

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
"ISMAEL COSIO VILLEGAS"

Importancia de la caracterización fenotípica y funcional de linfocitos T en tejido amigdalino en pacientes que fueron candidatos a una amigdalectomía

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
OTORRINOLARINGOLOGÍA Y CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO**

PRESENTA:

JOSÉ ANTONIO TALAYERO PETRA

ASESOR PRINCIPAL:

DRA. MARÍA ISABEL SADA OVALLE.

CO-ASESORES:

DR. ARMANDO CASTORENA MALDONADO.

DR. ANTONIO SODA MERHY.

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA Y

CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO:

DR. ANTONIO SODA MERHY.

MÉXICO D.F.,

AGOSTO DE 2011



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.

DR. JORGE SALAS HERNANDEZ
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DRA. MARIA ISABEL SADA OVALLE
TUTOR DE TESIS
LABORATORIO DE INMUNOLOGIA INTEGRATIVA
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DR. ANTONIO SODA MERHY
CO-TUTOR DE TESIS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE OTORRINOLARINGOLOGIA Y
CIRUGÍA DE CABEZA Y CUELLO
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

DR. ARMANDO CASTORENA MALDONADO
CO-TUTOR DE TESIS
DEPARTAMENTO DE TRASTORNOS RESPIRATORIOS DEL DORMIR
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Isabel Sada Ovalle, por su tiempo, enseñanzas, consejos, dedicación y apoyo incondicional para la realización y culminación de este proyecto. Asimismo quisiera agradecer al equipo del laboratorio de Inmunología Integrativa, en especial a Leslie Chávez Galán, por todo su apoyo.

Al Dr. Antonio Soda, por sus valiosos consejos y enseñanzas útiles para mi formación, así como por su paciencia y por haberme dado la oportunidad de estar en esta maravillosa sede para realizar la especialidad.

Al Dr. Armando Castorena por su interés, amabilidad y apoyo brindado. Asimismo quisiera agradecer a todo el servicio de la clínica de trastornos respiratorios del dormir por su apoyo y amabilidad.

A mis maestros y médicos adscritos, por su amistad, apoyo incondicional e interés en mi formación académica y en mi persona. Al Dr. Arturo Ramírez, por ser paciente y brindarme su apoyo y confianza en todo momento. Al Dr. Gabriel Tona, por ser tan buen amigo, por darme la oportunidad de conocer nuevos horizontes y por cuidar de mí en el sentido académico y personal durante mi residencia. Al Dr. Alejandro Jiménez, por su apoyo incondicional, amistad, su confianza hacia mi persona y por sus enseñanzas. A la Dra. Lisette Cristerna, por sus valiosas enseñanzas y consejos, por su apoyo e interés en mi aprendizaje, y por buscar explotar mis potenciales para poder ser un mejor médico. Al Dr. Fernando Arredondo, por impulsarme a tratar de ser mejor y por el apoyo y confianza brindado en todo momento. Al Dr. Bernardo Dávila, por creer en mí y por apoyarme en momentos difíciles. A la Dra. Ma. Lidia Sánchez, por las oportunidades brindadas, por su paciencia, enseñanzas y dedicación. A la Dra. Lizette Carranco, por sus enseñanzas, por creer en mí y por darme refugio y apoyarme ante todas las circunstancias. A la Dra. Carmen Tirado, por hacerme saber quién soy y hacerme dar cuenta de lo que tengo y puedo dar. A la Dra. María Prieto, por su alegría y motivación, por todas sus enseñanzas. A la Lic. Ivonne Mayer, por ser una persona alegre y dulce, por sus enseñanzas y su motivación.

A mis entrañables amigos y compañeros de generación, por todas las experiencias vividas, por todos los momentos críticos y de alegría por los que pasamos, pero principalmente, por su apoyo incondicional y por su confianza. Gracias por abrir su corazón y dejarme entrar en sus vidas: Iván González, Raúl Ortiz y Jenny Prado.

A todos mis amigos residentes con quien tuve la oportunidad de trabajar. Gracias por hacer de mí una mejor persona, gracias por recordarme que en la medicina además del trabajo y la academia, hay un espacio para el amor y la hermandad. Gracias a: Rosalba González, Iohannan Rodríguez, Rosd Berto Castellanos, Daniel Figueredo, Iván Schobert, Mario Dávalos, Ingeborg Gunther, Laura Espinosa, Karen Reyes, Karla Sámano, Jaime Otañez, Gabriel Carrasco, Jesús Báez, Erika Michaca, Mario Mújica, Erika Valdés, Fabiola Martínez, Guadalupe Góngora, Claudia del Cid, Miriam Lara y Lizette Corona.

Al personal de enfermería del INER, así como al personal de trabajo social, técnico y administrativo, quienes siempre me apoyaron, ayudaron y me brindaron la mano ante cualquier situación. Gracias a todos por ser parte de mi formación y por ser parte de un proceso de tanta importancia para mi vida. Gracias a: Ana María Solís, Cecilia Vázquez, Martha Chávez, Porfiria Aguilar Romero, Ma de Jesús Castillo, Alicia Guevara, Lety Hernández Ayala, Rosy, Vicky, Nancy, Paty Reyes, Betty García Rebolledo, Emma Zazueta Carpintero, Marthita García García[†], Carmelita Pérez Escobar, Cecilia Martínez Ramírez, Teresa Nájera Mora, Agustina Osnaya, Norma Margarita González, Norma Laura Sánchez Lezama, Sonia Paz, Sonia Juárez, Julia Luna, Oscar Senovio, Paula Fernández, Vianey Martínez, Ana Bertha Ruiz, Mayra Nazario, Marcela de Jesús Silverio, Rosaura, Mercedes Mendoza, Gabriela Esquivel González, Irma Velázquez, Jessica Minero, Andrea Juárez Mendieta, Erika Alvarez González, Maggy Moisen, Alejandra Godoy, Rita Montiel, Blanca Ramírez, Ana Ma. Hdez., Adriana Acosta, Odilón García, Isela Basurto, Enedina Benito Marcelo, Víctor, Reyna Pérez Rodríguez, Rosalía Valencia Castellanos, Rafael Heredia León, Víctor Manuel Anaya, Dolores Flores Herrera, Guadalupe Cruz. Faltan evidentemente muchas más personas por mencionar, imposible poder hacerlo en tan poco espacio, pero gracias a todos ellos y a muchos más.

A mis mejores amigos, quienes he conocido a lo largo de mi vida, que indudablemente han formado una parte vital en mi forma de pensar y actuar, que me han dado mucho y que han llenado mi corazón de alegría. Gracias por darme la mano aunque no se los pida, gracias por su apoyo y amistad incondicional. Sé que nuestra amistad será por siempre. Gracias a: Maricruz Souto, Gabriel Resa, Antonio Alvarez, Francisco Mendoza, Andrés Alcántara, Aldo Bauza. Gracias a todos mis amigos y compañeros de la infancia, adolescencia y a los que conocí en la licenciatura.

A Esther Pirod, por ser tan buena amiga, por ser un apoyo para mí y mi familia, por tener un gran corazón y por querer verme crecer y alegrarse de mis logros y éxitos. Gracias por todo.

DEDICATORIA

A mis padres, Ileana Petra Micu y José Antonio Talayero Uriarte. Gracias por darme la vida, por darme tanto amor y por preocuparse tanto por mí. Gracias por ser parte de mi formación académica y personal. Gracias por todas esas mañanas, tardes y noches dedicadas, pendientes cada uno de ustedes en sus respectivos momentos, por mi formación, bienestar, salud, progreso y logros. Gracias a ustedes soy la persona que soy actualmente. Tengo mucho que agradecer y estoy en deuda con ustedes..., deuda que nunca podré pagar pues el trabajo que han hecho, y el amor con el que lo han hecho, es ilimitado. Los admiro y quiero como a nadie.

A Walkiria Zamudio, aquélla persona que ha robado mi corazón y que ha sido mi musa e inspiración. Gracias por el amor, cariño y confianza. Gracias por acompañarme en este camino, por apoyarme y hacerme mejor día con día. Gracias por tu fidelidad, sinceridad y amistad. Gracias por sólo interesarte en mí bien y por querer verme crecer. Simplemente, gracias por existir. Esto sólo es el inicio de algo grande, de un proyecto de vida en donde quiero que mi corazón envejezca junto al tuyo y que tu alma se vuelva inmortal junto al mío. Gracias por ser la persona que más amo en esta vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
INDICE.....	1
RESUMEN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
JUSTIFICACIÓN.....	9
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	42
REFERENCIAS.....	43

RESUMEN

IMPORTANCIA DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LINFOCITOS T EN TEJIDO AMIGDALINO EN PACIENTES QUE FUERON CANDIDATOS A UNA AMIGDALECTOMÍA.

Introducción. Las amígdalas palatinas son el sitio en donde una gran variedad de patógenos se multiplican y persisten de manera indefinida, por esta razón la participación de los linfocitos T Y B es fundamental. En casos de amigdalitis crónica o recurrente, los procesos de presentación antigénica y activación pueden verse modificados. Por estos motivos podría considerarse como una ventaja potencial el remover de forma terapéutica las amígdalas enfermas de forma crónica o recurrente.

Objetivos. Identificar las principales características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T, B y células dendríticas provenientes de amígdalas palatinas en niños candidatos a amigdalectomía. Valorar el impacto terapéutico que puede representar lo anterior para ser considerado como un punto adicional y a favor en la toma de decisiones para someter a un paciente a un procedimiento quirúrgico.

Pacientes y métodos. Se incluyeron a 10 pacientes en edad pediátrica con indicación de amigdalectomía. Una vez realizado el procedimiento quirúrgico, se obtuvieron las células mononucleares palatinas (CMNP) y se identificaron las subpoblaciones linfoides y mieloides mediante citometría de flujo. Posteriormente se identificaron los linfocitos T CD4+ antígeno específicos y se evaluó la capacidad de degranulación de los linfocitos T CD8+. Por último, se caracterizó a las células dendríticas.

Resultados. La frecuencia de linfocitos T CD3+ fue de 18 ± 2.49 , linfocitos T CD4+ (73.9 ± 8.3), linfocitos T CD8+ (14.7 ± 5.2) y linfocitos B totales (32.9 ± 11.3). El ratio CD4:CD8 fue de 5.02, 3 veces más alto de lo observado tradicionalmente en sangre periférica. También se evaluó la capacidad funcional de los linfocitos T CD4+ mediante la expresión del marcador CD154, encontrando que el 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresan CD154 de manera espontánea y el 9.8% después de 4 horas de estimulación del TCR con enterotoxina B de estafilococo. En el ensayo de degranulación de los linfocitos T CD8+ se identificó que 30 minutos después del estímulo, los linfocitos T CD8+ expresaron CD107a/b en la membrana plasmática. Se identificó una relación inversa con la expresión de perforina intracelular. Estos resultados demuestran que los linfocitos T CD8+ de la amígdala palatina son funcionales ya que responden a la activación in vitro y tienen una adecuada capacidad de liberación de perforina. Por último se estudiaron las poblaciones de células dendríticas (CDs), tanto mieloides (mDC) (CD11c+) como las plasmocitoides (pDC) (CD123+). Nuestros resultados demuestran que en tejido amigdalino hay 1.39% de mDC y 0.19% pDC. Se identificaron en éstas mayor expresión de marcadores de activación en la subpoblación de plasmocitoides, y se encontró una adecuada funcionalidad para ambas poblaciones.

Conclusiones. Los linfocitos T, B y células dendríticas son funcionales en el tejido amigdalino a pesar de presentar estimulación crónica secundaria a cuadros de faringoamigdalitis de repetición. Consideramos que es necesario estudiar y justificar de forma más estricta quienes son los pacientes candidatos a una amigdalectomía.

Palabras clave: Linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas, amigdalectomía, faringoamigdalitis de repetición, amigdalitis crónica.

I. ANTECEDENTES

Histología e inmunología de las amígdalas palatinas

Las amígdalas y adenoides son órganos linfoides en donde predominan las células B; éstos representan el 50 – 60% de todos los linfocitos en dichos órganos. Los linfocitos T comprenden aproximadamente el 40% de los linfocitos, mientras que el 3% lo constituyen las células plasmáticas maduras. Por el contrario, el 70% de los linfocitos en sangre periférica son linfocitos T. Las amígdalas palatinas y adenoides están involucradas en la inmunidad secretora y en la regulación de la producción de inmunoglobulinas secretoras (1).

Las amígdalas palatinas no tienen vasos linfáticos aferentes y contienen 10-30 criptas (invaginaciones) que van hacia el parénquima y están delimitados por un epitelio escamoso especializado para el procesamiento antigénico. Este epitelio críptico tiene un complejo sistema de células presentadoras de antígenos y de microporos que dirigen los antígenos a las células linfoides inmunológicamente activas por debajo del epitelio tonsilar (hacia el folículo linfoide). Existen cuatro zonas o compartimentos inmunorreactivos que son importantes y que están involucradas en el procesamiento antigénico: 1) Epitelio escamoso especializado con células reticulares; 2) Área extrafolicular (rico en células T); 3) Zona de manta del folículo linfoideo y 4) Centro germinal

(células B). Un fenómeno opuesto puede identificarse en los linfonodos ya que éstos dependen de la entrega antigénica a través de linfáticos aferentes (1, 2).

Las amígdalas palatinas son el sitio en donde una gran variedad de patógenos se multiplican y persisten de manera indefinida, por esta razón la participación de los linfocitos T (CD4+ y CD8+) es fundamental. Ambas poblaciones de linfocitos tienen la capacidad de controlar la diseminación bacteriana promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias y a través de su actividad citotóxica (3). Los linfocitos B CD19+ también participan activamente ya que promueven la producción de anticuerpos neutralizantes en contra de los principales virus respiratorios (4). No menos importante es la presencia de los múltiples tipos de células dendríticas (CD), las cuales funcionan como células presentadoras de antígeno promoviendo la activación de los linfocitos T que no han tenido experiencia antigénica (5).

Fisiología y fisiopatología de las amígdalas palatinas

Las amígdalas palatinas representan la principal barrera protectora del tracto digestivo y respiratorio contra potenciales patógenos invasores. Amígdalas y adenoides son órganos inmunológicamente activos que generalmente refuerzan la inmunidad dependiente de las mucosas de todo el tracto aerodigestivo superior. Son también expuestas de manera continua a una gran variedad de estímulos físicos y químicos tales como: contaminantes del medio ambiente, alcohol, humo de tabaco y ácidos gástricos, todos ellos pueden

modificar las características fenotípicas y funcionales de las células del sistema inmune presentes en este tejido linfoideo (1, 6, 7).

Las amígdalas en el ser humano son inmunológicamente más activas entre los 3 y 10 años de edad. La involución de éstas ocurre después de la pubertad, resultado en una disminución de la población de células B y un aumento relativo del radio entre células T y células B. A pesar de que la función en la producción global de inmunoglobulinas se ve afectada, todavía se llega a ver una actividad considerable de las células B en amígdalas sanas de pacientes de 80 años de edad (8). Esta situación es distinta en pacientes con cambios relacionados con la enfermedad, como cuando existe amigdalitis de repetición o hay hipertrofia adenoidea.

Las células M que se encuentran en el sistema de canales especializados del epitelio amigdalino reticulado y críptico, capturan los antígenos en vesículas y los transportan a la región extrafolicular o a los folículos linfoides. En la región extrafolicular las células dendríticas interdigitantes y macrófagos procesan los antígenos y los presentan a los linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Estos linfocitos T estimulan la proliferación de los linfocitos B foliculares y su desarrollo en células B de memoria que secretan anticuerpos capaces de migrar a nasofaringe y otros sitios, o en células plasmáticas que producen anticuerpos y los liberan en el lumen de la cripta (9).

La exocitosis granular ó liberación de gránulos citotóxicos es uno de los mecanismos claves presentes en los linfocitos T CD8+ y células NK para eliminar células infectadas por virus y células tumorales. Los gránulos

citotóxicos son lisosomas secretores especializados que contienen proteínas formadoras de poros conocidas como perforinas, y una familia de proteasas de serina conocidas como granzimas. Las granzimas son inicialmente pro-enzimas inactivas que se convierten en enzimas activas a través de la acción de la catepsina C. Las granzimas A y B son las más abundantes, en particular la granzima B, quien participa en la activación de la vía de las caspasas que llevan a la inducción de la apoptosis (10).

En casos de amigdalitis crónica o recurrente, el proceso controlado de transporte y presentación antigénica puede verse modificado debido a la pérdida de células M del epitelio amigdalino (9). La respuesta inflamatoria crónica puede mediar la transformación del epitelio reticular críptico en un epitelio queratinizado que limite la funcionalidad de los linfocitos T y B (11). Se ha propuesto que estos cambios puedan modificar la frecuencia, distribución y nivel de activación de los linfocitos B en el centro germinal y por ende la producción de anticuerpos.

En casos de amigdalitis crónica o de repetición los linfocitos T y B se encuentran sometidos a estimulación crónica persistente y esto puede limitar al menos teóricamente su capacidad funcional y de protección. Esto por tanto resulta en una ventaja potencial de remover de forma terapéutica las amígdalas enfermas de forma crónica o recurrente (12). Sin embargo, no hay estudios a la fecha que demuestren el impacto clínico significativo de la amigdalectomía en el sistema inmune o en la producción final de sustancias efectoras a nivel local.

En contraste con la amigdalitis de repetición, en la hiperplasia adenoidea los cambios son menos pronunciados, pues las condiciones inmunorreguladoras necesarias para el mantenimiento de la población de las células B se encuentran bien conservados. Se presume que la razón para esto se debe a que el epitelio reticular está menos afectado en la inflamación adenoidea que la amigdalina (1).

Impacto en la función inmunológica de pacientes candidatos a amigdalectomía

Las funciones inmunológicas tanto de amígdalas como de adenoides han llevado a la elaboración de una serie de argumentos en contra de una adenoamigdalectomía. Existe una gran controversia en cuanto a los beneficios de la extirpación de un tejido crónicamente inflamado contra la posibilidad de un daño ante una amigdalectomía al eliminar una fuente local importante de defensa del huésped (13). La pregunta de si la extirpación de amígdalas y adenoides compromete la protección de la vía aérea superior resultando en cierto nivel de inmunodeficiencia continúa siendo tema de debate (14). Varios investigadores han documentado una disminución en los niveles de inmunoglobulinas posterior a la adenoamigdalectomía, mientras que otros no han encontrado cambios significativos. Sin embargo varios estudios sugieren que este procedimiento quirúrgico no modifica el desarrollo inmunológico del paciente que lo pudiese llevar a un estado de inmunodeficiencia (15).

Adenoamigdalectomía. Criterios y justificaciones para su realización.

La amigdalectomía es uno de los procedimientos quirúrgicos más frecuentes en Estados Unidos, siendo la segunda causa de cirugía ambulatoria más común, con más de 530 mil cirugías anualmente en niños menores de 15 años (16).

Las dos indicaciones más comunes para amigdalectomía son cuadros de faringoamigdalitis de repetición y trastornos respiratorios del dormir (TRD), en particular el síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS). Ambos pueden sustancialmente afectar tanto la salud como la calidad de vida en el niño. (12, 17, 18).

II. JUSTIFICACIÓN

Existe poca información acerca de las diferentes subpoblaciones linfocitarias que se pueden identificar en el tejido amigdalino así como de su capacidad funcional en el contexto de un tejido linfoide crónicamente expuesto a múltiples estímulos, muchos de los cuales son de origen infeccioso (amigdalitis recurrente).

Explorar las principales características fenotípicas de los linfocitos T provenientes del tejido amigdalino y analizar si estos conservan su función, nos permitiría conocer a mayor profundidad el tipo de respuesta inmune a nivel de un órgano linfoide secundario.

Este conocimiento sería relevante ya que nos permitiría, al menos teóricamente, tener un mayor número de elementos científicos para indicar la amigdalectomía en pacientes con justificación para ello.

III. HIPÓTESIS

Este estudio tiene un carácter meramente descriptivo acerca de subpoblaciones linfocitarias en tejido amigdalino; por lo tanto, no existe una hipótesis con magnitud y dirección.

Consideramos que algunas de las subpoblaciones de linfocitos T pudieran tener una menor capacidad de respuesta a la estimulación antigénica, haciendo que la hipofuncionalidad de las mismas sea considerada como un punto adicional y relevante a considerar para someter a un paciente a tratamiento quirúrgico.

IV. OBJETIVOS

Generales:

1. Identificar las principales características fenotípicas y funcionales de los linfocitos T CD4+, CD8+ y células dendríticas (CDs) provenientes de las amígdalas palatinas de niños candidatos a amigdalectomía.
2. De acuerdo a los resultados del punto anterior, valorar el impacto terapéutico que puede representar para ser considerado como un punto adicional y a favor en la toma de decisiones para someter a un paciente a un procedimiento quirúrgico.

Específicos:

1. Estandarizar la metodología para la obtención de células mononucleadas de tejido amigdalino.
2. Identificar la frecuencia de linfocitos T CD4+, CD8+ y subpoblaciones de CDs en tejido amigdalino.
3. Identificar la frecuencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ antígeno específicos.
4. Medir la capacidad funcional de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en base a su habilidad para producir perforina y granzima A.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Estudio

Prospectivo, Observacional, Transversal.

Pacientes

Se incluyeron a 10 pacientes en edad pediátrica con indicación de adenoamigdalectomía. Se les invitó a participar en el estudio tanto a los padres o tutores, como al paciente, firmando así una carta de consentimiento informado de aceptación. Este protocolo fue aprobado por el Comité Institucional de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER “ICV”).

Criterios de Inclusión:

1. Pacientes pediátricos desde los 2 hasta los 14 años de edad.
2. Pacientes que cuenten con los criterios para realización de una amigdalectomía o adenoamigdalectomía.
3. Género indistinto
4. Aceptación y firma de consentimiento informado para participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con alguna enfermedad sistémica u otra forma de inmunodepresión.

2. Pacientes candidatos a amigdalectomía con otro diagnóstico que no es sujeto a estudio para este trabajo (sospecha de neoplasia o afección linfoproliferativa).
3. Pacientes con inmunodeficiencias u otro trastorno inmunológico.
4. Pacientes quienes no acepten firmar cartas de consentimiento informado.

Estudios y procedimientos

Realización de la amigdalectomía

1. Previa anestesia general e intubación orotraqueal, se colocan campos estériles sobre paciente en decúbito supino, así como abreboca de Mc Ivor.
2. Se identifican amígdalas palatinas, y con pinza de Allis se pinza polo superior de amígdala izquierda y se medializa, se realiza incisión en plica triangularis con bisturí falciforme y se disecciona con tijera de Knight hasta encontrar plano subcapsular.
3. Se continúa disección con disector de Hurd hasta polo inferior, para terminar extrayendo la amígdala con el asa de Tyding.
4. Se realiza hemostasia con pinza bipolar en sitios sangrantes del lecho amigdalino, y de ser necesario se colocan puntos hemostáticos con sutura catgut 3-0.
5. Se palpan adenoides; de ser obstructivos se retiran con adenotomo libre o de canastilla.
6. Se realiza mismo procedimiento en amígdala derecha.

7. Se realizan lavados en nasofaringe con solución hasta obtenerse agua de roca.
8. Se verifica hemostasia y se da por terminado el procedimiento quirúrgico.

Inmediatamente después de haber retirado la amígdala palatina izquierda, se le entregó a la enfermera instrumentista para que la misma, y con ayuda de la enfermera circulante, fuera depositada en medio RPMI 1640 suplementada y estéril, proporcionado en un inicio por parte del servicio de Inmunología Integrativa del Instituto. La enfermera circulante entregó el tejido recolectado y en el medio correspondiente al personal de Inmunología Integrativa. La muestra se procesó en un lapso no mayor a 60 minutos.

Obtención de Células Mononucleares Palatinas (CMNP)

1. Una vez realizada la amigdalectomía se colocaron en un tubo plástico de 50 ml en medio de cultivo RPMI 1640 frío hasta su procesamiento.
Nota: dado que la viabilidad del tejido disminuye con el tiempo hay que procesarlas en un tiempo máximo de 3 hrs.
2. Se transfirieron las amígdalas palatinas en un plato de Petri que contiene 20 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado (10% suero fetal bovino, 2% HEPES, 10% L-glutamina, 10% penicilina-estreptomicina, 10% aminoácido esenciales, 10% aminoácidos no esenciales, 10% piruvato de sodio).
3. Se cortó el tejido amigdalino en pequeños fragmentos de 2-3 mm con tijeras de disección.

4. Con la ayuda de pinzas de disección estériles se transfirieron los fragmentos de tejido amigdalino a un colador metálico el cual cuenta con una malla de 60 μm . Con la ayuda del émbolo estéril de una jeringa de 3cc se realizaron pequeños movimientos circulares para homogeneizar el tejido y facilitar el paso de las células. Se adicionaron 1-2 ml de medio de cultivo cada vez que fue necesario.
5. Se colocó un filtro para células (marca Falcón, 10- μm) en un tubo cónico de 50 mL y se pasó a través de este la suspensión celular con la finalidad de eliminar el resto de los fragmentos tisulares.
6. Se transfirió la suspensión celular a tubos cónicos de 10 ml que contenían 3 ml de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077) y se centrifugaron por 30 minutos a 1700 rpm. Se aceleró y desaceleró sin freno.
7. Se colectaron las células mononucleadas de la interfase, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en RPMI 1640 suplementado a una concentración de 1×10^6 células/mL.
8. Se evaluó la viabilidad celular por el método de exclusión del colorante azul de tripano.

Identificación de subpoblaciones linfoides y mieloides en tejido amigdalino

Para identificar la frecuencia de las poblaciones de células linfoides y mieloides presentes en el tejido amigdalino se utilizaron los siguientes anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, CD20, CD40, CD80, CD83, CD86, CD123 y HLA-DR.

Protocolo de tinción: se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con 50 µl del coctel de anticuerpos previamente diseñado. Posteriormente las células se lavaron con buffer salino-fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) y se analizaron con el software FlowJo (Tree Star).

Identificación de linfocitos T antígeno específicos

Se resuspendieron las CMNP a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI 1640 suplementado y se sembraron en placas de cultivo (Costar) de 24 pozos. Se adicionó el anticuerpo anti-CD154-APC humano (previamente titulado) a cada uno de los pozos según la correspondencia al diseño experimental deseado. Se adicionó monensina y brefeldina ($2 \mu\text{M}$ [$5 \mu\text{g/mL}$], concentración final) a cada uno de los pozos según correspondía. Para los pozos que requirieron ser estimulados, se adicionó 1 µl de enterotoxina B del estafilococo (SEB). Se incubó la placa durante 12-24 hrs a 37°C, 5% CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se continuó con el protocolo de tinción.

Evaluación de la capacidad de degranulación de los linfocitos T CD4 y CD8+

Se resuspendieron las CMNP a una concentración de 1×10^6 células/mL en RPMI 1640 suplementado y se sembraron en placas de cultivo (Costar) de 24 pozos. Se adicionaron los anticuerpos anti-CD107a-PE y anti-CD107b-FITC previo a la estimulación antigénica. Para los pozos que requirieron ser estimulados, se adicionó 1 µl de enterotoxina B del estafilococo (SEB) o PMA 10ng/ml (phorbol myristate acetate) más ionomicina $1 \mu\text{M}$ de acuerdo al diseño

experimental deseado. Se incubó la placa durante 6 hrs a 37°C, 5% CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se continuó con el protocolo de tinción.

Citometría de flujo multiparamétrica y Protocolo de tinción.

1. Para la caracterización fenotípica y funcional de los linfocitos T antígeno específicos se utilizaran los siguientes anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69, CD107a, CD107b, CD154 y CCR7.

Intracelular: IFN-gamma.

2. Para la caracterización fenotípica de las células dendríticas se utilizaran anticuerpos dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD1a, CD11b, CD11c, CD68, CD123, CCR7 y HLA-DR.

Protocolo de tinción: Se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente con 50 µl del coctel de anticuerpos previamente diseñado. Posteriormente las células se lavaron con buffer salino-fosfato (PBS) y se fijaron en paraformaldehído al 1%. Las muestras se adquirieron en un citómetro FACSAria (BD Biosciences) y se analizaran con el software FlowJo (Tree Star).

Análisis estadístico

Los datos son expresados como proporciones y mediana y rango intercuartilar.

Se consideró como significativo a un valor de $p < 0.05$.

Limitaciones del proyecto

La descripción fenotípica y funcional de las células del sistema inmune presente en los órganos linfoides secundarios puede ser mucho más amplia que la propuesta en éste protocolo, sin embargo identificamos la frecuencia de las principales poblaciones de linfocitos T y B así como la frecuencia de células T antígeno específicas presentes en el tejido amigdalino. De igual manera realizamos una caracterización fenotípica completa de las principales poblaciones de células dendríticas.

Consideraciones éticas

La entrevista, el estudio simplificado de sueño y el manejo quirúrgico a seguir fueron los indicados a cada uno los pacientes que acudió al Departamento de Otorrinolaringología del INER "ICV". El estudio no le significó un costo extra a ninguno de los pacientes ya que se solicitó la condonación por el Instituto.

Aprobación por comité de ciencia y bioética en investigación.

Número: B14-11.

V. RESULTADOS

Población de estudio

Se incluyeron a 10 pacientes con criterios específicos para realizar una adenoamigdalectomía. En el **Cuadro 1** se muestran las características demográficas de la población estudiada y los diagnósticos específicos.

Cuadro 1. Características basales de la población de estudio.

Paciente	Edad	Género	Peso (kg)	Talla (m)	IMC	Amígdalas	Dx de RA	Dx de FAR	Cirugía realizada
1	9 años 7 meses	M	46.7	1.44	22.52122	III bilateral	SI	SI	Adenoamigdalectomía
2	8 años 9 meses	M	50.4	1.45	23.97146	IV der III izq	NO	SI	Amigdalectomía
3	4 años 8 meses	M	21.5	1.12	17.13967	IV der III izq	NO	SI	Adenoamigdalectomía
4	3 años 11 meses	M	16.7	1.03	15.74135	IV der III izq	SI	SI	Adenoamigdalectomía
5	4 años 11 meses	M	20.5	1.17	14.97553	II bilateral	SI	SI	Adenoamigdalectomía
6	5 años 11 meses	F	22.5	1.17	16.43655	IV der III izq	SI	SI	Adenoamigdalectomía
7	4 años 2 meses	M	14.5	1.065	12.78406	II bilateral	SI	SI	Adenoamigdalectomía
8	6 años 8 meses	M	20	1.09	16.8336	II bilateral	NO	NO	Adenoamigdalectomía
9	7 años 8 meses	M	31	1.32	17.31	III bilateral	SI	SI	Amigdalectomía
10	6 años 2 meses	F	25	1.23	16.5	III bilateral	NO	SI	Adenoamigdalectomía
Mediana	6.07 ± 2.1		22.0 (14.5-50.4)	1.17 (1.03-1.45)	16.6 (12.7-23.9)				

H: Hombre; M: Mujer; El peso se evaluó en kilogramos (*kg*); La talla se evaluó en metros (*m*); *IMC*: índice de masa corporal; Se identificó el grado de hipertrofia amigdalina *izq*: grado de hipertrofia de amígdala izquierda, *der*: grado de hipertrofia de amígdala derecha; *Dx*: Diagnóstico; *RA*: Rinitis alérgica; *FAR*: cuadros recurrentes de faringoamigdalitis bacteriana de repetición.

La mediana de edad para pacientes que fueron sometidos a amigdalectomía fue de 6 años. La mayoría de los pacientes incluidos fueron hombres, siendo sólo el 20% de mujeres de la población de estudio. La mediana obtenida en relación al índice de masa corporal (*IMC*) fue de 16.6, de acuerdo a la fórmula $\text{peso} / (\text{talla})^2$. El grado de hipertrofia amigdalina, evaluada de forma prequirúrgica fue de características “obstructivas” (grado III o IV) en el 80% de los pacientes, siendo grado II solamente en dos pacientes.

Por otro lado el 60% de los pacientes estudiados (6/10) presentó como diagnóstico prequirúrgico rinitis alérgica, mientras que el 90% de los pacientes refirieron durante la evaluación prequirúrgica, cuadros de faringoamigdalitis bacteriana de repetición. Sesenta por ciento de los pacientes presentaron ambos diagnósticos. A ocho pacientes de la población estudiada se les realizó una adenoamigdalectomía, por presentar hipertrofia adenoidea.

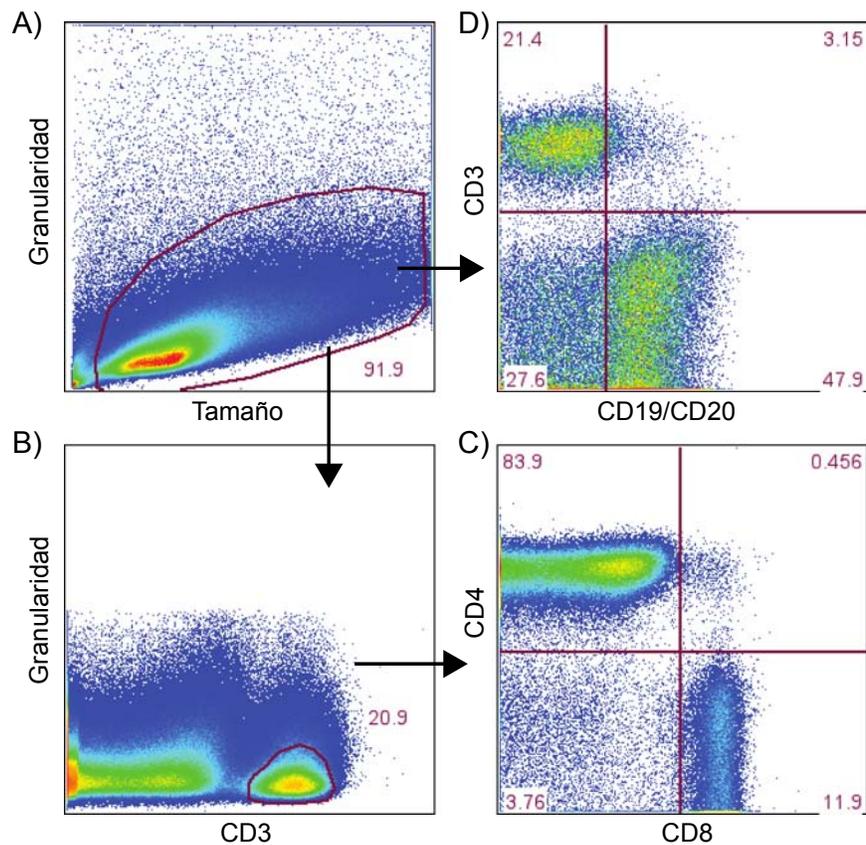
Cabe mencionar que en la población estudiada se encontró que 9 de los 10 pacientes presentó SAOS, diagnosticado mediante estudio simplificado del sueño. Esto se debe a que, por ser el INER "ICV" un centro de referencia de tercer nivel, es más probable encontrar a pacientes con un mayor número de comorbilidades e incluso de cuadros complicados.

Características inmunológicas basales

La caracterización inmunofenotípica de las células mononucleares palatinas se realizó mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los siguientes marcadores de superficie: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD45RA, CD62L, CCR7 e IgD. En la **Figura 1** se muestra un ejemplo representativo del tipo de estrategia de análisis que se realizó para identificar las subpoblaciones de linfocitos T (CD4+ y CD8+) y de linfocitos B totales.

Figura 1.

ANÁLISIS DE CELULAS MONONUCLEADAS PALATINAS



En la Figura 1 se representa la estrategia de análisis multiparamétrico para las poblaciones de linfocitos T y B totales. En el cuadro A) las células mononucleadas totales fueron identificadas a partir de un gráfico de puntos de dispersión frontal (FSC, *forward scatter*) vs. dispersión lateral (SSC, *side scatter*). En el cuadro B) se observa que a partir de una ventana de células vivas se seleccionó la ventana positiva para el marcador CD3 (linfocitos T totales). En el cuadro C) se ejemplifica que a partir de la ventana de CD3 se identificaron a aquéllos linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ (positivos a la doble marca). Por último, en el cuadro D) se observa que a partir de la ventana de células vivas se realizó un gráfico de puntos de CD3 contra CD19 para

identificar a los linfocitos B (CD19+). Un mínimo de 10^5 eventos fueron analizados.

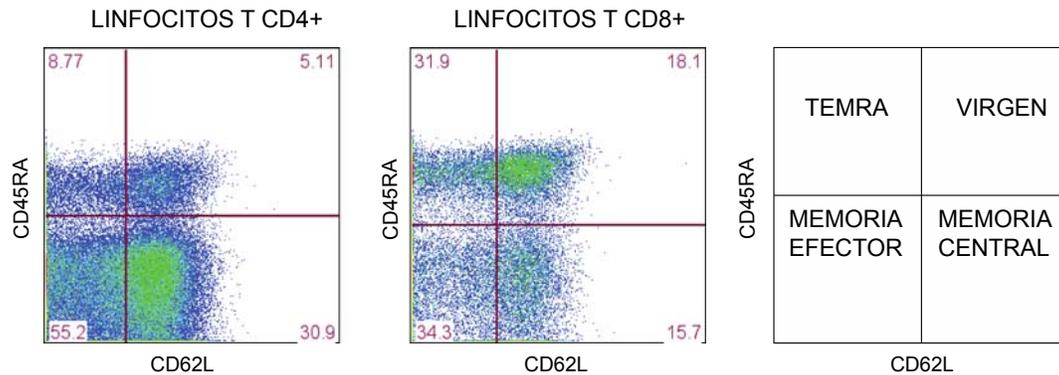
El **Cuadro 2** muestra la frecuencia de cada una de estas subpoblaciones que fueron analizadas en los 10 pacientes que incluimos. La frecuencia de linfocitos T totales CD3+ fue de $18.0\% \pm 2.4$, con una relación CD4:CD8 igual a 5.02. La frecuencia de linfocitos B totales en tejido amigdalino fue de $32.9\% \pm 11.3$.

Cuadro 2. Frecuencia e Linfocitos T y B en tejido amigdalino

POBLACION	FRECUENCIA (%)
Linfocitos T (<i>media \pm SD</i>)	18 ± 2.49
Linfocitos T CD4+ (<i>media \pm SD</i>)	73.9 ± 8.3
Linfocitos T CD8+ (<i>media \pm SD</i>)	14.7 ± 5.2
Linfocitos B (<i>media \pm SD</i>)	32.9 ± 11.3

Posteriormente analizamos la frecuencia de las 4 principales subpoblaciones de memoria en que se puede clasificar a los linfocitos T una vez que han reconocido antígenos provenientes de patógenos: 1) linfocito T efector terminalmente diferenciado T_{EMRA}, 2) linfocito T virgen, 3) linfocito T de memoria central y 4) linfocito T de memoria-efector. Esta clasificación de los linfocitos se realizó en base a la expresión de los marcadores CD45RA, CD62L y CCR7 (**Figura 2**).

Figura 2. Expresión de marcadores específicos de linfocitos T.



En la figura 2 se documenta el perfil fenotípico de linfocitos T de memoria. A partir de una ventana de linfocitos T totales (CD3+) se realizó un gráfico de puntos de CD45RA contra CD62L. En base a la expresión de estos marcadores se identificaron 4 subpoblaciones de memoria: 1) T_{EMRA} (CD45RA+CD62L-), 2) T VIRGEN (CD45RA+CD62L+), 3) T_{MC} (CD45RA-CD62L+) y 4) T_{ME} (CD45RA-CD62L-). Un mínimo de 10^5 eventos fueron analizados.

En el **Cuadro 3** se muestran los datos totales provenientes de los 10 pacientes incluidos en relación a la frecuencia de cada una de estas subpoblaciones de memoria así como a la intensidad media de fluorescencia para el marcador CCR7.

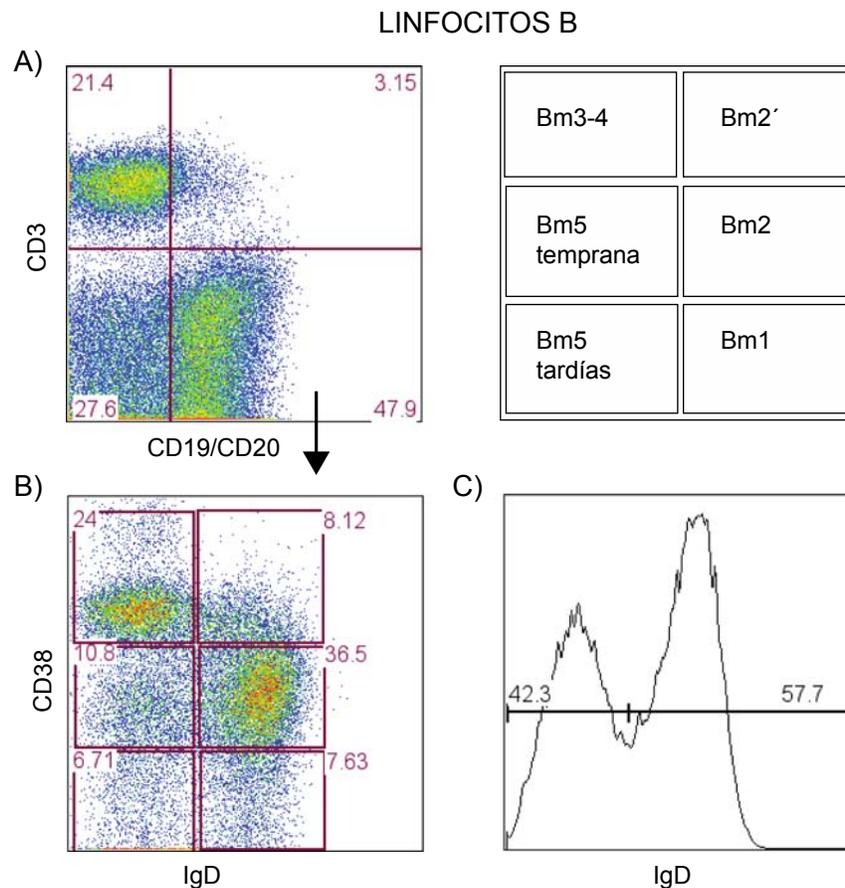
Cuadro 3. Frecuencia de subpoblaciones de células de memoria presentes en los linfocitos T CD4+ y CD8+.

POBLACIÓN	LINFOCITOS T CD4		LINFOCITOS T CD8	
	Frecuencia (%)	CCR7 IMF (unidades arbitrarias)	Frecuencia (%)	CCR7 IMF (unidades arbitrarias)
T_{MC}	30.3(29.2-54.6)	1130(896-1829)	16.9(6-25.3)	1921(1132-2740)
Virgen	4.8(2.7-8.2)	3481(2623-4043)	20.0(15.9-36.9)	4527(2929-5553)
T_{EMRA}	5.7(2.7-9)	3295(2786-4144)	33.6(27.3-51)	4488(2129-4847)
T_{ME}	56.4(38.9-62.4)	1234(916-1521)	33.5(10.5-51.6)	705(503-826)

Datos muestran: mediana (min-max).

Mediante una estrategia semejante analizamos las subpoblaciones de memoria en que se puede clasificar a los linfocitos B que se localizan en los folículos linfoides de la amígdala. Este análisis se realizó en base a la expresión de los marcadores CD38 e IgD (**Figura 3A y B**). La expresión de IgD en el linfocito B es utilizada para identificar a los linfocitos B maduros. Nosotros encontramos que el $54.6\% \pm 3.7$ de los linfocitos B expresan a la IgD en la superficie.

Figura 3. Perfil fenotípico de los linfocitos B.



En la figura 3, al graficar el perfil fenotípico de linfocitos B de memoria, se observa que en el *cuadro A*), a partir de una ventana de células vivas, se realizó un gráfico de puntos de CD3 contra CD19/CD20 para identificar a los linfocitos B totales (CD3-CD19/CD20+). En el *cuadro B*), a partir de una ventana de linfocitos B (CD3-CD19/CD20+) se realizó un dot plot de CD38 contra IgD para identificar las células de memoria. En base a la expresión de estos 2 marcadores se identificaron las siguientes subpoblaciones: células vírgenes (Bm1: IgD+CD38-); células vírgenes activadas (Bm2: IgD+CD38+); células pre-GC (Bm2'; IgD+CD38++); células GC (Bm3-centroblastos y Bm4-centrocitos, ambas son IgD-CD38++); y células de memoria (Bm5 tempranas y tardías: IgD-CD38+/-). En el *cuadro C*) a partir de una ventana de linfocitos B

totales (CD19/CD20+) se realizó un histograma para medir la expresión del marcador IgD. Un mínimo de 10^5 eventos fueron analizados.

El **Cuadro 4** muestra el resumen de las frecuencias de linfocitos B de memoria evaluadas en los 10 pacientes incluidos en el estudio.

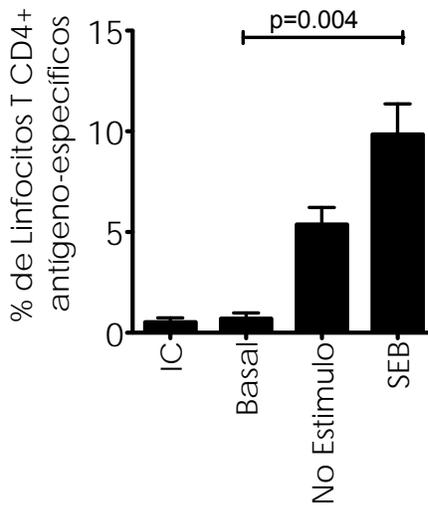
Cuadro 4. Frecuencia de subpoblaciones de células de memoria presentes en los linfocitos B.

POBLACION	Frecuencia
Bm1 (<i>mediana, min-max</i>)	6.2 (4.9-7.6)
Bm2 (<i>mediana, min-max</i>)	27 (10.7-36.5)
Bm2' (<i>mediana, min-max</i>)	8.12 (7.9-8.4)
Bm3 + Bm4 (<i>mediana, min-max</i>)	36.0 (33.9-55.4)
Bm5 tempranas (<i>mediana, min-max</i>)	9.8 (9.2-14.0)
Bm5 tardías (<i>mediana, min-max</i>)	6.7 (5.7-10.5)

Frecuencia de linfocitos T CD4+ antígenos-específicos en tejido amigdalino.

Una vez caracterizadas las distintas subpoblaciones en los linfocitos T CD4+, procedimos a evaluar la frecuencia de linfocitos T antígenos- específicos mediante un ensayo que evalúa la expresión del marcador CD154 (CD40L). Después de 4 hrs de estímulo con la enterotixina B de *Staphilococcus* (SEB) evaluamos la expresión del marcador CD154 en la superficie de los linfocitos CD4+. Nuestros resultados muestran que el 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresan a CD154 de manera espontanea y el 9.8% después de la estimulación con SEB (**Figura 4**).

Figura 4: Expresión de CD154 en linfocitos T CD4+.



En la figura 4 se identifica el grado de expresión de CD154 en linfocitos T CD4+. Las células mononucleadas totales fueron estimuladas durante 12 horas con SEB en presencia del anticuerpo monoclonal anti-CD15-APC. Durante las últimas 4 horas del cultivo se agregó brefeldina y monensina con la finalidad de inhibir la secreción de proteínas intracelulares (CD154). Después de 12 horas de estímulo las células fueron cosechadas y teñidas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD3 y CD4. Condiciones experimentales incluidas: *IC*: control de isotipo, *Basal*: células cultivadas durante 12 hrs sin estímulo, *No estímulo*: células cultivadas en presencia de brefeldina y monensina, y *Estímulo*: células cultivadas en presencia de SEB, brefeldina y monensina. Las barras de error muestran la media \pm desviación estándar. n=5.

CD107a y b se expresan en los linfocitos T CD8+ en respuesta a SEB

Con la finalidad de identificar la capacidad funcional de degranulación y citotóxica de los linfocitos T CD8+ activados con SEB analizamos simultáneamente la pérdida de perforina intracelular y la expresión membranal

de las moléculas CD107a y CD107b. Las CMNP fueron estimuladas durante 4 horas con SEB en presencia de brefeldina y monensina (inhibidores de la secreción de proteínas). Después de la estimulación las células fueron teñidas con anticuerpos contra CD3, CD8, CD107a, CD107b y perforina. Nuestros resultados mostraron que la expresión de CD107a y b incrementa a partir de los 30 min post-estimulación para alcanzar su máximo a las 4 hrs. La expresión de CD107a y b mostro una relación inversa con la expresión de perforina intracelular. Estos resultados sugieren que los linfocitos T CD8+ son funcionales, se degranulan y pueden eliminar células infectadas (**Figura 5**).

Figura 5. Capacidad de degranulación de linfocitos T CD8+ de tejido amigdalino.

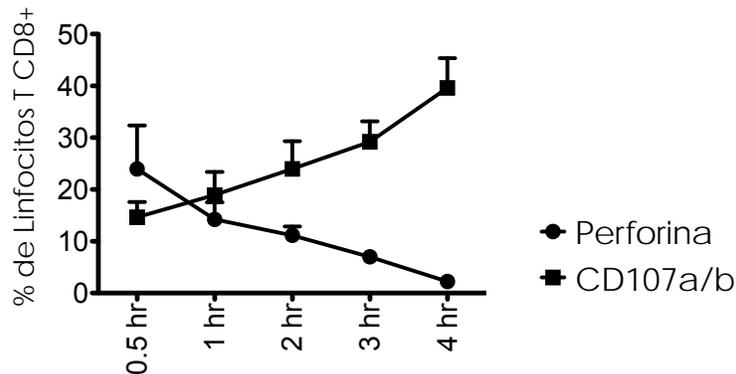


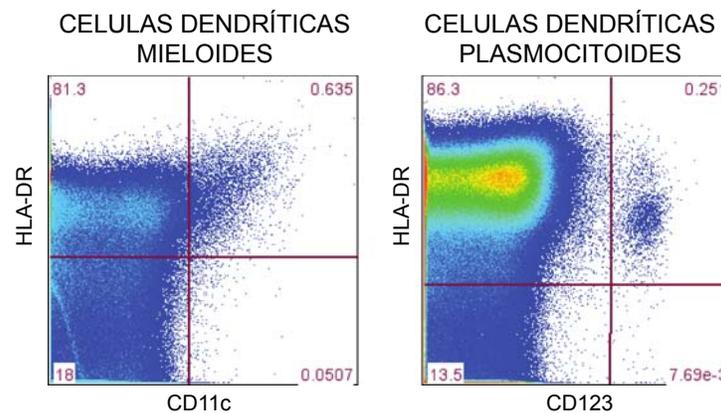
Figura 5: Capacidad de degranulación de linfocitos T CD8+ de tejido amigdalino. Las células mononucleadas fueron estimuladas con PMA/IO in vitro durante 4 hrs en presencia de brefeldina, monensina y anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD107a y b. Al final del tiempo de incubación las células fueron cosechadas, lavadas con PBS y permeabilizadas para la tinción de CD3, CD8 y perforina. Las barras de error muestran la media \pm desviación estándar. n=5.

Caracterización de células dendríticas de origen mieloide y plasmocitoide presentes en tejido amigdalino

Las células dendríticas (CDs) participan en la respuesta inmune innata y adaptativa a través de una gran variedad de mecanismos. Su principal función es la presentación de antígenos a los linfocitos T, sin embargo; esta puede

variar dependiendo de la localización de las CDs. En este trabajo evaluamos la frecuencia y estado de activación de las 2 poblaciones principales de CDs, mieloides y plasmocitoides. La caracterización fenotípica de estas poblaciones se realizó en base a la expresión de los marcadores CD1a, CD1c, CD11b, CD11c, CD123 y HLA-DR. Nosotros identificamos que en células mononucleadas palatinas totales la frecuencia de CDs mieloides (CD1a+CD11c+HLA-DR+) es de $1.39\% \pm 0.3$ y la de CDs plasmocitoides (CD1a+CD123+HLA-DR+) es de $0.19\% \pm 0.09$ (**Figura 6**).

Figura 6. Análisis de las subpoblaciones de CDs presentes en tejido amigdalino.



En el análisis de las subpoblaciones de CDs como se representa en la figura 6, se identificaron las células totales del tejido amigdalino a partir de una gráfica de puntos de dispersión frontal (FSC, *forward scatter*) vs. dispersión lateral (SSC, *side scatter*). Se identificaron como CDs plasmocitoides aquellas que coexpresaron el marcador CD123 y el antígeno de leucocitos humanos (human leukocyte antigen) HLA-DR, y como CDs mieloides aquellas que coexpresaron el marcador CD11c y el HLA-DR. Se muestra un experimento representativo.

En el **Cuadro 5** se muestra la frecuencia total de cada una de las siguientes poblaciones: HLA-DR+, CD11b+, CD11c+, CD11b+CD11c-, CD11b+CD11c+ y CD11b-CD11c+; este análisis se realizó a partir de una ventana de células vivas como un control de las frecuencias de las subpoblaciones de CDs analizadas posteriormente. También identificamos que del total de las CDs mieloides o convencionales el $23.1\% \pm 3.6$ corresponde a células CD11c+CD1a+HLA-DR+ las cuales son consideradas precursores directos de las CDs intersticiales.

Cuadro 5. Subpoblaciones de células dendríticas identificadas en tejido amigdalino.

Población	Frecuencia (%)
CD1a+CD11c+HLA-DR+	$1.39\% \pm 0.3$
CD1a+CD123+HLA-DR+	$0.19\% \pm 0.09$

Datos expresados como media \pm desviación estándar.

En el **Cuadro 6** se muestra el estado de activación de las diferentes poblaciones de CDs estudiado en base a la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD83 y CD86.

Cuadro 6. Análisis de marcadores de activación en CDm y CDp.

POBLACIÓN	IMF (unidades arbitrarias)
Células Dendríticas Mieloides	
CD40	158 (102-310)
CD80	328 (322-412)
CD83	581 (416-904)
CD86	320 (238-346)
Células Dendríticas Plasmocitoides	
CD40	219 (162-367)
CD80	244 (138-405)
CD83	1577 (709-3109)
CD86	477 (350-848)

Datos expresados como mediana (mínimo y máximo).

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue inmunofenotipificar las distintas poblaciones de células inmunes presentes en tejido amigdalino proveniente de niños con indicación de amigdalectomía. Primero estandarizamos la metodología necesaria para la obtención de las células mononucleares a partir de tejido amigdalino y posteriormente medimos la frecuencia de las principales poblaciones inmunológicas que participan en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa (linfocitos T totales, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B totales, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmocitoides).

Las amígdalas palatinas son órganos linfoides secundarios que forman parte del sistema MALT y representan la acumulación más grande de tejido linfoide del anillo de Waldeyer. Las amígdalas son el principal órgano linfoide secundario al cual se puede tener acceso con facilidad y frecuentemente son utilizadas como fuente de un gran número de células. Las células mononucleares son aisladas por fragmentación del tejido amigdalino y posteriormente son purificadas en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque. Como en todo órgano linfoide secundario los linfocitos T y B son segregados en diferentes compartimentos anatómicos; los linfocitos B se agrupan en pequeñas estructuras llamadas folículos, localizadas en la periferia ó corteza del órgano linfoide. Una vez que los linfocitos B presentes en el folículo han sido expuestos a un antígeno, este folículo desarrollará una región central llamada Centro Germinal (CG), cuya principal función es la producción

de anticuerpos. Los linfocitos T se localizan en zonas más periféricas pero adyacentes a los folículos, en la llamada paracorteza en donde hay una gran cantidad de células dendríticas que le presentan antígenos a los linfocitos T. Esta localización depende principalmente de la expresión de los receptores para quimiocinas CXCR5 y CCR7 (26). Las células linfoides (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B) en el tejido amigdalino se encuentran en estrecho contacto con una gran variedad de células dendríticas que forman parte del epitelio escamoso de la amígdala. Nosotros medimos la frecuencia de linfocitos T CD3+ (18 ± 2.49), linfocitos T CD4+ (73.9 ± 8.3), linfocitos T CD8+ (14.7 ± 5.2) y linfocitos B totales (32.9 ± 11.3). El ratio CD4:CD8 fue de 5.02, 3 veces más alto de lo observado tradicionalmente en sangre periférica. Aunque las amígdalas palatinas son una fuente rica de células del sistema inmune, también hay una gran cantidad de tejido conectivo que dificulta su recuperación. Sin embargo, la frecuencia de linfocitos T CD3+ es semejante a la informada por otros autores, siendo el ratio CD4:CD8 superior al observado en sangre periférica. Una posible explicación para este fenómeno es que una vez que un linfocito T CD4+ reconoce un antígeno presentado por una célula dendrítica, este regula positivamente la expresión del receptor para quimiocinas CXCR5 y puede migrar al folículo en donde se localizan los linfocitos B. Una vez juntas estas 2 células (linfocitos T CD4+ y linfocito B), van a interactuar, haciendo que el linfocito T CD4+ madure y se diferencie en una célula T cooperadora folicular (*follicular helper T cell*, T_{FH} cell). En este estadio el linfocito B ya es apto para reconocer antígenos presentados por las células dendríticas foliculares, por lo que podrá migrar a la periferia en donde se diferenciará en un plasmablasto extrafolicular y dará origen a los linfocitos B de

memoria, para después regresar al folículo, incrementar su proliferación y formar el CG (27, 28). Es por esta razón que la presencia de un gran número de linfocitos T CD4+ en la amígdala palatina es fundamental para el adecuado desarrollo, diferenciación de los linfocitos B y producción de anticuerpos.

Desde el punto de vista inmunológico la exposición a patógenos o a vacunas induce memoria inmunológica lo cual tiene como finalidad reducir la morbilidad del individuo. La memoria inmunológica se caracteriza por cambios en el número y distribución de los linfocitos con la finalidad de proveer de mejor protección en contra de los patógenos. A nivel celular los cambios asociados a la memoria inmunológica depende de cambios epigenéticos en los linfocitos B y los linfocitos T para permitir una respuesta efectora mucho más rápida y eficiente. La memoria inmunológica en las células B es mediada por dos poblaciones principales: las células plasmáticas, responsables de la producción de anticuerpos (memoria efectora) y las células B de memoria (memoria central), las cuales funcionan como precursoras de las células plasmáticas (29, 30). Los linfocitos B son producidos por la médula ósea a lo largo de la vida. Su desarrollo tiene 2 fases que se presentan en diferentes sitios: 1) la diferenciación de un precursor de linfocito B en un linfocito B virgen maduro a partir de una célula hematopoyética, que tiene lugar en la médula ósea; y 2) la maduración de estas células en células de memoria/efectoras en los órganos linfoides secundarios (31, 32). Los linfocitos B maduros con receptor de células B (BCR) funcional dejan la médula ósea, llegan a la circulación periférica y recirculan entre los diferentes tejidos linfoides para morir en unos pocos días. Aquéllos linfocitos B vírgenes que reconozcan un antígeno en un órgano

linfoide secundario iniciaran el desarrollo del CG en colaboración con los linfocitos T CD4⁺ _{FH} (28, 33). Después de varios “rounds” de proliferación antígeno-específica estas células B generan linfocitos B de memoria y células B efectoras ó plasmablastos. Los plasmablastos se establecen en órganos linfoides secundarios y terminan su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos (34).

En nuestro trabajo utilizamos los marcadores de superficie CD19, CD38, IgD y HLA-DR para clasificar a los linfocitos B en múltiples subpoblaciones de memoria llamadas Bm1-5: células vírgenes (Bm1: IgD+CD38-); células vírgenes activadas (Bm2: IgD+CD38+); células pre-GC (Bm2; IgD+CD38++); células GC (Bm3-centroblastos y Bm4-centrocitos, ambas son IgD-CD38++); y células de memoria (Bm5: IgD-CD38+/-) (32, 35). La principal función de estas poblaciones de linfocitos B de memoria es la producción de anticuerpos antígeno-específicos de alta afinidad así como su capacidad para responder a una segunda exposición antigénica con mayor rapidez. Tanto linfocitos B vírgenes como de memoria pueden circular en sangre periférica, sin embargo; la mayor parte de los linfocitos B de memoria permanecen en el epitelio de la zona marginal del bazo y las amígdalas palatinas (36).

El desarrollo de memoria inmunológica para los linfocitos T es muy semejante al de los linfocitos B, comienza cuando el receptor del linfocito T (TCR) reconoce un complejo antígeno-MHC (Major Histocompatibility Complex) presente en una células presentadora de antígeno en órgano linfoide secundario (37, 38). Múltiples señales indicadas por el TCR y moléculas

coestimuladoras favorecen la activación y diferenciación del linfocito T en una célula efectora. El número de linfocitos T efectores alcanza su máximo en 7 días aproximadamente y después mueren el 90% durante la fase de contracción inmunológica. En esta fase de contracción solo sobreviven los linfocitos T de memoria (39). Los linfocitos T de memoria son heterogéneos y se han descrito al menos 4 subpoblaciones principales en base al perfil de expresión de los marcadores CD45RA, CD62L y CCR7: linfocitos T vírgenes (CD45RA+CD62L+), linfocitos T de memoria central T_{CM} (CD45RA-CD62L+), linfocitos T de memoria efector (T_{EM}) (CD45RA-CD62L-) y linfocitos T de memoria efector que expresa CD45RA (T_{EMRA}) (CD45RA+CD62L-). Los linfocitos T de memoria efector expresan el receptor CCR7 que les permiten migrar a otros tejidos durante la respuesta inmune inflamatoria y expresan citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-5 así como grandes cantidades de perforina (29). Los linfocitos T_{CM} no producen citocinas pero tienen una gran capacidad proliferativa, expresan CCR7 y CD62L por lo que también pueden migrar a otros tejidos. Algunos linfocitos T_{EMRA}, también expresan perforina pero su capacidad para proliferar es todavía más limitada, de hecho se ha propuesto que esta subpoblación se produce en respuesta a la proliferación homeostática más que a la proliferación mediada por estimulación antigénica (40). En este trabajo identificamos las 4 poblaciones de linfocitos T de memoria en tejido amigdalino. Los linfocitos T_{CM} predominan en el compartimento CD4+ mientras que los linfocitos T vírgenes predominan en el compartimento CD8+. Linfocitos T CD4+ y CD8+ desempeñan funciones distintas en los órganos linfoides secundarios por lo que esta puede ser una de las razones que explique el por

qué identificamos un porcentaje distinto de células de memoria entre ambas poblaciones de linfocitos T.

A continuación nos propusimos evaluar la capacidad funcional de los linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante 2 ensayos funcionales. Primero medimos la frecuencia de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos, y posteriormente evaluamos la capacidad citotóxica de los linfocitos T CD8+. CD154 es un marcador de activación, que se expresa transitoriamente en la superficie de los linfocitos T CD4+ que han sido activados vía TCR (41). El análisis de este marcador nos permite identificar una subpoblación de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos aún y cuando su capacidad para producir citocinas sea limitada. Este ensayo sólo ha sido realizado en células mononucleadas de sangre periférica por lo que esta es la primera vez que intencionadamente se utiliza para medir la frecuencia de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos en tejido amigdalino. Nuestros resultados mostraron que el 5.3% de los linfocitos T CD4+ expresan CD154 de manera espontánea y el 9.8% después de 4 horas de estimulación del TCR con SEB. La medición de la expresión de CD154 en la superficie del linfocito T CD4+ es realmente confiable cuando se compara con la medición de la expresión de otros marcadores de activación tales como CD69 debido a que la expresión de este último marcador puede verse influenciada por las citocinas presentes en el medio de cultivo fenómeno que no se presenta al medir CD154. Este ensayo realizado en CMNP demuestra que de manera basal el 5.3% los linfocitos T CD4+ expresan CD154 y este porcentaje se incrementa después de la estimulación. La expresión de CD154 en el linfocito T_{FH} es importante ya que favorece el desarrollo de los centros

germinales y la producción de distintos isotipos de anticuerpos por los linfocitos B (42, 43). Se ha propuesto que los linfocitos T CD4⁺ en el centro germinal migran a la zona parafolicular para estar en estrecho contacto con los linfocitos B. La interacción dependiente de CD154 que se presenta entre los linfocitos T y B estimula la proliferación inicial de los linfocitos B favoreciendo su posterior diferenciación en plasmablastos y células plasmáticas productoras de anticuerpos (43). Consideramos que con este tipo de ensayo se pueden identificar linfocitos T CD4⁺ que cooperan con los linfocitos B para la adecuada producción de anticuerpos así como linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos. Esta información es relevante ya que las CMNP pueden ser utilizadas para otro tipo de ensayos funcionales que evalúen la respuesta inmune adaptativa.

Otra de las poblaciones de linfocitos T que participan directamente en la respuesta inmune adaptativa son los linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ tienen 2 funciones principales una vez que han reconocido un antígeno específico: producción de factores solubles (citocinas y quimiocinas) y mediar la muerte de la células blanco (células infectadas o transformadas). Los linfocitos T citotóxicos eliminan a las células blanco mediante 2 vías principales: dependiente de gránulos (perforina y granzimas) e independiente de gránulos (Fas-Fas ligando) (44). La vía dependiente de gránulos no requiere la síntesis de novo de las proteínas efectoras ya que estas se encuentran almacenadas en gránulos líticos localizados en el citoplasma (44). Los gránulos líticos son lisosomas complejos que expresan en la membrana algunas glicoproteínas tales como CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) y CD63 (LAMP-3). Estas proteínas no se expresan normalmente en la superficie de los linfocitos T

CD8+, sin embargo, sí se pueden identificar mediante citometría de flujo cuando los linfocitos son estimulados con ionomicina (45). Una vez que el linfocito T CD8+ ha sido activado y los gránulos líticos alcanzan la membrana plasmática para fusionarse con ella y liberar su contenido, se puede medir transitoriamente la expresión de CD107a y b. En este ensayo de degranulación identificamos que 30 minutos después de la estimulación de las CMNP los linfocitos T CD8+ expresaron CD107a/b alcanzando un máximo a las 4 hrs. La expresión de estas moléculas en la membrana plasmática de los linfocitos T CD8+ mostró una relación inversa con la expresión de perforina intracelular, esto es, a mayor expresión de CD107a/b en la superficie, menor la expresión de perforina intracelular. Estos resultados demuestran claramente que los linfocitos T CD8+ de la amígdala palatina son funcionales ya que responden a la activación in vitro y tienen una adecuada capacidad de degranulación, y por lo tanto, de eliminar células infectadas por patógenos o células transformadas.

Por último estudiamos a las CDs presentes en el tejido amigdalino. Las CDs se encuentran en prácticamente todas las áreas del cuerpo como piel, faringe, esófago superior, vagina, y también en las superficies mucosas tales como la vía aérea superior y el sistema digestivo (46). Participan directamente en la respuesta inmune adaptativa, ya que su principal función es la presentación de antígenos a los linfocitos T (47). Una vez que una CDs ha reconocido un antígeno, incrementa la expresión de algunos marcadores de activación como CD40, CD80, CD83 y CD86, además de que produce citocinas como IL-12 (48, 49).

En este trabajo primero estudiamos 2 distintas poblaciones de CDs, las CDs mieloides (mDC) (CD11c+) y las CDs plasmocitoides (pDC) (CD123+) y posteriormente evaluamos su estado de activación en base a la expresión de los marcadores CD40, CD80, CD83 y CD86. Nuestros resultados demuestran que en tejido amigdalino hay 1.39% de mDC y 0.19% pDC. Las mDC son células que producen IL-12 e IFN- γ en respuesta a estímulos microbianos y por lo tanto favorecen el desarrollo de una respuesta inmune de tipo TH1 mientras que las pDC son células que producen IFN- α , β y ω en respuesta a infecciones de origen viral. Ambos tipos de CDs median resistencia a las infecciones una vez que han internalizado a un patógeno (bacteria o virus); las CDs se activan, maduran y presentan antígenos a los linfocitos T para iniciar la respuesta inmune adaptativa. Nosotros identificamos mayor expresión de marcadores de activación en la subpoblación de CDs plasmocitoides. Es posible que este resultado sea consecuencia de la mayor frecuencia de infecciones de vías aéreas superiores de origen viral presentes durante la infancia. Desconocemos si un perfil de activación distinto puede identificarse en amígdalas no hipertróficas o sin antecedentes de faringoamigdalitis de repetición.

En este estudio demostramos que los linfocitos T y las CDs en el tejido amigdalino son funcionales a pesar de haber cambios microscópicos específicos en las criptas amigdalinas producto de una amigdalitis crónica por cuadros de faringoamigdalitis de repetición. Esto hizo que se revaluara nuestra posición expresada en la hipótesis, en donde se presumía que debido a una inadecuada estimulación antigénica por los cambios crónicos ya descritos, la funcionalidad de las células estudiadas se podría ver alterada. Los resultados

obtenidos son de suma importancia, puesto que no hay estudios previos que demuestren objetivamente dicho estado funcional de los linfocitos T y CD4 en un órgano linfóide secundario tan rico como las amígdalas. Esto por tanto nos lleva a tener que ser estrictos y objetivos al evaluar a los pacientes candidatos a una amigdalectomía, sugiriendo completar un protocolo de estudio detallado para considerar a un paciente como candidato quirúrgico. Existen criterios clínicos específicos, además de que se busca evitar comorbilidades a largo plazo, para pacientes que sí son candidatos y necesitan de un tratamiento quirúrgico para mejorar su nivel de vida. Para estos casos el retiro de un tejido inmunológicamente activo y funcional no implica que se condenará al paciente a un estado de inmunodeficiencia crónica, puesto que existen otros centros inmunológicos en otros niveles del cuerpo que son lo suficientemente capaces para soportar los embates antigénicos y que pueden proveer de una respuesta inmune adecuada y suficiente.

VII. CONCLUSIONES

Los linfocitos T y células dendríticas son funcionales en el tejido amigdalino a pesar de existir una estimulación crónica secundaria a cuadros de faringoamigdalitis de repetición. Es necesario estudiar y justificar de forma más estricta quienes son los pacientes candidatos a una amigdalectomía.

VIII. REFERENCIAS

1. Cummings C FP, Harker L, Haughey B, et al.,. Cummings otolaryngology head and neck surgery. *Elsevier Mosby, USA* 2005.
2. Bailey B JJ. Head and neck surgery otolaryngology. *Lippincott Williams & Wilkins, USA* 2006.
3. Oykman P, Mody CH. Direct microbicidal activity of cytotoxic t-lymphocytes. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010;2010:249482.
4. Dorner T, Radbruch A. Antibodies and b cell memory in viral immunity. *Immunity* 2007;27:384-392.
5. Figdor CG. Molecular characterization of dendritic cells operating at the interface of innate or acquired immunity. *Pathologie-biologie* 2003;51:61-63.
6. El-Serag HB, Hepworth EJ, Lee P, Sonnenberg A. Gastroesophageal reflux disease is a risk factor for laryngeal and pharyngeal cancer. *The American journal of gastroenterology* 2001;96:2013-2018.
7. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004;83:1-1438.
8. Brandtzaeg P, Surjan L, Jr., Berdal P. Immunoglobulin systems of human tonsils. I. Control subjects of various ages: Quantification of ig-producing cells, tonsillar morphometry and serum ig concentrations. *Clin Exp Immunol* 1978;31:367-381.
9. Brandtzaeg P. Immune functions and immunopathology of palatine and nasopharyngeal tonsils. *Immunology of the ear* 1987:63-106.
10. Lieberman J. The abcs of granule-mediated cytotoxicity: New weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3:361-370.

11. Ejzenberg. Diagnosis and manegement of chronic tonsillitis. *V IAPO Manual of Pediatric Otorhinolaryngology* 2005:100-105.
12. Baugh RF, Archer SM, Mitchell RB, Rosenfeld RM, Amin R, Burns JJ, Darrow DH, Giordano T, Litman RS, Li KK, Mannix ME, Schwartz RH, Setzen G, Wald ER, Wall E, Sandberg G, Patel MM. Clinical practice guideline: Tonsillectomy in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;144:S1-30.
13. Cantani A, Bellioni P, Salvinelli F, Businco L. Serum immunoglobulins and secretory iga deficiency in tonsillectomized children. *Ann Allergy* 1986;57:413-416.
14. Boyaka PN, Wright PF, Marinaro M, Kiyono H, Johnson JE, Gonzales RA, Ikizler MR, Werkhaven JA, Jackson RJ, Fujihashi K, Di Fabio S, Staats HF, McGhee JR. Human nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissues. Functional analysis of subepithelial and intraepithelial b and t cells from adenoids and tonsils. *Am J Pathol* 2000;157:2023-2035.
15. Ikinciogullari A, Dogu F, Egin Y, Babacan E. Is immune system influenced by adenotonsillectomy in children? *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2002;66:251-257.
16. Cullen KA, Hall MJ, Golosinskiy A. Ambulatory surgery in the united states, 2006. *Natl Health Stat Report* 2009:1-25.
17. Younis RT, Lazar RH. History and current practice of tonsillectomy. *Laryngoscope* 2002;112:3-5.
18. Paradise JL, Bluestone CD, Bachman RZ, Karantonis G, Smith IH, Saez CA, Colborn K, Bernard BS, Taylor FH, Schwarzbach RH, Felder H, Stool SE, Fitz AM, Rogers KD. History of recurrent sore throat as an indication for tonsillectomy. Predictive limitations of histories that are undocumented. *N Engl J Med* 1978;298:409-413.

19. Brodsky L. Modern assessment of tonsils and adenoids. *Pediatr Clin North Am* 1989;36:1551-1569.
20. Capdevila OS, Kheirandish-Gozal L, Dayyat E, Gozal D. Pediatric obstructive sleep apnea: Complications, management, and long-term outcomes. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:274-282.
21. Ali NJ, Pitson DJ, Stradling JR. Snoring, sleep disturbance, and behaviour in 4-5 year olds. *Arch Dis Child* 1993;68:360-366.
22. Brunetti L, Rana S, Lospalluti ML, Pietrafesa A, Francavilla R, Fanelli M, Armenio L. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome in a cohort of 1,207 children of southern italy. *Chest* 2001;120:1930-1935.
23. Muzumdar H, Arens R. Diagnostic issues in pediatric obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:263-273.
24. Gozal D, O'Brien LM. Snoring and obstructive sleep apnoea in children: Why should we treat? *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S371-376.
25. Lipton AJ, Gozal D. Treatment of obstructive sleep apnea in children: Do we really know how? *Sleep Med Rev* 2003;7:61-80.
26. Cyster JG. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 2005;23:127-159.
27. Nutt SL, Tarlinton DM. Germinal center b and follicular helper t cells: Siblings, cousins or just good friends? *Nat Immunol* 2011;12:472-477.
28. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27:190-202.
29. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory t cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004;22:745-763.

30. Dorner T, Radbruch A. Selecting b cells and plasma cells to memory. *J Exp Med* 2005;201:497-499.
31. McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Antigen-specific memory b cell development. *Annu Rev Immunol* 2005;23:487-513.
32. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five b cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994;180:329-339.
33. Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for b-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006;6:107-116.
34. Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dorner T, Hiepe F. Competence and competition: The challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006;6:741-750.
35. Grammer AC, McFarland RD, Heaney J, Darnell BF, Lipsky PE. Expression, regulation, and function of b cell-expressed cd154 in germinal centers. *J Immunol* 1999;163:4150-4159.
36. Tangye SG, Tarlinton DM. Memory b cells: Effectors of long-lived immune responses. *Eur J Immunol* 2009;39:2065-2075.
37. Davis MM. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem* 1990;59:475-496.
38. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific cd4 t cells. *Annu Rev Immunol* 2001;19:23-45.
39. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in cd4+ and cd8+ effector and memory t cell generation. *Nat Immunol* 2003;4:835-842.

40. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human cd8+ memory t-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003;101:4260-4266.
41. Frensch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A. Direct access to cd4+ t cells specific for defined antigens according to cd154 expression. *Nat Med* 2005;11:1118-1124.
42. Elzey BD, Grant JF, Sinn HW, Nieswandt B, Waldschmidt TJ, Ratliff TL. Cooperation between platelet-derived cd154 and cd4+ t cells for enhanced germinal center formation. *J Leukoc Biol* 2005;78:80-84.
43. Wolniak KL, Shinall SM, Waldschmidt TJ. The germinal center response. *Crit Rev Immunol* 2004;24:39-65.
44. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735-747.
45. Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW, Holcombe RF. Lysosome-associated membrane proteins h-lamp1 (cd107a) and h-lamp2 (cd107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell Immunol* 1996;171:10-19.
46. Lindquist RL, Shakhar G, Dudziak D, Wardemann H, Eisenreich T, Dustin ML, Nussenzweig MC. Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 2004;5:1243-1250.
47. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419-426.

48. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of mhc class ii complexes on dendritic cells. *Nature* 1997;388:782-787.

49. Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy KM, O'Garra A. Dendritic cells produce il-12 and direct the development of th1 cells from naive cd4+ t cells. *J Immunol* 1995;154:5071-5079.