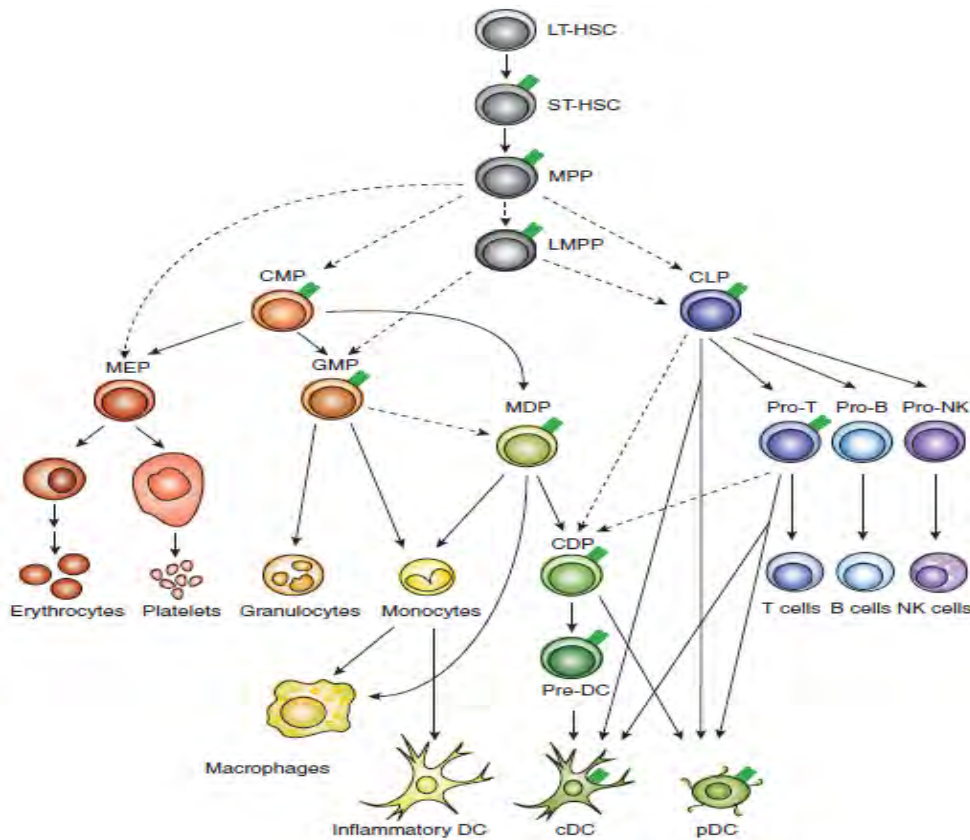
En diversos trabajos se ha descrito que los monocitos en estado normal no dan origen a las DCs, una cuestión interesante ha sido determinar el origen de estas células, así como determinar el momento en que una célula precursora compromete su diferenciación hacia linaje de célula dendrítica. Una de las observaciones más importantes fue la expresión de Flt3 en células progenitoras de DCs, información que hizo posible la identificación de un precursor de monocitos, macrófagos y cDCs; denominado como MDP (Progenitor de Macrófagos y DCs)[62] cuyo fenotipo es Lin⁻ CX3CR1⁺ CD11b⁻ CD115⁺ cKit⁺ CD135⁺ y representa el 0.5% de células mononucleares en médula ósea de ratón. Se ha observado también que al cultivar MDPs en presencia de GM-CSF in vitro o al transferirlos a ratones, estas células son capaces de dar origen a macrófagos y DCs, pero no a Polimorfonucleares (PMNs), linfocitos B, T, ni células NKs[63, 64]; por lo tanto ha podido concluirse que los MDP se encuentran más restringidos que los CMPs de los que derivan.

Por otra parte se ha descrito también un progenitor de DCs más restringido, el cual puede dar origen *in vitro* [65] e *in vivo* [66] a cDCs y pDCs pero no así a monocitos, y ha sido denominado como CDP (Precursor Común de Células Dendríticas) cuyo fenotipo es $\text{Lin}^- \text{CD115}^+ \text{Flt3}^+ \text{CD117}^{\text{baja}}$. Con las evidencias anteriores ha sido posible plantear que en orden jerárquico se encuentran los CMP que a la vez dan origen a los MDP y finalmente a los CDP (**figura 3**); es importante destacar que hasta este momento no se había podido una división entre precursores de monocitos y DCs.

4.2 Precursor migratorio de DCs.

Los precursores de DCs migran desde la médula ósea hasta los órganos linfoides a través de la sangre; se sabe que los MDPs y CDPs se encuentran restringidos a médula ósea; por lo que se ha planteado la existencia de un precursor de DCs (pre-DCs) aislado de sangre periférica y médula ósea; e identificado como: $\text{CD11c}^+ \text{MHCII}^- \text{SIRP}\alpha^{\text{lo}}$ y que posee la capacidad de dar origen a DCs [67]; adicionalmente para aislar como tal a este precursor se analizó también la expresión de Flt3 durante la diferenciación de DCs.

Las células pre-DCs en sangre se encuentran en equilibrio con las pre-DCs encontradas en órganos linfoides; sin embargo éstas células no poseen la capacidad de migrar de regreso a médula ósea. Las pre DCs representan aproximadamente el 0.5% del total de leucocitos en médula ósea, el 0.02% en sangre, 0.05% en bazo y 0.03 en nódulos linfáticos. Estas células presentan un tiempo de permanencia en sangre extremadamente corto [68], lo que en conjunto con su baja proporción en sangre explican parcialmente porque su identificación ha resultado tan complicada.



[69]

Figura 3. Desarrollo hematopoyético de células dendríticas. En la figura es posible observar en orden jerárquico la el proceso de diferenciación de las distintas estirpes celulares presentes en sangre a partir de HSC. (Células Troncales Hematopoyéticas). De manera interesante se observa en el lado de la rama mieloides que los CMPs (Progenitores Mieloides Comunes) pueden dar origen a los GMPs (Progenitores de Granulocitos/Macrófagos) y MDPs (Progenitores de Macrófagos y DCs) y CDPs (Progenitores de DCs) que pueden originar a su vez pre-DCs, cDCs y pDCs. Por otra parte los monocitos provenientes de GMPs pueden dar lugar a DCs inflamatorias. Y finalmente por el lado de la rama linfoides los Progenitores Linfoides Comunes (CLPs) pueden también dar origen a los CDPs. Las flechas continuas señalan procesos de diferenciación bien establecidos de distintos linajes celulares, las flechas punteadas hacen referencia a las diferentes posibilidades que pueden existir en el proceso de diferenciación de DCs.

5. Caracterización de nuevas subpoblaciones.

El estudio y caracterización de nuevas subpoblaciones de DCs se ha convertido en un amplio campo de estudio para los inmunólogos debido a las características que poseen estas células para modular diferentes aspectos de la RI. De manera clásica los estudios hechos en DCs se han enfocado en evaluar su capacidad para iniciar la RI después de su activación por distintos estímulos de maduración; aunque recientemente se han hecho estudios que se enfocan a determinar la expresión de marcadores involucrados en la captura de antígenos, así como también en determinar la participación de las DCs en procesos de tolerancia inmunológica (TI) [70].

5.1 Criterios “clásicos” para la identificación de DCs.

Para definir a una subpoblación de DCs se han establecido criterios clásicos (resumidos en la tabla 1.) que debe cumplir cualquier población celular para poder considerarse dentro del linaje de DCs; aunque es necesario considerar que las características evaluadas se hacen más evidentes después del proceso de maduración de las DCs. Con respecto a estos criterios de manera general las células consideradas como dendríticas maduras deben presentar las siguientes características: 1) Morfología típica, 2) capacidad fagocítica 3) Alto nivel de expresión de MHC II 4) Expresión de receptores de superficie involucrados con la captura y procesamiento antigénico y 5) Capacidad de iniciar respuesta inmune mediada por linfocitos T.

5.2 Criterios “nuevos” (complementarios) para la identificación de DC’s

Con los avances hechos en la identificación de subpoblaciones; se han planteado nuevos criterios que complementan la caracterización de posibles poblaciones de DCs, que permiten explicar un poco más su proceso de desarrollo, diferenciación y las funciones de cada una de ellas. Estos nuevos criterios abarcan: 1) Evaluación del papel de las DCs en procesos de inducción de TI tales como la selección clonal [71] y la inducción de linfocitos T reguladores (foxp3⁺) [72]; 2) Identificación de Hematopoyetinas involucradas en la diferenciación de subpoblaciones, así como la expresión de sus receptores en las distintas poblaciones celulares (p. ej. GM-CSF, Flt3L, M-CSF); 3) Identificación de progenitores como MDPs y CDPs y su relación con las diferentes subpoblaciones en el humano; 4) Evaluar los distintos factores y programas transcripcionales involucrados en la diferenciación y función de las distintas poblaciones (p. ej. el factor E2-2 en el desarrollo de pDCs en ratón y humano)[73].

Criterios para la identificación de subpoblaciones de DC's

Clásicos	Complementarios
Morfología	Funciones en tolerancia inmunológica
Marcadores de superficie	Expresión de receptores de hematopoyetinas (GM-CSF, M-CSF, FLT-3)
Capacidad fagocítica	Identificación de MDP y CDP
Procesamiento y presentación de Ag.	Programas transcripcionales IRF's , Id2, NF-kB
Función en inmunidad adaptativa	

Steinman & Idoyaga 2010.

Tabla 1. Criterios para la identificación de nuevas subpoblaciones de DCs. En la tabla se muestran las características que se propone deben ser evaluadas para la identificación de subpoblaciones de DCs. (MDP: Progenitor de Monocitos y Células Dendríticas; CDP: Progenitor Común de Células Dendríticas)

6. E STÍMULOS DE MADURACIÓN Y VIRUS DE INFLUENZA.

Como se ha descrito previamente la capacidad de activación/maduración de las DCs se ha relacionado con la expresión de una diversa gama de PRR's en estas células, tales como los TLR's, RLR's y CLR's los cuales son capaces de reconocer diversos PAMP's como LPS, RNA, DNA [74, 75], entre otros, los cuales pueden inducir cambios morfológicos y bioquímicos dentro de las DCs (descritos previamente) por lo que se les denomina como "estímulos de maduración". Es importante mencionar que las consecuencias funcionales para cada una de las subpoblaciones puede variar con respecto a la clase de receptores que expresan.

6.1 Virus de influenza como estímulo de maduración.

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus de influenza A, B y C, son los únicos miembros de esta familia; solo A y B son capaces de producir infección en el humano. Su material genético es de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de polaridad negativa. La envoltura viral contiene dos glicoproteínas, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La proteína HA es la proteína de unión al receptor celular, favorece la fusión de la envoltura del virus con la membrana celular, importante para la penetración del virus a la célula blanco, hemaglutina eritrocitos de humano, pollo y cobayo e induce una respuesta de anticuerpos neutralizantes protectores. La proteína NA corta el ácido siálico de las células del hospedero, que favorece la liberación del virus de las células, degrada el moco y facilita el acceso del virus al tejido. [76, 77]

El genoma viral (ssRNA) puede actuar como un estímulo de maduración para las DCs y es reconocido por las subpoblaciones de DCs por diferentes vías. Se ha descrito que las pDCs lo hacen mediante el TLR-7/8 y la molécula adaptadora MyD88 lo cual tiene como consecuencia funcional la producción de IFN-I [78, 79]. A diferencia de las pDCs, las cDCs pueden realizar el reconocimiento del virus vía el receptor RIG-I (Gen inducible por ácido retinóico) [31, 80] promoviendo la producción de IFN-I mediada por una proteína adaptadora denominada IPS-1 (interferon promoter stimulator-1) de manera independiente a la señalización mediada por TLR-7/8 y MyD88[81]

7. A NTECEDENTES DIRECTOS A ESTE TRABAJO:

Mediante un estudio previo hecho con un grupo de 30 pacientes con psoriasis, y cuyo objetivo fue determinar si el porcentaje, números absolutos y estado de activación de las distintas subpoblaciones de células dendríticas (cDCs y pDCs) en sangre periférica se encontraban afectados por la enfermedad; fue posible identificar una tercera población identificada como Lin- CD123⁺ HLA-DR^{baja}: a la que posteriormente se denominó como “nDCs”, interesantemente se observó que la disminución de dicha población en sangre periférica correlacionaba con el índice de actividad y tiempo de evolución de los pacientes. El PASI: índice de severidad y área de psoriasis es la escala que permite clasificar a los pacientes de acuerdo a la gravedad de la enfermedad en 3 grupos: PASI leve: menor a 20, PASI moderado: 21-50 y PASI severo: 51-72. El estudio se realizó con pacientes de PASI leve y moderado ya que los pacientes de PASI severo se presentan con poca frecuencia. En la **figura 4** es posible observar la comparación de los porcentajes y números absolutos obtenidos para cada una de las poblaciones analizadas en sujetos sanos (controles) y pacientes con PASI leve y moderado, es en estos últimos donde se halló una disminución tanto en porcentaje como en números absolutos de la población de nDCs; es por esto que nos llamó la atención y se decidió hacer un estudio más a fondo para evaluar sus características y funciones para poder determinar su posible participación en la patogénesis de la enfermedad.

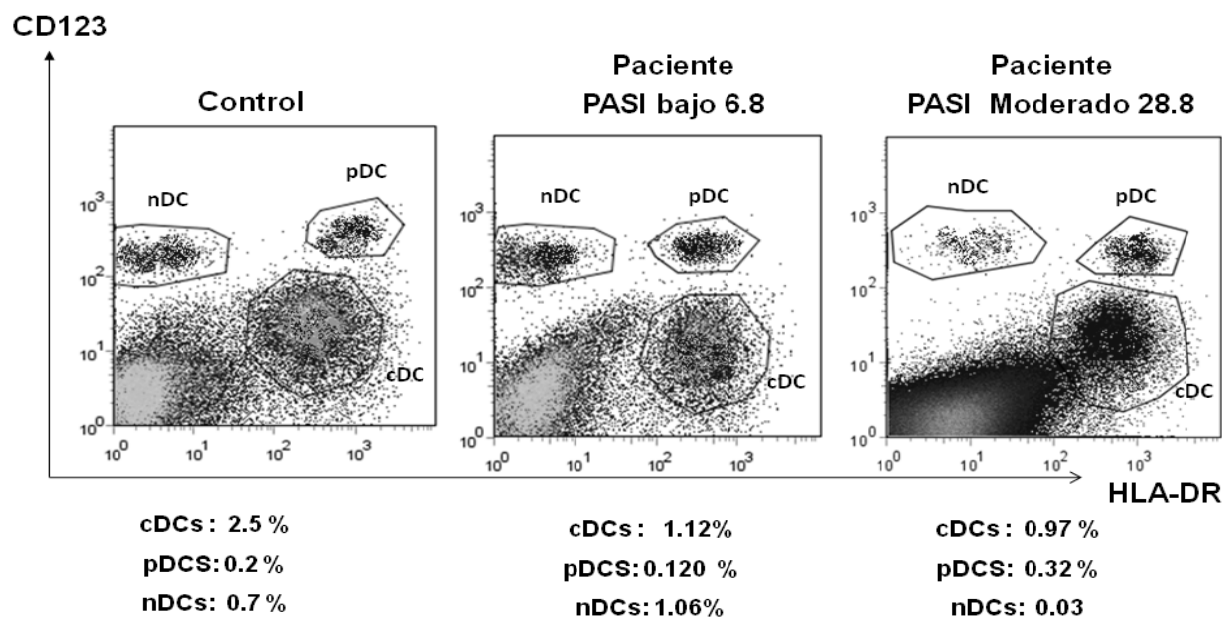


Figura 4. Porcentajes de poblaciones en pacientes con Psoriasis. De izquierda a derecha se muestran los porcentajes de las distintas poblaciones en sujetos sanos (controles) y pacientes con PASI bajo y moderado, la disminución en la población de nDCs en pacientes con PASI moderado se puede observar en la gráfica de puntos así como en los valores obtenidos. (Datos representativos de un grupo de 30 pacientes).

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En un estudio previo realizado en el laboratorio se lograron identificar claramente por citometría de flujo de 7 colores tres subpoblaciones de células negativas para linaje CD3, CD19, CD14 y CD56 (lin-) en sangre periférica de individuos normales. Estas poblaciones celulares incluyen a las cDCs identificadas como CD123^{int} HLA-DR⁺ CD11c⁺, a las pDCs CD123⁺ HLA-DR⁺ CD11c^{baja} y a una subpoblación identificada como CD123⁺, HLA-DR^{baja}, CD11c^{baja}, la cual no se encuentra descrita en la literatura. Esta población está notablemente reducida en sangre periférica de pacientes con Psoriasis que presentan un grado de actividad moderado. De esta manera resulta de suma importancia estudiar y caracterizar fenotípica y funcionalmente esta población celular para determinar si corresponde a una DC y de ser así si comparte características fenotípicas y funcionales con cDCs, pDCs, o si es una población con características y funciones independientes.

9. HIPÓTESIS:

- La población definida como Lin- CD11c⁻ CD123⁺ HLA-DR^{baja} podría tener características fenotípicas y funcionales correspondientes a una subpoblación de células dendríticas.
- La población definida como Lin- CD11c⁻ CD123⁺ HLA-DR^{baja} compartirá características fenotípicas y funcionales con alguna de las subpoblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica (cDCs o pDCs).
- La población en estudio será una población celular con características fenotípicas y funcionales distintas a las de las poblaciones de DCs descritas.

10. OBJETIVOS GENERALES:

- Caracterizar fenotípicamente y funcionalmente la población celular definida como Lin-CD11c^{baja} CD123⁺ HLA-DR^{baja}
- Determinar si la población en estudio comparte características fenotípicas y funcionales similares a una cDC o a una pDC.
- Determinar si la población en estudio corresponde a una población de DC con características y funciones independientes.

11. OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Determinar la expresión de marcadores relacionados con subpoblaciones de células dendríticas en la población de interés.
- ❖ Evaluar cambios morfológicos y fenotípicos después 18 horas de cultivo en presencia de distintos ligandos de TLR's.
- ❖ Determinar la cantidad de citocinas producidas después de 18 horas de cultivo con la finalidad de evaluar la capacidad funcional de la población en estudio.
- ❖ Determinar la expresión de marcadores relacionados con precursores de células dendríticas.
- ❖ Evaluar cambios morfológicos y fenotípicos después 6 días de cultivo en presencia de IL-3, GM-CSF, FL y virus de influenza inactivado.
- ❖ Determinar la cantidad de citocinas producidas después de 6 días de cultivo en presencia de IL-3, GM-CSF, FL y virus de influenza inactivado.

12. MATERIALES Y MÉTODOS:

- **Muestras de sangre periférica:**

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

- **Obtención de Células Mononucleares. (PBMC's)**

Se partió de un volumen inicial de sangre entre 70 y 80 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, se lavaron tres veces con PBS, se centrifugaron por 10 minutos dos veces a 1500 rpm y una vez 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 alícuota de 10 μ L 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 μ L) y se colocó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de cada una de las muestras en el microscopio.

- **Enriquecimiento de Células Dendríticas**

Como primera parte del enriquecimiento se colocaron 30-50 x 10⁶ células en placas con medio RPMI sin suplementar y se incubaron por 1 hora a 37°C con la finalidad de eliminar las células adherentes (principalmente monocitos), al finalizar el tiempo de incubación se colectaron las células no adheridas, se lavaron 2 veces las placas con PBS y se contaron las células restantes. Después de este paso se realizaron dos técnicas de enriquecimiento para las DC, descritas a continuación:

Enriquecimiento por perlas magnéticas (MACS:Magnetic Associated Cell Sorting):

Después de realizar el conteo de células, se resuspendieron en buffer de FACS (PBS, suero de caballo 2%, EDTA 5mM, azida de sodio 0.05%, pH 7.4; esto con la finalidad de bloquear los receptores Fc para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos), después de 20 min, se marcaron con los anticuerpos anti-CD3, CD14, CD19 y CD56 marcados todos con PE (eBioscience), por un tiempo de 20 min a 4°C, se lavaron 2 veces con 5 mL de buffer de FACS, posteriormente se incubaron con perlas anti-PE (Miltenyi Biotec) por 15 min a 4°C, se realizaron 2 lavados con buffer MACS (PBS, 0.5% ASB, 2mM EDTA, pH 7.2). Finalmente se realizó una selección negativa de las células marcadas utilizando una columna magnética y un magneto MACS para depletar las células marcadas con PE (LIN+). Nuevamente se contaron las células y se procedió a realizar la tinción de inmunofluorescencia.

Enriquecimiento por adherencia a placas: Un día antes del experimento se prepararon las placas Fisher con 5 mL de anti-IgG de ratón 50 µg/mL durante toda la noche a 4°C, antes de utilizarse se quitó el anticuerpo y se lavaron 2 veces con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo de la placa, después se bloquearon con medio R5 (RPMI+ SFB 5%). Después de realizar la adherencia a placas, se realizó el conteo de células para después incubarlas con los sobrenadantes/anticuerpos (anti-CD3 y anti-CD19) por 20 min a 4°C, se lavaron 2 veces con medio RPMI, y se colocaron entre 10-20 x 10⁶ en las placas Fisher previamente preparadas y se incubaron por 30 min a 37°C, al finalizar este tiempo se colectaron las células no adheridas a las placas, realizando dos lavados adicionales a cada placa con PBS. Nuevamente se contaron las células y se procedió a realizar la tinción de inmunofluorescencia.

- **Tinción de inmunofluorescencia.**

Después del proceso de enriquecimiento, se realizó la tinción de inmunofluorescencia utilizando los siguientes anticuerpos HLA-DR-APC-Cy7(BD Biosciences) y CD123-PE-Cy5 (BD Biosciences), se incubaron las células con los anticuerpos por 20 min a 4°C y posteriormente se lavaron 2 veces con buffer de FACS,

- **Separación de las poblaciones celulares por citometría de flujo (cell sorting).**

Después de teñir las células con los marcadores elegidos, las poblaciones celulares de interés se separaron por citometría de flujo (FACS Aria), teniendo como criterios de elección: 1. FSC vs SSC, 2. Células linaje negativas, 3. Expresión diferencial de los marcadores HLA-DR, de este modo se separaron 3 poblaciones (linaje negativas CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, y CD56⁻): 1. cDC (HLA-DR⁺, CD123^{int}), 2. pDC (HLA-DR⁺, CD123⁺) y 3. nDC (HLA-DR^{baja}, CD123⁺), las células aisladas se colectaron en tubos con medio RPMI suplementado, la duración de la separación fue alrededor de 6-8 horas por experimento.

- **Cultivo celular.**

Las células aisladas por citometría, se sembraron en placas de 96 pozos; alrededor de 90-100 x10⁵ células por pozo en un volumen de 150-200 µL y fueron cultivadas a distintos tiempos (18 horas y 6 días) con diferentes estímulos de activación entre los cuáles se probaron: LPS, Poli I:C, anti-CD40, CpG, DNA bacteriano, Virus de influenza (A/H3N2) inactivado, IL-3, FL, y GM-CSF. Durante el cultivo se tomaron fotografías a distintos tiempos con la finalidad de analizar los cambios morfológicos en las células aisladas; y al finalizar el tiempo de cultivo se colectaron los sobrenadantes para posteriormente medir la concentración de diversas citocinas, y las células se colectaron para analizar el cambio en la expresión de marcadores de activación como CD40, CD86, B7-H1 y HLA-DR por citometría de flujo.

- **Detección de citocinas.**

Los sobrenadantes de los cultivos se guardaron a – 80°C para posteriormente realizar la detección de citocinas por ELISA o CBA (Cytometric bead array)

- **IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α:** La detección de estas citocinas se realizó mediante la técnica de CBAs (BD Biosciences), la cual permite detectar en la misma muestra estas 6 citocinas (Human Inflammation kit) en un volumen de muestra de 50 µL.
- **IFN-α:** La cantidad de interferón producida se determinó mediante un ELISA tipo sandwich (PBL Biomedical Laboratories) en un volumen de muestra de 100 µL.

- **Análisis de la expresión de marcadores:**

A partir de células mononucleares se analizó mediante citometría de flujo la expresión de un panel de marcadores entre los cuales están: BDCA-1,2,3 y 4, CD4, CD8, CD20, CD45RA, CD45RO, CD11b, CD11c, CD62L, CLA (Antígeno Linfocitario Cutáneo), CD40, CD86, B7-H1, TLR-2,3,4,8 y 9; para esto se realizó una tinción de inmunofluorescencia (Bloqueo con solución de FACS 20 min/4°C, incubación con los anticuerpos primarios 20 min/4°C, 2 lavados, incubación con anticuerpos secundarios 20 min/4°C, 2 lavados, incubación con paraformaldehído al 4% 20 min/4°C para fijar las células). Para el análisis de marcadores intracelulares, se realizó de igual forma la tinción de superficie y después de la incubación con los anticuerpos secundarios, se realizó un lavado extra con Permashield 1x (BD Biosciences), una incubación con Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) 20 min/4°C con la finalidad de permeabilizar y fijar las células y posteriormente se incubó con los anticuerpos por 30 min a temperatura ambiente, y finalmente se realizaron 2 lavados para eliminar el exceso de anticuerpo.

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

13. RESULTADOS:

Las subpoblaciones de células dendríticas en sangre periférica se identificaron mediante citometría de flujo tomando en cuenta distintos parámetros; el primero de ellos es la exclusión de células linaje positivas (lin+), es decir células que se encuentran comprometidas con algún linaje en específico, para lo cual se utilizaron los siguientes marcadores: CD3, CD14, CD19 y CD56. El siguiente parámetro es la expresión de una combinación de marcadores como CD11c, HLA-DR, CD123 y los BDCA's (Blood Dendritic Cell Antigens). En la **figura 5** se muestran los criterios de exclusión para las células Lin+ e identificación de las cDCs (LIN- HLA-DR+CD11c+CD123^{int}), pDCs (LIN-HLA-DR+CD11c^{bajas}CD123⁺) y una tercer población identificada como LIN- HLA-DR^{baja} CD11c^{baja} CD123⁺, a la cual denominamos como "nDCs".

Con el objetivo de caracterizar fenotípicamente la población de interés (nDCs) se analizó la expresión en condiciones basales de un panel de marcadores (**Figura 6**) de los que resaltó la elevada expresión de CD11b, CLA (Antígeno linfocitario cutáneo) y CD62L, tomando como referencia la expresión de dichos marcadores en las otras subpoblaciones analizadas (cDCs y pDCs).

Adicionalmente se determinó el nivel de expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86) y co-inhibidoras (B7-H1) así como de CD40 en estado basal de cada una de las poblaciones. Como podemos observar en la **figura 7** la población de nDCs comparada con las cDCs y pDCs es la que menor expresión muestra de HLA-DR, CD40 y CD86 y a la vez la que muestra mayor expresión de B7-H1. Es importante señalar que el análisis de estos marcadores se utilizó como referencia durante todo el trabajo para determinar el estado de activación de las diferentes subpoblaciones bajo diferentes condiciones.

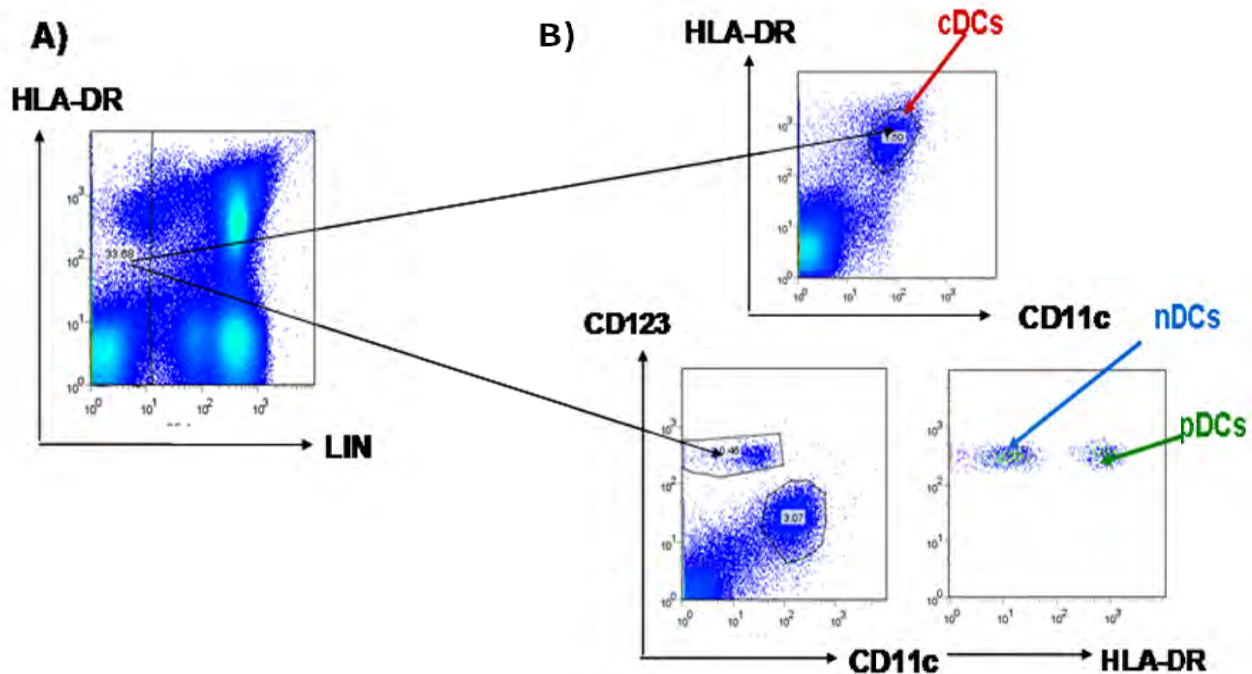


Figura 5. Identificación de las poblaciones celulares en estudio. En la figura se muestran los criterios de elección para las distintas poblaciones del estudio (cDCs, pDCs y nDCs), en A) se muestra la región de las células LIN-, y en B) el criterio de elección con respecto a los marcadores CD11c, CD123 y HLA-DR.

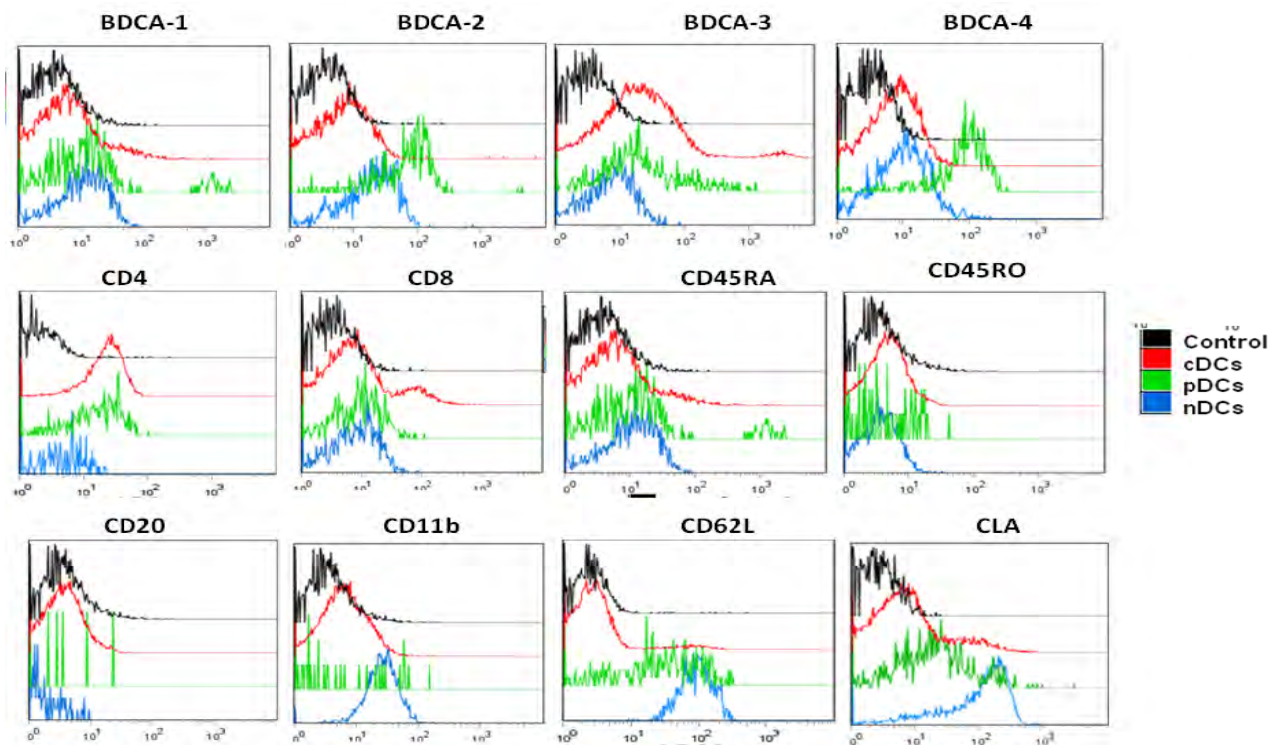


Figura 6. Fenotipo comparativo cDCs, pDCs y nDCs. Análisis en condiciones basales de un panel de marcadores en las diferentes subpoblaciones estudiadas. En la población de nDCs (azul) se observan niveles altos de expresión de los marcadores CD11b, CLA y CD62L.

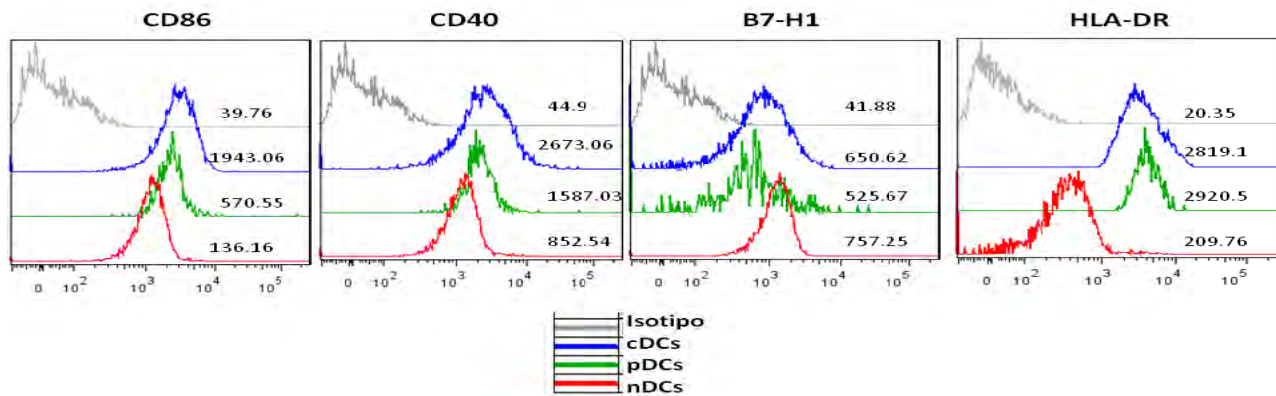


Figura 7. Expresión de marcadores de activación (basal). Análisis de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40,CD86), co-inhibidoras (B7-H1) y moléculas de HLA-DR en estado basal en las diferentes poblaciones. (Experimento representativo de tres independientes).

En la **tabla 1** se resume el análisis de la expresión del panel de marcadores en las distintas subpoblaciones en estado basal. De esta forma determinamos que el fenotipo de las “nDCs” es: Lin⁻ HLA-DR^{baja} CD4⁻, CD8⁻, CD20⁻, BDCA-1^{baja} BDCA-2^{+/-} BDCA-3⁻ BDCA-4⁻, CD45RA⁻, CD45RO⁻, CD80^{baja} CD86^{baja} B7-H1^{+/-}, y CD11b⁺ CD62L⁺ CLA⁺. Con la determinación del fenotipo, es posible decir que a pesar que las nDCs comparten la expresión de ciertos marcadores con las cDCs y pDCs, se pueden distinguir de las anteriores; así como también definir que la población en estudio es diferente a las ya descritas cDCs y pDCs.

Marcador/ Subpoblación	cDCs	pDCs	nDCs
CD4	+	+	-
CD8	+	-	-
CD20	-	-	-
CD45RA	Baja	+	-
CD45RO	-	-	-
BDCA-1	+	-	Baja
BDCA-2	-	+	int
BDCA-3	+	Baja	-
BDCA-4	-	+	-
CD11b	baja	-	+
CD62L	Baja	Int.	+
CLA	int	+	++
CD40	+	Baja	Baja
CD86	+	Baja	Baja
B7-H1	Int.	Int.	Int.

Tabla 2. Fenotipo Basal cDCs, pDCs y nDCs. En la tabla se muestra la expresión basal de distintos marcadores utilizados para caracterizar fenotípicamente a la población de nDCs en comparación con las subpoblaciones de cDCs y pDCs.

Posteriormente para evaluar las características morfológicas y el potencial de activación de la población en estudio, se aislaron por citometría de flujo las distintas subpoblaciones (cDCs, pDCs y nDCs) y se cultivaron en presencia o ausencia de diferentes estímulos, entre los cuales se probaron distintos ligandos de TLR's como lo son el LPS, CpG, DNA bacteriano, Poli I:C, entre otros; lo que se logró observar en la población de cDCs (**figura 8**) es que al ser cultivadas por 18 horas en presencia de los distintos estímulos se inducen cambios morfológicos en las células y la formación de agregados celulares (clusters) como señal de activación, en el caso de las pDCs (**figura 9**) es posible observar también cambios morfológicos y formación de agregados pero no bajo todos los estímulos probados como en el caso del LPS donde no se observan cambios.

Para las nDCs (**figura 10**) no fue posible observar cambios en la morfología ni formación de agregados al ser estimuladas únicamente con los ligandos antes mencionados. Por otra parte considerando que esta población expresa CD123 (IL-3 α R) y que se ha descrito a la IL-3 como factor de supervivencia y maduración para pDCs [45, 46], se decidió cultivar a la población de nDCs en presencia de esta citocina; las células cultivadas bajo estas condiciones mostraron cambios morfológicos, pasando de células redondas a células alargadas, aunque la formación de agregados celulares no fue tan evidente; por lo que se decidió cultivarlas en presencia de IL-3 más algún otro estímulo previamente probado (LPS, CpG, etc) y adicionalmente en presencia del virus de influenza inactivado (A/H3N2 2008), el cual se ha reportado que puede estimular tanto cDCs como pDCs por diferentes vías. En estos cultivos fue posible observar cambios morfológicos en presencia de IL-3 y el virus de influenza inactivado por 18 horas, e interesantemente el mayor cambio en la morfología y la presencia de agregados celulares se observó al realizar el cultivo de IL-3 más el virus inactivado como se puede ver en la **figura 7** y no así en presencia de otros estímulos como LPS o DNA combinados con IL-3, lo que sugería una activación específica por el virus de influenza. Otra observación importante que se hizo a partir de estos experimentos y que se re-afirmaría después con los cultivos a largo plazo es que la IL-3 es un factor de supervivencia para la población de interés ya que al ser cultivadas por más de 24 horas en ausencia de esta citocina, las células empiezan a morir como puede observarse en la **figura 20**. Tomando en cuenta estos resultados se planteó más adelante la posibilidad de que la IL-3 fuera un factor de diferenciación indispensable para éstas células por lo que se decidió realizar cultivos a largo plazo (5 días).

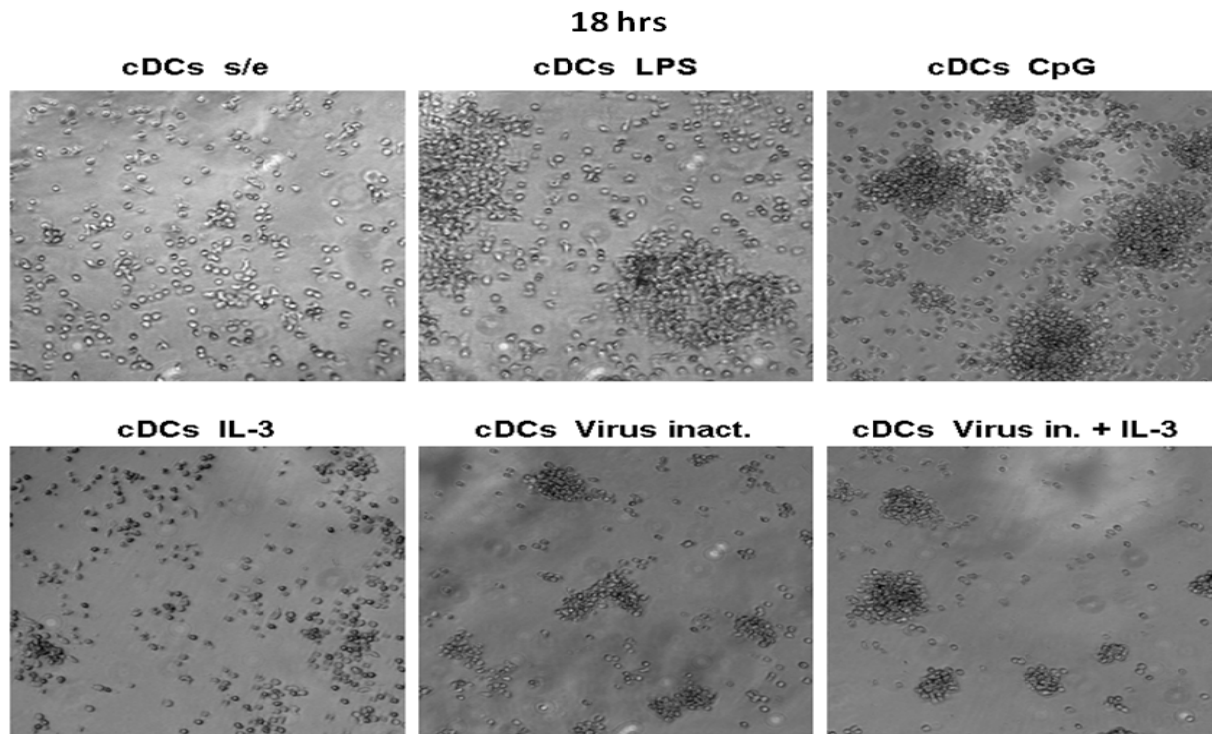


Figura 6. Cambios morfológicos en cultivos de cDCs 18h. En la figura se muestran las cDCs aisladas por citometría de flujo y cultivadas por 18 horas bajo diferentes condiciones. Se puede apreciar la presencia de agregados celulares bajo diferentes estímulos de activación. (Fotos representativas de uno de tres experimentos independientes)

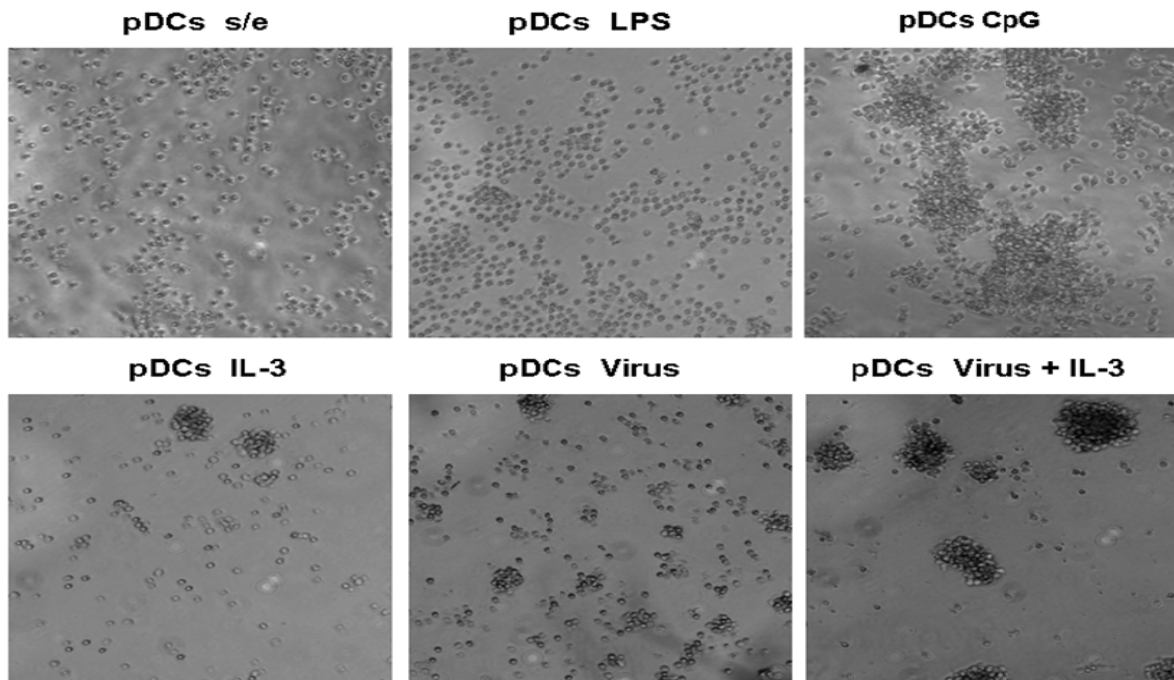


Figura 7. Cambios morfológicos en cultivos de pDCs 18h. En la figura se muestran las pDCs aisladas por citometría de flujo y cultivadas por 18 horas bajo diferentes condiciones. Se puede apreciar la presencia de agregados celulares bajo diferentes estímulos de activación. (Fotos representativas de uno de tres experimentos independientes)

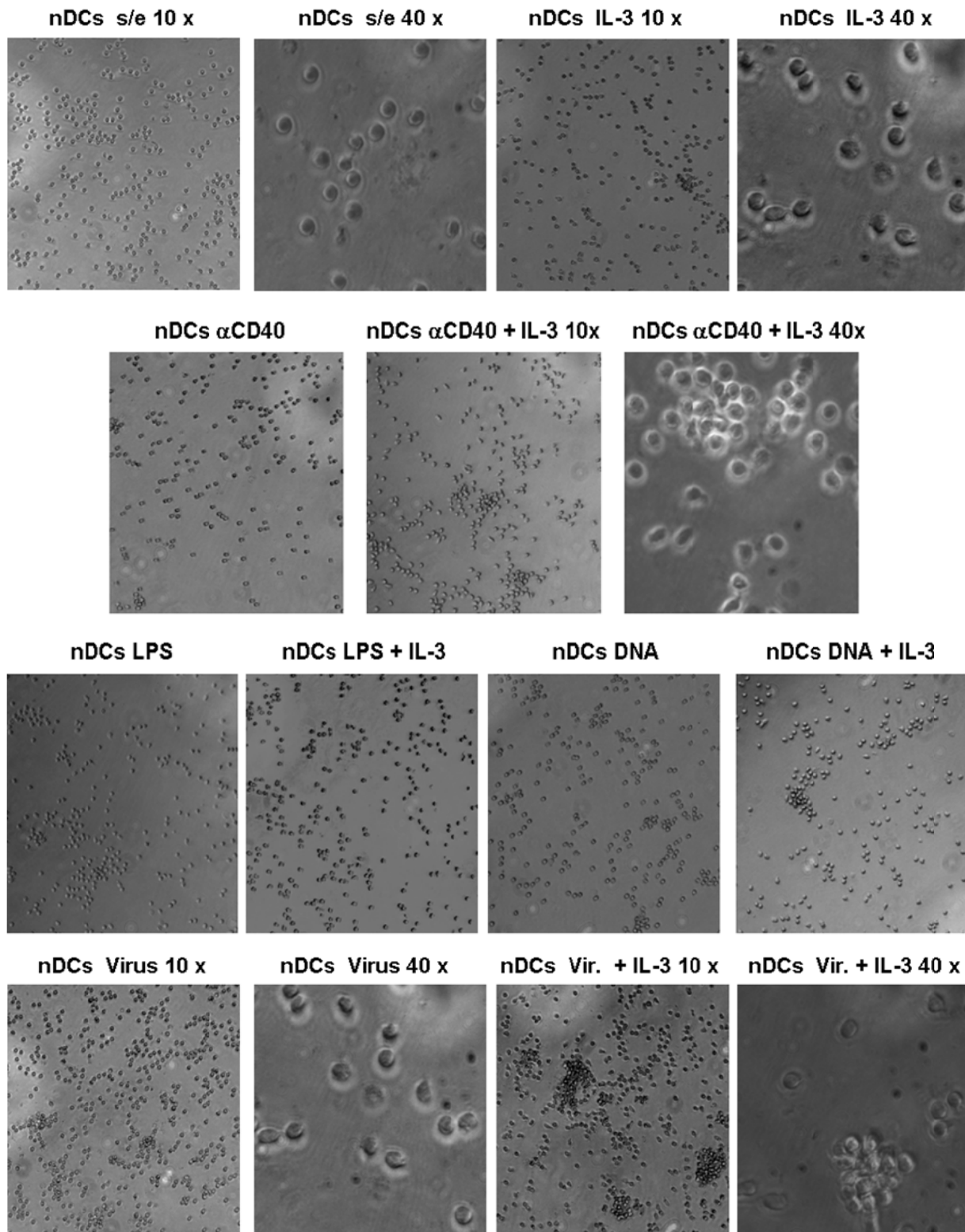


Figura 8. Cambios morfológicos cultivos de nDCs 18h. En la figura se muestran las nDCs aisladas por citometría de flujo y cultivadas por 18 horas bajo diferentes condiciones. Se pueden apreciar cambios morfológicos y la presencia de agregados celulares únicamente bajo estímulos de activación de IL-3 y Virus de influenza inactivado + IL-3. (Fotos representativas de uno de tres experimentos independientes)

Un objetivo importante de este trabajo fue evaluar la función de la población de nDCs comparada con las cDCs y pDCs. Considerando los cambios morfológicos y la formación de agregados observados en la población nDC al ser cultivada en presencia de IL-3 y virus de influenza se decidió analizar la expresión de algunos TLR's por citometría de flujo. y de este modo poder explicar los cambios observados, así como también determinar posibles estímulos de activación.

Se analizó la expresión de TLR-2,3,4,8 y 9 en estado basal y después de 18 horas de cultivo con IL-3 y virus de influenza inactivado. En la **figura 11** se muestran los resultados obtenidos para el TLR-2 y 4. Para el TLR-2 se observó un nivel de expresión basal bajo, comparado con el control de isotipo, en las tres poblaciones (cDC, pDC y nDC) el cual se incrementa ligeramente después de 18 horas de cultivo aún sin estímulo y vuelve a disminuir en presencia de IL-3 y el virus. En el caso del TLR-4 puede observarse que al igual que el TLR-2 la expresión basal comparada con el isotipo es muy baja en las tres poblaciones, de la que sobresale ligeramente la expresión en cDCs. Después de 18 horas de cultivo aún sin estímulo la expresión disminuye en cDCs y nDCs y aumenta ligeramente en las pDCs.

Los resultados obtenidos de la expresión del TLR-3 y 9 (**figura 12**) muestran que la expresión basal del TLR-3 es muy parecida en las 3 poblaciones y se incrementa de manera similar después de 18 horas de cultivo y un poco más en presencia de IL-3 y virus de influenza inactivado.

Para el TLR-9 (**figura 12**) se observó que las pDCs son las que presentan mayor expresión en condiciones basales comparadas con el isotipo, dicha expresión disminuye después de las 18 horas de cultivo; las poblaciones de cDCs y nDCs presentaron una expresión similar tanto en condiciones basales como después de cultivo, la expresión basal en estas poblaciones es menor que en las pDCs y después de cultivo en ausencia o presencia de IL-3 y el virus, los niveles de expresión en las tres poblaciones son similares.

Por último se analizó la expresión del TLR-8 (**figura 13**), los resultados obtenidos fueron que tanto en las cDCs y pDCs la expresión basal de este receptor es similar a la del control de isotipo y se incrementa ligeramente después 18 horas de cultivo con los distintos estímulos utilizados. Interesantemente en la población de nDCs se encontró que es la población que más expresa este receptor tanto en condiciones basales como después de cultivo en presencia de distintos estímulos, el nivel más alto de expresión fue después de 18 horas de cultivo en

presencia de IL-3 más ORN02 (ligando sintético de TLR-8). Este resultado nos llamó la atención ya que podría explicar la activación preferencial observada en cultivos de nDCs con IL-3 y virus de influenza inactivado que está compuesto de RNA de cadena sencilla y es un ligando potencial del TLR-8.

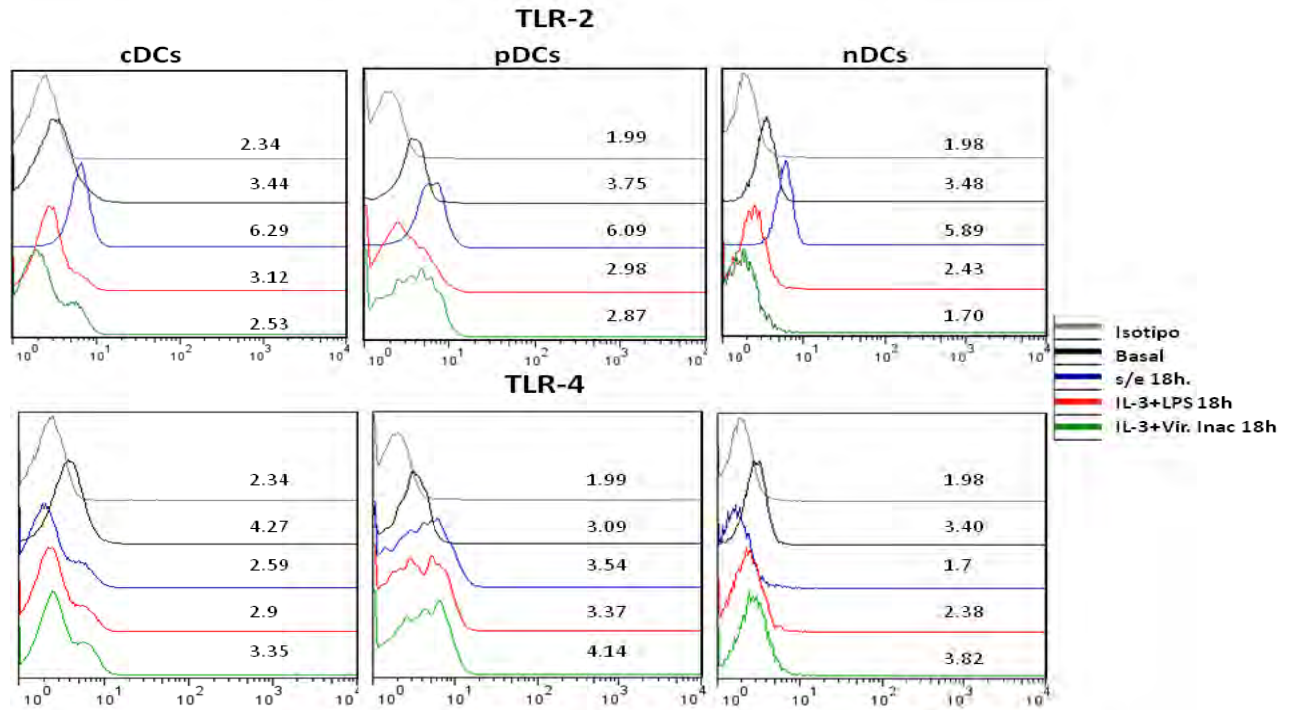


Figura 11. Expresión de TLR-2 y 4. En la parte superior de la figura y de izquierda a derecha se muestra la expresión de TLR-2 y en la parte inferior la expresión de TLR-4 en las distintas subpoblaciones en estado basal y después de 18 horas de cultivo bajo diferentes condiciones. Experimento representativo de dos independientes.

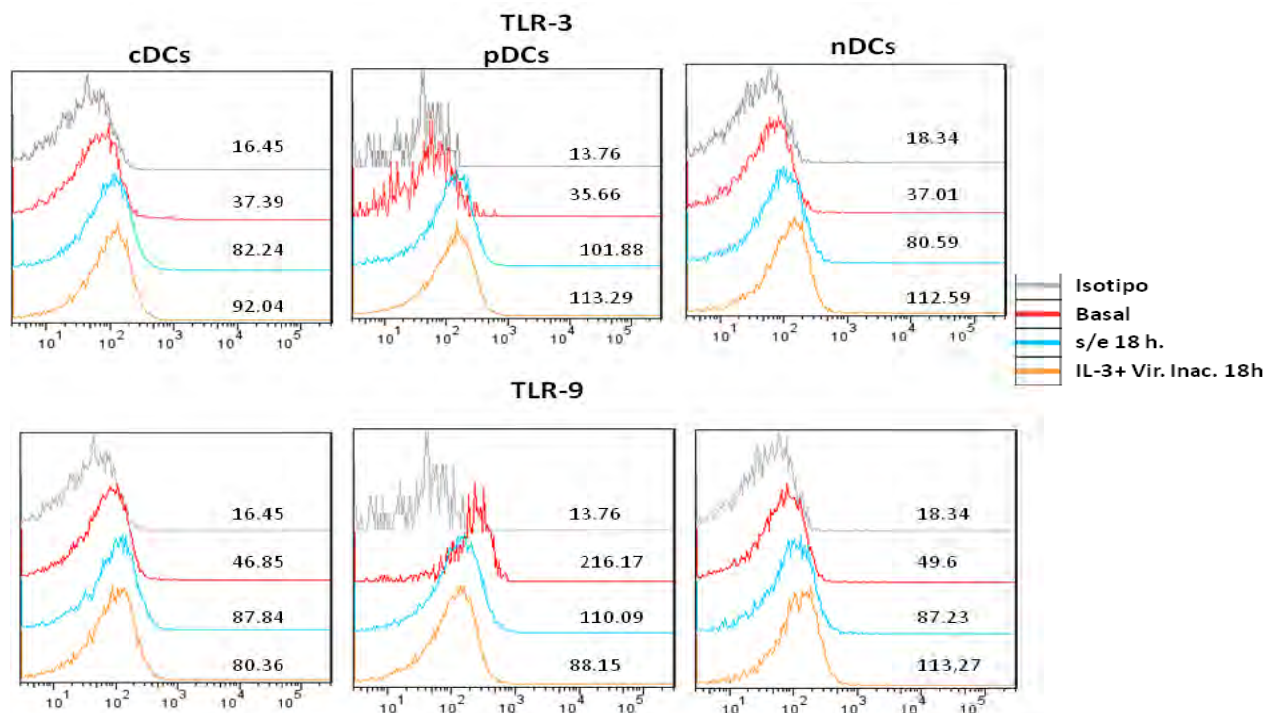


Figura 12. Expresión de TLR-3 y TLR-9. En la parte superior de la figura y de izquierda a derecha se muestra la expresión de TLR-3 y en la parte inferior la expresión de TLR-9 en las distintas subpoblaciones en estado basal y después de 18 horas de cultivo bajo diferentes condiciones. Experimento representativo de dos independientes.

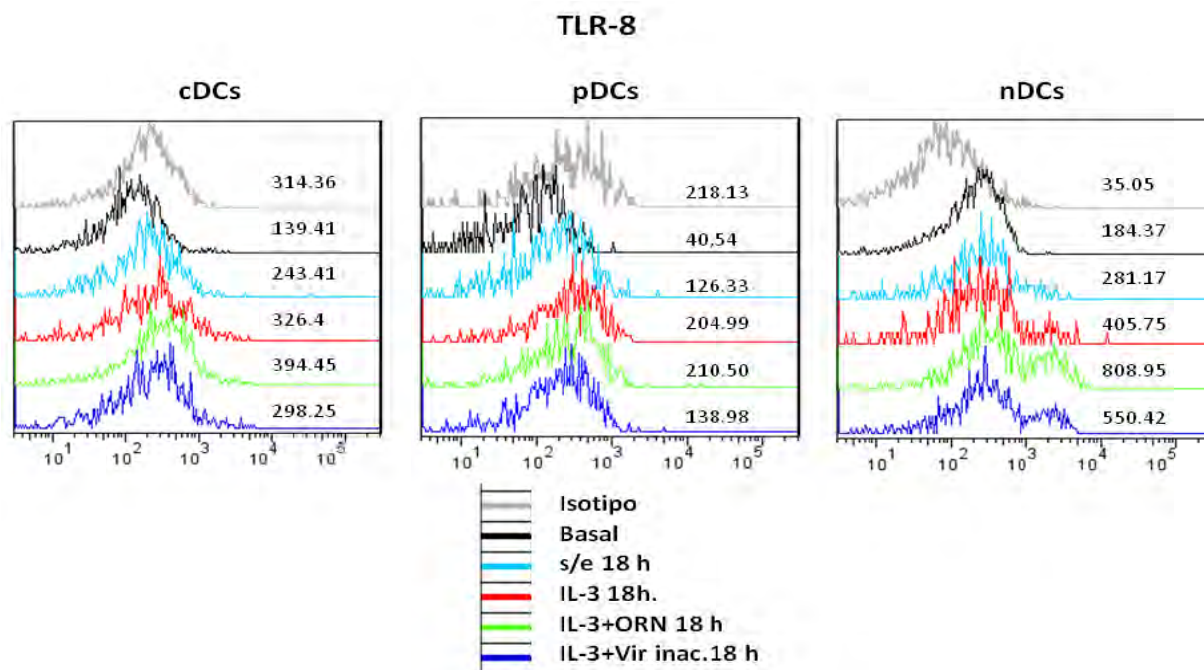


Figura 13. Expresión de TLR-8. De izquierda a derecha se muestra la expresión de TLR-8 en las distintas subpoblaciones, en estado basal y después de 18 hrs de cultivo bajo distintos estímulos. La población de nDCs es la que muestra mayor expresión tanto en estado basal como después de activación. Experimento representativo de tres independientes.

Para determinar si los cambios morfológicos y la formación de agregados observados en los cultivos por 18 horas de la población nDC en presencia de IL-3 y virus de influenza correlacionaban con la expresión de marcadores de activación y con la expresión de citocinas se evaluó la expresión de algunos marcadores típicos de DC (CD11c, CD11b, HLA-DR, CD40, CD86 y B7-H1) así como la cuantificación de citocinas en sobrenadantes colectados al término de los cultivos.

Primero se comparó la expresión de CD11c y CD11b en las diferentes subpoblaciones, en la **figura 14** se muestra la comparación hecha entre cDCs y nDCs después de 18 hrs de cultivo bajo distintas condiciones (basal, s/e, IL-3, Virus+IL-3), en la población de cDCs es posible observar que hay una disminución de la expresión del marcador CD11c después del cultivo respecto al basal, la cual se acentúa con IL-3 y el virus; por otra parte la expresión de CD11b se incrementa ligeramente a las 18 horas de cultivo con respecto al basal y un poco más con IL-3 más el virus. Para la población de nDCs que desde un principio se había observado que es la que presenta mayor expresión de CD11b, después del tiempo de cultivo y con los diferentes estímulos dicha expresión se incrementa ligeramente; y en el caso de CD11c lo que se observa es un incremento de la expresión con IL-3 y el virus inactivado con respecto al basal.

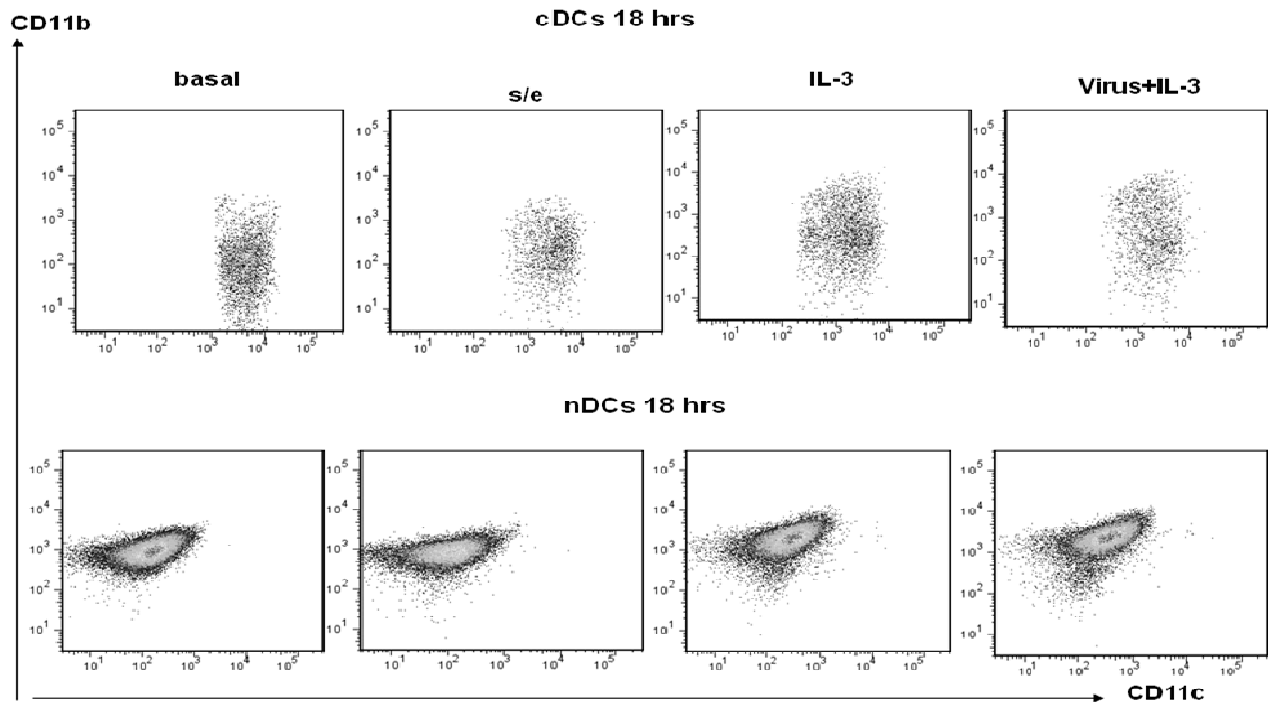


Figura 14. Expresión de CD11b y CD11c 18 h. De manera comparativa se muestra la expresión de estos marcadores en estado basal y después de 18 horas de cultivo bajo distintas condiciones, en la parte superior en la población de cDCs y en la parte inferior en las nDCs. Experimento representativo de 3 independientes.

En el análisis de los marcadores de activación (**figura 15**) se observó lo siguiente: cDCs: incremento en la expresión de todos los marcadores analizados (CD40, CD86, B7-H1 y HLA-DR) después de 18 horas de cultivo en ausencia de estímulo, y un incremento mayor en presencia de estímulo (virus+IL-3) con respecto a la expresión basal. En las pDCs solo se comparó la expresión basal de los marcadores con respecto al observado después del estímulo donde se aprecia un incremento en todos los casos. nDCs: se observa la misma tendencia que en las cDCs, es decir la expresión de todos los marcadores se incrementa después de 18 horas de cultivo en ausencia de estímulo y se incrementa aún más en presencia del estímulo de activación con respecto al basal.

Sin embargo aunque la expresión de los marcadores se incrementa en la población de nDCs es importante resaltar que solo en el caso de B7-H1 los niveles de expresión después de activación es similar en las 3 poblaciones, en el caso de CD40 y CD86 son las cDCs las que muestran mayor expresión después de activación, y las poblaciones de pDCs y nDCs muestran niveles similares de dichos marcadores bajo las mismas condiciones. Para HLA-DR son las cDCs y pDCs las que mayormente lo expresan, y aunque en las nDCs se puede apreciar un incremento, no llega al nivel de expresión de las otras dos poblaciones.

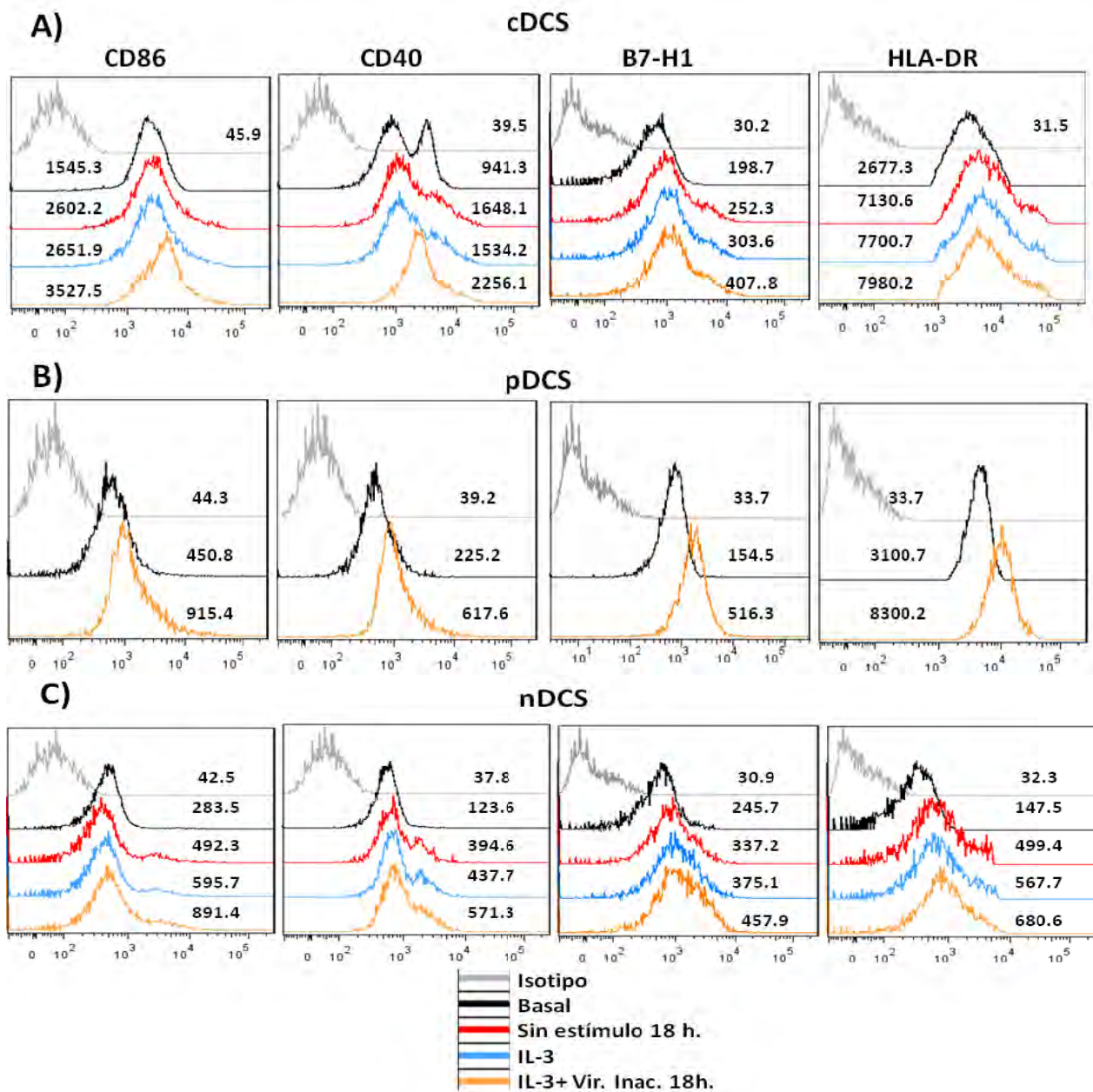


Figura 15. Marcadores de activación 18 h. Análisis de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40,CD86), co-inhibidoras (B7-H1) y moléculas de HLA-DR a las 18 horas de cultivo bajo distintas condiciones en las distintas subpoblaciones. Experimento representativo de tres independientes.

El siguiente punto crítico dentro de la caracterización funcional de la población, fue evaluar la capacidad de producción de citocinas en respuesta a estímulos. Para esto se colectaron los sobrenadantes de las células cultivadas por 18 horas y se determinó la cantidad de IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α , IL-10* e IL-12p70*¹, producida por cada una de las poblaciones aisladas por citometría de flujo.

* No se detectó producción de estas citocinas.

Los resultados muestran que después de 18 horas en cultivo en presencia de IL-3 y virus de influenza inactivado la población de nDCs fue capaz de producir IL-6, TNF- α , e IL-8 (**figura 17**). Los valores de IL-6 y TNF- α fueron similares a los obtenidos por las cDC los niveles de IL-8 fueron menores comparado con lo obtenido tanto para pDCs como para cDCs. Por otra parte al activar a las nDC con Ionomicina/PMA fue posible detectar una mayor cantidad de todas las citocinas cada una mencionadas confirmando es potencial que tienen estas células de producir citocinas pro-inflamatorias después de ser activadas.

Por otra parte se realizó la determinación de producción de IFN- α , tomando como control positivo pDCs activadas bajo las mismas condiciones. Lo que se puede observar es que la población de nDCs al estimularse con el virus inactivado e IL-3 por 18 horas, es capaz de producir esta citocina en cantidades inclusive más altas que las pDCs (**figura 18**).

La capacidad de producción de citocinas pro-inflamatorias y de IFN- α en respuesta al virus de influenza inactivado confirman que los cambios morfológicos y formación de clusters observados en los cultivos celulares son consecuencia de activación y que esto se traduce en la producción de citocinas importantes tanto en la restricción de la replicación viral como en la posible inducción de una respuesta inmune.

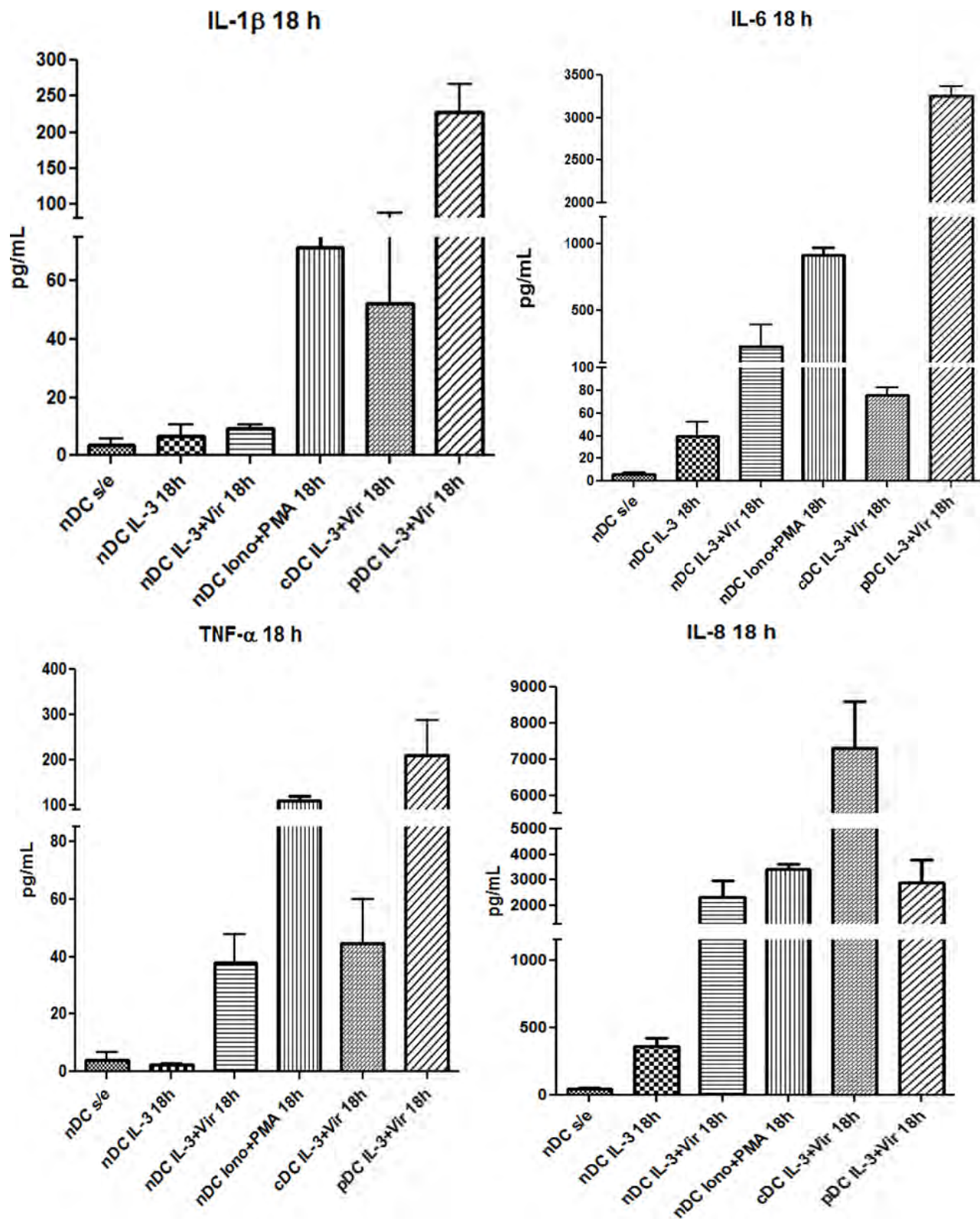


Figura 1 6. Producción de citocinas pro-inflamatorias 18 h. Cantidad de citocinas detectadas en sobrenadantes de nDCs cultivadas 18 h. bajo diferentes condiciones, tomando como controles positivos los sobrenadantes de cultivos de cDCs y pDCs. En la parte superior se muestran las cantidades detectadas (pg/mL) de IL-1 β e IL-6, y en la parte inferior las cantidades de TNF- α e IL-8.

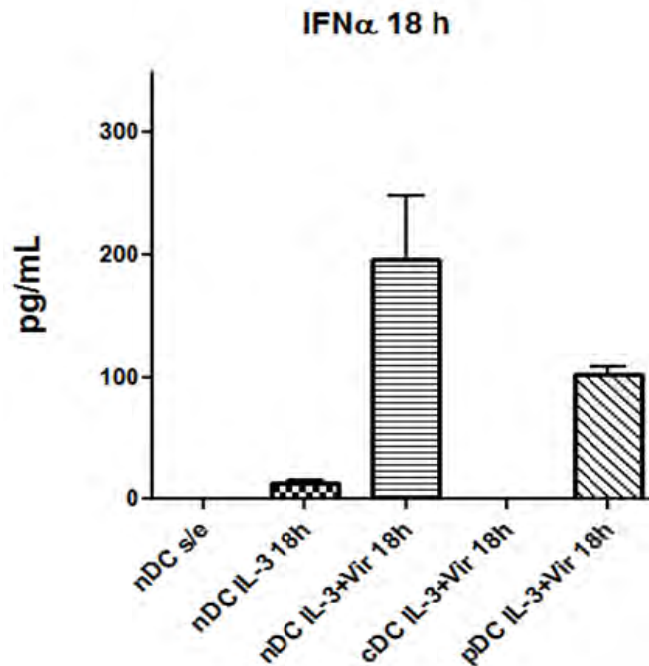


Figura 17. Las nDCs producen IFN- α en respuesta al virus de influenza. Cantidad de IFN- α detectado en sobrenadantes de nDCs cultivadas 18h. bajo diferentes condiciones, tomando como control positivo los sobrenadantes de cultivos de pDCs. Sobresale la producción observada a las 18 horas de estímulo con el virus de influenza inactivado.

El siguiente objetivo del trabajo fue evaluar el papel de las nDCs como posibles precursoras de DCs, por lo que por una parte se analizó la expresión de otros marcadores como c-kit (CD117) y flt3 (CD135), el primero se ha descrito como marcador de células troncales hematopoyéticas (HSC) y presenta una expresión diferencial en CMP y CLP's así como también en células precursoras o que no han completado su proceso de diferenciación; la expresión del segundo (CD135) se ha reportado también en HSC, y diversos estudios han relacionado su expresión con células precursoras comprometidas hacia el linaje de células dendríticas.

Los resultados obtenidos para la expresión de c-kit (CD117) muestran (**figura 18**) que la expresión basal de este marcador con respecto al control de isotipo es muy similar en las tres poblaciones; después de activación con IL-3 y virus inactivado se observó un ligero incremento de la expresión en las poblaciones de cDCs y nDCs, pero no así en las pDCs.

En cuanto a la expresión de flt3 (CD135) es posible observar (**figura 18**) en comparación con el control de isotipo que en estado basal la población de pDCs es la que mayormente lo expresa, las cDCs y nDCs muestran niveles bajos y muy similares, los cuales se incrementan ligeramente después de activación; la expresión de este marcador en pDCs disminuye considerablemente a las 18 horas de cultivo en presencia del estímulo.

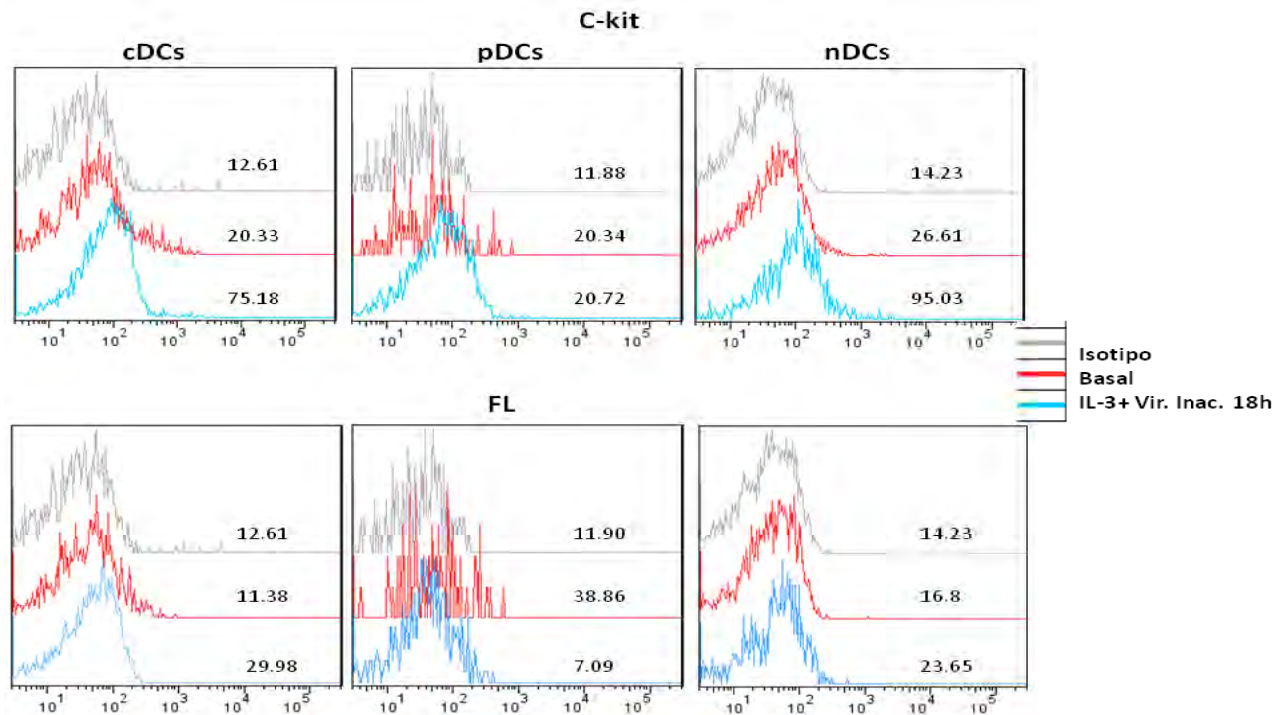


Figura 18. Expresión de c-kit y flt3. En la parte superior de la figura se muestra la expresión de c-kit y en la parte inferior se observa la expresión de FL en las diferentes subpoblaciones en estado basal y después de 18 horas de cultivo con IL-3 y virus de influenza inactivado. Experimento representativo de dos independientes.

Considerando que el fenotipo determinado tanto en condiciones basales como después de 18hr de cultivo no correspondía al de ninguna de las poblaciones de CD descritas, se decidió realizar cultivos a largo plazo (5 días) con células aisladas por citometría de flujo pero ahora en presencia de un cóctel de citocinas (GM-CSF, FL (ligando de flt3) e IL-3) o solamente IL-3 con el objetivo de evaluar la capacidad de estas citocinas de diferenciar DCs a partir de nDCs. En las últimas 18 horas de cultivo se adicionó el virus de influenza o en algunos cultivos se mantuvo durante todo el tiempo.

En el caso de las cDCs (**figura 19**) fue posible observar nuevamente cambios morfológicos y presencia de agregados celulares (clusters) en presencia de IL-3, el cóctel de citocinas (GM-CSF, FL, IL-3), así como también en presencia del virus, aunque no se observaron diferencias importantes con respecto a lo observado a las 18 horas (**figura 8**). En cuanto a las nDCs pudimos confirmar una vez más que la IL-3 es un factor de crecimiento indispensable para éstas células ya que como puede observarse en la parte superior de la **figura 20** a las 18 y 72 horas de cultivo en ausencia de esta citocina la viabilidad celular disminuye considerablemente. Por otra parte al ser cultivadas en presencia del cóctel de citocinas fue posible apreciar cambios morfológicos importantes y abundante presencia de agregados celulares a partir de los 4 días de cultivo. En presencia de solamente la IL-3 se observaron cambios morfológicos importantes

a partir de las 72 horas, aunque la presencia de agregados no fue tan evidente a este tiempo; por otra parte después de estimularlas por 18 horas con el virus inactivado, se pudo observar claramente la presencia de dichos agregados; en comparación con lo observado en los cultivos de 18 horas (**figura 10**) no hubo grandes diferencias, lo único que se puede observar es que el efecto visto a las 18 horas se amplifica después de varios días de cultivo

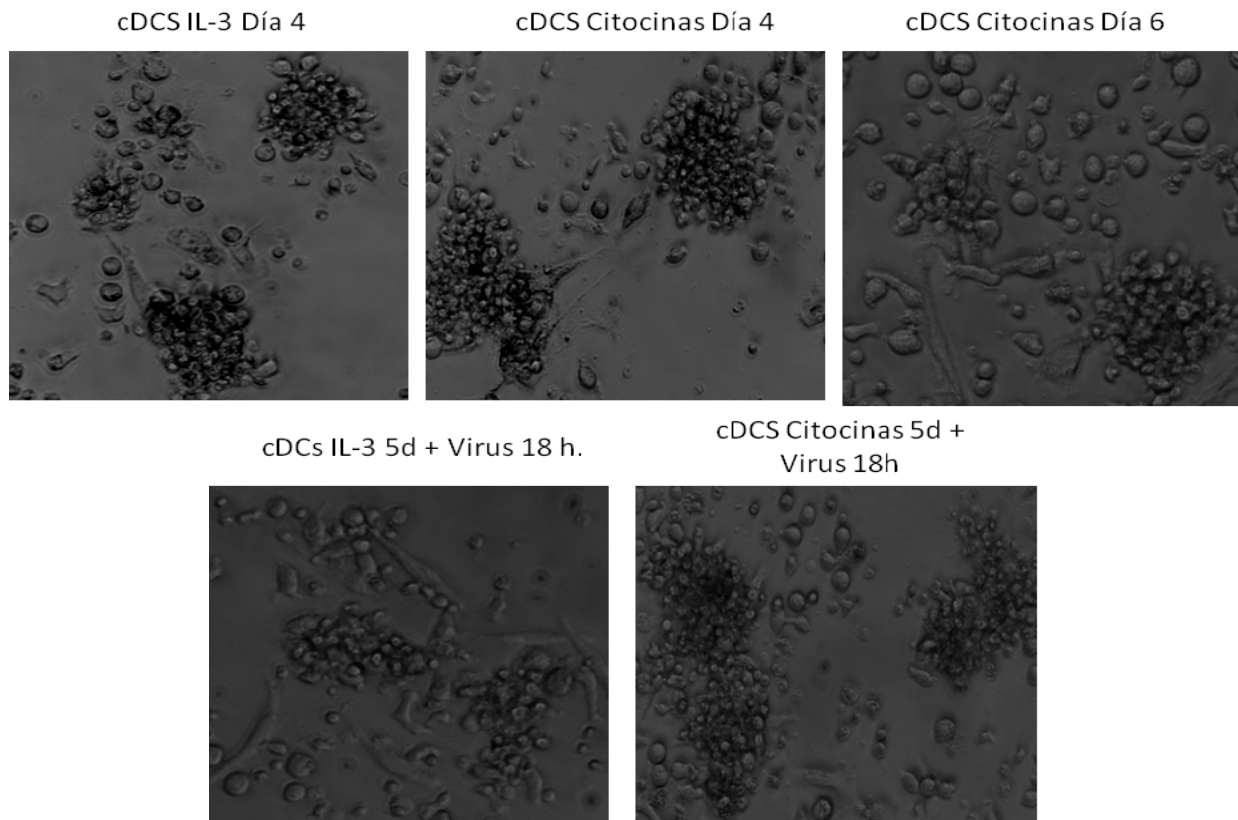


Figura 19. Cambios morfológicos en cultivos de cDCs 6d. En la figura se muestran las cDCs aisladas por citometría de flujo y cultivadas por 6d bajo diferentes condiciones. Se pueden apreciar cambios morfológicos y la presencia de agregados celulares bajo las distintas condiciones de cultivo. (citocinas: FL, GM-CSF, IL-3). Fotos representativas de uno de tres experimentos independientes.

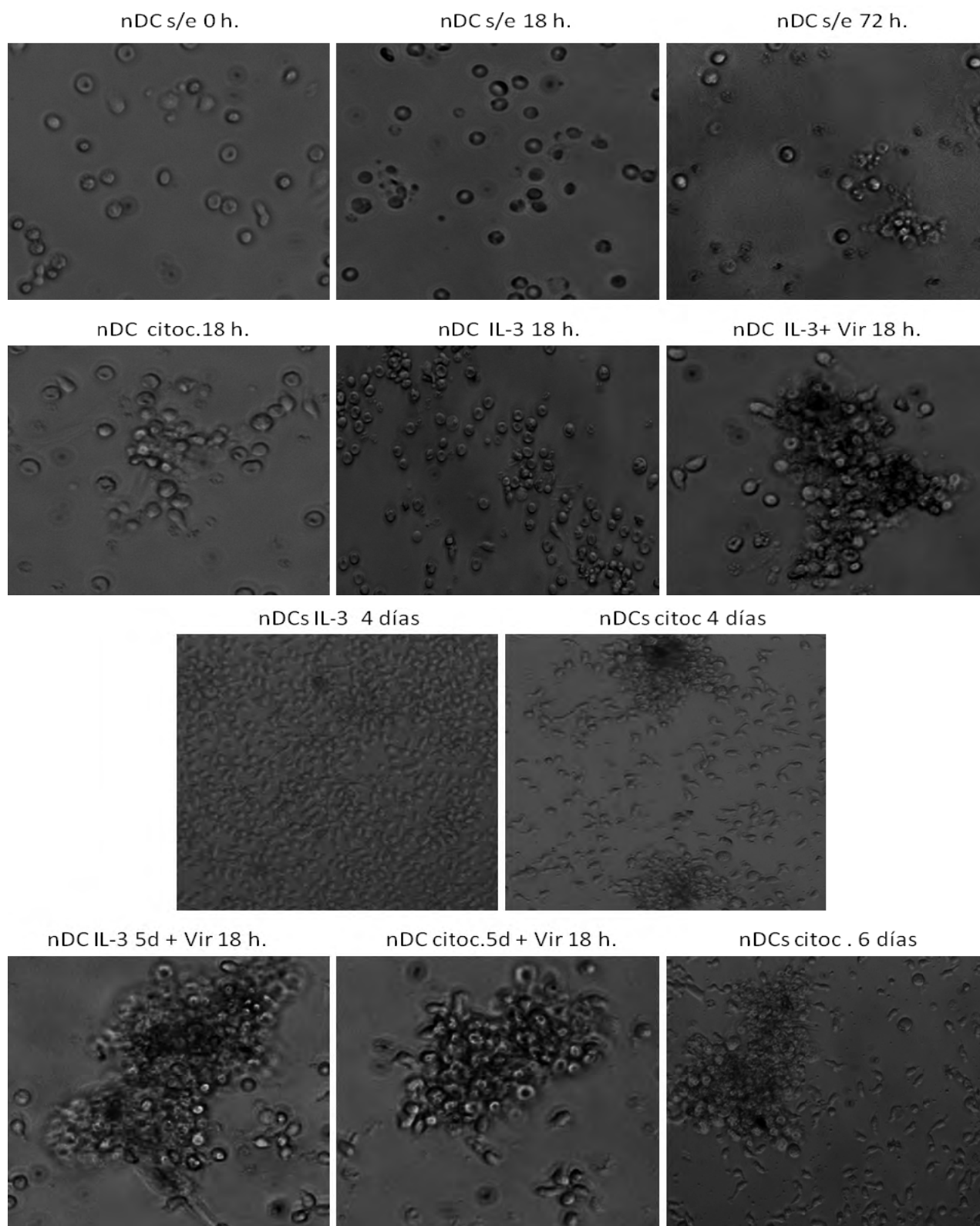


Figura 20. Cambios morfológicos en cultivos de nDCs 6d. En la figura se muestran las nDCs aisladas por citometría de flujo y cultivadas por 18h y 6d bajo diferentes condiciones. Se pueden apreciar cambios morfológicos y la presencia de agregados celulares bajo distintas condiciones de cultivo a partir de las 18 h en presencia de IL-3 + virus de influenza inactivado. (citocinas: FL, GM-CSF, IL-3). Fotos representativas de uno de tres experimentos independientes.

Al término del cultivo se analizó nuevamente el fenotipo de las poblaciones, los resultados obtenidos muestran que en cuanto a la expresión de CD11b en cDCs se presenta la misma tendencia observada a las 18 horas; es decir se observó un incremento en la expresión este marcador con respecto al basal, aunque no hay diferencias importantes en cuanto a las distintas condiciones (**figura 21**); la expresión de CD11c a pesar de encontrarse ligeramente disminuida con respecto a lo observado a las 18 horas (**figura 14**) tampoco mostró grandes cambios con respecto a las diferentes condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos para la población de nDCs muestran una disminución de la expresión de CD11b y un incremento para CD11c con respecto a lo observado a las 18 horas (**figura 14**), al igual que en el caso de las cDCs no se observan cambios considerables entre las distintas condiciones a los 6 días de cultivo. Cabe resaltar que a este tiempo de cultivo la expresión de estos marcadores resultó ser bastante similar.

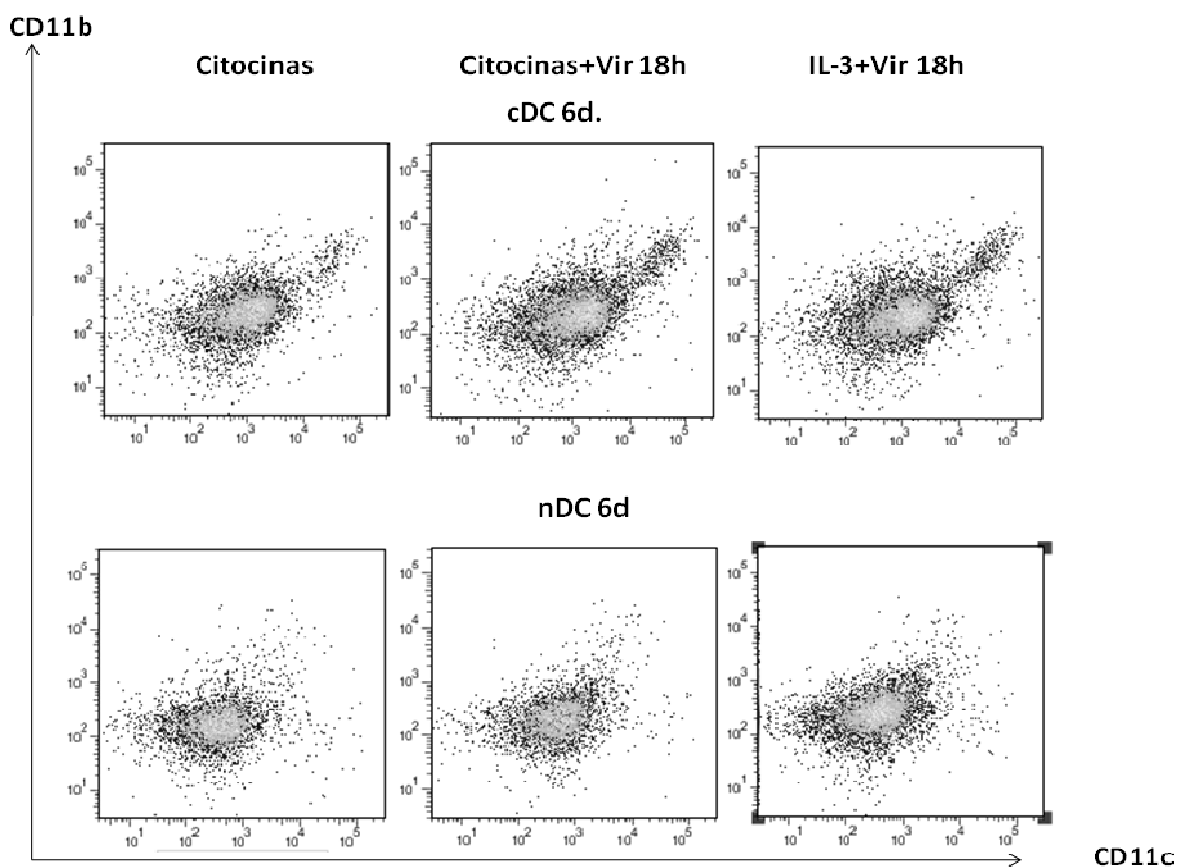


Figura 21. Expresión de CD11b y CD11c 6d. De manera comparativa se muestra la expresión de estos marcadores después de 6 días de cultivo bajo diferentes condiciones, en la parte superior en la población de cDCs y en la parte inferior en las nDCs. Experimento representativo de dos independientes.

La expresión de los marcadores de activación en las poblaciones de cDCs y nDCs después de 6 días de cultivo (**figura 22**) se incrementó de manera general con respecto a lo observado previamente a las 18 horas de cultivo (**figura 15**), tomando como punto de referencia las intensidades medias de fluorescencia (IMF). La población de cDCs es la que muestra mayor expresión de todos los marcadores (CD86,CD40, B7-H1 y HLA-DR); aunque no fue posible detectar diferencias importantes entre las condiciones de cultivo establecidas.

Es importante señalar que en el caso de las nDCs, al analizar las intensidades medias de fluorescencia, se observó un incremento en la expresión de los marcadores de activación con respecto a lo observado previamente en estado basal y a las 18 horas de cultivo, pero a pesar de esto al compararse con cDCs cultivadas bajo las mismas condiciones la expresión de todos los marcadores analizados es menor en las nDCs (**figura 15**). Estos resultados nos permitieron determinar que aún en cultivos a largo plazo en presencia de distintas citocinas la población de nDCs no logra diferenciarse fenotípicamente a una población correspondiente a una DC madura sin embargo alcanza niveles importantes de todos los marcadores analizados.

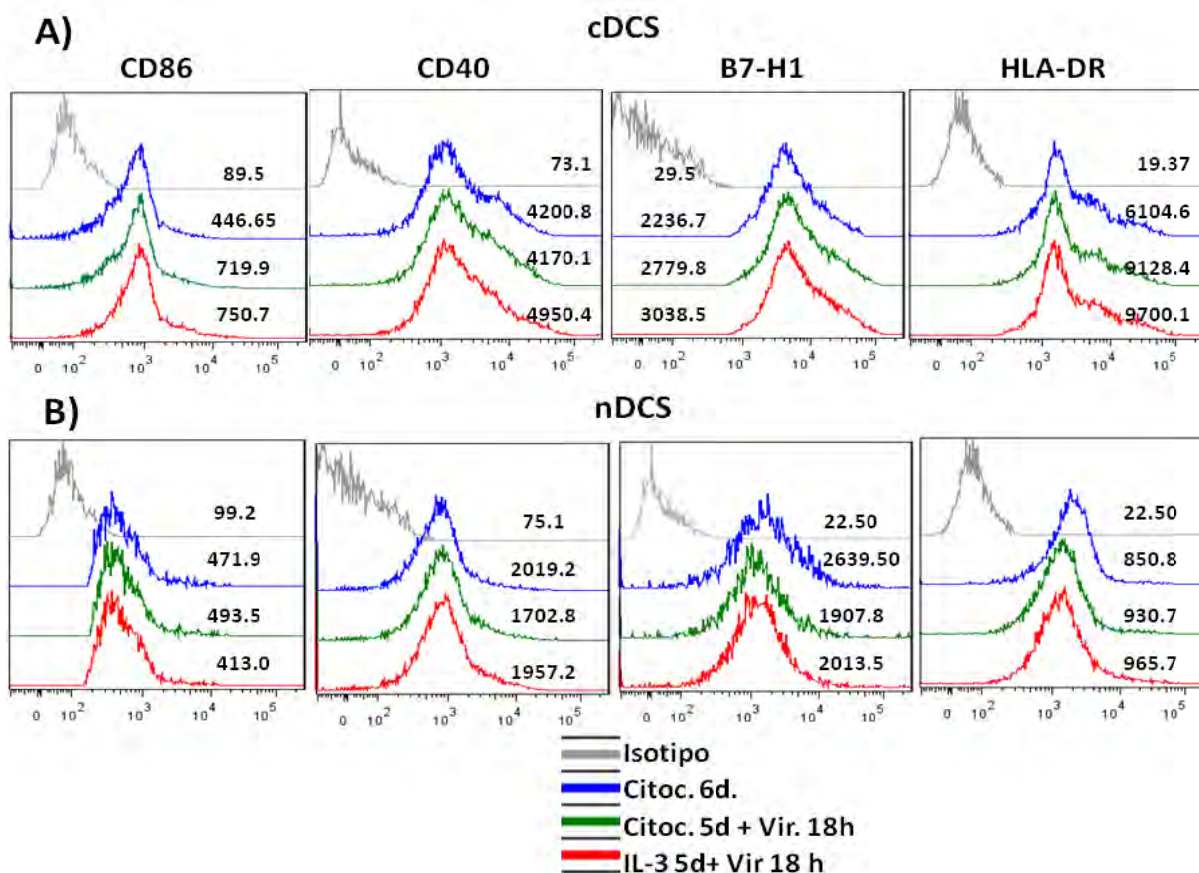


Figura 22. Marcadores de activación 6d. Análisis de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40,CD86), co-inhibidoras (B7-H1) y moléculas de HLA-DR a las 18 horas de cultivo bajo distintas condiciones en las distintas subpoblaciones. Experimento representativo de tres independientes.

Para determinar la funcionalidad de las células a este tiempo de cultivo, se detectó la cantidad de citocinas presentes en los sobrenadantes (**figura 23**). Los resultados obtenidos muestran una vez más que las nDCs en presencia de IL-3 o el cóctel de citocinas más el virus inactivado son capaces de producir IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α . Para IL-6 y TNF- α se detectaron valores similares a los observados a las 18 horas, la producción de IL-1 β se incrementó y la de IL-8 fue menor; aunque en todos los casos los niveles de estas citocinas resultaron menores a los obtenidos con cDCs cultivadas con IL-3 por 5 días y con el virus inactivado durante las últimas 18 horas de cultivo.

Por último se evaluó nuevamente la producción de IFN- α , en los cultivos de cDCs no se detectó esta citocina; y en el caso de las nDCs al ser cultivadas por 6 días en presencia de IL-3 y el virus inactivado se detectaron valores similares a los de los cultivos de 18 horas, y menores al cultivarse por 5 días en presencia de IL-3 y el virus durante las últimas 18 horas de cultivo.

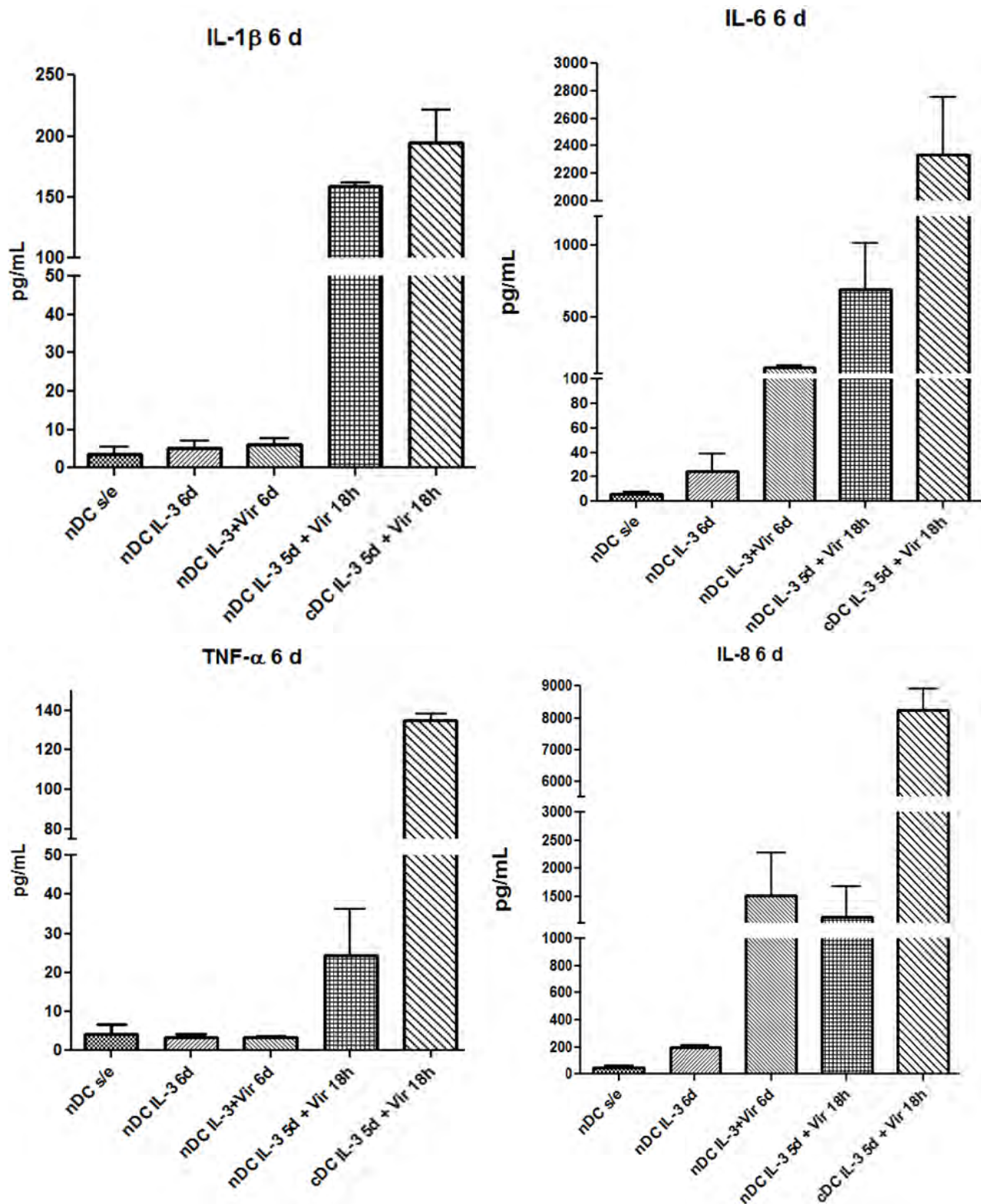


Figura 23. Producción de citocinas pro-inflamatorias a los 6 d. d de cultivo. Cantidad de citocinas detectadas en sobrenadantes de nDCs cultivadas 6d. bajo diferentes condiciones, tomando como controles positivos los sobrenadantes de cultivos de cDCs . En la parte superior se muestran las cantidades detectadas (pg/mL) de IL-1 β e IL-6, y en la parte inferior las cantidades de TNF- α e IL-8.

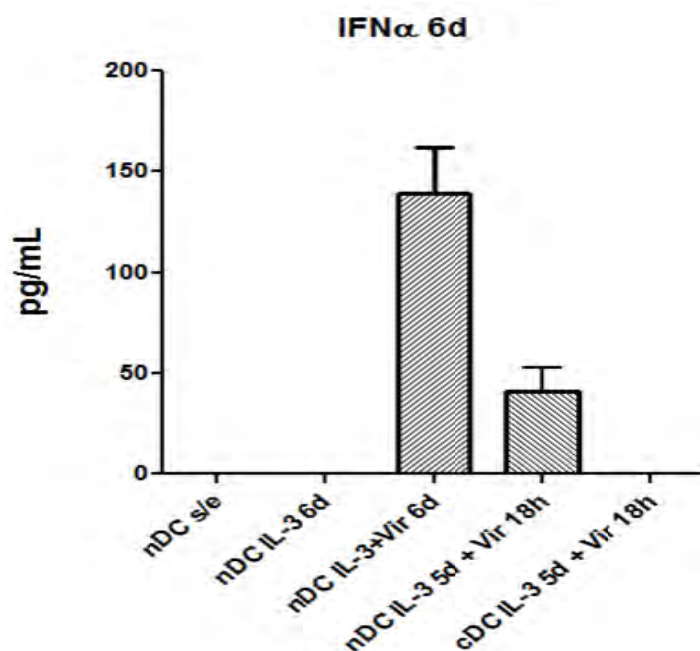


Figura 24. Producción de IFN- α 6d. Cantidad de IFN- α detectado en sobrenadantes de nDCs cultivadas 6d en presencia de IL-3 y virus de influenza inactivado.

14. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Dentro de la caracterización de la población denominada como “nDCs” presente en sangre periférica se obtuvieron resultados interesantes; entre los que destacan: 1) La expresión compartida de diversos marcadores descritos previamente para la identificación de DCs, entre los cuales resaltan de manera importante: CD11b, CD62L y CLA; 2) baja expresión basal de TLR 2, 3 y 4 y elevada expresión de TLR-8; 3) Menor expresión de moléculas co-estimuladoras (CD86), CD40 y moléculas de HLA-DR con respecto a lo observado en cDCs y similar de moléculas co-inhibidoras (B7-H1) en comparación con lo observado en cDCs y pDCs incluso después de activación, 4) expresión basal baja de c-kit (CD117) y flt3 (CD135) similar a lo observado en cDCs; 5) determinación del papel de la IL-3 como factor de supervivencia para la población; 6) cambios morfológicos en respuesta a la IL-3 y el virus de influenza inactivado; 7) producción de citocinas pro-inflamatorias e IFN- α en respuesta a estímulos de carácter viral preferentemente.

Tomando en cuenta los criterios de identificación de nuevas subpoblaciones de DCs[70]; en la primer parte del trabajo nos enfocamos a la caracterización fenotípica de la población, dentro de la cual se analizó la expresión de un panel de marcadores en las distintas subpoblaciones de DCs descritas en la literatura. La población de nDCs en estado basal comparte la expresión de algunos marcadores típicos de DCs (BDCA-2, CD123, etc.) y de manera importante resalta la elevada expresión de CD11b, CD62L y CLA sugiriendo que poseen el potencial de migración de sangre periférica a piel y nódulos linfáticos; lo cual en conjunto con lo observado previamente en sangre periférica de pacientes con psoriasis con actividad moderada (PASI moderado); en los cuales se encontró que la población de nDCs estaba disminuida, sugiere que posiblemente esta población se encuentre migrando constantemente a los sitios de lesión (piel) y esté participando en la patogénesis de la enfermedad. Cabe mencionar que a pesar de que no se logró identificar algún marcador que fuera exclusivo de la población de nDCs; estos resultados nos llevaron a concluir que para la identificación de esta población en sangre periférica es necesario hacer una exclusión de células linaje positivas, así como analizar la expresión de una combinación de marcadores, de igual forma que se hace para la identificación de las otra poblaciones de DCs [82-84]; y aunque fue posible observar que las nDCs comparten la expresión de algunos marcadores típicos de DCs, dicha expresión varía en intensidad con lo observado en otras subpoblaciones de DCs en sangre periférica; por lo cual en estudios posteriores sería interesante utilizar otras metodologías como el análisis de proteómica para identificar marcadores exclusivos de esta población y de ser posible determinar también algún patrón de expresión compartido entre las distintas subpoblaciones de DCs.

Por otra parte se analizó la expresión de moléculas co-estimuladoras, co-inhibidoras y de HLA-DR. La expresión de estas moléculas se ha asociado con la capacidad de una célula para funcionar como célula presentadora de antígeno profesional, así como también con el estado de maduración de las DCs y por lo tanto con la consiguiente inducción de la respuesta inmune mediada por linfocitos T. Los resultados obtenidos en cuanto a marcadores de activación (CD40, CD86, HLA-DR) mostraron nuevamente diferencias claras entre las poblaciones, es importante mencionar que aunque fue posible observar un incremento en la expresión de CD86, CD40 y B7-H1, la expresión de HLA-DR en la población de nDCs siempre fue menor que en el caso de cDCs y pDCs, lo que en conjunto sugiere que en estado basal la población de nDCs presenta un fenotipo similar a lo descrito para DCs inmaduras y junto con la expresión de B7-H1 (molécula co-inhibidora) que ésta pudiera estar relacionada con la inducción de tolerancia inmunológica, como ya se ha reportado para distintas subpoblaciones de DCs en condiciones de reposo o bajo ciertas condiciones de cultivo y microambientes in vivo [85-87].

Además es importante mencionar que en modelos murinos la expresión de moléculas de MHC-II en pDCs es baja, lo que llevó a considerar en un inicio que esta población posea capacidades limitadas para realizar la presentación de antígeno, aunque posteriormente se demostraría que las pDCs son capaces de realizarla aunque con menor eficiencia que las cDCs. La menor expresión de moléculas de HLA-DR observada en las nDCs con respecto a cDCs y pDCs, sugiere que posiblemente esta población tenga una menor capacidad para realizar la presentación de antígenos; por lo que sería importante realizar experimentos para evaluar dicha capacidad, y determinar el papel de esta población en la inducción de RI o TI; el cual es un criterio más dentro de la identificación de subpoblaciones de DCs.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos de células aisladas por citometría de flujo mostraron nuevamente diferencias entre las poblaciones. De manera interesante fue posible determinar que la población de nDCs se activó (por los cambios morfológicos observados) [88] en presencia de IL-3 y virus de la influenza inactivado, y no así en presencia de otros estímulos clásicos utilizados para activar DCs como los son LPS, o Poli I:C entre otros. Estos resultados en conjunto con la expresión diferencial de algunos TLR's en las distintas subpoblaciones, destacando de manera importante la expresión de TLR-8 en las nDCs, sugieren una vez más que aunque la población en estudio comparte características con las otras poblaciones ya descritas; como la expresión de marcadores, capacidad de activación o requerimiento de factores de crecimiento (IL-3), posee características únicas que probablemente sean el reflejo de la especialización funcional de la población.

Es importante mencionar que existen diversos reportes en los que se ha descrito la propiedad de plasticidad que poseen las DCs [2], que consiste en la capacidad para responder diferencialmente a distintos estímulos de maduración así como también al microambiente que las rodea, para de esta manera controlar diversos aspectos de la RI, como la activación de diferentes poblaciones celulares; adicionalmente a esta propiedad de plasticidad podría decirse que las DCs pueden también especializarse (dependiendo de las subpoblaciones) en la realización de funciones específicas como por ejemplo el control de infecciones virales por parte de las pDCs. Por lo cual podríamos decir que las diferencias encontradas hasta el momento en la población de nDCs con respecto a cDCs y pDCs, sugieren precisamente una posible especialización funcional de la población diferente a lo descrito para las cDCs y pDCs y que está relacionada con la elevada expresión de TLR-8 (reconocimiento de RNA de cadena sencilla) y su activación mediada por estímulos de carácter viral preferentemente.

Por otra parte a pesar de que se detectó una expresión similar de TLR-2,3 y 4 en cDCs, pDCs y nDCs, los cultivos celulares mostraron que en presencia de ligandos específicos de estos receptores (LPS, Poli I:C, etc), la población de interés no mostró cambios morfológicos como señal de activación a diferencia de lo observado en cDCs y pDCs bajo las mismas condiciones; esto puede tener dos explicaciones principales: 1) Los niveles de expresión detectados en la población de nDCs son insuficientes para dar como resultado una consecuencia funcional como la activación de la población. 2) Recientemente se ha reportado que en macrófagos, los cuales tienen una elevada expresión de CD11b, esta integrina funciona como regulador negativo de la señalización de TLR's ya que promueve la degradación de las moléculas adaptadoras MyD88 y TRIF [89]; por lo que dicho mecanismo podría estar presente en las nDCs debido a su alta expresión de CD11b.

La determinación de la producción de citocinas pro-inflamatorias mostró que las nDCs al ser estimuladas con ionomicina/PMA fueron capaces de producir IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α ; al estimularse con IL-3 y el virus de influenza inactivado se observaron niveles similares de IL-6 y TNF- α y menores de IL-1 β e IL-8 comparados con lo obtenido para las cDCs bajo las mismas condiciones de cultivo. Estos resultados confirmaron que la población en estudio puede ser activada por el virus de influenza y que dicha activación conduce a la producción de citocinas pro-inflamatorias a niveles similares a los de una cDC. En relación a esto hay estudios en los que se describe que diferentes subpoblaciones de DCs son capaces de producir una serie de quimiocinas tales como CXCL16, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 en respuesta a la activación por virus de influenza y que están involucradas en el reclutamiento de células NK's y linfocitos T de memoria [11]; por lo cual resultaría interesante determinar la capacidad de producción de dichas quimiocinas por parte de las nDCs, de tal forma que se pudiera determinar una posible redundancia o especialización de función entre las distintas poblaciones de DCs; así como también determinar su participación dentro de la respuesta antiviral temprana o tardía a distintas clases de virus, no solo influenza. Adicionalmente retomando la propuesta de que dicha población pudiera estar participando en la inducción de tolerancia inmunológica por las características antes descritas (baja expresión de moléculas de HLA-DR, alta expresión de B7-H1) sería importante también determinar la producción de otras citocinas involucradas en este proceso tales como TGF- β e IL-10 [90, 91].

Por otra parte se sabe que la activación mediada por TLR7/8 puede inducir a su vez la activación de factores transcripcionales involucrados con la producción de IFN- α , la cual se sabe es determinante en la protección contra virus [92, 93]. Los niveles detectados de IFN- α en los cultivos de nDCs fueron similares e incluso mayores a los obtenidos por las pDCs las cuales como ya se mencionó han sido reportadas como las principales productoras de esta citocina [94]. Este resultado confirma una vez más la activación observada en cultivos en presencia de IL-3 y el virus de influenza y correlaciona con la elevada expresión del TLR-8 en las nDCs; el cual pudiera estar mediando la producción de esta citocina; el bloqueo de este receptor y la posterior evaluación del estado de activación de la población de nDCs así como su capacidad de producción de citocinas sería crucial para determinar si este receptor podría estar involucrado en la activación observada con el virus de influenza. Sería relevante además determinar la expresión de otros receptores involucrados en reconocimiento viral como es el caso de los RLR's así como también la presencia de factores transcripcionales como IRF7/8 cuya activación tiene como consecuencia la producción de IFN- α [95, 96].

Con base en los resultados anteriores y con la finalidad de determinar el papel de las nDCs como posibles precursoras de DCs maduras, se analizó la expresión de 2 marcadores: c-kit y flt3; el primero se ha identificado como marcador de células troncales hematopoyéticas y se ha descrito que la expresión de este marcador disminuye gradualmente a lo largo del proceso de diferenciación de los diferentes linajes celulares. La expresión de flt-3 por otra parte ha sido relacionada con el compromiso de células progenitoras hacia linaje de células dendríticas; la expresión de este marcador al igual que c-kit varía de acuerdo al proceso de diferenciación de HSC y se ha descrito que en células de la periferia su expresión es muy baja [69], lo cual concuerda con los resultados obtenidos para las tres poblaciones analizadas.

Los resultados obtenidos para la expresión de c-kit y flt3 sugirieron el potencial de las nDCs como precursoras de DCs maduras. A pesar de que no es posible decir que la población de nDCs es precursora de cDCs o pDCs; los resultados sugieren que dichas poblaciones tienen el mismo origen; es decir que probablemente sea la misma célula progenitora la que sea capaz de dar origen a estas poblaciones con características y funciones diferentes. Es importante mencionar que aunque se determinó el papel de la IL-3 como factor de crecimiento para la población de interés, resultaría interesante determinar la expresión de receptores de otros

factores de crecimiento involucrados en la diferenciación de DCs como es el caso de GM-CSFR [57] y M-CSFR [61]; así como también el análisis de la expresión de diversos factores transcripcionales involucrados en el proceso de diferenciación de las DCs.

Los cultivos a largo plazo (5-6 días) en presencia de IL-3 o un coctel de citocinas (GM-CSF, FL, IL-3) se hicieron con la finalidad de favorecer el proceso de diferenciación de la población en estudio, y aunque los resultados no mostraron diferencias con los cultivos de 18 horas, pudo confirmarse la capacidad de la población de activarse en presencia del virus de influenza inactivado.

Los niveles de producción de citocinas por parte de las nDCs a los 6 días de cultivo mostraron valores similares a los obtenidos en los cultivos a corto plazo y en la mayoría de los casos son inferiores a los determinados para las cDCs; lo cual indica que a pesar de los cambios fenotípicos y morfológicos observados, la producción de citocinas no se incrementa como se hubiera esperado, debido al proceso de diferenciación llevado a cabo durante 5 días de cultivo. De manera interesante se observó una menor producción de INF- α en los cultivos de nDCs al ser cultivadas por 5 días en presencia de IL-3 y en las últimas 18 horas se añadió el virus de influenza. En cambio al ser cultivadas todo el tiempo en presencia de IL-3 y el virus se detectaron valores similares a los obtenidos a las 18 horas de cultivo. Las diferencias observadas en la producción de citocinas sugieren que posiblemente la población de nDCs es capaz de responder de diferente manera ante diversos factores del microambiente que la rodea, así como también a estímulos externos como lo es el caso del virus de influenza; lo cual puede relacionarse con la propiedad de plasticidad descrita previamente como característica de DCs [2].

Una observación importante realizada a los 6 días de cultivo fue el cambio en la expresión de los marcadores CD11b y CD11c, con respecto a lo observado en estado basal y a las 18 horas de cultivo, la expresión de estos marcadores a este tiempo resultó ser bastante similar entre las poblaciones de cDCs y nDCs. Es importante mencionar que a lo largo del trabajo al analizar la expresión de diversos marcadores como TLR-8, CD40, CD86, HLA-DR e incluso CD11b y CD11c (a los 6 días de cultivo), la población de nDCs presentó una expresión heterogénea de estos, sugiriendo que esta población puede estar compuesta a la vez de al menos dos subpoblaciones, como es el caso de cDCs y pDCs en donde se han descrito subpoblaciones de las mismas.

El análisis de la expresión de marcadores de activación después de 6 días de cultivo no mostró diferencias entre las condiciones probadas, y aunque en general se observó un incremento de estos marcadores tanto en cDCs y nDCs; fue posible una vez más determinar diferencias en la expresión entre poblaciones, al igual que lo observado a las 18 horas de cultivo, lo que sugiere una vez más una participación diferente para cada una de estas poblaciones en la inducción de RI.

En términos generales al realizar la caracterización de la población denominada como nDCs, se logró determinar su fenotipo en condiciones basales, de lo cual destacó la expresión de CD11b, CLA y CD62L, que en conjunto con las similitudes observadas con respecto a las cDCs, podría sugerirse que esta población es un posible precursor de DCs maduras con capacidad de migrar a diversos órganos periféricos incluyendo piel, por la elevada expresión de CLA el cual se ha descrito puede dirigir la migración (homing) de linfocitos T a piel [97], así como también a órganos linfoides secundarios mediada por CD62L, lo cual se podría estar relacionado con lo observado previamente en pacientes con Psoriasis (PASI moderado).

Adicionalmente se pudo determinar la producción de citocinas en respuesta a estímulos de activación, e interesantemente se detectó la producción de IFN- α lo cual en conjunto con la elevada expresión de TLR-8 es un indicio de que esta población está relacionada con la respuesta antiviral, aunque sería de gran importancia evaluar su capacidad de activación en presencia de otros virus que señalicen vía este receptor; así como también determinar la expresión de otros receptores involucrados en el reconocimiento viral como es el caso de los RLRs.

Finalmente para poder concluir si la población analizada corresponde a una subpoblación de DCs, es necesario evaluar otras características como la capacidad fagocítica, la capacidad de procesamiento y presentación de antígenos, su posible participación en la inducción de tolerancia; así como también en la inducción de RI mediada por linfocitos T, y la capacidad de la misma de polarizar dicha respuesta hacia distintas subpoblaciones de linfocitos (Th1, Th2...etc.); además de evaluar cambios fenotípicos en presencia de otras citocinas como M-CSF, la cual se ha descrito está involucrada en la diferenciación de precursores de DCs, y finalmente hacer un análisis a nivel molecular de la expresión de factores transcripcionales involucrados en el desarrollo, diferenciación y función de las distintas subpoblaciones de DCs.

Por otra parte es necesario también analizar la expresión de CD2 en esta población con la finalidad de compararla con lo descrito recientemente sobre subpoblaciones de pDCs en el humano. [27]

Es importante mencionar también que la identificación de MDPs y CDPs se ha hecho solamente en modelos murinos, por lo que la identificación de sus contrapartes en el humano resulta un área de investigación abierta y de suma relevancia para la posterior manipulación de las distintas subpoblaciones de DCs presentes en el organismo con la finalidad de diseñar vacunas y terapias celulares.

15. CONCLUSIONES:

- El fenotipo basal de las nDCs sugiere que es una población independiente que comparte algunos marcadores con las poblaciones de DCs descritas en sangre periférica, pero que claramente es posible diferenciarla de estas por la intensidad de expresión de marcadores como CD11b, CLA y CD62L; lo cual a la vez sugiere que esta población tiene la capacidad de migrar a piel y nódulos linfáticos.
- Se determinó que la IL-3 es un factor de crecimiento indispensable para las nDCs.
- La expresión de CD86 y CD40 en la población nDC en estado basal y después de activación es menor a la observada en cDCs y similar al de pDCs de sangre periférica.
- La población de nDCs es capaz de incrementar la expresión de HLA-DR después de activación, aunque siempre en niveles menores a los observados en cDCs y pDCs.
- La población en estudio expresa TLR-8 y puede ser activada por el virus de influenza inactivado.
- La población nDC es capaz de producir citocinas pro-inflamatorias e IFN- α en respuesta al virus de influenza.
- La expresión del TLR-8 y la capacidad de producción de IFN- α por parte de esta población sugieren una activación específica de la misma en respuesta a virus de RNA de cadena sencilla como lo es el caso del virus de influenza.
- La expresión de flt3 es indicio de la relación de la población en estudio con el linaje de células dendríticas.
- La baja expresión en la población nDC de moléculas co-estimuladoras y de moléculas del MHC II con expresión similar de la molécula co-inhibidora B7-H1 comparada con las otras dos poblaciones de DCs aún después de activación sugiere la posible participación de las nDC en la inducción de tolerancia inmunológica.

16. REFERENCIAS:

1. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
2. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
3. Klechevsky, E., et al., *Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines*. Hum Immunol, 2009. **70**(5): p. 281-8.
4. Banchereau, J., et al., *Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 180-7.
5. Palucka, K., et al., *Harnessing dendritic cells to generate cancer vaccines*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 88-98.
6. Banchereau, J., et al., *Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 24-32.
7. Banchereau, J. and A.K. Palucka, *Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(4): p. 296-306.
8. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
9. Ueno, H., et al., *Dendritic cell subsets in health and disease*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 118-42.
10. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
11. Piqueras, B., et al., *Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2613-8.
12. Penna, G., et al., *Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1164-71.
13. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
14. Pierre, P., et al., *Localization and intracellular transport of MHC class II molecules in bone marrow-derived dendritic cells*. Adv Exp Med Biol, 1997. **417**: p. 179-82.
15. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-7.
16. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. Eur J Immunol, 1996. **26**(3): p. 659-68.
17. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En un estudio previo realizado en el laboratorio se lograron identificar claramente por citometría de flujo de 7 colores tres subpoblaciones de células negativas para linaje CD3, CD19, CD14 y CD56 (lin-) en sangre periférica de individuos normales. Estas poblaciones celulares incluyen a las cDCs identificadas como CD123^{int} HLA-DR⁺ CD11c⁺, a las pDCs CD123⁺ HLA-DR⁺ CD11c^{baja} y a una subpoblación identificada como CD123⁺, HLA-DR^{baja}, CD11c^{baja}, la cual no se encuentra descrita en la literatura. Esta población está notablemente reducida en sangre periférica de pacientes con Psoriasis que presentan un grado de actividad moderado. De esta manera resulta de suma importancia estudiar y caracterizar fenotípica y funcionalmente esta población celular para determinar si corresponde a una DC y de ser así si comparte características fenotípicas y funcionales con cDCs, pDCs, o si es una población con características y funciones independientes.

9. HIPÓTESIS:

- La población definida como Lin- CD11c⁻ CD123⁺ HLA-DR^{baja} podría tener características fenotípicas y funcionales correspondientes a una subpoblación de células dendríticas.
- La población definida como Lin- CD11c⁻ CD123⁺ HLA-DR^{baja} compartirá características fenotípicas y funcionales con alguna de las subpoblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica (cDCs o pDCs).
- La población en estudio será una población celular con características fenotípicas y funcionales distintas a las de las poblaciones de DCs descritas.

10. OBJETIVOS GENERALES:

- Caracterizar fenotípicamente y funcionalmente la población celular definida como Lin-CD11c^{baja} CD123⁺ HLA-DR^{baja}
- Determinar si la población en estudio comparte características fenotípicas y funcionales similares a una cDC o a una pDC.
- Determinar si la población en estudio corresponde a una población de DC con características y funciones independientes.

11. OBJETIVOS PARTICULARES:

- ❖ Determinar la expresión de marcadores relacionados con subpoblaciones de células dendríticas en la población de interés.
- ❖ Evaluar cambios morfológicos y fenotípicos después 18 horas de cultivo en presencia de distintos ligandos de TLR's.
- ❖ Determinar la cantidad de citocinas producidas después de 18 horas de cultivo con la finalidad de evaluar la capacidad funcional de la población en estudio.
- ❖ Determinar la expresión de marcadores relacionados con precursores de células dendríticas.
- ❖ Evaluar cambios morfológicos y fenotípicos después 6 días de cultivo en presencia de IL-3, GM-CSF, FL y virus de influenza inactivado.
- ❖ Determinar la cantidad de citocinas producidas después de 6 días de cultivo en presencia de IL-3, GM-CSF, FL y virus de influenza inactivado.

18. Karsunky, H., et al., *Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 305-13.
19. Bruno, L., et al., *Identification of a committed T cell precursor population in adult human peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(5): p. 875-84.
20. Strobl, H., et al., *Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics*. J Immunol, 1998. **161**(2): p. 740-8.
21. Schakel, K., et al., *6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 289-301.
22. Dzionek, A., et al., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6037-46.
23. Zaba, L.C., et al., *Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(1): p. 79-88.
24. MacDonald, K.P., et al., *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4512-20.
25. Ito, T., et al., *A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells*. J Immunol, 1999. **163**(3): p. 1409-19.
26. Cella, M., et al., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon*. Nat Med, 1999. **5**(8): p. 919-23.
27. Matsui, T., et al., *CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions*. J Immunol, 2009. **182**(11): p. 6815-23.
28. Chan, C.W., et al., *Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 207-13.
29. Shortman, K. and J.A. Villadangos, *Is it a DC, is it an NK? No, it's an IKDC*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 167-8.
30. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
31. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 54-65.
32. Jiang, W., et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 151-5.
33. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 33-54.
34. Akira, S., *[Toll-like receptors and innate immune system]*. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2001. **46**(4 Suppl): p. 562-6.

35. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol. **11**(5): p. 373-84.
36. Heil, F., et al., *The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 2987-97.
37. Matsumoto, M., et al., *Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3154-62.
38. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
39. Jarrossay, D., et al., *Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3388-93.
40. Gilliet, M., et al., *Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors*. Arch Dermatol, 2004. **140**(12): p. 1490-5.
41. Macatonia, S.E., et al., *Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5071-9.
42. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses*. Immunity, 2003. **19**(5): p. 641-4.
43. Uhlig, H.H., et al., *Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 309-18.
44. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
45. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
46. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 275-306.
47. Lowes, M.A., et al., *Increase in TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19057-62.
48. Feldmann, M. and R.N. Maini, *Lasker Clinical Medical Research Award. TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1245-50.
49. Baechler, E.C., et al., *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2610-5.

50. Bennett, L., et al., *Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 711-23.
51. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1693-702.
52. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
53. Brasel, K., et al., *Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures*. Blood, 2000. **96**(9): p. 3029-39.
54. Xu, Y., et al., *Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7577-84.
55. Gilliet, M., et al., *The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*. J Exp Med, 2002. **195**(7): p. 953-8.
56. McKenna, H.J., *Role of hematopoietic growth factors/flt3 ligand in expansion and regulation of dendritic cells*. Curr Opin Hematol, 2001. **8**(3): p. 149-54.
57. Kingston, D., et al., *The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis*. Blood, 2009. **114**(4): p. 835-43.
58. Brasel, K., et al., *Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice*. Blood, 1996. **88**(6): p. 2004-12.
59. Bjorck, P., *Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice*. Blood, 2001. **98**(13): p. 3520-6.
60. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, 2006. **7**(3): p. 265-73.
61. Fancke, B., et al., *M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin*. Blood, 2008. **111**(1): p. 150-9.
62. Fogg, D.K., et al., *A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells*. Science, 2006. **311**(5757): p. 83-7.
63. Waskow, C., et al., *The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues*. Nat Immunol, 2008. **9**(6): p. 676-83.
64. Liu, K., et al., *In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis*. Science, 2009. **324**(5925): p. 392-7.

65. Naik, S.H., et al., *Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 663-71.
66. Onai, N., et al., *Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow*. Nat Immunol, 2007. **8**(11): p. 1207-16.
67. Diao, J., et al., *Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1826-33.
68. Liu, K., et al., *Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 578-83.
69. Schmid, M.A., et al., *Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment*. Immunol Rev. **234**(1): p. 32-44.
70. Steinman, R.M. and J. Idoyaga, *Features of the dendritic cell lineage*. Immunol Rev. **234**(1): p. 5-17.
71. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nat Immunol, 2005. **6**(3): p. 280-6.
72. Luo, X., et al., *Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2821-6.
73. Cisse, B., et al., *Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development*. Cell, 2008. **135**(1): p. 37-48.
74. Robinson, M.J., et al., *Myeloid C-type lectins in innate immunity*. Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1258-65.
75. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
76. Webster, R.G., et al., *Evolution and ecology of influenza A viruses*. Microbiol Rev, 1992. **56**(1): p. 152-79.
77. Gorman, O.T., W.J. Bean, and R.G. Webster, *Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 75-97.
78. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
79. Lund, J.M., et al., *Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(15): p. 5598-603.
80. Kato, H., et al., *Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
81. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. Nat Immunol, 2005. **6**(10): p. 981-8.

82. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 487-93.
83. Robinson, S.P., et al., *Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(9): p. 2769-78.
84. Thomas, R., L.S. Davis, and P.E. Lipsky, *Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells*. J Immunol, 1993. **150**(3): p. 821-34.
85. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 515-48.
86. Moser, M., *Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?* Immunity, 2003. **19**(1): p. 5-8.
87. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 769-79.
88. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
89. Han, C., et al., *Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 734-42.
90. Torres-Aguilar, H., et al., *Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 1765-75.
91. Tisch, R., *Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation*. Int Rev Immunol, 2010. **29**(2): p. 111-8.
92. Sen, G.C., *Viruses and interferons*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 255-81.
93. Stetson, D.B. and R. Medzhitov, *Antiviral defense: interferons and beyond*. J Exp Med, 2006. **203**(8): p. 1837-41.
94. Asselin-Paturel, C. and G. Trinchieri, *Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond*. J Exp Med, 2005. **202**(4): p. 461-5.
95. Daffis, S., et al., *Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8465-75.
96. Tailor, P., T. Tamura, and K. Ozato, *IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells*. Cell Res, 2006. **16**(2): p. 134-40.
97. Santamaria-Babi, L.F., *CLA(+) T cells in cutaneous diseases*. Eur J Dermatol, 2004. **14**(1): p. 13-8.