



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA N (CD13) EN LA  
MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**MARÍA GUADALUPE GARCÍA PATIÑO**

**MÉXICO, D.F.**

**2013**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Constantino III Roberto López Macías.

**VOCAL:** Profesor: Enrique Ortega Soto.

**SECRETARIO:** Profesor: Araceli Mendieta Rergis.

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Javier Fernández Torres.

**2° SUPLENTE:** Profesor: Mauricio Rodríguez Dorantes.

**EL PRESENTE TRABAJO FUE DESARROLLADO EN EL LABORATORIO DEL CUAL ES TITULAR EL DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO, PERTENECIENTE AL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNAM.**

## **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Enrique Ortega Soto

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

L.I.B.B. Irma Ileana Licona Limón

## **SUSTENTANTE:**

María Guadalupe García Patiño

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. <b><u>RESUMEN</u></b> .....   | 1  |
| 2. <b><u>INTRODUCCIÓN</u></b> .....  | 2  |
| <b>2.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS</b> .....  | 3  |
| 2.1.1. <u>ORIGEN Y SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....                                 | 3  |
| 2.1.2. <u>FUENTES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES</u> .....                    | 5  |
| 2.1.3. <u>CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....                                     | 6  |
| 2.1.4. <u>MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....  | 8  |
| <b>2.2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS</b> .....   | 12 |
| 2.2.1. <u>CAPTURA, PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T</u> ..... | 12 |
| 2.2.2. <u>INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA</u> .....   | 17 |
| 2.2.3. <u>ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS B Y MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA INMUNOLÓGICA</u> .....        | 18 |
| <b>2.3. AMINOPEPTIDASA N (CD13)</b> .....  | 18 |
| 2.3.1. <u>FUNCIONES DEPENDIENTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CD13</u> .....                      | 19 |
| 2.3.2. <u>FUNCIONES INDEPENDIENTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CD13</u> .....                    | 20 |
| 2.3.3. <u>CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....  | 22 |
| 3. <b><u>JUSTIFICACIÓN</u></b> .....   | 23 |

|   |    |
|---|----|
| 4. <b><u>HIPÓTESIS</u></b> .....  | 23 |
| 5. <b><u>OBJETIVOS</u></b> .....  | 24 |
| 6. <b><u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b> .....   | 25 |
| 6.1. <b>CÉLULAS</b> .....   | 25 |
| 6.1.1. <b><u>OBTENCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS</u></b> .....   | 25 |
| 6.1.2. <b><u>OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS</u></b> .....  | 27 |
| 6.1.3. <b><u>MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</u></b> .....  | 27 |
| 6.2. <b>ENTRECRUZAMIENTO DE CD13</b> .....  | 28 |
| 6.2.1. <b><u>ENTRECRUZAMIENTO DE CD13 MEDIANTE FRAGMENTOS F(ab')<sub>2</sub> DEL ANTICUERPO 452 Y EL USO DE FRAGMENTOS F(ab')<sub>2</sub> DE UN ANTICUERPO SECUNDARIO</u></b> ..... | 28 |
| 6.2.2. <b><u>ENTRECRUZAMIENTO DE CD13 MEDIANTE PLACAS SENSIBILIZADAS CON EL ANTICUERPO 452 COMPLETO</u></b> .....   | 28 |
| 6.3. <b>INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA</b> .....   | 29 |
| 6.4. <b>ENSAYO INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)</b> .....  | 29 |
| 6.5. <b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....  | 30 |
| 7. <b><u>RESULTADOS</u></b> .....   | 31 |
| 7.1. <b>OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y EVALUACIÓN DE SU PUREZA</b> .....  | 31 |
| 7.2. <b>OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS</b> .....   | 32 |
| 7.3. <b>MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS MEDIANTE ESTÍMULOS DE MADURACIÓN CONOCIDOS</b> .....  | 33 |

|   |    |
|---|----|
| 7.4. EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE EL USO DE FRAGMENTOS F(ab') <sub>2</sub> DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 452 Y FRAGMENTOS F(ab') <sub>2</sub> DE UN ANTICUERPO SECUNDARIO SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MADURACIÓN Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS..... | 39 |
| 7.5. EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE EL USO DEL ANTICUERPO 452 COMPLETO INMOVILIZADO, SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MADURACIÓN Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....  | 46 |
| 7.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE CCR7 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS.....  | 48 |
| 8. <u>DISCUSIÓN</u> .....   | 51 |
| 9. <u>CONCLUSIONES</u> .....  | 55 |
| 10. <u>ANEXOS</u> .....   | 56 |
| 10.1. ANEXO I. IMÁGENES DE CÉLULAS.....   | 56 |
| 10.1.1. <u>DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A CÉLULAS DENDRÍTICAS O A MACRÓFAGOS</u> .....   | 56 |
| 10.1.2. <u>MADURACIÓN Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS</u> .....   | 57 |
| 10.2. ANEXO II. SOLUCIONES EMPLEADAS.....   | 58 |
| 10.3. ANEXO III. ABREVIATURAS.....  | 60 |
| 11. <u>REFERENCIAS</u> .....  | 63 |

## 1. RESUMEN

La aminopeptidasa N (CD13) es una ectoenzima transmembranal que cataliza la remoción de aminoácidos neutros del extremo N terminal de algunos péptidos. Además posee la característica de ser multifuncional, por lo que desempeña papeles tanto dependientes como independientes de su actividad enzimática [1-3]. Se ha demostrado que CD13 modula la fagocitosis a través de FcγRI [4], que es capaz de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno [5] y que participa en procesos de adhesión celular [3]. Esto sugiere que CD13 podría estar actuando como receptor de reconocimiento de patógenos (PRR) o modulando la respuesta que resulta de la activación de otros receptores.


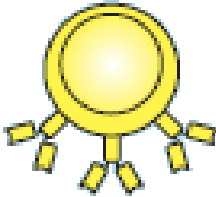

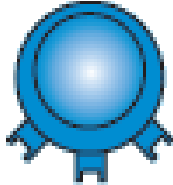

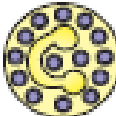

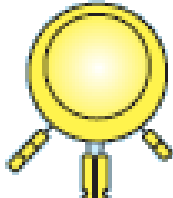

Las DCs son células presentadoras de antígeno (APCs) que pueden encontrarse en dos estadios funcionales: como células dendríticas inmaduras (iDCs) o como células dendríticas maduras (mDCs). Luego del reconocimiento y captura del antígeno, las DCs inician su maduración, misma que se caracteriza por una disminución en su capacidad endocítica y un aumento en la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos. Las mDCs migran a los órganos linfoides secundarios donde presentan el antígeno a linfocitos T [6,7].

El objetivo de este trabajo fue determinar si la estimulación de DCs a través de CD13 puede inducir y/o modular la maduración de estas células. Para ello se obtuvieron DCs a partir de monocitos humanos cultivados en presencia de GM-CSF e IL-4. Se indujo el entrecruzamiento de CD13 con un anticuerpo monoclonal anti-CD13 (mAb 452) en presencia o ausencia de un estímulo de maduración conocido —LPS o TNF- $\alpha$ — y se determinó el grado de expresión de marcadores de superficie —CD83, HLA-DR, CD86, y CCR7— y la producción de citocinas —IL-12 y TNF- $\alpha$ —.

Encontramos que al entrecruzar CD13 empleando fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del mAb 452 y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo secundario no hubo un incremento de la producción de IL-12 ni de TNF- $\alpha$  por las células dendríticas. Sin embargo, al entrecruzar CD13 empleando el mismo anticuerpo completo unido a una superficie, se incrementó la producción de ambas citocinas cuando las células fueron estimuladas por LPS y además, hubo un leve aumento de la expresión de CD83, HLA-DR y CD86. Esto sugiere que si bien el entrecruzamiento de CD13 no es suficiente para inducir maduración en DCs por sí mismo, puede incrementar la maduración que se obtiene por estímulos como LPS y TNF- $\alpha$ .

## 2. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico está constituido por diversas células y moléculas que participan en los mecanismos de defensa del organismo contra agentes infecciosos o dañinos [8]. Las células del sistema inmunológico, denominadas leucocitos o glóbulos blancos, se originan a partir de una célula progenitora hematopoyética pluripotencial en un proceso conocido como hematopoyesis y desempeñan diferentes papeles en la defensa del organismo [9,10] (Fig. 1).

| CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO   |   |   |  |
|--|---|---|--|
| Origen Mieloide  |   | Origen Linfoide   |  |
| <br>Macrófago           | Fagocitosis   | <br>Linfocito B   | Producción de anticuerpos<br>Mantenimiento de memoria inmunológica   |
| <br>Neutrófilo          | Fagocitosis<br>Mecanismos Bactericidas                      | <br>Linfocito T | Activación de otras células<br>Mantenimiento de memoria inmunológica<br>Citotoxicidad<br>Inmunorregulación de respuestas |
| <br>Eosinófilo        | Ataque a parásitos  |   |  |
| <br>Basófilo          | Producción de mediadores en respuestas de hipersensibilidad |   |  |
| <br>Célula Cebada     | Inducción de inflamación                                    | <br>Célula NK   | Citotoxicidad  |
| <br>Célula Dendrítica | Captura y presentación de antígenos                         |   |  |

**Figura 1. Funciones de las células del sistema inmunológico.** Se muestra una representación de células que componen el sistema inmunológico y se enumeran algunas de sus funciones. (Modificada de Murphy, K *et al.* 2008).



## 2.1. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs por su nombre en inglés *dendritic cells*) son células del sistema inmunológico que fueron descubiertas en preparaciones de bazo de ratón y descritas por primera vez por Ralph Steinman en 1974 [12,13]. Estas células funcionan como células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales [6], lo que significa que son capaces de procesar antígenos, presentarlos a linfocitos T *naive* y activar a éstos últimos [8].

### 2.1.1. ORIGEN Y SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

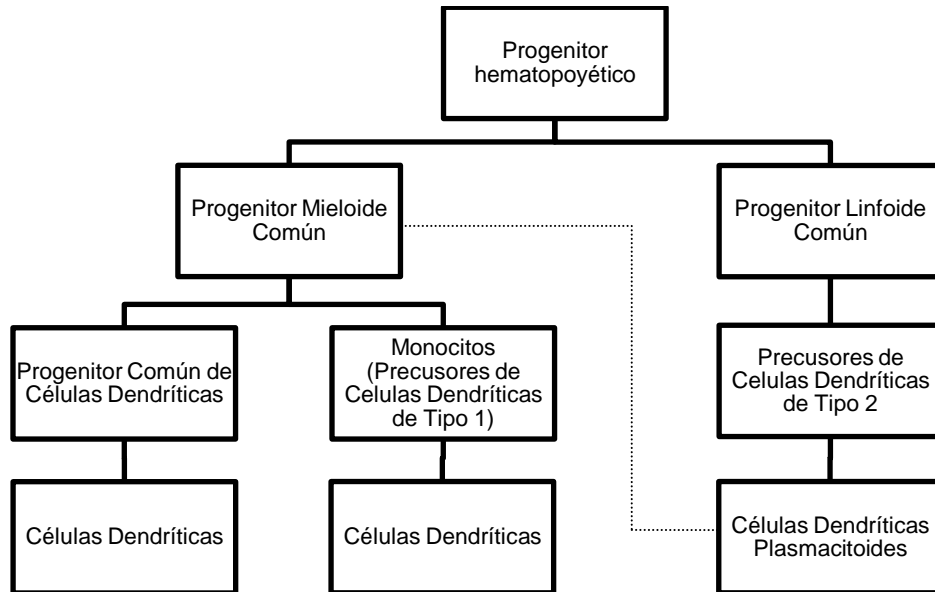
Al igual que otras células del sistema inmunológico, las DCs se originan constantemente a partir de precursores hematopoyéticos. Las vías de desarrollo de las DCs no se encuentran aún bien dilucidadas, sin embargo recientemente se ha esclarecido un poco la ontogenia de dichas células.

Durante la hematopoyesis, los precursores hematopoyéticos dan origen tanto a progenitores mieloides comunes (CMPs) como a progenitores linfoides comunes (CLPs) y a pesar de que las DCs han sido tradicionalmente consideradas células de origen mieloides, se sabe que tanto CMPs como CLPs pueden originar DCs, pues al estimular CLPs con islas CpG (citocina-fosfato-guanina)—regiones ricas en pares de bases de citocina y guanina enlazadas mediante un enlace fosfodiéster— o con (lipopolisacárido) LPS se promueve su diferenciación hacia DCs.

Los CMPs pueden diferenciarse subsecuentemente para originar células de Langerhans o DCs a partir de un progenitor común de DCs (CDP) [14], pero también pueden originar a los monocitos que son considerados como el precursor de DCs de tipo 1 (pre-DC1) y cuyo cultivo en presencia de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y de interleucina 4 (IL-4) da lugar a DCs derivadas de monocitos (moDCs).

Por otro lado, los CLPs originan precursores de DCs de tipo 2 (pre-DC2) cuya maduración en presencia de IL-3 o de virus da origen a DCs plasmacitoides (pDCs) [15, 16], que son células que participan activamente durante infecciones virales produciendo grandes cantidades de interferón gama (IFN- $\gamma$ ) y dirigiendo respuestas de tipo T<sub>H</sub>2. Sin embargo, algunas fuentes señalan que las pDCs también pueden originarse a partir de CMPs [15] (Fig. 2).

Las distintas subpoblaciones de DCs difieren en cuanto a su origen ontogénico, su localización en el organismo, su tiempo de vida media y, probablemente, en los mecanismos por los que se renuevan [17].



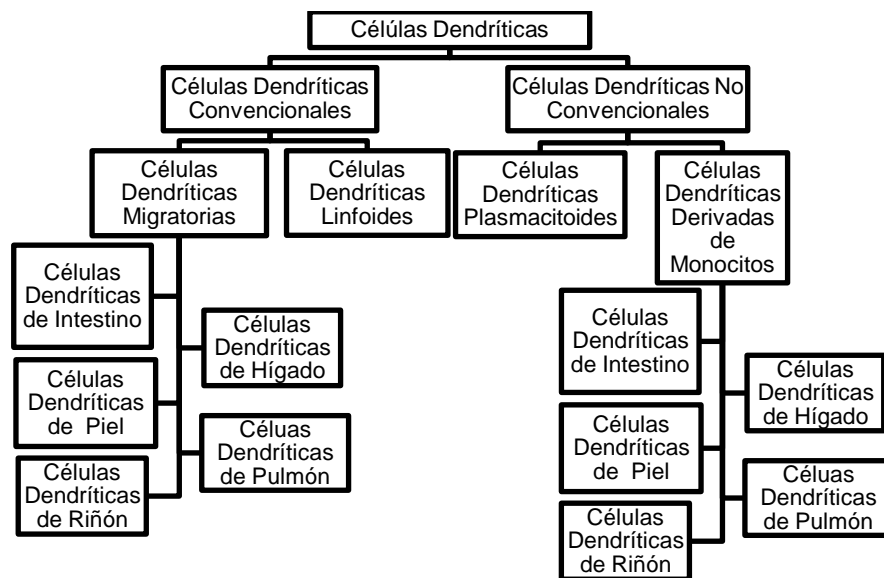
**Figura 2. Diferenciación de células dendríticas a partir de precursores hematopoyéticos.** El precursor hematopoyético se diferencia en progenitores linfoides comunes y en progenitores mieloides comunes que se diferencian subsecuentemente a células dendríticas.

De manera general las DCs se clasifican en dos grupos, las DCs convencionales y las DCs no convencionales. Las DCs convencionales comprenden aquellas DCs que se originaron a partir de un CDP y a unas cuantas subpoblaciones de DCs derivadas de monocitos. Estas DCs convencionales pueden ser clasificadas en DCs residentes de órganos linfoides, también llamadas simplemente DCs linfoides y en DCs migratorias.

Las DCs migratorias poseen la habilidad para migrar de los tejidos periféricos hacia los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y tejidos linfoides de la mucosa [8]) y comprenden subpoblaciones encontradas en la piel, los pulmones, el tracto gastrointestinal, el hígado y los riñones; en tanto que las DCs residentes, como sugiere su nombre, residen en los órganos linfoides como los ganglios linfáticos, el bazo y el timo.

Las DCs no convencionales incluyen a las pDCs y a algunas subpoblaciones de DCs derivadas de monocitos y al igual que las DCs migratorias pueden encontrarse en el hígado, los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal. A su vez, cada una de estos grupos de DCs

incluye diferentes subpoblaciones de DCs identificadas mediante su fenotipo y principalmente por la función que llevan a cabo [14] (Fig. 3).



**Figura 3. Clasificación de las subpoblaciones de células dendríticas en células dendríticas convencionales y no convencionales.** Las células dendríticas convencionales se derivan principalmente de un progenitor común de células dendríticas y se clasifican en migratorias y linfoides, Las células dendríticas no convencionales incluyen a las células dendríticas plasmacitoides y a algunas derivadas de monocitos. Tanto convencionales, como no convencionales se distribuyen en diferentes tejidos del organismo.

### 2.1.2. FUENTES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PARA ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Uno de los principales problemas para el estudio de las células dendríticas *ex vivo* es el bajo número de éstas que pueden obtenerse a partir de tejidos y las etapas de incubación prolongada que se requieren para su aislamiento. Para obtener DCs diferenciadas se pueden emplear rumiantes, ya que ofrecen la ventaja de que las DCs se pueden aislar directamente de linfa.

Una alternativa a la problemática del aislamiento de DCs es la generación *in vitro* de DCs a partir de precursores estimulados con distintas citocinas. Es posible generar DCs mediante el cultivo *in vitro* de monocitos CD14<sup>+</sup> o de precursores leucocitarios CD34<sup>+</sup> provenientes de médula ósea o de sangre de cordón umbilical con elevadas dosis de citocinas, por ejemplo GM-CSF, factor de células madre (SCF) e IL-4. El uso de estos tratamientos suele conducir a

la generación de poblaciones heterogéneas de DCs inmaduras (iDCs). A fin de evitar la heterogeneidad, las células pueden generarse incubando precursores CD34<sup>+</sup> con FLT-3L (ligando de tirosina cinasa 3 tipo fms).

Las DCs provenientes de monocitos de sangre periférica (moDCs) son las células mejor caracterizadas de entre las DCs que se generan por el uso de citocinas. Las moDCs son fenotípicamente similares a las células de Langerhans, expresan altos niveles de CD1a, moléculas MHC clase I y clase II y moléculas coestimuladoras [18]. Las DCs obtenidas de esta manera tienen un fenotipo inmaduro, pero puede inducirse su maduración *in vitro* mediante su exposición a citocinas o a productos bacterianos [19]. El cultivo de moDCs con TNF- $\alpha$  o LPS induce la activación de dichas células, promoviendo el incremento en la expresión de moléculas MHC, de moléculas de adhesión como las moléculas de adhesión intracelular (ICAM), de moléculas coestimuladoras y de antígenos como CD83 y el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal CMRF44 [18].

### **2.1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las DCs poseen una morfología distintiva: poseen largas extensiones membranosas que semejan dendritas de células nerviosas. Esta peculiaridad las dota de una gran área de superficie que les permite entrar en contacto con un gran número de moléculas o células presentes a su alrededor. En su membrana citoplasmática expresan una amplia variedad de receptores que les permiten detectar la presencia de estructuras asociadas a patógenos o a peligros potenciales para el organismo [20].

Otra propiedad de las DCs que les permite llevar a cabo su función como APCs es su elevada capacidad para capturar antígenos. Para ello se valen de mecanismos tales como la fagocitosis, la macropinocitosis o la endocitosis. La fagocitosis consiste en la internalización, dependiente de actina, de partículas mayores a 0.05  $\mu\text{m}$  [13, 21, 22] y en ella participan receptores como los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcRs), los receptores *scavenger*  $\alpha_v\beta_5$  y CD36, lectinas de tipo C como el receptor de manosa y DEC-205, entre otros [13]. La macropinocitosis consiste en la internalización no específica de solutos y fluido extracelular dependiente de actina [19] mediante la formación de vesículas pinocíticas. La endocitosis es un proceso en el que la célula internaliza moléculas a través de la deformación de la membrana y la participación de acarreadores unidos a la membrana [23]. Este último proceso puede estar mediado por receptores del complemento o por el

receptor de manosa. Además de emplear estos mecanismos, las DCs son capaces de secretar exosomas con complejos péptido-moléculas MHC en su interior, mismos que pueden ser capturados por otras DCs, las cuales pueden presentar estos péptidos para la activación de linfocitos T [22].

Las DCs, al igual que otras células del sistema inmunológico, poseen un amplio repertorio de receptores que les permiten decodificar e integrar señales originadas por el reconocimiento de patógenos o de señales endógenas de peligro. Dentro del repertorio de receptores que expresan las DCs se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que son moléculas encargadas de reconocer PAMPs—moléculas altamente conservadas en diversos microorganismos, entre las que se encuentran el lipopolisacárido (LPS), el zimosán y la flagelina—[20].

Las DCs son las células más eficaces para realizar presentación de antígenos y son además las APCs más eficientes para estimular linfocitos T vírgenes y de esta forma iniciar repuestas primarias *in vivo*. La señalización a través de los diversos receptores de las DCs en respuesta a diferentes estímulos induce una transformación fenotípica y funcional de las DCs, al final de la cual serán APCs competentes para iniciar y mantener la expansión y diferenciación de linfocitos T antígeno específicos, en células T efectoras. Dicha transformación es conocida como activación o maduración de las DCs [10, 19, 24, 25, 26, 27].

Entre los receptores que expresan las DCs, están PRRs pertenecientes a tres familias de moléculas: los receptores que son lectinas de tipo C (CLRs), los receptores tipo NOD (NLRs) y los receptores tipo *Toll* (TLRs). Estos últimos son por el momento, los PRRs más estudiados. Si bien algunas de estas moléculas no participan de manera directa en la activación de DCs, se sabe que actúan como receptores endocíticos, tal es el caso del receptor de manosa. Los PRRs que poseen las DCs no sólo se expresan en la superficie celular, sino que también incluyen receptores presentes en compartimientos intracelulares, ya sea en endosomas como algunos TLRs [20], o bien en el citoplasma, como los NLRs.

No todas las subpoblaciones de DCs expresan los mismos TLRs, además de que se ha encontrado que el repertorio de TLRs de las distintas subpoblaciones de DCs no es igual entre diferentes especies. Se ha documentado que las moDCs expresan TLR9, haciéndolas capaces producir altos niveles de IFN- $\alpha$  en respuesta a islas CpG; estas células también expresan TLR4 lo que las hace susceptibles de responder a LPS, mientras que las pDCs no

expresan este último receptor [24]. Cada TLR es capaz de reconocer diferentes PAMPs y cada microorganismo posee una combinación específica de éstos últimos. La activación de diversos TLRs presentes en las DCs conduce a diferentes perfiles de maduración de las DCs y en consecuencia a diferentes tipos de respuestas; por ejemplo, el LPS presente en algunas bacterias estimula a las DCs a través del TLR4, llevando a la inducción de una respuesta tipo  $T_H1$  mediante la secreción de IL-12, mientras que la estimulación del TLR2 por algunas lipoproteínas induce la producción de IL-10 en DCs, lo que al final favorece una respuesta de tipo  $T_H2$ .

Las DCs expresan un amplio número de CLR y análogamente a los TLRs, diferentes poblaciones de DCs expresan diferentes CLR. Estos receptores de la familia de lectinas tipo C no sólo participan en el reconocimiento de microbios, sino que actúan como moléculas de adhesión entre DCs y entre éstas y otros tipos celulares. Algunos CLR expresados por DCs son BDCA2, langerina, ICAM1, el receptor de manosa DEC-205 y DC/SIGN.

Los NLRs, especializados en reconocer componentes microbianos intracelulares, activan vías de señalización que conducen a la producción de citocinas proinflamatorias. De momento no se conoce mucho acerca de los NLRs que expresan las DCs, pero se sabe que NOD1/2, NALP1 y una isoforma de NALP3 se expresan en algunas subpoblaciones de DCs [20].

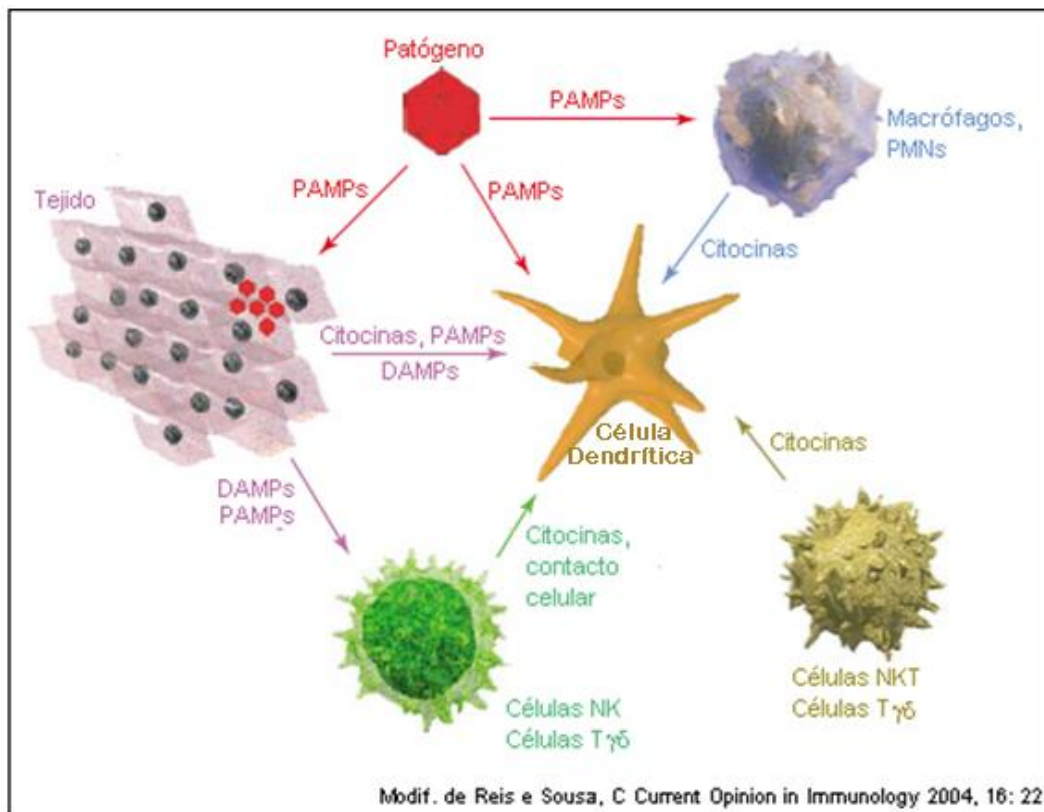
#### **2.1.4. MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

El desarrollo funcional de las DCs comprende dos etapas: células dendríticas inmaduras (iDCs) y células dendríticas maduras (mDCs). La captura de antígenos por parte de las iDCs induce cambios fenotípicos y funcionales en las células durante un proceso denominado maduración, al final del cual, las células poseen la capacidad de fungir como APCs para la activación de linfocitos T vírgenes.

Diversos factores inducen o regulan la maduración de DCs, entre ellos: a) PAMPs como el LPS, DNA bacteriano o RNA de doble cadena; b) patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que son moléculas endógenas del hospedero liberadas por células dañadas, tales como las proteínas de choque térmico (HSP), la fibronectina y el ácido hialurónico; c) el balance entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias en el microambiente, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, el factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ) y prostaglandinas; y d) interacciones con otras células [24] (Fig. 4).

La maduración de las DCs implica varios cambios fenotípicos que ocurren de manera coordinada tales como la disminución de la capacidad endocítica/fagocítica de las células, el aumento en la expresión de moléculas MHC y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), incremento en la motilidad celular, cambios morfológicos y cambio en el contenido de los compartimentos lisosomales [28]. Las características de las mDCs y de las iDCs se muestran resumidas en la Tabla 1.

Los cambios morfológicos que se observan durante la maduración se deben a factores como la pérdida de las estructuras de adhesividad, reorganización del citoesqueleto y el aumento en la motilidad celular. La fascina, una proteína de unión a actina, regula la remodelación del citoesqueleto permitiendo el alargamiento de proyecciones dendríticas en la célula [25].



**Figura 4. Señales involucradas en la activación de células dendríticas.** Las DCs pueden detectar la presencia de un patógeno potencial a través de PAMPs (señales exógenas) o a través de la alteración de marcadores propios inducida por la infección (señales endógenas). Cualquiera de estas señales es detectada por las DCs en forma directa o indirecta. (Modificada de Reis e Sousa, C. 2004).

Si bien las DCs maduras presentan una reducción en su habilidad para capturar antígenos al disminuir su capacidad endocítica y fagocítica, resultan más aptas para procesar antígenos previamente endocitados puesto que durante la maduración activan la maquinaria encargada del procesamiento de antígenos, para ello modifican el contenido de sus lisosomas e incrementan la expresión de la proteína de membrana de células dendríticas asociada a lisosomas (DC-LAMP).

Las DCs inmaduras se localizan en diversos tejidos y pueden migrar a sitios de inflamación en respuesta a quimiocinas inflamatorias como CCL3, CCL5, y CCL20; una vez localizadas en el sitio de inflamación, las DCs capturan los antígenos ahí presentes, mismos que inducen la maduración de las DCs. Al madurar, las DCs comienzan a expresar el receptor CCR7, lo que les permite migrar del sitio de inflamación a los órganos linfoides secundarios en respuesta a citocinas como CCL19 y CCL21. Es decir, las DCs no responden a las mismas quimiocinas durante sus diferentes etapas funcionales, ya que aunque algunos receptores a quimiocinas se expresen en ambas etapas funcionales de las DCs, al madurar, ocurren disminuciones en la expresión o desensibilización de algunos de estos receptores [26, 29]


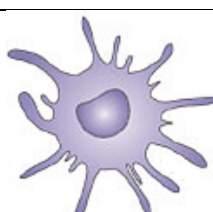
Una vez cargadas con el antígeno, las DCs maduras son capaces de interactuar con otros leucocitos a través de moléculas pertenecientes a tres familias: citocinas, moléculas de la familia B7 y moléculas de la familia TNF.

Las citocinas son proteínas pequeñas liberadas por las células en respuesta a un estímulo y que inducen respuesta mediante la unión a su receptor. Entre las citocinas que producen las DCs maduras se encuentran la IL-12, que promueve la diferenciación de linfocitos T *naive* hacia linfocitos efectores con el perfil de linfocitos T<sub>H</sub>1. Otras moléculas de la familia IL-12 liberadas por las DCs maduras son IL-23 e IL-27, pero a diferencia de la IL-12, regulan la respuesta inmunológica promoviendo la diferenciación de linfocitos T hacia linfocitos T<sub>H</sub>17, aunque el desarrollo de estas células también depende de otras citocinas como IL-6.

Las moléculas de la familia B7 son esenciales en la regulación de la tolerancia inmunológica y la inducción de respuestas inmunológicas mediadas por linfocitos T. Se sabe que los siete miembros de esta familia de moléculas: CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), el ligando coestimulador inducible (ICOSL), el ligando 1 de muerte celular programada (PD-L1; B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 y B7-H4 se expresan en DCs. Tanto CD80 como CD86 son usados comúnmente como marcadores de maduración de DCs.



Es conocido que TNF y CD40 son capaces de activar DCs. La unión CD40-ligando de CD40 (CD40L, CD154) incrementa la expresión de CD80 y CD86 en las DCs e induce la secreción de IL-12. La unión CD40-CD40L también induce la expresión de otras moléculas de la familia TNF en DCs como CD70, el ligando de 4-1BB (4-1BBL) y el ligando de OX40 (OX40L). Todos estos cambios tienen la finalidad de dar a la célula dendrítica madura la capacidad de promover la activación de linfocitos T *naive*.

|   |   |  |
|---|---|--|
|    | → |    |
| Células Dendríticas Inmaduras                      Células Dendríticas Maduras  |   |  |
| Marcadores de Superficie  |   |  |
| FcγR, TLR, DC-SIGN <sup>alta</sup> , CD83 <sup>baja</sup> ,<br>CD80, CD86 <sup>intermedia</sup> , MHC-I,<br>MHC-II <sup>intermedia</sup> , DC-STAMP <sup>alta</sup> . |   | FcγR, TLR, DC-SIGN <sup>baja</sup> , CD83 <sup>alta</sup> ,<br>CD80, CD86 <sup>alta</sup> , MHC-I, MHC-II <sup>alta</sup> , DC-<br>STAMP <sup>baja</sup> . |
| Localización de las Moléculas MHC-II  |   |  |
| Compartimientos intracelulares  |   | Superficie   |
| Producción de Citocinas   |   |  |
| IL-1, IL-6, TNF-α, IL-12 baja   |   | IL-1, IL-6, TNF-α, IL-12 alta  |
| Producción de Quimiocinas   |   |  |
| CCL17, CCL18, CCL19 baja, CCL22,<br>CXCL8 alta  |   | CCL17, CCL18, CCL19 alta, CCL22,<br>CXCL8 baja   |
| Expresión de Receptores de Quimiocinas  |   |  |
| CCR1, CCR5, CCR6 <sup>++</sup>  |   | CCR1, CCR5, CCR7 <sup>++</sup>   |
| Capacidad Endocítica/Fagocítica   |   |  |
| Elevada   |   | Disminuida   |
| Activación de Linfocitos T  |   |  |
| Capacidad moderada para inducir la<br>actividad de linfocitos T.  |   | Capacidad elevada para inducir la<br>actividad de linfocitos T.  |

**Tabla 1. Fenotipo y comportamiento funcional de las DCs durante su desarrollo.** Las iDCs y las mDCs difieren en cuanto a su repertorio de moléculas de superficie, proteínas secretadas y en cuanto a su capacidad para internalizar antígenos.

## 2.2. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DCs llevan a cabo múltiples funciones, entre las que se encuentran la capacidad de iniciar respuestas inmunológicas primarias a través del estímulo de linfocitos T *naive*, la inducción de tolerancia inmunológica y se sabe también que pueden actuar como células efectoras de la inmunidad innata [15]. De manera general, estas funciones pueden clasificarse en tres grupos:

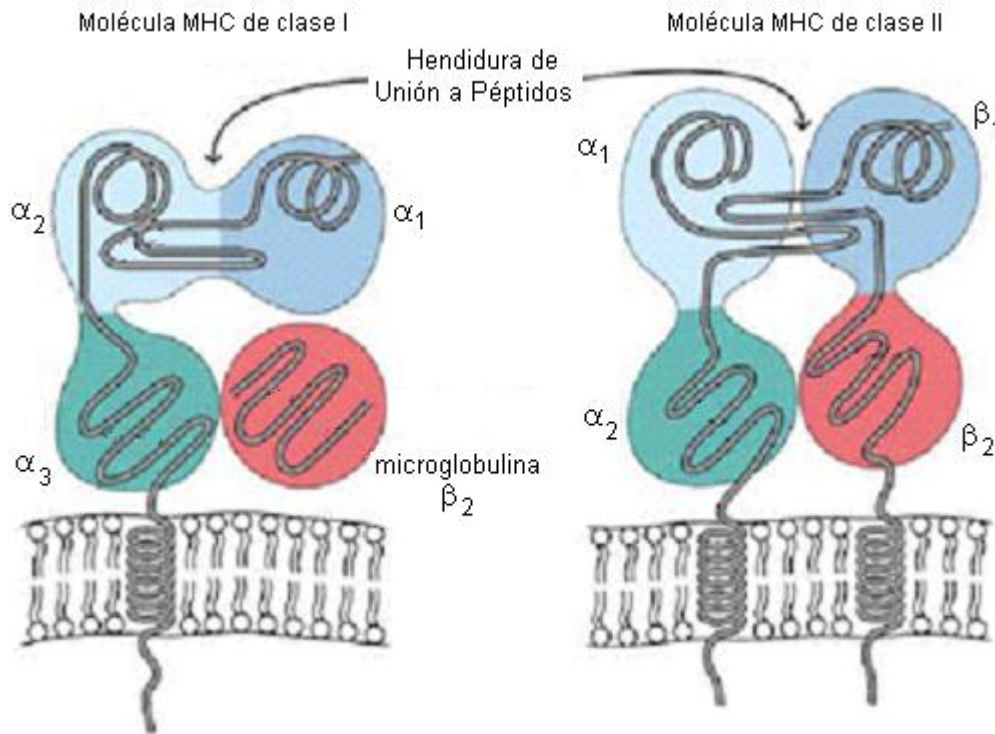
- ▶ Captura, presentación de antígeno y activación de linfocitos T.
- ▶ Inducción de tolerancia inmunológica.
- ▶ Estimulación de linfocitos B y mantenimiento de la memoria inmunológica [22, 30]

### 2.2.1. CAPTURA, PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO Y ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

A diferencia de los linfocitos B, los linfocitos T sólo son capaces de reconocer antígenos si éstos les son presentados en forma de péptidos por una APC. Los receptores de antígeno de los linfocitos T (TCRs) reconocen fragmentos de antígenos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las APCs. Estas moléculas proteicas pueden ser de dos tipos: moléculas MHC de clase I (MHC-I) o moléculas MHC de clase II (MHC-II), las cuales presentan péptidos antigénicos a linfocitos T CD8<sup>+</sup> y a linfocitos T<sub>H</sub> CD4<sup>+</sup>, respectivamente.

Todas las células nucleadas expresan moléculas MHC-I, por lo que todas ellas podrían ser designadas APCs, aunque por convención las células capaces de presentar antígenos unidos a moléculas MHC-I se denominan células blanco, mientras que aquéllas que presentan antígenos unidos a moléculas MHC-II son conocidas como APCs. Las DCs, los macrófagos y los linfocitos B son consideradas APCs profesionales, que se distinguen por su capacidad para internalizar antígenos complejos del ambiente, degradarlos en compartimientos intracelulares y expresarlos en la superficie celular asociados a moléculas del MHC clase II para que puedan ser reconocidos por linfocitos T. Además, pueden proveer al linfocito T señales adicionales capaces de incrementar y modular su activación. Estas células difieren entre sí como APCs por los mecanismos que emplean para captar antígeno, por expresar de manera constitutiva o no moléculas MHC-II y por su actividad coestimuladora [10, 13, 31].

Las moléculas MHC-I y MHC-II son glucoproteínas que se expresan en la membrana celular y que están relacionadas estructural y funcionalmente. Son productos de genes localizados en una región genética específica llamada Complejo Principal de Histocompatibilidad. Las moléculas MHC-I se componen de una cadena  $\alpha$  organizada en tres dominios y codificada por las regiones A, B y C del Complejo HLA humano, y de una molécula de microglobulina  $\beta_2$ . Las moléculas MHC-II se componen de dos cadenas polipeptídicas: una cadena  $\alpha$  y otra  $\beta$ , codificadas en humanos en el complejo HLA por las regiones DP, DQ y DR. Ambas cadenas, la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  se organizan en dos dominios extracelulares. Tanto la moléculas de clase I como las de clase II cuentan con una hendidura de unión del péptido, la de las moléculas MHC-I une péptidos de 8 a 10 aminoácidos, en tanto que la hendidura de las moléculas MHC-II unen péptidos de un tamaño mayor—13 a 18 aminoácidos—(Fig. 5).



**Figura 5. Representación esquemática de la estructura de las moléculas MHC de clase I y de clase II.** Cada dominio se muestra sombreado con un color diferente. (Modificado de Kindt, T. *et al* 2007).

### VÍA EXÓGENA DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Las DCs migran al sitio de inflamación o infección como respuesta inicial a la presencia de antígeno. Una vez que una DC ha captado algún antígeno exógeno gracias a los diversos mecanismos que posee para captar material extracelular, éste ingresa a la vía endocítica de

la célula para ser procesado. La vía endocítica se compone de tres compartimentos con diferentes grados de acidez: los endosomas tempranos (pH entre 6.0 y 6.5), los endosomas tardíos, también llamados endolisosomas (pH entre 5.0 y 6.0) y los lisosomas (pH entre 4.5 y 5.0). Tales compartimentos poseen enzimas hidrolíticas con pH óptimo en el rango ácido, entre las que se encuentran proteasas, glucosidasas, nucleasas, fosfolipasas, lipasas y fosfatasa. Estas enzimas degradan al antígeno endocitado en polipéptidos de 10 a 13 aminoácidos. La degradación del antígeno se denomina procesamiento de antígeno.

Las DCs son capaces de sintetizar grandes cantidades de moléculas MHC-II en el retículo endoplásmico rugoso. Tres pares de cadenas  $\alpha\beta$  se unen a una proteína llamada cadena invariante (Ii, CD74) que interactúa con la hendidura de unión de péptidos con la finalidad de impedir que cualquier péptido se una a dicha región [10]. Mientras las DCs se encuentran en un estado inmaduro las moléculas MHC-II son almacenadas en compartimentos ricos en moléculas MHC-II (MIICs) que son endosomas que contienen además a la molécula no clásica HLA-DM. Mientras las DCs se encuentran en su estado inmaduro, muchas moléculas MHC-II se degradan en estos compartimentos [13]. La cadena invariante es degradada gradualmente por la actividad proteolítica de la vía endocítica, aunque un pequeño fragmento de esta cadena, llamado CLIP (péptido de la cadena invariante relacionado con moléculas clase II) permanece unido a las moléculas MHC-II hasta que la molécula HLA-DM media el intercambio de CLIP por péptidos antigénicos procesados. Finalmente, los complejos moléculas MHC-II-péptido llegan a la superficie celular, donde pueden activar a linfocitos  $T_H$   $CD4^+$  [10] (Fig.6).

### VÍA CITOSÓLICA DE PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Algunos microorganismos como los virus y bacterias citosólicas obligadas se eliminan mediante linfocitos T citotóxicos (CTLs), cuya función es matar a la célula infectada [8]. Al replicarse, estos microorganismos generan antígenos intracelulares que son marcados con ubiquitina para poder ser degradados mediante un sistema citosólico proteolítico denominado proteasoma. Una vez que los antígenos han sido degradados en el citosol hasta péptidos de entre 8 y 10 aminoácidos, éstos son transportados al retículo endoplásmico por un heterodímero llamado transportador relacionado con el procesamiento de antígeno (TAP) constituido por las cadenas TAP1 y TAP2. Al igual que otras proteínas, las cadenas  $\alpha$  y la microglobulina  $\beta_2$  se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso, sólo que para salir de

éste requieren estar correctamente plegadas y cargadas con un péptido en la hendidura de unión a péptido, para lo que requieren de la participación de proteínas denominadas chaperonas moleculares. En primer lugar, la calnexina facilita el plegamiento de la cadena  $\alpha$ . Al unirse la microglobulina  $\beta_2$ , la calnexina se disocia y se unen las moléculas calreticulina y tapasina, esta última promueve la interacción de TAP con la molécula MHC-I, quedando esta última cargada con un péptido. La proteína ERp57 permite que la molécula MHC-I se libere de las chaperonas moleculares luego de haber unido al péptido. Por último, el complejo molécula MHC-I-péptido es llevado hasta la membrana celular a fin de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> [8,10] (Fig. 6).

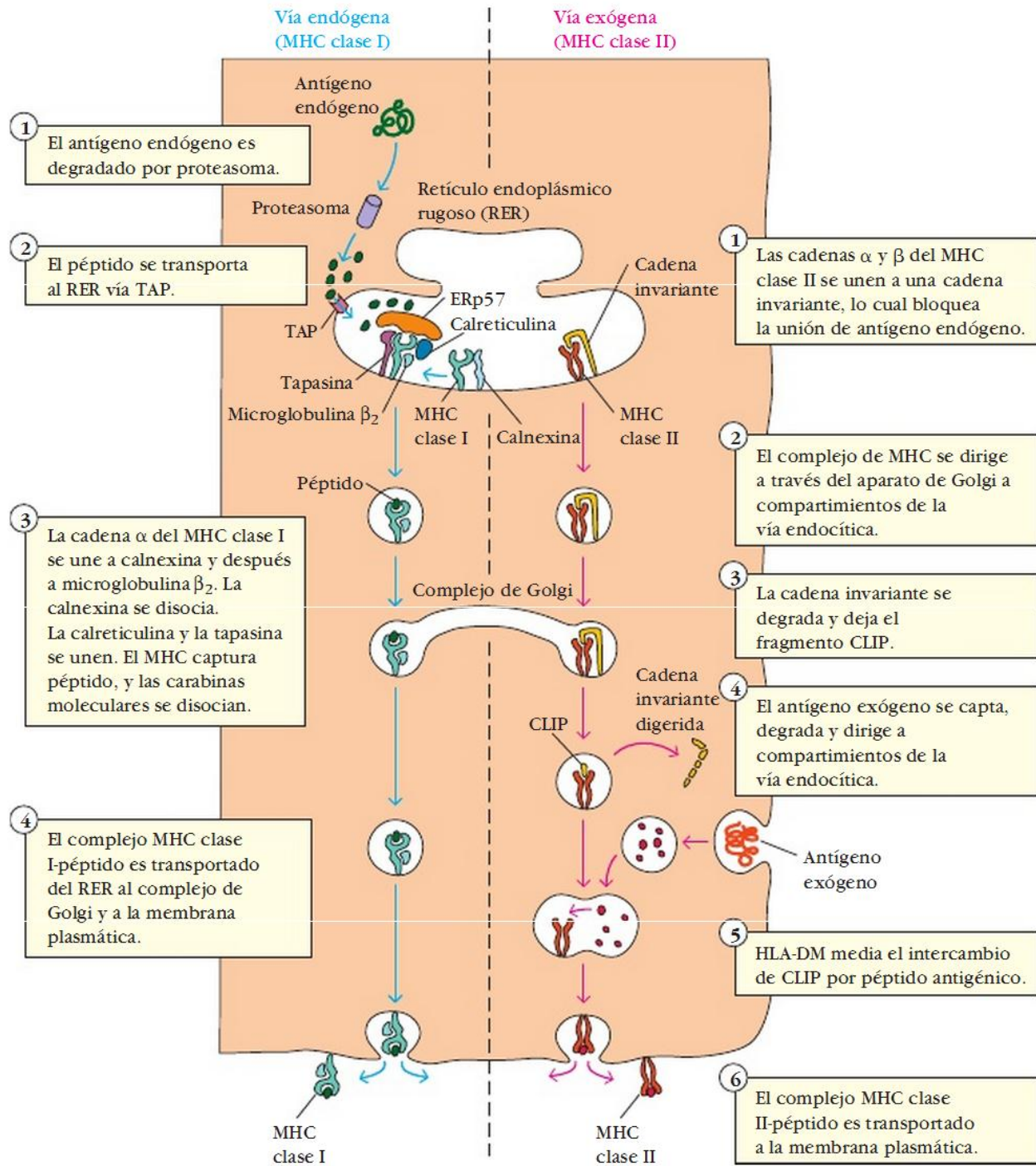
### PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS ENDÓGENOS

En ocasiones, las APCs presentan antígenos exógenos en el contexto de moléculas MHC-I. Se ha propuesto que esta presentación de antígeno, denominada presentación cruzada, se deba a un intercambio dentro del compartimento endosómico de péptidos exógenos por otros ya cargados en moléculas MHC-I o a que péptidos exógenos tengan acceso al retículo endoplásmico [10].

Una vez que las DCs consiguen presentar al antígeno por cualquiera de las vías antes mencionadas dejan de responder a quimiocinas específicas para DCs inmaduras a través del descenso en la expresión de los receptores para éstas o por la desensibilización de tales receptores. Así las DCs son capaces de escapar de los gradientes de citocinas del sitio de inflamación o infección al que fueron reclutadas. Al madurar, la DCs aumentan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 y adquieren la capacidad de responder a quimiocinas como MIP-3 $\beta$ , CCL21 y CCL19. En consecuencia, las DCs dejan el tejido inflamado y se dirigen a los órganos linfoides como el bazo y ganglios linfáticos para activar a linfocitos T.

La interacción de complejos moléculas MHC-péptido con los TCRs constituye la primera señal de interacción entre los linfocitos T y las DCs. Sin embargo, esta señal no es suficiente para activar al linfocito, sino que es necesaria la participación de moléculas que mantengan la interacción entre ambas células y que induzcan señales intracelulares complementarias. Esta segunda señal es proporcionada por moléculas denominadas coestimuladoras [25]. Entre ellas, las mejor caracterizadas son CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). El principal ligando de estas moléculas es CD28. En linfocitos T que ya han sido activados, se induce la expresión de un segundo receptor que interacciona con CD80 y con CD86 denominado antígeno 4 de

linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). Otras moléculas coestimuladoras presentes en las DCs son OX40L y CD40, que interactúan respectivamente con OX40 y con CD40L presentes en la superficie del linfocito T [31].



**Figura 6. Representación de las vías de presentación de antígenos externa e interna. (Tomado de Goldsberg et. al. 2008).**

Diferentes subpoblaciones de DCs proporcionan diferentes microambientes que determinan la clase de respuesta inmunológica que se ha de llevar a cabo; por ejemplo, las DCs CD11<sup>+</sup> polarizan linfocitos T vírgenes hacia linfocitos T<sub>H</sub>1, esto debido principalmente a la producción de IL-12, en tanto que las CD11<sup>-</sup> producen citocinas que conducen a respuestas tipo T<sub>H</sub>2.

### **2.2.2. INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA**

Tolerancia es la incapacidad del sistema inmunológico de responder a antígenos específicos. La tolerancia central ocurre en el timo para linfocitos T y en la médula ósea para los linfocitos B (órganos linfoides centrales o primarios). Durante este proceso se eliminan linfocitos que son capaces de responder a antígenos propios. Las DCs se encuentran de manera abundante en el timo, donde se producen y maduran los nuevos linfocitos T. Aquellos linfocitos que muestran una afinidad muy elevada por antígenos propios presentados por DCs en el contexto de moléculas MHC propias son eliminados por deleción y fagocitados por macrófagos mediante un proceso denominado selección negativa. Aquellos linfocitos con baja afinidad hacia los antígenos propios sobreviven y llegan a la periferia [13].

Los linfocitos que escapan a este proceso de selección negativa, que salen de los órganos linfoides centrales y que pueden reaccionar con un autoantígeno en la periferia, deben ser eliminados o inactivados mediante un mecanismo que se denomina tolerancia periférica.

Las DCs residentes en los órganos linfoides secundarios como bazo y ganglios linfáticos, tienen un tiempo de vida media prolongado y expresan altos niveles de complejos moléculas MHC-antígeno propio. Probablemente los linfocitos T que reconocen estos antígenos se tornan anérgicos o mueren en respuesta a antígenos persistentes y abundantes. Los mecanismos de tolerancia periférica incluyen muerte celular, anergia y supresión activa mediante linfocitos T reguladores (T<sub>reg</sub>) [8]. Las DCs que participan en la inducción de tolerancia se encuentran en un estado parcialmente maduro, es decir, expresan altos niveles de moléculas MHC en su superficie pero bajos niveles de moléculas coestimuladoras, lo que las hace aptas para inducir tolerancia. En el caso de DCs que capturan cuerpos apoptóticos, sólo se inducen altos niveles de expresión de moléculas MHC-II. Cuando además de captar cuerpos apoptóticos las DCs son estimuladas a través de TLRs por productos microbianos, es decir que la ausencia de señalización a través de estos receptores en DCs conduce a los linfocitos T a un fenotipo tolerante [22].

### **2.2.3. ESTIMULACIÓN DE LINFOCITOS B Y MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA INMUNOLÓGICA**

Las DC pueden contribuir a la estimulación directa de linfocitos B en los ganglios linfáticos mediante la secreción de citocinas que son críticas para la activación y desarrollo de estos linfocitos, aunque también los estimulan en forma indirecta, es decir, las DCs activan linfocitos T<sub>H</sub> que a su vez secretan citocinas necesarias para la proliferación de los linfocitos B y la producción de anticuerpos.

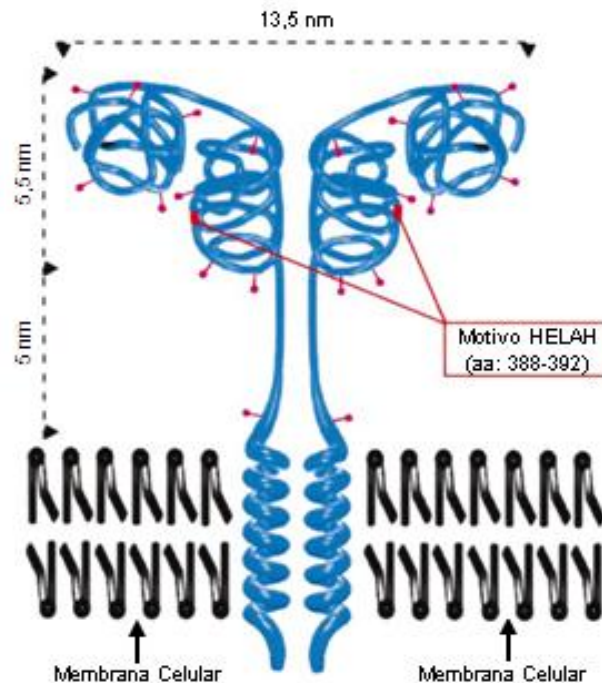
Por otra parte las DCs foliculares (FDCs) mantienen la viabilidad, el crecimiento y la diferenciación de linfocitos B activados. Las FDCs capturan y exhiben complejos antígeno-anticuerpo en su superficie que son reconocidos por los linfocitos B con elevada afinidad, posteriormente éstos procesan al antígeno y lo presentan en el contexto de moléculas MHC-II a linfocitos T [13]. Las DCs de centros germinales (GCDCs) estimulan, a través de IL-12 la proliferación de linfocitos B y favorecen su diferenciación hacia células plasmáticas [25].

### **2.3. AMINOPEPTIDASA N (CD13)**

La aminopeptidasa N (CD13; EC.3.4.11.2) es una proteína de membrana de tipo-II altamente glicosilada, que forma dímeros en la membrana celular. Esta enzima está formada por 963 aminoácidos, la mayor parte de ellos (926) se localiza en la región extracelular. Tiene también una región transmembranal y una pequeña región intracelular de entre 8 y 10 aminoácidos. CD13 es una ectoenzima transmembranal perteneciente a la familia M1 de las metalopeptidasas que posee el motivo HELAH de unión a Zn<sup>2+</sup> (Fig. 7).

CD13 se expresa en los epitelios renal e intestinal, en las membranas sinápticas del sistema nervioso central, en células mieloides (monocitos, DCs y macrófagos), en células tipo fibroblasto, en células endoteliales; además, en el suero humano se ha reconocido una forma soluble de CD13 [2].





**Figura 7. Representación de la estructura de CD13.** La aminopeptidasa CD13 es una proteína transmembranal homodimérica. Consta de dos subunidades unidas mediante enlaces no covalentes, cada una de las cuales posee 10 sitios de glicosilación (mostrados en color rojo). (Modificado de Rieman et. al. 1999).

### 2.3.1. FUNCIONES DEPENDIENTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CD13

CD13 es bastante conocida por su actividad enzimática que consiste en la eliminación de los aminoácidos N terminales de algunos péptidos. Sin embargo se sabe que CD13 es capaz de participar en numerosos procesos, por ello es que se considera una enzima multifuncional y es debido a esto que sus funciones dependen de su localización [32].

Entre las funciones llevadas a cabo por CD13, que son dependientes de su actividad enzimática se encuentran:

- Regulación de péptidos. El papel que desempeña CD13 como enzima consiste en la remoción de aminoácidos, preferentemente de carácter neutro, del extremo N terminal de oligopéptidos no sustituidos, amidas o arilamidas. Al retirar la porción amino terminal, CD13 regula la actividad de algunos péptidos como las encefalinas en las que disminuye su vida media, citocinas y quimiocinas (*in vitro*), angiotensinas y proteínas de matriz extracelular.
- Capacidad invasiva de células tumorales. Se ha demostrado que la capacidad invasiva de células tumorales correlaciona con la actividad enzimática de CD13 y que el uso de

anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD13 disminuye el potencial invasivo. Por otro lado, CD13 se ha encontrado altamente expresado en algunas neoplasias.

- Diferenciación. Se sabe que CD13 participa en procesos de diferenciación celular debido a que CD13 tiene diferentes grados de expresión en las diversas etapas de diferenciación de células mieloides. Agentes como los ésteres de forbol, el TGF- $\beta$ , interleucinas como IL-4 e IL-10 regulan su expresión y además, el uso de mAbs anti-CD13 anula la diferenciación celular.
- Apoptosis y proliferación celular. Algunos inhibidores de la actividad enzimática de CD13 como la bestatina, la actinomicina y algunos mAbs, suprimen la proliferación de algunas líneas celulares de leucemia y de carcinomas.
- Quimiotaxis. CD13 induce quimiotaxis de linfocitos *in vitro*, misma que es inhibida con bestatina. Además de que CD13 participa en la degradación de quimiocinas como CXCL11. Regula la migración inducida por CXCL12 y el entrecruzamiento de CD13 provoca secreción de CXCL8.
- Motilidad celular. Se sabe que la migración de algunas células cancerosas se inhibe mediante el entrecruzamiento de CD13 con mAbs, mientras que la expresión estable de CD13 en la membrana y la adición de CD13 en su forma soluble incrementa la capacidad migratoria de estas células. Asimismo, se sabe que CD13 participa en la motilidad de espermatozoides en humanos [2].
- Presentación de Antígeno. Se ha reportado la participación de CD13 en el procesamiento extracelular de los antígenos presentados por DCs en el contexto de moléculas MHC-II [33]. Además se demostró que la preincubación de DCs con mAbs anti-CD13 inhibe la proliferación de linfocitos T. Esto último sugiere que CD13 podría estar implicada en la presentación de antígeno no sólo mediante su actividad enzimática.

### **2.3.2. FUNCIONES INDEPENDIENTES DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE CD13**

No todas las funciones en las que está implicada CD13 son dependientes de su actividad enzimática. Muchas de estas funciones han sido identificadas luego de que CD13 fue entrecruzada con mAbs y se sabe que son independientes de la actividad enzimática de CD13 puesto que algunos de los anticuerpos que se han empleado bloquean el sitio catalítico de esta aminopeptidasa.

Se ha sugerido el papel de CD13 como regulador de señales inducidas por otros receptores, ya que se ha demostrado que su entrecruzamiento conduce a la fosforilación de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) e induce flujos de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula.

A pesar de que CD13 tiene un dominio citoplásmico muy corto carente de motivos de señalización, se ha propuesto que CD13 participe en la señalización de algunas de las funciones que realiza mediante su asociación con proteínas auxiliares que no han sido identificadas plenamente, pero podrían ser moléculas como galectina-3, galectina-4, la proteína rica en cisteína con motivos Kazal que induce reversión (RECK) o el antígeno asociado a tumores L6 [2].

Entre las funciones que desempeña CD13 y que no dependen de su actividad enzimática se encuentran:

- Receptor viral. En varias especies, CD13 se ha identificado como receptor de diversos virus. En humanos funciona como receptor del coronavirus humano 229E (HCoV-229E). También se le ha relacionado con la infección por citomegalovirus humano, pues se sabe que el uso de mAbs anti-CD13 impide la infección viral.
- Endocitosis de colesterol. Se sabe que CD13 participa en la endocitosis de colesterol por enterocitos. Se ha propuesto que CD13 participa en este proceso asociada a receptores Fcγ.
- Fagocitosis. Tokuda y Levi [34] reportaron que el nivel de expresión de CD13 correlaciona con la capacidad fagocítica de las células mononucleares de sangre periférica. Por trabajos previos del laboratorio [4] se sabe que CD13 se redistribuye hacia la copa fagocítica durante la fagocitosis y que el entrecruzamiento de receptores Fcγ y de CD13 simultáneamente con partículas fagocíticas incrementa la fagocitosis que se observa al entrecruzar solamente receptores FcγRs.
- Angiogénesis. CD13 es capaz de degradar proteínas de matriz extracelular, generar péptidos con propiedades angiogénicas o antiangiogénicas y participar en la señalización de factores angiogénicos y de crecimiento.
- Adhesión. Altas cantidades de CD13 han sido identificadas en las zonas de contacto celular entre células de melanoma en crecimiento [35]. Por otro lado, se ha encontrado que el entrecruzamiento de CD13 en monocitos provoca la agregación homotípica de los mismos [36].

### 2.3.3. CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS

A la fecha no se ha estudiado profundamente el papel que desempeña CD13 en las DCs. Se sabe que CD13 tiene una alta expresión durante el desarrollo de células mieloides y si bien no es indispensable para que se lleve a cabo una correcta hematopoyesis [37], el grado de expresión de ésta molécula correlaciona con el desarrollo y la activación de DCs y de macrófagos derivados de células de cordón umbilical CD34<sup>+</sup> [38]. Otro estudio reveló que la falta de CD13 en DCs de ratones *knock out* no afecta el desarrollo ni la maduración de las células, ni el procesamiento ni presentación del antígeno [39]. Sin embargo, van der Velden [40] identificó la participación de CD13 en la maduración de DCs, sugiriendo que la aminopeptidasa N podría estar activando péptidos que promueven la maduración autócrina o parácrina.

En lo que a la presentación de antígenos se refiere, algunos grupos de trabajo han identificado la participación de CD13 durante la modificación de los péptidos a presentar por escisión [33, 41]. Larsen y colaboradores [33] identificaron que CD13 puede digerir el extremo amino terminal de los péptidos cargados en las moléculas MHC-II, generando epítomos que reconocen los linfocitos T.

Otro de las funciones de CD13 que se ha estudiado en DCs es su papel como receptor viral, en este sentido Mesel-Lemoine y colaboradores [42] estudiaron la infección por HCoV-229E en DCs y en monocitos, concluyendo que sin existir diferencia en el grado de expresión de CD13, las DCs resultan más susceptibles que los monocitos a la muerte debida a la infección viral.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

CD13 es una molécula que se expresa, entre otras células, en células hematopoyéticas mieloides, incluyendo a las DCs [38, 43].

Se ha propuesto que a través de su actividad enzimática, CD13 participa en la producción de DCs [38]. Aunque se sabe que no es indispensable para este proceso [37], es posible que esté regulando la producción y maduración de DCs.

Se sabe que CD13 participa en procesos de adhesión y, por datos generados previamente en el laboratorio, se sabe que esta aminopeptidasa participa en la modulación de la fagocitosis a través de FcγRI en monocitos [4], que es una molécula fagocítica por sí misma [Ortega, E. y Licona, I. Datos no publicados] y que es capaz de inducir la formación de especies reactivas de oxígeno [5]. Todo ello apunta a que CD13 podría fungir como receptor de la inmunidad innata. Como tal, podría ser capaz de inducir maduración de DCs o de modular la maduración que se da en respuesta a la estimulación de otros receptores, como lo hace Dectina-1 en la maduración inducida a través de TLR2 [44].

En este trabajo se propuso estudiar el papel del entrecruzamiento CD13 en la maduración de DCs humanas. Hasta donde sabemos, la participación de CD13 en la maduración de las DCs sólo se ha estudiado a nivel de su actividad enzimática [40]. Nosotros propusimos estudiar la participación de esta molécula como un posible receptor capaz de inducir o de modular la maduración de DCs. La importancia de estudiar el papel de DC13 en la maduración de monocitos humanos es conocer más sobre el papel de esta molécula en los mecanismos inmunológicos de defensa.

### **4. HIPÓTESIS**

El entrecruzamiento de CD13 puede modular positivamente la maduración de células dendríticas humanas.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar si la estimulación de células dendríticas inmaduras por el entrecruzamiento de CD13 induce la expresión de marcadores de maduración y si puede modular la maduración inducida por estímulos bacterianos (LPS) o endógenos (TNF- $\alpha$ ).

### OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Determinar la capacidad de CD13 de modificar la expresión de marcadores de maduración (CD83, CD86 y HLA-DR) en células dendríticas humanas.
- II) Determinar la capacidad de CD13 de modular la expresión de marcadores de maduración (CD83, CD86 y HLA-DR) de células dendríticas inducida por LPS y por TNF- $\alpha$ .
- III) Determinar la capacidad de CD13 de inducir la secreción de citocinas (IL-12 y TNF- $\alpha$ ) por células dendríticas humanas.
- IV) Determinar la capacidad de CD13 de modular la secreción de citocinas (IL-12 y TNF- $\alpha$ ) inducida por LPS y por TNF- $\alpha$ .
- V) Determinar el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre la expresión del receptor de quimiocinas CCR7.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. CÉLULAS

Las células dendríticas se obtuvieron a partir de monocitos humanos aislados de sangre periférica. Para el aislamiento de monocitos se emplearon concentrados leucocitarios de donadores sanos, los cuales nos fueron donados por el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Dr. Ismael Cosío Villegas”.

#### 6.1.1. OBTENCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS

El contenido de una bolsa de concentrado leucocitario se dividió en dos tubos de polipropileno con capacidad para 50 mL (Falcon) nuevos y estériles. Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 20 minutos a 10 °C, sin freno ni aceleración (Eppendorf centrifuge 5810R). Se separó el suero autólogo (capa superior) sin tomar el botón celular.

Se conservaron 15 mL de suero autólogo y se desechó el resto. El suero conservado se inactivó incubándolo durante 30 minutos a 56 °C, se centrifugó a 4401 g durante 20 minutos a 4 °C (Sorvall Legend March 1.6R). Se desechó el botón y el sobrenadante se centrifugó en un tubo nuevo durante 20 minutos a 4401 g a 4 °C.

El suero autólogo inactivado se colocó en las placas de cultivo de acuerdo a la siguiente tabla:

| Tipo de Placa                    | Volumen de Suero Autólogo |
|----------------------------------|---------------------------|
| Placa de 6 pozos (Nunc)          | 0.5 mL (por pozo)         |
| Caja Petri 60 x 10 mm (Corning)  | 0.5 mL                    |
| Caja Petri 100 x 20 mm (Corning) | 1.5 mL                    |

Las placas con el suero autólogo se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de haber retirado el suero autólogo, el paquete celular se diluyó 1:2 con PBS 1x a temperatura ambiente. Se prepararon tres tubos de 50 mL, cada uno con 15 mL de Ficoll-Paque (Amersham). Sobre la capa de Ficoll-Paque se adicionaron entre 25 y 30 mL de suspensión sangre-PBS (1:2). Los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 30 minutos a 10 °C sin freno ni aceleración. Se retiró el 80% de suero-PBS (capa superior) con ayuda de una

pipeta. Los anillos celulares (conteniendo las células mononucleares) se transfirieron a un tubo nuevo con capacidad para 50 mL conteniendo 30 mL de PBS a 4 °C y se llevaron a un volumen final de 50 mL con PBS a 4 °C. Los tubos se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se descompactó completamente el botón celular. Se realizaron dos lavados adicionales con 40 mL de PBS a 4 °C. Los eritrocitos presentes en el botón celular se lisaron con 3 mL de solución para lisis eritrocitaria durante 3 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo el volumen se completó a 50 mL con PBS a 4 °C. Se centrifugó a 400 g durante 5 minutos a 4 °C y se realizaron dos lavados adicionales con 40 mL de PBS.

Las células mononucleares se resuspendieron en 40 mL de medio RPMI-1640 (Gibco) complementado libre de suero fetal bovino (SFB). Se tomó una alícuota de la suspensión para contar las células en una cámara de Neubauer (Propper). La concentración de la suspensión celular se ajustó a  $7.5 \times 10^6$  células mononucleares/mL para sembrar las células de acuerdo a la siguiente tabla:

| Tipo de Placa          | Volumen de Suspensión Celular |
|------------------------|-------------------------------|
| Placa de 6 pozos       | 3 mL (por pozo)               |
| Caja Petri 60 x 10 mm  | 3 mL                          |
| Caja Petri 100 x 20 mm | 10 mL                         |

Para permitir la adherencia de los monocitos, las placas de cultivo con las células mononucleares se incubaron de 30 a 60 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Las placas se lavaron 6 veces con PBS a temperatura ambiente para eliminar las células no adherentes (linfocitos).

A cada placa se le adicionó medio RPMI-1640 complementado al 10 % de SFB (Gibco) de acuerdo a lo siguiente:

| Tipo de Placa          | Volumen de RPMI-1640 |
|------------------------|----------------------|
| Placa de 6 pozos       | 4 mL (por pozo)      |
| Caja Petri 60 x 10 mm  | 3 mL                 |
| Caja Petri 100 x 20 mm | 25 mL                |

Una vez obtenidos, los monocitos se mantuvieron incubando a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.



Las células de la caja Petri de 60 x 10 mm se emplearon para evaluar la pureza del aislamiento de los monocitos, las de las placas de 6 pozos para obtener células dendríticas y las de la caja Petri de 100 x 200 mm como control para evaluar la diferenciación de monocitos a células dendríticas.

### **6.1.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS**

Luego del aislamiento de los monocitos, a cada pozo de una placa de 6 pozos se le adicionó interleucina 4 (IL-4, PeproTech) para obtener una concentración final de 250 U/mL y factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, PeproTech) para obtener una concentración final de 200 U/mL. Las células se dejaron en cultivo en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. El día tres después del aislamiento, se retiraron 2 mL de medio de cada pozo, tomando la menor cantidad posible de células. Se adicionaron 2 mL de medio RPMI-1640 fresco complementado al 10 % de SFB conteniendo IL-4 (250 U/mL) y GM-CSF (200 U/mL).

Al quinto día después del aislamiento se adicionó a cada pozo 1 mL de RPMI-1640 complementado al 10 % de SFB sin citocinas. Al día siguiente se retiró la mayor cantidad de medio tratando de no tomar células y posteriormente a cada pozo se le adicionaron 4 mL de medio RPMI-1640 complementado al 10 % de SFB sin citocinas.

Al séptimo día las células se consideraron células dendríticas inmaduras.

### **6.1.3. MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Obtenidas las células dendríticas inmaduras a partir de monocitos, el día siete después del aislamiento, se recolectaron las células de las placas de 6 pozos mediante un pipeteo suave con el medio de cultivo para despegar de la superficie las células que estuvieran adheridas. La suspensión celular extraída se colocó en tubos de polipropileno de 50 mL. A cada pozo de donde se extrajeron las células se le adicionó 1 mL de RPMI-1640 complementado al 10 % de SFB a 37 °C y los pozos se lavaron mediante pipeteo. El medio con el que se realizaron los lavados se colocó en el mismo tubo donde se colocaron las células extraídas de los pozos. La serie de lavados se repitió una vez más y los tubos con la suspensión celular se centrifugaron a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular y las células se contaron en una cámara Neubauer. En caso de que las

células requirieran entrecruzamiento de CD13 mediante el uso de fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpo, se realizó en este punto (antes de sembrar las células).

Se sembraron  $4 \times 10^5$  células en cada pozo de una placa de 24 pozos (Nunc), en un volumen final de 800  $\mu$ L de RPMI-1640 al 10 % de SFB y se adicionó el estímulo de maduración a cada pozo: LPS (Sigma Aldrich) 20 ng/mL o TNF- $\alpha$  (Peprotech) 50 ng/mL. Las células permanecieron en contacto con el estímulo durante 24 horas, después de lo cual se colectó el sobrenadante para determinar la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$  y las células se emplearon para determinar el nivel de expresión de marcadores de maduración.

## **6.2. ENTRECruzamiento DE CD13**

### **6.2.1. ENTRECruzamiento DE CD13 MEDIANTE FRAGMENTOS $F(ab')_2$ DEL ANTICUERPO 452 Y EL USO DE FRAGMENTOS $F(ab')_2$ DE UN ANTICUERPO SECUNDARIO**

Antes de adicionar el estímulo de maduración a las DCs inmaduras, se incubaron en RPMI-1640 complementado al 10 % de SFB durante 30 minutos a 4 °C con fragmentos  $F(ab')_2$  del mAb 452 (10  $\mu$ g de anticuerpo por  $1 \times 10^6$  células) con agitación ocasional (el anticuerpo monoclonal anti-CD13 humano 452 isotipo IgG1 se obtuvo a partir del hibridoma correspondiente. Los fragmentos  $F(ab')_2$  del anticuerpo 452 se obtuvieron mediante la digestión del anticuerpo completo con ficina inmovilizada en agarosa).

Las células se lavaron dos veces con RPMI-1640 complementado libre de SFB centrifugando a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron en RPMI-1640 complementado con 10 % de SFB y se sembraron en placas de 24 pozos donde se les adicionaron fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra (10  $\mu$ g por  $1 \times 10^6$  células) (Jackson ImmunoResearch). Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>.

### **6.2.2. ENTRECruzamiento DE CD13 MEDIANTE PLACAS SENSIBILIZADAS CON EL ANTICUERPO 452 COMPLETO**

Se colocaron 5  $\mu$ g de anticuerpo 452 completo y estéril en cada pozo requerido de una placa de 24 pozos y se completó el volumen a 300  $\mu$ L con PBS. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Como control, se empleó un

anticuerpo anti-IgG2a murina. Se retiró el remanente de anticuerpo y cada pozo se enjuagó dos veces con 500  $\mu$ L de PBS mediante pipeteo. Las células se sembraron en los pozos sensibilizados con anticuerpo, adicionando o no estímulo de maduración y se incubaron en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 24 horas.

### **6.3. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA**

La expresión de los marcadores de maduración: CD83, antígeno humano leucocitario-DR (HLA-DR) y CD86, así como el receptor a quimiocinas CCR7 y de los marcadores de monocitos y macrófagos CD14 y de células dendríticas CD1a, se determinó mediante citometría de flujo. Para ello se resuspendieron  $2 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo. Se adicionaron los anticuerpos: 1  $\mu$ L de anti-CD83 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (eBioscience), 15  $\mu$ L de anti-HLA-DR marcado con ficoeritrina (PE) (Beckman coulter), 1  $\mu$ L de anti-CD86 marcado con *brilliant violet* 421 (BD Pharmingen), 2  $\mu$ L de anti-CCR7 marcado con complejo de peridina-clorofila/cianina 5.5 (PerCP/Cy5.5) (Biolegend), 10  $\mu$ L de anti-CD1a PE (BD Pharmingen) y 10  $\mu$ L de anti-CD14 FITC (Beckman Coulter). Las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, luego de lo cual se adicionaron 200  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo. Las células se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 453 g, posteriormente se lavaron dos veces con 100  $\mu$ L de solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo centrifugando a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 90  $\mu$ L de solución de fijación para citometría de flujo. La fluorescencia de las células se midió empleando un citómetro de flujo (Attune Acoustic Focusing Cytometer). Se capturaron 10 000 eventos de cada condición y se evaluó la expresión de los marcadores celulares en base a la intensidad media de fluorescencia (IMF).

### **6.4. ENSAYO INMUNOADSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)**

A fin de evaluar la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$ , se colectó el sobrenadante de las células estimuladas durante 24 horas y la concentración de ambas citocinas presentes en los sobrenadantes se evaluó mediante un kit comercial por ELISA (Peprotech), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. De manera breve:

Pozos de una placa de 96 pozos se incubaron durante toda la noche con anticuerpo de captura, anti-IL-12 o anti-TNF- $\alpha$  (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), en solución amortiguadora de fosfatos, a 4  $^{\circ}\text{C}$ . La placa se lavó 4 veces, cada una con 300  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de lavados para ELISA. Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos, los pozos se bloquearon con 300  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de bloqueo durante 1 hora a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Después de lavar la placa 4 veces, se colocaron las diluciones de citocina recombinante (IL-12 o TNF- $\alpha$ ) para realizar una curva estándar (0  $\text{pg}/\text{mL}$  – 2000  $\text{pg}/\text{mL}$ ) y los sobrenadantes de las células por triplicado. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente luego de lo cual se lavó 4 veces. Posteriormente la placa se incubó con anticuerpo de detección biotinilado anti-IL-12 o anti-TNF- $\alpha$  en solución diluyente (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 4 veces, cada pozo se incubó con peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con avidina (1:2000) durante 30 minutos a temperatura ambiente y se volvió a lavar 4 veces. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de sustrato ABTS (Zymed) y la concentración de las citocinas se calculó midiendo la densidad óptica (O. D.) de los pozos a una longitud de onda de 405 nm con una corrección a 650 nm (Multiscan Ascent).

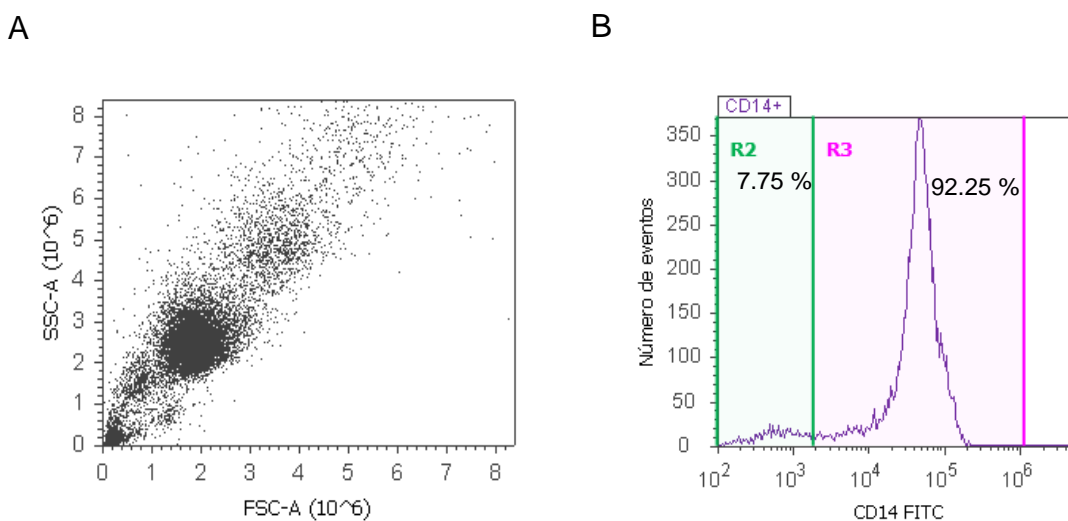
## **6.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con la colaboración de la M. en C. Tzipe Govezensky, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Para determinar las diferencias en la producción de citocinas y en la expresión de los marcadores entre células dendríticas tratadas con el anticuerpo 452 y células sin anticuerpo se realizó un análisis estadístico mediante una prueba de análisis de varianza, considerando significancia estadística en valores de  $p \leq 0.1$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y EVALUACIÓN DE SU PUREZA

En primer lugar se aislaron monocitos humanos de sangre periférica de donadores sanos, con el fin de derivarlos a DCs mediante su incubación con IL-4 y GM-CSF [45, 46]. A fin de determinar si los monocitos aislados de sangre periférica resultaban lo suficientemente puros para proceder con la diferenciación hacia DCs y obtener un buen rendimiento de éstas últimas, luego del aislamiento de los monocitos se determinó la expresión de CD14 de las células obtenidas durante el aislamiento por gradiente de densidad y adherencia. CD14 es una molécula expresada por monocitos y macrófagos [47] por lo que determinar el porcentaje de células que expresan esta molécula nos dio una idea de cuan puros resultaban los aislamientos realizados. En este caso, las células CD14<sup>-</sup> son células que no se eliminaron del cultivo durante el aislamiento, y pueden incluir linfocitos, plaquetas o PMNs. Las células obtenidas con el método de aislamiento empleado mostraron una pureza superior al 90% (Fig. 8). Para todos los experimentos de esta tesis, únicamente se usaron para la obtención de DCs poblaciones con porcentajes de células CD14<sup>+</sup> mayores a 90 %.



**Figura 8. Gráfica de puntos de granularidad contra tamaño e histograma del nivel de expresión de CD14 de la población celular obtenida luego del aislamiento de monocitos.** A) Muestra una gráfica de puntos de las células luego del aislamiento por gradiente de densidad y adherencia. B) Muestra la expresión de CD14 de las células mostradas en la gráfica de puntos. Los números indican los porcentajes de las células CD14<sup>-</sup> (región R2) y de las células CD14<sup>+</sup> (región R3). Ambas gráficas corresponden a un mismo aislamiento que es representativo de los aislamientos realizados a lo largo de los experimentos.

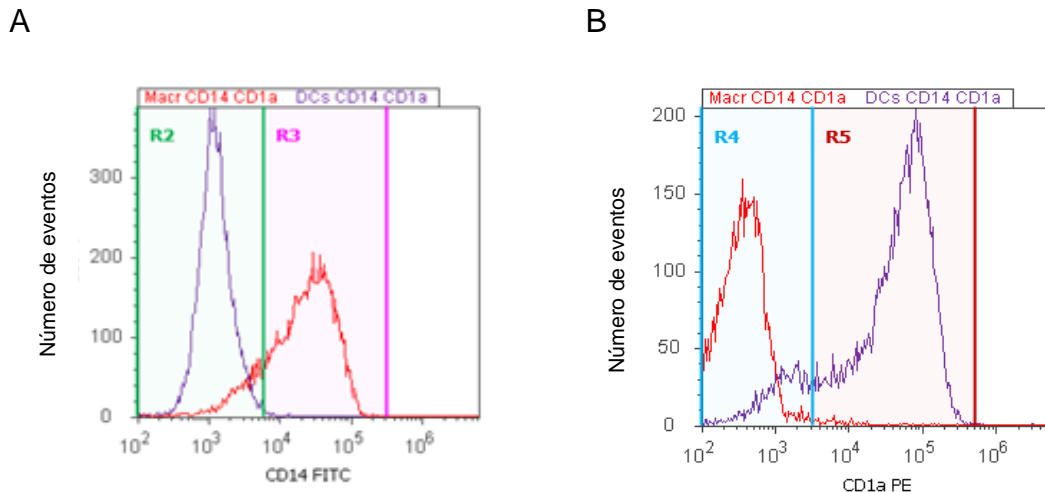
## 7.2. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS

En la actualidad existen diversas fuentes y métodos de obtención de DCs con fines de investigación [20]. El método empleado en este trabajo para obtener DCs consistió en la obtención de monocitos de sangre periférica y el posterior cultivo de éstos durante seis días con GM-CSF —citocina utilizada para incrementar la proliferación de las DCs— e IL-4 —para inhibir el desarrollo de macrófagos a partir de monocitos [45, 46]—. Las DCs generadas mediante este método se conocen como células dendríticas derivadas de monocitos y al igual que otras fuentes de DCs para la investigación, las DCs así obtenidas presentan ventajas, entre las que se encuentran ser una forma fácil, con buen rendimiento y relativamente rápida de obtener DCs [48, 49], pero también desventajas, como obtener una población de células con menor capacidad para activar linfocitos T [50] y una menor expresión de moléculas coestimuladoras [48], en comparación con DCs derivadas de progenitores CD34<sup>+</sup>.

Pese a que no se conoce un marcador o un grupo de ellos que distinga de manera inequívoca a las DCs, se sabe que las DCs derivadas de monocitos humanos son células que expresan altos niveles tanto de moléculas MHC-I como MHC-II, CD1, FcγRII, CD40, moléculas de la familia B7, CD44 e ICAM-1, además de carecer de CD14 [51]. En base a lo anterior y a fin de comprobar que los monocitos tratados con GM-CSF e IL-4 durante seis días se habían diferenciado a DCs, se determinó el grado de expresión de CD14 y de CD1a mediante citometría de flujo, puesto que la diferenciación conduce a la pérdida de CD14 y a la expresión de CD1a [25]. CD1a es una molécula que media la presentación de lípidos y glicolípidos a linfocitos T y se expresa tempranamente en algunas subpoblaciones de células dendríticas. La expresión de esta molécula está determinada por el microambiente en el que se desarrollan las DCs y no depende del grado de madurez de éstas. A pesar de no hallarse expresada en todas las subpoblaciones de DCs, es ampliamente utilizada como marcador de DCs humanas [52].

Las células que se diferenciaron hacia células dendríticas mediante el uso de IL-4 y de GM-CSF resultaron ser positivas para la expresión de CD1a y dejaron de expresar CD14, tal como se esperaba, pues esta última molécula, que participa en el reconocimiento de LPS bacteriano, se expresa solamente en monocitos y en macrófagos. Por el contrario, las células que no recibieron tratamiento con citocinas, es decir, monocitos que eventualmente se

diferenciaron a macrófagos, continuaron expresando CD14 en su superficie pero no expresaron CD1a. De las células tratadas con citocinas, porcentajes superiores al 85 % fueron CD1a<sup>+</sup> en tanto que porcentajes menores al 1 % de estas células resultaron CD14<sup>+</sup> (Fig. 9). El nivel de expresión de este par de marcadores que presentó la población obtenida luego del tratamiento de las células con IL-4 y GM-CSF indica que hubo una diferenciación de monocitos a DCs.



**Figura 9. Histogramas representativos de la expresión de CD1a y de CD14 en monocitos incubados durante seis días con IL-4 y TNF- $\alpha$  (células dendríticas).** A) Expresión de CD14 en DCs (línea morada) y en macrófagos (línea roja). B) Expresión de CD1a en células dendríticas (línea morada) y en macrófagos (línea roja). Para este experimento el 85 % de las células dendríticas capturadas fueron CD1a<sup>+</sup> (línea morada en la región R5) y sólo el 0.6% resultaron ser CD14<sup>+</sup> (línea morada en la región R3), en tanto que el 84 % de los macrófagos continuó siendo CD14<sup>+</sup> (línea roja en la región R3) y sólo el 0.9 % fueron CD1a<sup>+</sup> (línea roja en R5). Se muestran dos histogramas representativos de uno de los experimentos realizados.

### 7.3. MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS MEDIANTE ESTÍMULOS DE MADURACIÓN CONOCIDOS

Uno de los objetivos de este trabajo fue determinar si el entrecruzamiento de CD13 modifica la expresión de diferentes marcadores de maduración. Algunas moléculas que incrementan su expresión cuando maduran las DCs son CD83, moléculas MHC-II y CD86 [25]. Por esta razón se midió el nivel de expresión de estas tres moléculas de superficie en DCs maduras e inmaduras a las que se les hubiera entrecruzado CD13 y se comparó con el nivel de expresión de las mismas moléculas en DCs sin entrecruzamiento. Cabe mencionar que para

evaluar el nivel de expresión de las moléculas MHC-II, sólo se midió la expresión de HLA-DR, que es una de las moléculas MHC-II clásicas.

Primeramente se buscaron estímulos que maduraran las DCs derivadas de monocitos, para que, una vez maduras éstas, el nivel de expresión de los tres marcadores de superficie elegidos nos sirviera como control para comparar la expresión de los mismos marcadores en células que se hubieran estimulado a través de CD13.

Se sabe que el uso de diversos métodos de maduración resulta en la generación de DCs maduras con diferentes características. En la actualidad se utilizan diversos métodos para madurar DCs entre los que se encuentran CD40L, TNF- $\alpha$ , cocteles de citocinas consistentes en IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y prostaglandina E2 (PGE2); RNA de doble cadena (dsRNA) y productos bacterianos como LPS o islas CpG [53-56]. Entre estos métodos, el TNF- $\alpha$  y el LPS son los agentes de maduración que se emplean con mayor frecuencia *in vitro* de manera individual, por lo que se probaron ambas moléculas como controles de maduración en el modelo experimental utilizado [55].

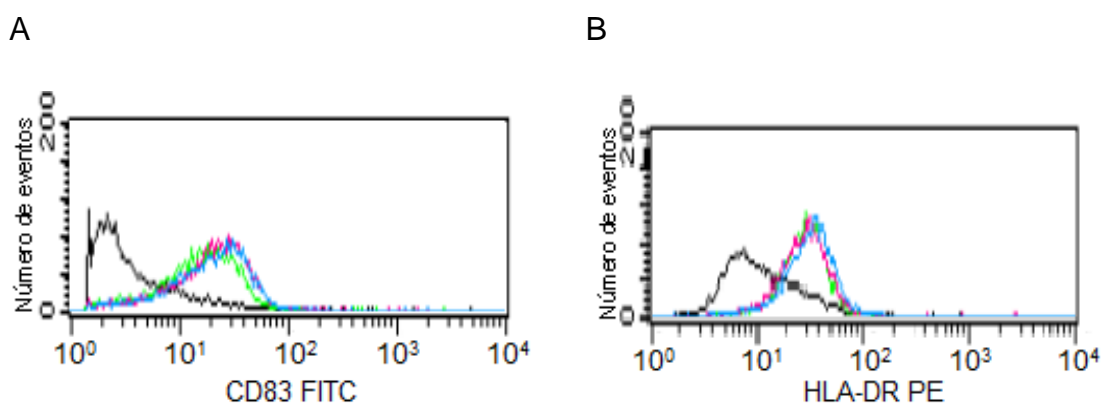
La activación de DCs con LPS desencadena la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12 y promueve la maduración mediante la señalización a través del TLR-4 [7]. Dado que la producción de estas citocinas es un indicio de la maduración de DCs, en el presente trabajo se evaluó la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$  como indicadores de maduración celular.

Numerosos artículos publicados emplean 50 ng/mL de TNF- $\alpha$  para inducir la maduración de DCs [54, 55, 57], por lo que se utilizó esa concentración de TNF- $\alpha$  con las DCs derivadas de monocitos para madurarlas. Sin embargo, dado que las concentraciones de LPS utilizadas en la literatura para madurar DCs cubren un rango muy amplio [7, 58, 59] las DCs obtenidas se maduraron durante 24 horas con tres concentraciones distintas de LPS: 20 ng/mL, 100 ng/mL y 500 ng/mL y posteriormente se analizó la expresión de dos de los marcadores de maduración: CD83 y HLA-DR (Fig. 10).

Se pudo observar que ninguna de las tres concentraciones de LPS empleada resultó en una expresión muy distinta de ninguno de los dos marcadores analizados, pues se puede ver que las tres curvas de expresión de marcadores correspondientes a las diferentes concentraciones de LPS se encuentran traslapadas (Fig. 10) y las medias de fluorescencia son muy parecidas (tabla 2). Esto indica que utilizar 20 ng/mL o 1  $\mu$ g/mL de LPS provoca el



mismo efecto sobre la expresión de los marcadores analizados, por ello, en los experimentos realizados se emplearon 20 ng/mL de LPS para madurar las células.



**Figura 10. Histogramas que muestran el nivel de expresión de CD83 y de HLA-DR en células dendríticas maduras con diferentes concentraciones de LPS.** Se muestra la expresión de CD83 (A) y de HLA-DR (B) de células dendríticas maduras con tres concentraciones distintas de LPS: 20 ng/mL (líneas color verde), 500 ng/mL (líneas color rosa) y 1 µg/mL (líneas color azul); las líneas negras representan la expresión de ambas moléculas para células dendríticas que no se sometieron a ningún estímulo de maduración (iDCs).

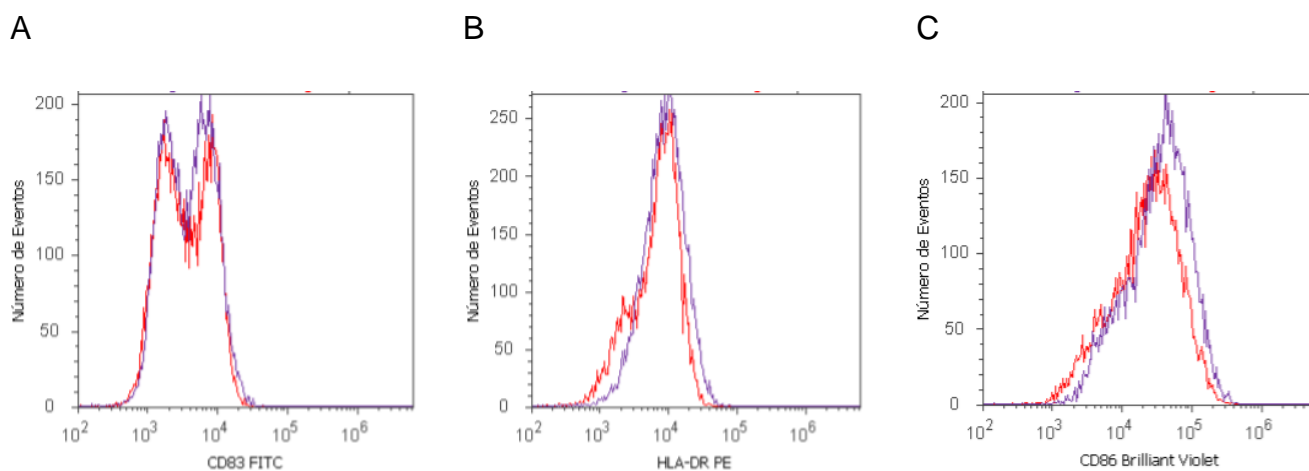
| Expresión de CD83   |   | Expresión de HLA-DR |   |
|---------------------|---|---------------------|---|
| Tratamiento         | Intensidad Media de Fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia) | Tratamiento         | Intensidad Media de Fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia) |
| iDCs                | 3.60  | iDCs                | 10.58   |
| DCs + LPS 20 ng/mL  | 14.82   | DCs + LPS 20 ng/mL  | 26.61   |
| DCs + LPS 500 ng/mL | 19.01   | DCs + LPS 500 ng/mL | 26.38   |
| DCs + LPS 1 µg/mL   | 18.31   | DCs + LPS 1 µg/mL   | 30.04   |

**Tabla 2. Intensidad media de fluorescencia correspondiente a la expresión de CD83 y de HLA-DR en DCs maduras con diferentes concentraciones de LPS.** Se enlistan las intensidades medias de fluorescencia (IMFs) obtenidas mediante citometría de flujo debidas a la expresión de CD83 y de HLA-DR de DCs maduras con tres diferentes concentraciones (20 ng/mL, 500 ng/mL y 1 µg/mL) de LPS.

Otro de los puntos en los que difiere bastante la literatura es en el tiempo de incubación con el estímulo necesario para obtener mDCs. Las metodologías de algunos grupos de trabajo consisten en exponer las DCs al estímulo de maduración durante 24 horas [57, 59], sin embargo, otras tantas recomiendan la incubación de las DCs con el estímulo durante 48

horas [7, 55]. Debido a esto se comparó si la expresión de los marcadores de maduración y la producción de citocinas era dependiente del tiempo que las DCs permanecían en contacto con el estímulo. Para ello se maduraron DCs con LPS durante 24 o 48 horas y se comparó la expresión de sus marcadores de maduración (Fig. 11) y la concentración de dos de las citocinas producidas —IL-12 y TNF- $\alpha$ — (Fig. 12). Al realizar esta comparación, pudo evidenciarse que el nivel de expresión de los marcadores evaluados no difiere considerablemente al determinarse luego de que las células permanecieran incubándose durante 24 o 48 horas con el estímulo de maduración, ya que los histogramas de la intensidad de fluorescencia para cada uno de los marcadores de DCs maduras por 24 o 48 horas, se traslapan (Fig.11). Además, las intensidades medias de fluorescencia (IMF) de los marcadores para ambos tiempos de maduración no resultaron ser muy distintas (tabla 3). En cuanto a la producción de citocinas, se observó que la concentración basal, es decir, de iDCs, para ambas citocinas no presentó diferencia significativa al medirse a las 24 o 48 horas de cultivo. En cambio, cuando se indujo la maduración de las células con LPS a la concentración determinada, se encontró una concentración significativamente mayor de ambas citocinas tras 24 horas de estimulación que a las 48 horas (Fig.12). Esta diferencia en la concentración puede deberse a la cinética de expresión que presentan las células para estas citocinas, ya que en etapas tempranas de maduración las DCs producen grandes cantidades de IL-12, que decrecen conforme transcurre el tiempo de maduración [60] o a la degradación de las mismas.

En base a los indicadores de maduración —la expresión de CD83, HLA-DR y CD86 y a la cantidad de IL-12 y TNF- $\alpha$  presente en el sobrenadante de las células— se optó por utilizar un sistema en el que las células ya diferenciadas a DCs permanecieran 24 horas en contacto con los estímulos, ya fueran los estímulos de maduración o los anticuerpos necesarios para estimular CD13.

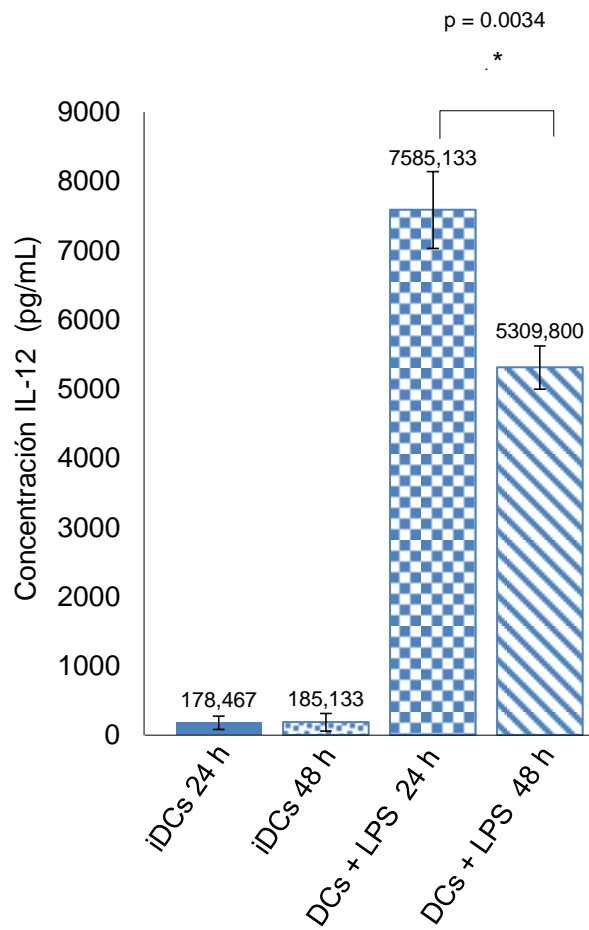


**Figura 11. Comparación entre el nivel de expresión de diferentes marcadores de superficie de células dendríticas maduras durante 24 o 48 horas con LPS.** Se muestra la expresión de CD83, HLA-DR y CD86 (A, B y C, respectivamente) de células dendríticas incubadas durante 24 horas (líneas rojas) o 48 horas (líneas moradas) con LPS. Los tres histogramas pertenecen a uno de los dos experimentos realizados en los que se obtuvieron resultados similares.

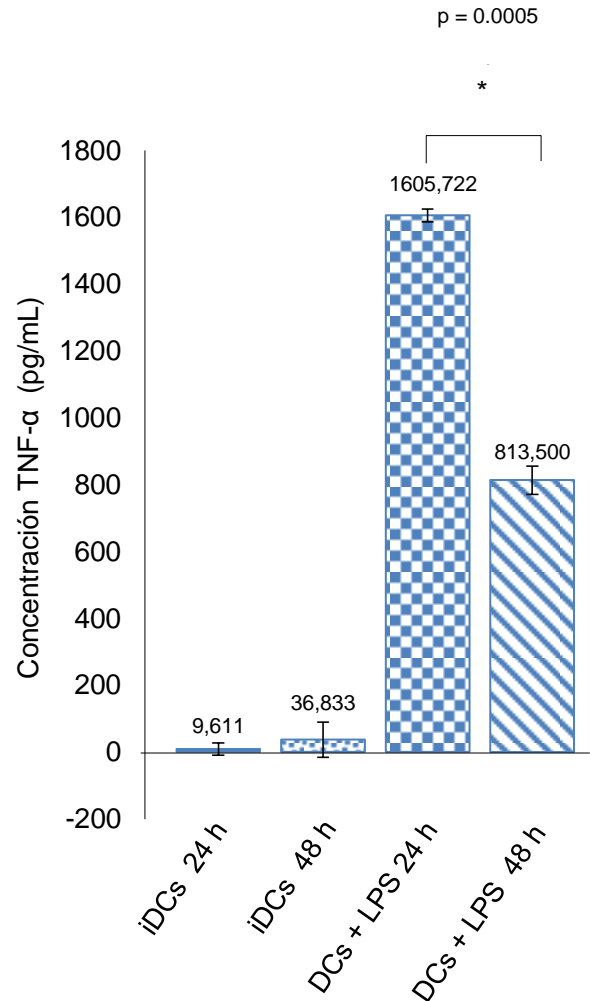
| Expresión de Marcadores de Maduración |                    |   |
|---------------------------------------|--------------------|---|
| Marcador                              | Tratamiento        | Intensidad Media de Fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia) |
| CD83                                  | DCs + LPS 24 horas | 4696  |
|                                       | DCs + LPS 48 horas | 5274  |
| HLA-DR                                | DCs + LPS 24 horas | 8013  |
|                                       | DCs + LPS 48 horas | 10695   |
| CD86                                  | DCs + LPS 24 horas | 34485   |
|                                       | DCs + LPS 48 horas | 50528   |

**Tabla 3. Intensidad media de fluorescencia de marcadores de maduración en células dendríticas luego de madurarse durante 24 o 48 horas.** Se muestra la expresión de tres marcadores de maduración, CD83, HLA-DR y CD86, en base a la intensidad media de fluorescencia que mostraron células dendríticas (DCs) luego de madurarse durante 24 o 48 horas.

A



B



**Figura 12. Concentraciones de interleucina 12 y de factor de necrosis tumoral alfa en los sobrenadantes de células dendríticas luego de madurarse con LPS durante 24 o 48 horas.** Las barras indican la concentración de IL-12 (A) y de TNF- $\alpha$  (B) detectada mediante ELISA en los sobrenadantes de células dendríticas determinadas luego de la incubación de las células con LPS a dos tiempos distintos. Los asteriscos señalan que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones de citocinas evaluada a través de una prueba t de Student no pareada con  $p \leq 0.05$ . Se muestra un experimento de dos realizados en los que se obtuvieron resultados similares.

#### **7.4. EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE EL USO DE FRAGMENTOS F(ab')<sub>2</sub> DEL ANTICUERPO MONOCLONAL 452 Y FRAGMENTOS F(ab')<sub>2</sub> DE UN ANTICUERPO SECUNDARIO SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MADURACIÓN Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS**

A la fecha se desconoce el o los ligandos de CD13 [3] por lo que para estimular esta molécula, durante la realización de este trabajo se empleó el anticuerpo monoclonal 452.

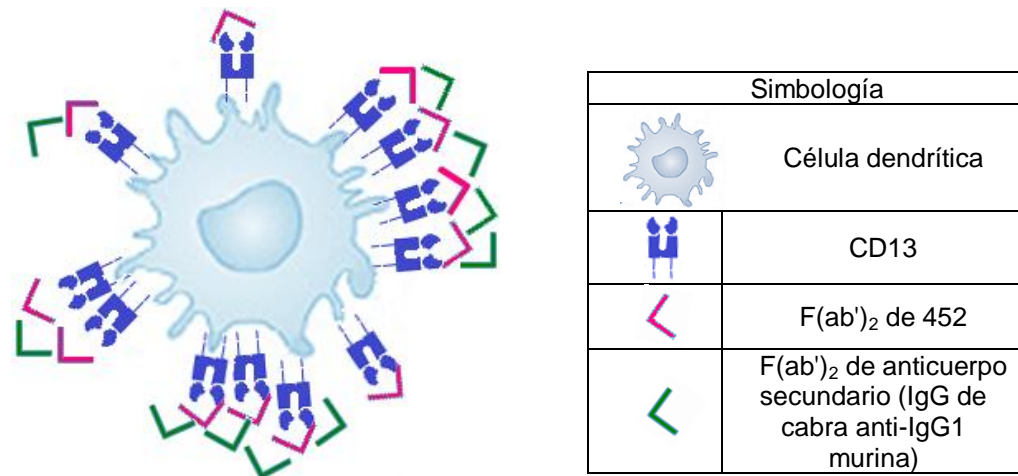
Para poder determinar el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre la maduración de DCs y con la finalidad de que las células permanecieran en contacto el mismo tiempo con los estímulos, ya fuera con los fragmentos de anticuerpo para entrecruzar CD13 o con LPS o TNF- $\alpha$  para madurarlas, se diseñó un modelo, en el que cuando se requirió entrecruzar CD13, las DCs se incubaron primero con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo monoclonal 452 anti-CD13 durante 30 minutos y posteriormente se indujo el entrecruzamiento incubando estas DCs con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo secundario anti-IgG murina hecho en cabra durante 24 horas para mantener el entrecruzamiento ese tiempo (Fig. 13). Cuando así se requirió, adicionalmente se agregó un estímulo de maduración previamente elegido: LPS o TNF- $\alpha$  y como control positivo de la maduración se emplearon, de manera independiente LPS o TNF- $\alpha$  durante 24 horas también. La idea de agregar un estímulo de maduración además de realizar el entrecruzamiento de CD13 era detectar si tal entrecruzamiento podía modular, ya fuera positiva o negativamente el nivel de maduración que se obtenía con LPS o con TNF- $\alpha$ .

La razón de emplear fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo 452 y de entrecruzar éstos a través de fragmentos de un anticuerpo secundario que reconociera al primero de ellos fue evitar respuestas que no se debieran al estímulo de CD13, sino que pudieran deberse al reconocimiento de la región de la fracción cristalizable (Fc) al utilizar el anticuerpo anti-CD13 completo, ya que las DCs poseen en su superficie FcRs [13] que al reconocer complejos inmunes a través de la porción Fc de los anticuerpos son capaces de incrementar la presentación de antígenos en el contexto de moléculas MHC-II [61] y se sabe que son capaces de inducir maduración de DCs [62, 63].

Con el propósito de confirmar que el efecto observado en células a las que se les entrecruzó CD13 se debía efectivamente al entrecruzamiento de la molécula y no era un

efecto inespecífico de cualquiera de los dos anticuerpos utilizados, se incubaron células con fragmentos  $F(ab')_2$  de uno u otro anticuerpo en forma independiente y de igual forma se evaluó el nivel de expresión de sus marcadores de maduración y la producción de citocinas.

De esta manera se realizaron cuatro experimentos, cada uno con DCs de un donador diferente.



**Figura 13. Modelo de entrecruzamiento de CD13 mediante el uso de fragmentos  $F(ab')_2$  del anticuerpo monoclonal 452 y fragmentos  $F(ab')_2$  de un anticuerpo secundario.** Células dendríticas derivadas de monocitos humanos se incubaron durante 30 minutos con fragmentos  $F(ab')_2$  del anticuerpo monoclonal 452 anti-CD13, se lavó el exceso de anticuerpo y las células se incubaron durante 24 horas con un anticuerpo secundario anti-IgG murina a fin de permitir el entrecruzamiento de CD13.

Al determinar, mediante citometría de flujo, el nivel de expresión de los marcadores de maduración de DCs obtenidas de los cuatro donadores distintos se pudo observar que la expresión de éstos resultó ligeramente distinta entre las DCs en las que se indujo el entrecruzamiento de CD13 y aquéllas que no fueron estimuladas a través de esta molécula (Fig. 14).

La expresión de CD83, determinada en base a la IMF, fue un poco mayor en DCs tras el entrecruzamiento de CD13 mediante fragmentos de anticuerpos, con respecto a DCs que no recibieron ningún tratamiento; de la misma forma, DCs que se maduraron con  $TNF-\alpha$  y que adicionalmente fueron estimuladas por el entrecruzamiento de CD13 mostraron una expresión mayor de CD83 que aquellas que sólo se maduraron con  $TNF-\alpha$ . Para aquellas células que se maduraron con LPS, la expresión de CD83 resultó menor al entrecruzar CD13 que al no hacerlo (Fig. 14A y Tabla 4).

En el caso de la molécula HLA-DR, su expresión fue levemente mayor en iDCs que recibieron tratamiento para entrecruzar CD13 que en DCs que no fueron sometidas al entrecruzamiento. De forma similar, la expresión de HLA-DR fue un poco mayor en células sometidas al entrecruzamiento de CD13 y maduras con TNF- $\alpha$  que en DCs que solamente se maduraron con TNF- $\alpha$ . Sin embargo, al entrecruzar CD13 en DCs a las que se indujo maduración con LPS, la expresión de HLA-DR apenas aumentó en comparación con la expresión de esta molécula en DCs cuyo tratamiento fue sólo la maduración con LPS (Fig. 14B y Tabla 4).

La expresión de CD86 en células que no recibieron estímulo de maduración aumentó ligeramente cuando se entrecruzó CD13 con respecto a DCs que no fueron estimuladas a través de CD13. También, en las células en las que se indujo maduración con LPS y que se sometieron a entrecruzamiento de CD13 tuvieron una mayor expresión de CD86 que DCs solamente maduras con LPS. No obstante, aquellas DCs que además de madurarse con TNF- $\alpha$  recibieron entrecruzamiento de CD13 mediante fragmentos de anticuerpos, no mostraron un incremento en la expresión de CD86 respecto a DCs maduras sólo con TNF- $\alpha$  (Fig. 14C y Tabla 4).

Cabe destacar que ninguno de los cambios observados en la expresión de los tres marcadores de maduración celular resultó ser estadísticamente significativo al analizarse mediante análisis de varianza (ANOVA), seguida de un análisis Tukey.

Otra prueba para conocer el grado de maduración de las DCs fue la determinación, mediante ELISA, de la producción de dos citocinas proinflamatorias —TNF- $\alpha$  e IL-12— que son secretadas por mDCs.

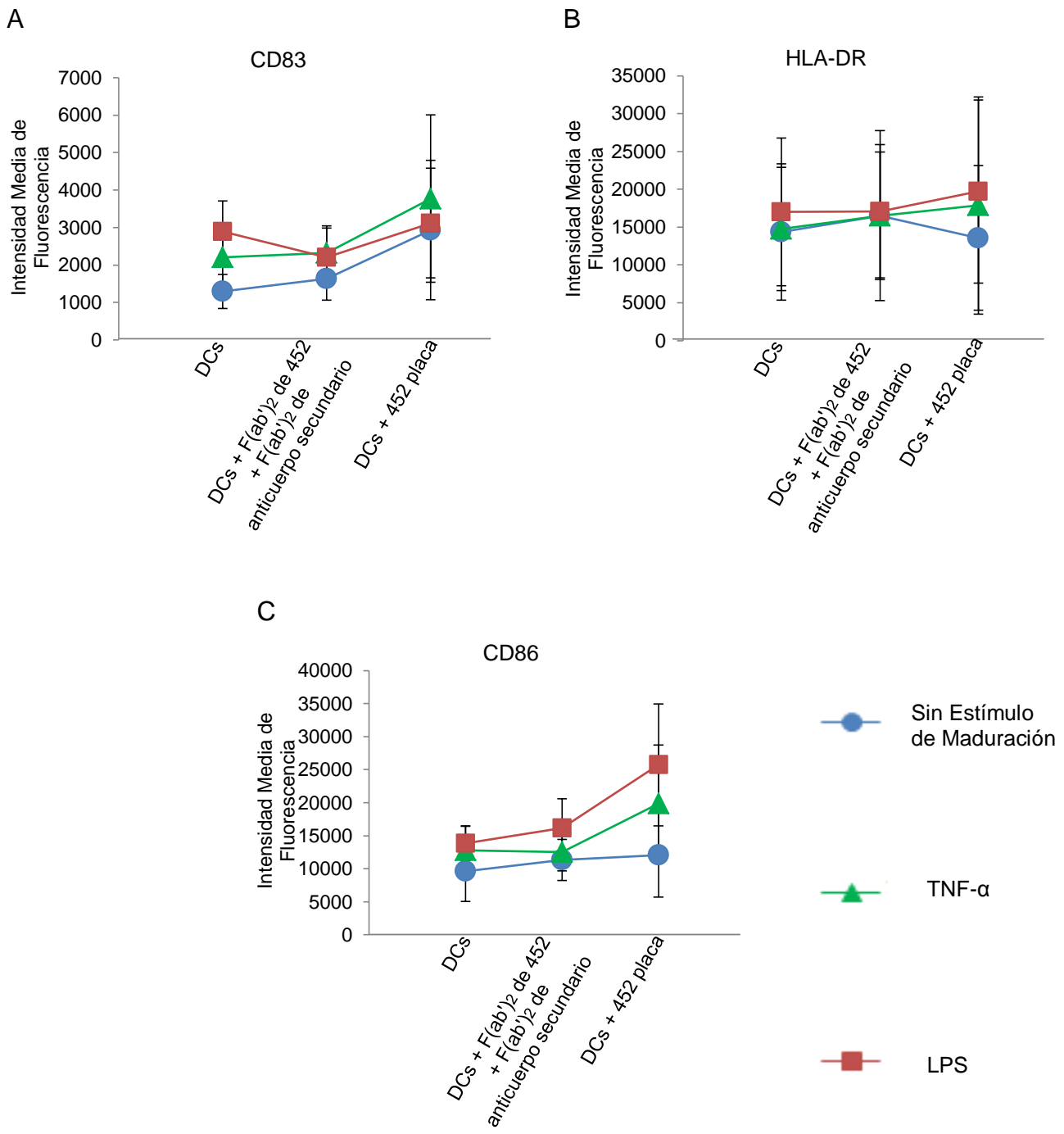
La producción de IL-12 disminuyó, aunque poco, al entrecruzar CD13 con los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 452 y de anticuerpo secundario en células maduras, ya fuera con TNF- $\alpha$  o con LPS respecto a la producción de esta citocina en células sin estimulación de CD13 que solamente recibieron tratamiento con cualquiera de los dos estímulos de maduración. Sin embargo, el solo entrecruzamiento de CD13 en DCs, en ausencia de estímulo de maduración, provocó un ligero incremento en la producción de IL-12 respecto a las células que permanecieron sin estímulo alguno (Fig. 15A y tabla 5). Entre tanto, la producción de TNF- $\alpha$  basal de las DC, es decir, de las células que no fueron estimuladas, fue menor que la de DCs a las que se les entrecruzó CD13 con los fragmentos de anticuerpos. Además, la producción de esta citocina en células maduras con LPS fue muy parecida a la producción

observada en células maduras con LPS y que adicionalmente recibieron tratamiento con fragmentos para entrecruzamiento de CD13 (Fig. 15B y tabla 5).

Tampoco las diferencias en la producción de ninguna de las dos citocinas resultaron estadísticamente significativas.

Vale la pena mencionar que la producción de TNF- $\alpha$  sólo se determinó en DCs que no recibieron estímulo de maduración y en DCs maduras con LPS, ya que de medir la concentración de TNF- $\alpha$  en células maduras con esa misma citocina se habrían obtenido resultados muy elevados en la concentración de TNF- $\alpha$  o incluso falsos positivos.



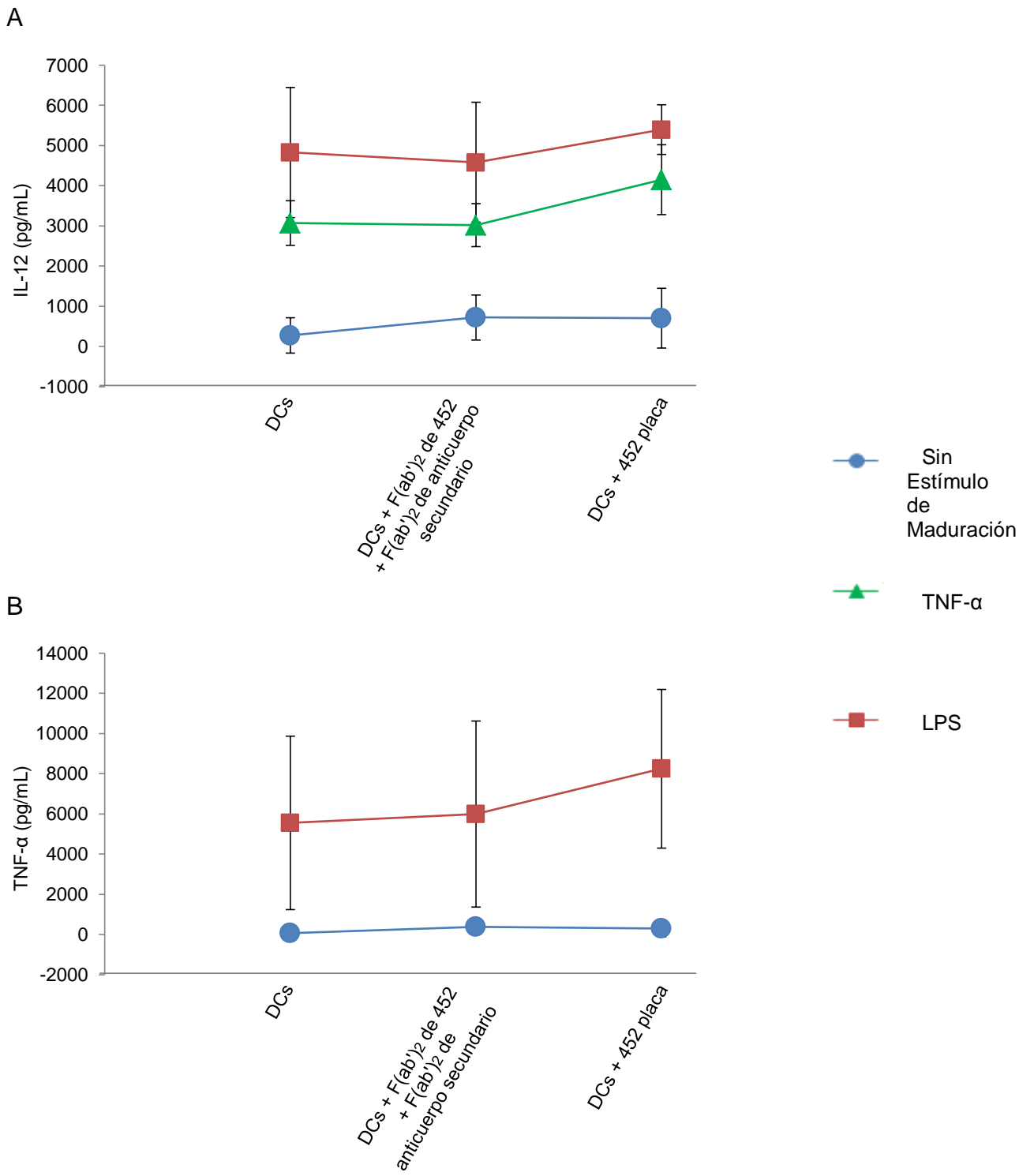


**Figura 14. Expresión de marcadores de maduración en células dendríticas.** Las gráficas muestran la intensidad media de fluorescencia promedio para la expresión de CD83 (A), HLA-DR (B) y CD86 (C) y sus respectivas desviaciones estándar de DCs de cuatro donadores distintos luego de incubarse durante 24 horas con estímulos de maduración —LPS (cuadrados rojos) o TNF- $\alpha$  (triángulos verdes)— o sin éstos (círculos azules) en presencia o no del anticuerpo 452 completo o fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de éste para entrecruzar CD13 más un anticuerpo secundario.

| Expresión de Marcadores de Maduración |  |   |                        |   |
|---------------------------------------|--|---|------------------------|---|
| Marcador Evaluado                     | Tratamiento                                  |   |                        | Intensidad Media de Fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia) |
|                                       | Células                                      | Anticuerpo para estimulación  | Estímulo de maduración |   |
| CD83                                  | iDCs sin teñir                               | Ninguno   | Ninguno                | 800.75  |
|                                       | DCs  | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 1337.00   |
|                                       |  |   | Ninguno                | 1293.50   |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 2209.50   |
|                                       |  | Ninguno   | LPS                    | 2891.25   |
|                                       |  |   | Ninguno                | 1305.50   |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 2319.00   |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | LPS                    | 2072.25   |
|                                       |  |   | Ninguno                | 1630.00   |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 2318.50   |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | LPS                    | 2206.25   |
|                                       |  |   | Ninguno                | 2931.25   |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 3771.25   |
| 452 placa                             | LPS  | 3118.00   |                        |   |
|                                       | Ninguno                                      | 738   |                        |   |
|                                       | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | Ninguno   | 14373.00               |   |
| HLA-DR                                | iDCs sin teñir                               | Ninguno   | Ninguno                | 738   |
|                                       | DCs  | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 14348.75  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 14757.00  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 14757.25  |
|                                       |  | Ninguno   | LPS                    | 17032.25  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 14757.25  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 15005.25  |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | LPS                    | 17180.75  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 16500.25  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 16486.50  |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | LPS                    | 17091.25  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 13557.75  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 17865.50  |
| 452 placa                             | LPS  | 19698.00  |                        |   |
|                                       | Ninguno                                      | 1026.25   |                        |   |
|                                       | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | Ninguno   | 11005.75               |   |
| CD86                                  | iDCs sin teñir                               | Ninguno   | Ninguno                | 1026.25   |
|                                       | DCs  | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 9593.00   |
|                                       |  |   | Ninguno                | 12756.25  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 13853.75  |
|                                       |  | Ninguno   | LPS                    | 13853.75  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 10003.75  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 12143.50  |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | LPS                    | 16648.00  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 11353.50  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 12555.75  |
|                                       |  | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | LPS                    | 16157.50  |
|                                       |  |   | Ninguno                | 12090.50  |
|                                       |  |   | TNF-α                  | 19853.50  |
| 452 placa                             | LPS  | 25724.00  |                        |   |

**Tabla 4. Intensidad media de fluorescencia de marcadores de maduración de células dendríticas.**

Se muestra la expresión de CD83, HLA-DR y CD86, determinada por citometría de flujo, en base a la intensidad media de fluorescencia que mostraron células dendríticas (DCs) luego de incubarse durante 24 horas con diferentes estímulos. Valores promedio de cuatro donadores.



**Figura 15. Comparación entre las concentraciones de citocinas proinflamatorias secretadas por células dendríticas con diferentes tratamientos.** Se muestra la concentración de IL-12 (A) y de TNF-α (B) determinada mediante ELISA luego de que DCs permanecieran incubándose 24 horas con estímulos de maduración —LPS (cuadrados rojos) o TNF-α (triángulos verdes)— o sin éstos, con o sin entrecruzamiento de CD13. Se muestran las concentraciones promedio correspondientes a cuatro donadores.

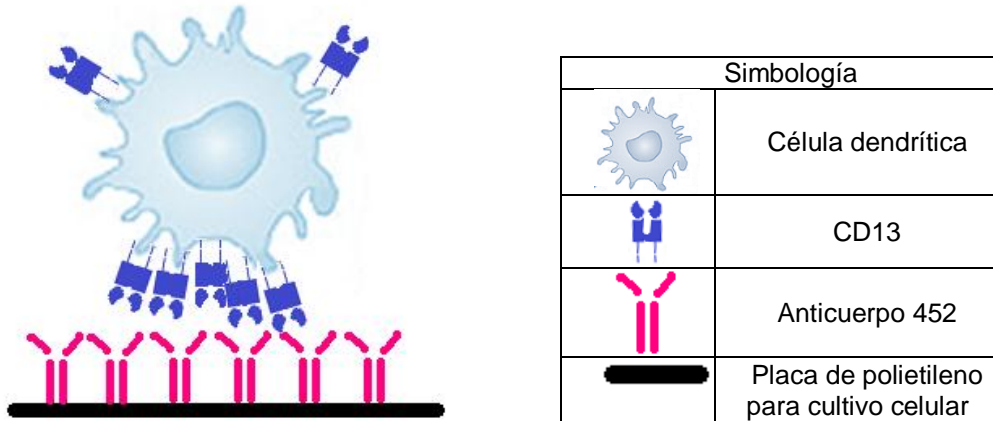
| Producción de Citocinas |             |   |                        |                       |
|-------------------------|-------------|---|------------------------|-----------------------|
| Citocina Evaluada       | Tratamiento |   |                        | Concentración (pg/mL) |
|                         | Células     | Anticuerpo para estimulación  | Estímulo de maduración |                       |
| IL-12                   | DCs         | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 919.55                |
|                         |             | Ninguno   | Ninguno                | 273.35                |
|                         |             |   | TNF-α                  | 3073.55               |
|                         |             |   | LPS                    | 4827.27               |
|                         |             |   | Ninguno                | 426.44                |
|                         |             | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | TNF-α                  | 2262.27               |
|                         |             |   | LPS                    | 4369.97               |
|                         |             |   | Ninguno                | 721.94                |
|                         |             | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | TNF-α                  | 3020.77               |
|                         |             |   | LPS                    | 4582.30               |
|                         |             |   | Ninguno                | 708.83                |
|                         |             | 452 placa   | TNF-α                  | 4151.52               |
| LPS                     | 5397.02     |   |                        |                       |
| Ninguno                 | 584.24      |   |                        |                       |
| TNF-α                   | DCs         | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 584.24                |
|                         |             | Ninguno   | Ninguno                | 70.70                 |
|                         |             |   | LPS                    | 5552.49               |
|                         |             |   | Ninguno                | 194.7                 |
|                         |             | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | LPS                    | 5661.49               |
|                         |             |   | Ninguno                | 378.66                |
|                         |             | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | LPS                    | 5992.41               |
|                         |             |   | Ninguno                | 292.87                |
|                         |             | 452 placa   | LPS                    | 8249.24               |

**Tabla 5. Concentración de citocinas proinflamatorias secretadas por células dendríticas.** Concentración de IL-12 y de TNF-α determinada mediante ELISA en sobrenadantes de DCs luego de incubarse con diferentes estímulos durante 24 horas. Se muestran los valores promedio correspondientes a cuatro donadores.

### 7.5. EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIANTE EL USO DEL ANTICUERPO 452 COMPLETO INMOVILIZADO, SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE MADURACIÓN Y SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

Adicionalmente al entrecruzamiento de CD13 mediante el uso de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo 452 y del anticuerpo secundario, se buscó otra manera de llevar a cabo el entrecruzamiento de CD13. Para ello se empleó otro modelo experimental basado en las pruebas para determinar la activación de linfocitos T. Dichos ensayos miden la proliferación de linfocitos cuando éstos se activan y emplean un sistema en el que la placa de cultivo a utilizar se cubre previamente con anticuerpos completos anti-CD3, anti-TCR o anti-Thy-1 [64]. La finalidad de cubrir las placas de cultivo con los anticuerpos es emular el trabajo de las células accesorias *in vivo*, las cuales presentan al linfocito T los ligandos que entrecruzan los receptores de la superficie de los linfocitos T—CD3, TCR o Thy-1— en la superficie

celular, y que en la sinapsis inmunológica que se establece entre ambas células, los inmovilizan [65]. En función de lo anterior, se trabajó con un sistema en el que CD13 se entrecruzó empleando el anticuerpo 452 completo inmovilizado sobre la placa de cultivo celular (Fig. 16).



**Figura 16. Modelo de entrecruzamiento de CD13 mediante el uso de placas de cultivo previamente cubiertas con el anticuerpo monoclonal 452 completo.** Se sembraron células dendríticas derivadas de monocitos humanos en placas de cultivo celular previamente cubiertas con el anticuerpo monoclonal 452. Una vez sembradas, las células se incubaron durante 24 horas en presencia o ausencia de estímulo de maduración.

Empleando este sistema de entrecruzamiento de CD13, se realizaron cuatro experimentos para evaluar el efecto de dicho entrecruzamiento sobre la maduración de DCs. Las células empleadas para realizar estos experimentos se obtuvieron de los mismos cuatro donadores a cuyas células se les entrecruzó CD13 empleando fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpos y se realizaron a la par de esos experimentos.

Para las DCs cuyo CD13 se entrecruzó mediante el uso del anticuerpo completo también se evaluó la expresión de CD83, HLA-DR y de CD86 por citometría de flujo y la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  por ELISA para determinar el efecto de tal entrecruzamiento sobre la maduración celular.

Para aquellas células que se sometieron a cualquiera de los estímulos de maduración —ya fuera LPS o TNF- $\alpha$ —, la expresión de CD83, CD86 y HLA-DR se incrementó cuando además del estímulo de maduración, las células se estimularon a través de CD13 mediante el anticuerpo 452 inmovilizado en la placa. Aún más, en el caso de CD83 y de CD86, el entrecruzamiento de CD13 provocó un aumento su expresión incluso en ausencia de

estímulos de maduración. Dichos incrementos en la expresión de los marcadores resultaron más evidentes que el aumento de estos mismos marcadores en DCs cuyo CD13 se entrecruzó mediante fragmentos de anticuerpos (Fig.14 A, C y tabla 4).

Por otra parte, el entrecruzamiento conseguido con el anticuerpo completo inmovilizado sólo logró incrementar la expresión de HLA-DR en células que se incubaron con estímulo de maduración, puesto que sin dicho estímulo, la expresión de esta molécula fue mayor en iDCs a las que no se les entrecruzo CD13, que en DCs a las que sí se les entrecruzó. Esta respuesta resultó ser contraria a la obtenida al entrecruzar CD13 usando fragmentos de anticuerpo. En aquellas células en las que aumentó la expresión de HLA-DR (que fueron estimuladas con LPS o TNF- $\alpha$ ); al igual que para los otros dos marcadores, el incremento resultó mayor que el obtenido a través del entrecruzamiento de CD13 por fragmentos de anticuerpos (Fig. 14 B y tabla 4).

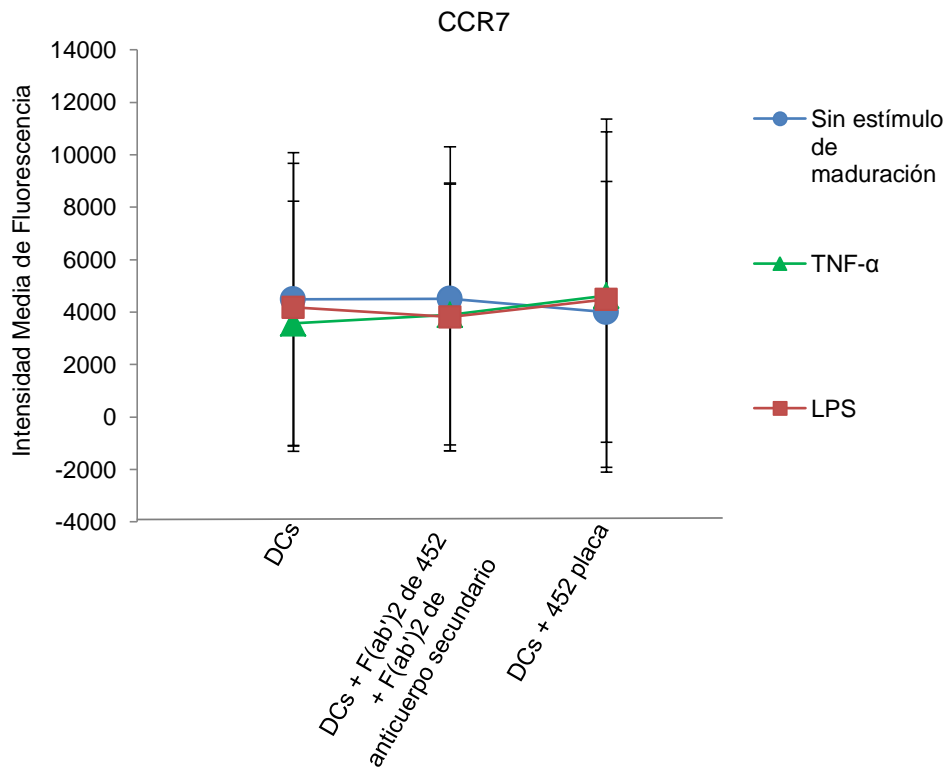
En cuanto a la producción de citocinas, tanto la concentración de IL-12 como de TNF- $\alpha$  aumentaron de forma evidente cuando las células, además de recibir el estímulo de LPS o TNF- $\alpha$ , fueron sometidas a entrecruzamiento de CD13 mediante el anticuerpo completo y de forma parecida a la expresión de marcadores, este incremento resultó ser mayor que el obtenido por el entrecruzamiento a través de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos. No obstante, al entrecruzar CD13 mediante el anticuerpo 452 inmovilizado, la concentración determinada para ambas citocinas, respecto a la producción basal de éstas, no se vio considerablemente modificada (Fig. 15).

## **7.6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DEL ENTRECruzAMIENTO DE CD13 SOBRE EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE CCR7 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Durante el proceso de maduración, uno de los cambios fenotípicos de las DCs es la expresión en su superficie del receptor de quimiocinas CCR7, lo que les permite migrar en respuesta a quimiocinas como CCL19 y CCL21, del sitio de inflamación hacia los órganos linfoides secundarios para estimular linfocitos T [29, 66]. Por esto mismo, otro de los marcadores de maduración empleado para determinar si la estimulación de CD13 provoca la maduración de DCs o la modula, fue CCR7. Para ello, mediante citometría de flujo, se determinó el nivel de expresión de este receptor de quimiocinas en DCs maduras e inmaduras a las que se les dejó sin entrecruzar o se les entrecruzó CD13, ya fuera a través

de fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpos o mediante el uso de 452 completo inmovilizado en la placa de cultivo.

Sin embargo, la IMF apenas se modificó entre las DCs sometidas a los distintos tratamientos, es decir, no se detectaron cambios en la expresión de este receptor ni en respuesta a LPS o  $TNF-\alpha$  (Fig. 17 y tabla 6).



**Figura 17. Nivel de expresión de CCR7 determinado por citometría de flujo en DCs tratadas con LPS o  $TNF-\alpha$ , con o sin entrecruzamiento de CD13.** En la gráfica se muestra la intensidad media de fluorescencia promedio para la expresión de CCR7, con sus respectivas desviaciones estándar correspondientes a células dendríticas de cuatro donadores expuestas a diferentes estímulos.

| Expresión de CCR7 |   |                        |   |
|-------------------|---|------------------------|---|
| Células           | Tratamiento   |                        | Intensidad Media de Fluorescencia (unidades relativas de fluorescencia) |
|                   | Anticuerpo para estimulación  | Estímulo de maduración |   |
| iDCs sin teñir    | Ninguno   | Ninguno                | 864.00  |
| DCs               | F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario                              | Ninguno                | 4029.75   |
|                   |   | Ninguno                | 4491.50   |
|                   | Ninguno   | TNF- $\alpha$          | 3560.75   |
|                   |   | LPS                    | 4173.00   |
|                   |   | Ninguno                | 4379.75   |
|                   |   | Ninguno                | 4379.75   |
|                   | F(ab') <sub>2</sub> de 452  | TNF- $\alpha$          | 3541.50   |
|                   |   | LPS                    | 3960.25   |
|                   |   | Ninguno                | 4506.50   |
|                   | F(ab') <sub>2</sub> de 452 + F(ab') <sub>2</sub> de anticuerpo secundario | TNF- $\alpha$          | 3901.25   |
|                   |   | LPS                    | 3812.00   |
|                   |   | Ninguno                | 4006.00   |
| 452 placa         | TNF- $\alpha$   | 4625.25                |   |
|                   | LPS   | 4482.75                |   |
|                   | Ninguno   | 4006.00                |   |

**Tabla 6. Expresión de CCR7 en DCs determinada por citometría de flujo.** Se presentan los valores correspondientes a la intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida al teñir las células con un anticuerpo anti-CCR7 conjugado con PerCP/Cy5.5. Promedio de cuatro donadores.



## **8. DISCUSIÓN**

Las DCs son consideradas el punto de unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa debido a que son las principales APCs [6]. Las DCs son las únicas APCs que pueden brindar la coestimulación necesaria para inducir la activación de linfocitos T *naïve* e iniciar así una respuesta inmune adaptativa. Para cumplir esta función, las DCs deben, una vez estimuladas por la detección de PAMPs, experimentar un cambio fenotípico conocido como maduración, mismo que las dota del fenotipo y la capacidad de efectuar funciones necesarias para estimular linfocitos T. El proceso de maduración se ve reflejado fenotípicamente en el aumento en la expresión de proteínas de membrana como moléculas MHC-I y MHC-II, moléculas coestimuladoras y receptores de quimiocinas y en modificaciones funcionales tales como la disminución en la capacidad endocítica, el aumento en la producción de citocinas, el incremento en la presentación de antígenos en el contexto de moléculas MHC y el aumento en la capacidad migratoria hacia ganglios linfáticos [26, 28, 29].

Las DCs expresan un amplio repertorio de PRRs [67], muchos de los cuales al ser estimulados, inducen la maduración de DCs, entre los que se encuentran TLRs y lectinas de tipo C [24]. Teniendo presente que diversos receptores participan en la maduración de DCs y que trabajos previos del laboratorio perfilan a CD13 como un posible PRR, dada su implicación en procesos como la fagocitosis [Ortega, E. y Licon, I. Datos no publicados] y la producción de especies reactivas de oxígeno [5], en este trabajo se aprovecharon los cambios funcionales y fenotípicos que se gestan en las DCs durante su maduración a fin de evaluar el efecto que produce la estimulación de CD13 sobre el grado de maduración de DCs humanas derivadas de monocitos de sangre periférica. Para ello se evaluó, mediante citometría de flujo, la expresión de las moléculas CD83, HLA-DR y CD86, y la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$ , mediante ELISA.

De manera general se observó que cuando las DCs se sometieron a maduración mediante LPS o TNF- $\alpha$  y adicionalmente se sometieron a entrecruzamiento de CD13 a través del mAb anti-CD13 452, ya fuera mediante fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo secundario o mediante el anticuerpo 452 inmovilizado sobre la placa de cultivo, hubo una tendencia al aumento de la expresión de CD83, HLA-DR y CD86, tendencia que también se observó en la producción de IL-12 y de TNF- $\alpha$ .

Puesto que el entrecruzamiento de CD13 en ausencia de estímulos de maduración no provocó gran diferencia en el nivel de expresión de los marcadores evaluados y no provocó el aumento en la producción de citocinas respecto a la producción por células que no recibieron estímulo alguno, se propone que el estímulo de DCs a través de CD13 no es capaz de provocar la maduración de las células por sí mismo. Sin embargo, esto no descarta la posibilidad de que la estimulación a través de CD13 pudiera estar modulando la maduración de DCs que se obtiene con estímulos de maduración que se conocen hasta el momento.

Aunque el entrecruzamiento de CD13 provocó diferencias tanto en la expresión de marcadores como en la producción de citocinas, éstas fueron pequeñas y no resultaron ser estadísticamente significativas. Además, la variabilidad observada tanto en la expresión de marcadores como en la secreción de citocinas, entre las células de cada uno de los donadores, dificulta alcanzar significancia estadística. A causa de esto y a fin de comprobar o descartar la participación de CD13 en el proceso de maduración de DCs, debe incrementarse el número de experimentos realizados puesto que diferencias muy pequeñas pueden resultar significativas cuando el tamaño de la muestra es grande.

Aunque las diferencias obtenidas en cuanto a la expresión de marcadores de maduración y a la producción de citocinas al entrecruzar CD13 no fueron significativas, se observó una tendencia a que tanto los marcadores como las citocinas se incrementaran al estimular CD13. Esta tendencia fue más evidente cuando se hizo uso del anticuerpo 452 completo inmovilizado sobre la placa de cultivo. En vista de lo anterior, pensamos que aún no debe descartarse la posibilidad de que CD13 esté implicada de alguna manera en la modulación de la maduración de DCs y, por los resultados obtenidos en este trabajo, podría esperarse que esta modulación sea positiva.

No se descarta que, a pesar de lavar la placa de cultivo cubierta con anticuerpo antes de sembrar las células, algunos anticuerpos permanezcan libres, es decir, sin adherirse a la placa y sean capaces de estimular a las DCs a través de su porción Fc. A fin de comprobar si el efecto observado se debe a la estimulación de CD13 o a la interacción entre los FcRs de las DCs y la porción Fc del anticuerpo utilizado, resultaría útil cubrir la placa de cultivo con un anticuerpo irrelevante y determinar la expresión de los mismos marcadores y la producción de citocinas evaluados en este trabajo.

Las proteínas de superficie analizadas como marcadores de maduración fueron: CD86 que es una proteína de membrana, ligando de CD28 y de CTLA4 expresados en linfocitos T y cuya unión a CD28 durante la presentación de antígeno proporciona una señal coestimuladora para la activación del linfocito T [68]; HLA-DR que es una molécula clase II del MHC cuya función es presentar péptidos de antígenos proteicos para que sean reconocidos por el TCR [69] y CD83, molécula transmembranal empleada como marcador específico de mDCs y aunque no se conoce bajo qué mecanismos, se sabe que está implicada en la regulación de la presentación antigénica a linfocitos [70, 71]. También analizamos la secreción de TNF- $\alpha$ , el cual puede actuar de manera autócrina sobre las DCs y entre los efectos que esta molécula perteneciente a la familia de la linfotóxina  $\alpha$ , provoca en estas células están el incremento en la expresión de moléculas MHC y de moléculas coestimuladoras, el incremento en la capacidad para activar linfocitos T [72] y el aumento en el tiempo de vida útil de las DCs [73].

Como ya se mencionó, el entrecruzamiento de CD13 adicionalmente a la incubación de DCs con un estímulo de maduración provocó una tendencia a que se incrementaran la expresión de CD83, CD86 y HLA-DR y la producción de TNF- $\alpha$ . Esto podría ser indicativo de que al recibir estimulación a través de CD13, las DCs pueden aumentar su capacidad para llevar a cabo la presentación de antígenos previamente procesados y esto resultar en respuestas adaptativas más potentes contra patógenos, ya que tanto los marcadores medidos como el TNF- $\alpha$  participan durante la presentación antigénica o la favorecen.

Una vez maduras, y de acuerdo al perfil de citocinas que producen, las DCs son capaces de promover respuestas inmunológicas de tipo  $T_H1$  o  $T_H2$  [31]. Las DCs que secretan IL-12 inducen el desarrollo de linfocitos  $T_H1$ , tanto en el sistema humano como en el murino. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo y puesto que perfiles de secreción de IL-12 por DCs conducen a respuestas de tipo  $T_H1$ , la estimulación de CD13 en DCs podría estar conduciendo a respuestas tipo  $T_H1$  y por ello modulando positivamente las respuestas celulares, ya que los linfocitos  $T_H1$  se caracterizan por secretar IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  y mediar respuestas inmunológicas de tipo celular, mismas que incluyen activación de macrófagos y de CTLs [74, 75].

Otro de los cambios que experimentan las DCs durante su maduración es el incremento en su capacidad para migrar a ganglios linfáticos a fin de llevar a cabo la presentación de antígenos. Esto lo hacen incrementando la expresión de receptores de quimiocinas, como

CCR7 [66]. A pesar de ello, en este trabajo no fue posible detectar la presencia de CCR7 en la superficie de las DCs, ni siquiera en células que se sabe estaban maduras —en base a la expresión de los otros marcadores de superficie y a la producción de citocinas—. Este problema en la detección de CCR7 podría deberse a la cinética de expresión de la molécula, pues si bien el incremento en la expresión de CCR7 ya es detectable mediante citometría de flujo luego de 24 horas de maduración [75, 76], el máximo nivel de expresión en DCs derivadas de monocitos se alcanza luego de la maduración durante 48 horas con LPS [77]. En este trabajo, se comparó la expresión de CD83, HLA-DR y CD86 luego de madurar las DCs durante 24 y 48 horas, aunque la expresión de CCR7 no fue medida a ese último tiempo. Posiblemente la expresión de este receptor podría evidenciarse si se midiera a tiempos más largos después de inducir la maduración y además de esto, podrían hacerse ensayos de funcionalidad de la molécula, es decir, se podría determinar la migración en respuesta a citocinas como CCL19 o CCL21 para detectar su presencia de manera indirecta [78]. Esto último resultaría útil en caso de que el anticuerpo empleado para detectar CCR7 no presentara una buena actividad.

Puesto que existe correlación entre el nivel de expresión y el desarrollo de DCs derivadas de progenitores CD34<sup>+</sup> [38], resultaría relevante determinar si existe un cambio en la expresión de CD13 que se relacione con el estado de maduración de las DCs, pues el nivel de expresión de la aminopeptidasa N, al menos en humanos, no se ha correlacionado con el nivel de maduración de ésta. A este respecto, cabe mencionar que Zhuang y colaboradores no encontraron correlación entre el nivel de expresión de CD13 y el grado de maduración de DCs provenientes del bazo de terneros Holstein [79].

Desafortunadamente la falta de significancia estadística en los cambios fenotípicos y funcionales que reflejan la maduración de las DCs obtenidos mediante la estimulación de CD13 en este trabajo no permite comprobar o descartar la participación de esta molécula en la maduración de DCs. Para concluir al respecto, es necesario incrementar el número de donadores empleados en los experimentos e incluir en ellos el uso de un anticuerpo no relacionado para corroborar que el efecto obtenido se debe específicamente a la estimulación de CD13, así como incrementar el número de pruebas para evaluar la maduración de las DCs a través de ensayos de migración, como ya se había mencionado, y de ser posible evaluar la capacidad DCs estimuladas a través CD13 para inducir la proliferación de linfocitos T mediante reacciones leucocitarias mixtas.

## 9. CONCLUSIONES

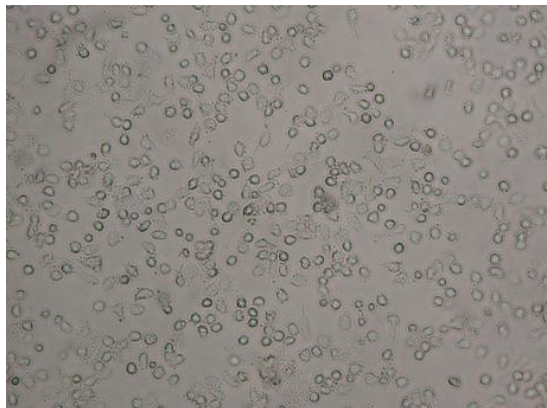
- ★ Existe una tendencia al incremento en la expresión de marcadores de maduración al entrecruzar CD13 en células dendríticas. Esta tendencia es más evidente cuando para realizar el entrecruzamiento se emplea el anticuerpo 452 completo inmovilizado sobre una placa de cultivo celular.
- ★ Existe también una tendencia al incremento en la secreción de IL-12 y de TNF- $\alpha$  cuando se entrecruza CD13 con 452 completo en presencia de un estímulo de maduración.
- ★ El solo entrecruzamiento de CD13, en ausencia de un estímulo de maduración, no induce producción de IL-12 ni de TNF- $\alpha$  y no provoca una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de marcadores de maduración. Posiblemente la estimulación de CD13 no induce la maduración de células dendríticas pero sí podría modularla positivamente.
- ★ Mediante citometría de flujo no fue posible detectar diferencias en la expresión de CCR7 en células dendríticas sometidas a distintos tratamientos. La presencia de esta molécula podría evidenciarse de manera indirecta mediante ensayos como la capacidad migratoria de células dendríticas en respuesta a la presencia de quimiocinas como CCL19 y CCL21.

## 10. ANEXOS

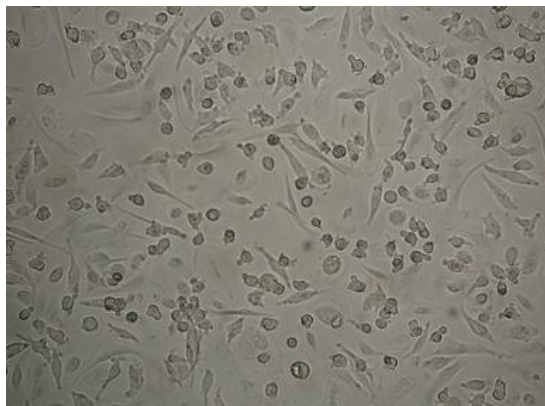
### 10.1. ANEXO I. IMÁGENES DE CÉLULAS

#### 10.1.1. DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A CÉLULAS DENDRÍTICAS O A MACRÓFAGOS

A



B

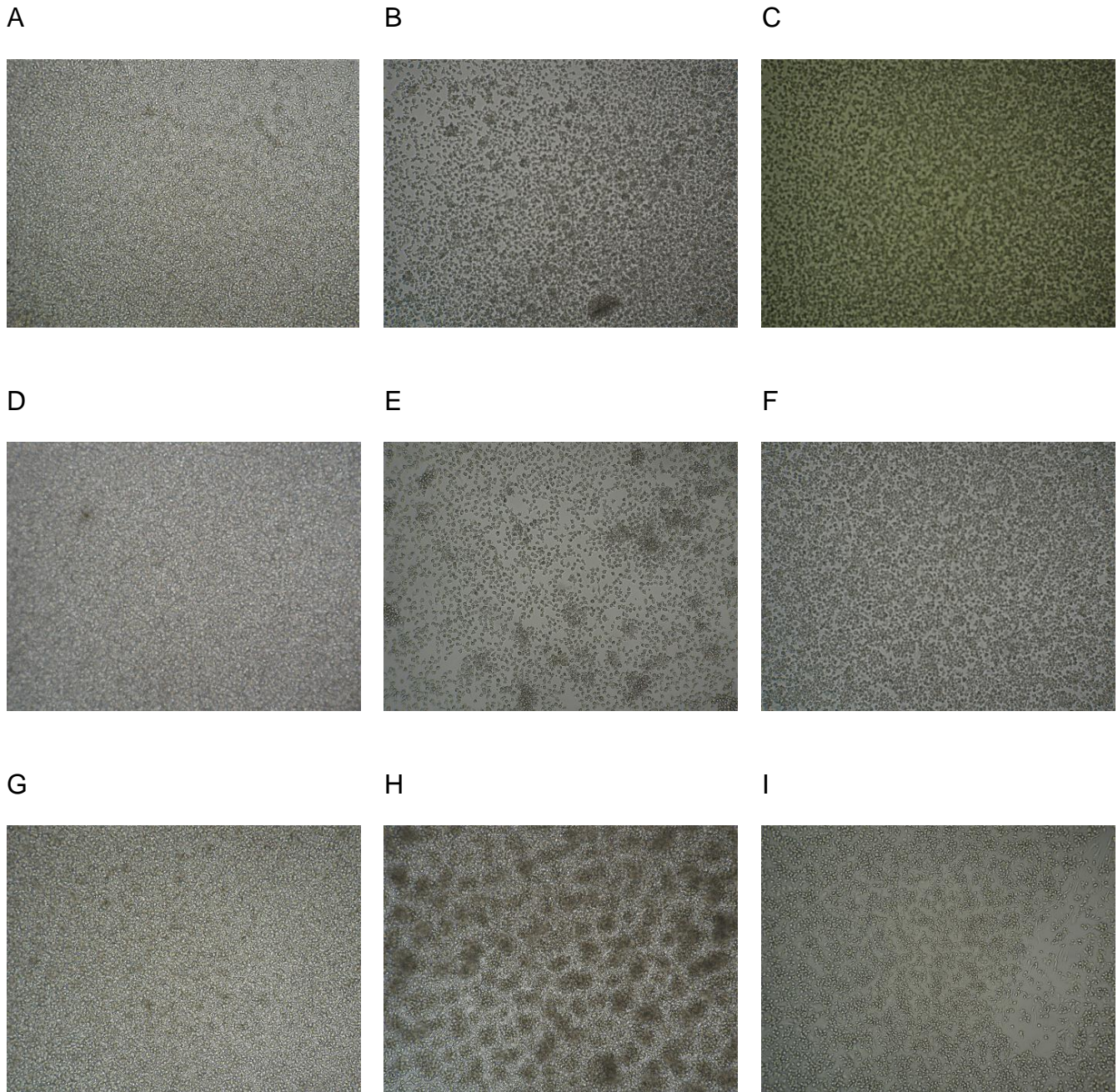


C



**Figura 18. Diferenciación de monocitos a macrófagos o a células dendríticas.** A) Fotografía de monocitos recién aislados de sangre periférica mediante gradiente de densidad y adherencia. Objetivo 40x. B) Fotografía de macrófagos derivados de los monocitos mostrados en la fotografía 18 A). Fotografía tomada nueve días después del aislamiento de los monocitos. Objetivo 40x. C) Fotografía de células dendríticas derivadas de los monocitos mostrados en la figura 18 A) mediante la incubación de éstos con IL-4 y GM-CSF durante 7 días. Fotografía tomada nueve días después del aislamiento de los monocitos. Objetivo 40x.

### 10.1.2. MADURACIÓN Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS



**Figura 19. Fotografías de células dendríticas luego de incubarse durante 24 horas con diferentes estímulos. Objetivo 10x.** A). Células dendríticas sin estímulo (iDCs). B) Células dendríticas (DCs) estimuladas con fragmentos  $F(ab')_2$  de 452 y fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpo secundario. C) DCs estimuladas con anticuerpo 452 completo inmovilizado en la placa de cultivo. D) DCs estimuladas con LPS. E) DCs estimuladas con LPS, fragmentos  $F(ab')_2$  de 452 y fragmentos  $F(ab')_2$  de anticuerpo secundario. F) DCs estimuladas con LPS y anticuerpo 452 completo inmovilizado en la placa de cultivo. G) DCs estimuladas con TNF- $\alpha$ . H) DCs estimuladas con TNF- $\alpha$ , fragmentos  $F(ab')_2$  de 452 y fragmentos

F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo secundario. I) DCs estimuladas con TNF- $\alpha$  y anticuerpo 452 completo inmovilizado en la placa de cultivo. En células estimuladas mediante fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de 452 y fragmentos del anticuerpo secundario puede observarse agregación homotípica que induce el anticuerpo 452 y que ya ha sido estudiada en otros tipos de células [3].

## 10.2. ANEXO II. SOLUCIONES EMPLEADAS

### • Medio de cultivo RPMI 1640 complementado al 10% de SFB

- RPMI 1640 (Gibco), 1 sobre
- NaHCO<sub>3</sub> (Baker), 2.2g
- HEPES (Sigma) 25 mM, 5.9575 g
- $\beta$ -mercaptoetanol (dilución en agua ultrapura, 1:100), 7.8  $\mu$ L

Ajustar el pH entre 7.2 y 7.4 y llevar a un volumen final de 1 L con agua ultrapura (Easypure UF).

Esterilizar filtrando a través de membrana de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro.

Conservar al menos 3 días a temperatura ambiente antes e complementar.

Para complementar:

- RPMI 1640 (Gibco) reconstituido como se indicó anteriormente, 500 mL.
- Penicilina (Sigma), 50 000 U
- Estreptomina (Sigma), 5 mg
- Glutamina 0.2 M, 5 mL
- Aminoácidos no esenciales 100x (Gibco), 5 mL
- Piruvato de sodio 100x (Gibco), 5 mL
- SFB (Gibco), 50 mL

Mezclar y conservar a 4 °C.

### • PBS

- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O (Baker), 0.13 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Baker), 0.387 mM
- NaCl (Baker), 8  $\mu$ M

Disolver las sales en agua ultrapura y ajustar el pH a 7.5 con NaOH.

Filtrar a través de membrana de 0.22  $\mu$ m de diámetro de poro.



• Solución para lisis eritrocitaria

- $\text{CINH}_4$  3 mM, 5 mL
- $\text{NaHCO}_3$  100 mM, 2 mL
- EDTA 0.5 mM, 1 mL
- Agua ultrapura, 2 mL

Justo antes de realizar la lisis, mezclar el agua y cada una de las soluciones que deberán estar estériles y preparadas con agua ultrapura.

• Solución amortiguadora de lavados para citometría de flujo

- PBS, 100 mL
- SFB, 5 mL
- Azida de sodio (Sigma), 0.1 g

Disolver la azida de sodio en el PBS, agregar el SFB y filtrar a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Conservar a 4 °C.

• Solución de fijación para citometría de flujo

- PBS, 100 mL
- Paraformaldehído, 1 g

Calentar el PBS a una temperatura máxima de 45 °C. Disolver el paraformaldehído, de requerirse, emplear NaOH para disolver por completo.

Permitir que la solución se enfríe y ajustar el pH a 7.5 con HCl.

Filtrar a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y conservar a 4 °C protegido de la luz.

• Solución amortiguadora de fosfatos

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 M

Disolver en agua ultrapura. Ajustar el pH a 9 con HCl, filtrar a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y conservar a 4 °C.

• Solución amortiguadora de bloqueo

- Albúmina bovina (Santa Cruz Biotechnology), 1 g
- PBS, 100 mL

Disolver la albúmina en el PBS y ajustar el pH a 7.4. Esterilizar filtrando a través de membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y conservar a 4 °C.

• Solución diluyente

- Albúmina bovina, 1 g
- Tween 20 (Bio-rad), 50  $\mu\text{L}$

Disolver la albúmina bovina en PBS y agregar el Tween 20. Ajustar el pH a 7.4 y llevar a un volumen final de 100 mL con PBS.

• Solución amortiguadora de lavados para ELISA

- Tween 20, 500  $\mu\text{L}$

Disolver el Tween 20 en PBS llevando a un volumen final de 1 L. Filtrar a través de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro y conservar a 4 °C.

### 10.3. ANEXO III. ABREVIATURAS

(4-IBBL): ligando para 4-IBB.

(ANOVA): análisis de varianza.

(APC): célula presentadora de antígeno.

(BCR): receptor de antígeno de los linfocitos B.

(BDCA2): antígeno 2 de células dendríticas sanguíneas.

(CCL): quimiocina con motivo C-C.

(CCR): receptor para quimiocinas con motivo C-C.

(CD): cúmulo de diferenciación

(CD40L): ligando de CD40.

(CDP): progenitor común de células dendríticas.

(CLIP): péptido de la cadena invariante asociada a moléculas de clase II.

(CLPs): progenitores linfoides comunes.

(CLRs): receptores de tipo lectina de tipo C.

(CMPs): progenitores mieloides comunes.

(CTLA-4): antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.

(CTLs): linfocitos T citotóxicos.

(CXCL): quimiocina con motivo C-X-C.

(DAMPs): patrones moleculares asociados a daño.

(DC/SIGN): molécula no-integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas.

(DC-LAMP): proteína de membrana de células dendríticas asociada a lisosomas.

(DCs): células dendríticas.

(DC-STAMP): proteína transmembranal específica de células dendríticas.

(DNA): ácido desoxirribonucleico.

(dsRNA): ácido ribonucleico de doble cadena.

(ELISA): ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

(Fc): fracción cristalizante de inmunoglobulinas.

(FcRs): receptores para la fracción cristalizante de inmunoglobulinas.

(FcγR) receptor para la fracción cristalizante de inmunoglobulina G.

(FDCs): células dendríticas foliculares.

(FITC): isotiocianato de fluoresceína.

(FLT-3L): ligando de tirosina cinasa 3 tipo Fms.

(GCDCs): células dendríticas de centros germinales.

(GM-CSF): factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

(HCoV-229E): coronavirus humano 229 E

(HLA): antígeno leucocitario humano.

(HRP): peroxidasa de rábano.

(HSP): proteínas de choque térmico.

(ICAM): molécula de adhesión intracelular.

(ICOSL): ligando coestimulador inducible.

(iDCs) células dendríticas inmaduras.

(IFN-γ): interferón gama.

(Ig): inmunoglobulina.

(IgG): inmunoglobulina tipo G.

(IL): interleucina.

(IMF): intensidad media de fluorescencia.

(LPS): lipopolisacárido.

(mAb): anticuerpo monoclonal.

(MAPK): proteína cinasa activada por mitógenos.

(mDCs) células dendríticas maduras.

(MHC): complejo principal de histocompatibilidad.

(MIP-3 $\beta$ ): proteína inflamatoria de macrófagos 3 $\beta$ .

(moDCs): células dendríticas derivadas de monocitos.

(NK): asesinas naturales.

(NLRs): receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos.

(O.D.): densidad óptica.

(OX40L): ligando para OX40.

(PAMPs): patrones moleculares asociados a patógenos.

(pDCs): células dendríticas plasmacitoides.

(PE): ficoeritrina.

(PerCP/Cy5.5): complejo de peridina-clorofila/cianina 5.5.

(PGE<sub>2</sub>): prostaglandina E<sub>2</sub>

(pH): potencial de hidrógeno.

(PMNs): leucocitos polimorfonucleares.

(pre-DC1): precursor de células dendríticas de tipo 1.

(pre-DC2): precursor de células dendríticas de tipo 2.

(PRRs): receptores de reconocimiento de patrones.

(RECK): proteína rica en cisteína con motivos Kazal que induce reversión.

(RNA): ácido ribonucleico.

(SFB): suero fetal bovino.

(TAP): transportador relacionado con el procesamiento de antígeno.

(TCR): receptor de los linfocitos T.

(TGF- $\beta$ ): factor transformante de crecimiento beta.

(T<sub>H</sub>1): linfocitos T colaboradores tipo 1.

(T<sub>H</sub>2): linfocitos T colaboradores tipo 2.

(TLRs): receptores tipo *Toll*.

(TNF- $\alpha$ ): factor de necrosis tumoral alfa.

(Treg): linfocitos T reguladores.

## 11. REFERENCIAS

1. Navarrete, A., Langner, J., Herrmann, M., Riemann, D. (2000) Aminopeptidase N/CD13 is Directly Linked to Signal Transduction Pathways in Monocytes. (2000). *Cellular Immunology*. 201: 22-32.
2. Mina-Osorio, P. (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine*. 14: 361-371.
3. Mina-Osorio, P., Shapiro, L. y Ortega, E. (2006) CD13 in Cell Adhesion: Aminopeptidase N. (CD13) Mediates Homotypic Aggregation of Monocytic Cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 79: 719-730.
4. Mina-Osorio, P. y Ortega, E. (2005). Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγRs in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 77: 1008-1017.
5. Rivera Fuentes, A. D. Papel de la aminopeptidasa N (CD13) en la Inducción del Estallido Respiratorio en Macrófagos Derivados de Monocitos Humanos. 2011. Tesis de Licenciatura de Química Farmacéutica Bióloga. Facultad de Química, UNAM.
6. Jones, H., Klein, N. y Dixon, G. (2012). Human Dendritic Cell Culture and Bacterial Infection. En: *Neisseria meningitidis: Advanced Methods and Protocols*, Methods In Molecular Biology. Human Press. 799: 217-235.
7. Li, C.-Y., Chao, L.-K., Wang, S.-C., Chang, H.-Z., Tsai, M.-L., Fang, S.-H., Liao, P.-C., Ho, C.-L., Chen, S.-T., Cheng, W.-C., Chiang, C.-S., Kuo, Y.-H., Hua, K.-F., Hsu, I.-C. (2010) Honokiol Inhibits LPS-Induced Maturation and Inflammatory Response of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Journal of Cellular Physiology*. 226: 2338-2349.
8. Murphy, K., Travers, P. y Walport, M. (2008). Inmunobiología de Janeway. 7ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. Distrito Federal, México.
9. Brooks, G.F., Carroll, K. C., Butel, J. S. y Morse, S. A. (2008). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª ed. Editorial El Manual Moderno. Distrito Federal, México.
10. Kindt, T. J., Goldsby, R. A. y Osborne, B. A. (2007) Inmunología de Kuby. 6ª ed. 19ª ed. McGraw-Hill Interamericana Editores. Distrito Federal, México.
11. McKenzie, S. B. (2000). Hematología clínica. 2ª ed. Editorial El Manual Moderno. Distrito Federal, México.

- 12.Liu, K. y Nussenzweig, M. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*. 234: 45-54.
- 13.Banchereau, J. y Steinman, R. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245-252.
- 14.Kushwah, R. y Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunobiology*. 133: 409-419.
- 15.Liu, Y.-J. (2001). Dendritic Cell Subsets and Lineages, and Their Functions in Innate and Adaptive Immunity. *Cell*. 106: 259-262.
- 16.Liu, Y.-J., Kanzler, H., Soumelis, V. y Gilliet, M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*. 7 (2): 585-589.
- 17.Geissmann, F. (2007). The origin of dendritic cells. *Nature Immunology*. 6: 558-560.
- 18.Clark, G., Angel, N., Kato, M., López, J., MacDonald, K., Vuckovic, S. Y Hart, D. (2000). The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and Infection*. 2 (7): 257-277.
- 19.Howard, C., Charleston, B., Stephens, S., Sopp, P. y Hope, J. (2004). The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Animal Health Research Reviews*. 5 (2): 191-195.
- 20.Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Puccino, T., Connolly, J., Fay, J., Pascual, V., Palucka, A y Bancherau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*. 219: 118-142.
- 21.Groves, E., Dart, A. y Caron, E. (2008). Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 1957-1976.
- 22.Rivas-Caicedo, A. y García-Zepeda, E. (2009). Características e implicaciones terapéuticas de las células dendríticas. *El Residente*. 4(3): 97-104.
- 23.Canton, I. y Battaglia, G. (2012). Endocytosis at the nanoscale. *Chemical Society Reviews*. 41: 2718-2739.
- 24.Reis e Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*. 16: 21-25.
- 25.Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B. y Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Reviews of Immunology*. 18: 767-811.

- 26.Land, W. (2012). Emerging role of innate immunity in organ transplantation Part I: evolution of innate immunity and oxidative allograft injury. *Transplantation Reviews*. 26: 60-72.
- 27.Mellanby, R., Cambrook, H., Turner, D., O'Connor, R., Leech, M., Kurschus, F., MacDonald, A., Arnold, B. y Anderton, S. (2012). TLR-4 ligation of dendritic cells is sufficient to drive pathogenic T cell function in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*. 9 (1): 248-252.
- 28.Sato, K. y Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergy International*. 56 (3): 183-191.
- 29.Yoshino, H., Takahashi, K., Monzen, S. y Kashiwakura, I. (2010). Proteoglycans Regulate the Chemotaxis of Dendritic Cells Derived from Human Peripheral Blood Monocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33 (6): 938-944.
- 30.Wieder, E. (2003). Dendritic Cells: A Basic Review. *International Society for Cellular Therapy*.1-6.
- 31.Stagg, A. y Knight, S. (2001). Antigen-presenting cells. *Encyclopedia of Life Sciences*. 1-8.
- 32.Riemann, D., Kehlen, A. y Langer, J. (1999). CD13—not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today*. 20 (2): 83-88.
- 33.Larsen, L., Pedersen, L., Buus, S. y Stryhn, A. (1996) T Cell Responses Affected by Aminopeptidase N (CD13)-mediated Trimming of Major Histocompatibility Complex Class II-bound Peptides. *The Journal of Experimental Medicine*. 184: 183-189.
- 34.Tokuda, N. y Levy, R. B. (1996) 1, 25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 211: 244-250.
- 35.Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J. y Herlyn, M. (1993) Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Research*. 5: 1450-1455.
- 36.Mina-Osorio, P., Soto-Cruz, I. y Ortega, E. (2007) A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353: 605-610.

37. Winnicka, B., O'Connor, C., Schacke, W., Vernier, K., Grant, C., Fenteany, F., Pereira, F., Liang, B., Kaur, A., Zhao, R., Montrose, D., Rosenberg, D., Aguila, H. y Shapiro, L. (2010). CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *Journal of Leukocyte Biology*. 88: 347-359.
38. Rosenzweig, M., Tailleux, L. y Gluckman, J. (2000) CD13/N-aminopeptidase is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *Blood*. 95: 453-460.
39. Ghosh, M., McAuliffe, B., Subramani, J., Basu, S. y Shapiro, L. (2012). CD13 Regulates Dendritic Cell Cross-Presentation and T Cell Responses by Inhibiting Receptor-Mediated Antigen Uptake. *The Journal of Immunology*. 188: 5489-5499.
40. Van der Velden, V., Leenen, P. y Drexhage, H. (2001), CD13/aminopeptidase N involvement in dendritic cell maturation. *Leukemia*. 15 (1): 190-191.
41. Dong, X., An, B., Salvucci Kierstead, L., Storkus, W., Amoscato, A. y Salter, R. (2000). Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *The Journal of Immunology*. 164 (1): 129-135.
42. Mesel-Lemoine, M., Millet, J., Vidalain, P.-O., Law, H., Vabret, A., Lorin, V., Escriou, N., Albert, M., Nal, B. y Tangy, F. (2012). A Human Coronavirus Responsible for the Common Cold Massively Kills Dendritic Cells but Not Monocytes. *Journal of Virology*. 86 (14): 7577-7587.
43. Stockwin, L., McGonagle, D., Martin, I. y Blair, G. (2000). Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and Cell Biology*. 78: 91-102.
44. Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. y Underhill, D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine*. 197 (9): 1107-1117.
45. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. Y Schuler, G. (1994). Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood. *The Journal of Experimental Medicine*. 180: 83-93.
46. O'Neil, D. W. Y Bhardwaj, N. (2005). Differentiation of Peripheral Blood Monocytes into Dendritic Cells. *Current Protocols in Immunology*. 22F.4.1-22F.4.9.



47. Ning, B.-T. y Tang, Y.-M. (2012). Establishment of the cell line, HeLa-CD14, transfected with the human CD14 gene. *Oncology Letters*. 3: 871-874.
48. Syme, R., Bajwa, R., Robertson, L., Stewart, D. y Glück, S. (2005). Comparison of CD34 and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Mobilized Peripheral Blood from Cancer Patients. *Stem Cells*. 23: 74-81.
49. Luykx-de Bakker, S. A., de Gruijil, T. D., Scheper, R. J., Wagstaff, J., y Pinedo, H. M. (1999). Dendritic cells: A novel therapeutic modality. *Annals of Oncology*. 10: 21-27.
50. DeMeyer, E. S. y Baar, J. (2007). Dendritic Cells: The Sentry Cells of the Immune System. Oncology Education Services, Inc.
51. Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1994). Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *The Journal of Experimental Medicine*. 179: 1109-1118.
52. Gogolak, P., Rethi, B., Szatmari, I., Lanyi, A., Dezso, B., Nagy, L. y Rajnavolgyi, E. (2007). Differentiation of CD1a<sup>-</sup> and CD1a<sup>+</sup> monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR $\gamma$ . *Blood*. 109: 643-652.
53. Thurner, B., Röder, C., Dieckmann, D., Heuer, M., Kruse, M., Glaser, A., Keikavoussi, P., Kämpgen, E., Bender, A. Y Schuler, G. (1999). Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of Immunological Methods*. 223: 1-15.
54. Tkachenko, N., Wojas, K., Tabarkiewicz, J. y Rolinski, J. (2005). Generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes - comparison of different culture media. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 43 (1): 25-30.
55. Landi, A., Babiuk, L. A. y van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2010). Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF- $\alpha$  or LPS. *Immunobiology*. 216: 649-662.
56. Duperrier, K., Farre, A., Bienvenu, J., Bleyzac, N., Bernaud, J., Gebuhrer, L. y Elijaafari, A. (2002). Cyclosporin A inhibits dendritic cell maturation promoted by TNF- $\alpha$  or LPS but not by double-stranded RNA or CD40L. *Journal of Leukocyte Biology*. 72: 953-961.

- 57.Min, Y., Han, D., Fu, Z., Wang, H., Liu, L. Y Tian, Y. (2011).  $\alpha$ -MSH inhibits TNF- $\alpha$ -induced maturation of human dendritic cells in vitro through the up-regulation of ANXA1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 43 (1): 61-68.
- 58.Polančec, D. S., Kos, V. M., Banjanac, M., Vrančić, M., Čužič, S., Belamarić, D., Parnham, M., Polančec, D. y Haber, V, E. (2011). Azithromycin drives in vitro GM-CSF/IL-4-induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 91: 229-243.
- 59.Wang, C.-C., Chen, T.-Y., Wu, H.-Y., Liu, T.-Y. y Jan, T.-R. (2012). Areca nut extracts suppress the differentiation and functionality of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Periodontal Research*. 47: 198-203.
- 60.Moser, M. y Murphy, K. M. (2000). Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature Immunology*. 1: 199-205.
- 61.Fanger, N. A., Voigtlaender, D., Liu, C., Swink, S., Wardwell, K., Fisher, J., Graziano, R. F., Pfefferkorn, L. C. Y Guyre, P. M. (1997). Characterization of Expression, Cytokine Regulation, and Effector Function of the High Affinity IgG Receptor FcyRI (CD64) Expressed on Human Blood Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 158 (7): 3090-3098.
- 62.Boruchov, A. M., Heller, G., Veri, M.-C., Bonvini, E., Ravetch, J. V. y Young, J. W. (2015). Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *The Journal of Clinical Investigation*. 115 (10): 2914-2923.
- 63.Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. y Amigorena, S. (1999). Fcy Receptor-mediated Induction of Dendritic Cell Maturation and Major Histocompatibility Complex Class I-restricted Antigen Presentation after Immune Complex Internalization. *The Journal of Experimental Medicine*. 189 (2): 371-380.
- 64.Kruisbeek, A. M., Shevach, E. y Thornton, A. M. (2004). Proliferative Assays for T Cell Function. *Current Protocols in Immunology*. 3.12.1-3.12.20.
- 65.Verwilghen, J., Baroja, M. L., van Vaeck, F., van Damme, J. y Ceuppens, J. L. (1991). Differences in the stimulating capacity of immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies: variable dependence on interleukin-1 as a helper signal for T-cell activation. *Immunology*. 72: 269-276.

66. Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. y Yamaguchi, Y. (1998). EBI1/CCR7 Is a New Member of Dendritic Cell Chemokine Receptor That Is Up-Regulated upon Maturation. *The Journal of Immunology*. 161: 3096-3102.
67. Van Montfoort, N., 't Hoen, P. A. C., Mangsbo, S. M., Camps, M. G. M., Boross, P., Melief, C. J. M., Ossendorp, F. y Verbeek, S. (2012). Fcγ Receptor IIb Strongly Regulates Fcγ Receptor-Facilitated T Cell Activation by Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*. 189: 92-101.
68. Pletinckx, K., Döhler, A., Pavlovic, V. y Lutz, M. B. (2011). Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Frontiers in Immunology*. 2: 1-16.
69. Karakikes, I., Morrison, I. E. G., O'Toole, P. O., Metodieva, G., Navarrete, C. V., Gomez, J., Miranda-Sayago, J. M., Cherry, R. J, Metodiev, M. y Fernandez, N. (2012). *The FASEB Journal*. 26: 4886-4896.
70. Breloer, M. y Fleischer, B. (2008). CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends in Immunology*. 29 (4): 186-194.
71. Lechman, M., Berchtold, S., Hauber, J. y Steinkasserer, A. (2002). CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology*. 23 (6): 273-275.
72. Ding, X., Yang, W., Shi, X., Du, P., Su, L., Qin, Z., Chen, J. Y Deng, H. (2011). TNF Receptor 1 Mediates Dendritic Cell Maturation and CD8 T Cell Response through Two Distinct Mechanisms. *The Journal of Immunology*. 187: 1184-1191.
73. Lehner, M., Kellert, B., Proff, J., Schmid, M. A., Diessenbacher, P., Ensser, A., Dörrie, J., Schaf, N., Leverkus, M., Kämpgen, E. y Holter, W. (2012). Autocrine TNF Is Critical for the Survival of Human Dendritic Cells by Regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *The Journal of Immunology*. 188: 4810-4818.
74. Viallard, J. F., Pellegrin, J. L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., Ragnaud, J. M., Leng, B. y Moreau, J. F. (1999). Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clinical and Experimental Immunology*. 115: 189-195.
75. Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T. A. Schadendorf, D. y Kalinski, P. (2010). PGE2 transiently enhances DC expression of CCR7 but

- inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*. 116: 1454-1459.
76. Yen, J.-H., Khayrullina, T. y Ganea, D. (2008). PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood*. 111: 20-270.
77. Bax, M., van Vliet, S. J., Litjens, M., García-Vallejo, J. J., van Kooyk, Y. (2009). Interaction of Polysialic Acid with CCL21 Regulates the Migratory Capacity of Human Dendritic Cells. *PLoS ONE*. 4 (9): e6987.
78. Fedele, G., Bianco, M., Debie, A.-S., Locht, C. y Ausiello, C. M. (2011). Attenuated Bordetella pertussis Vaccine Candidate BPZE1 Promotes Human Dendritic Cell CCL21-Induced Migration and Drives a Th1/Th17 Response. *The Journal of Immunology*. 186: 5388-5396.
79. Zhuang, Y., Mwangi, W., Brown, W. C., Davis, W. C., Hope, J. C. y Palmer, G. H. (2006). Characterization of a Phenotypically Unique Population of CD13<sup>+</sup> Dendritic Cells Resident in the Spleen. *Clinical and Vaccine Immunology*. 13 (9). 1064-1069.