



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Expresión de TLRs en subpoblaciones de
células dendríticas de sangre periférica
en reposo y activadas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

Q. F. B. Iliana Donají Palomec Nava

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

COMITÉ TUTOR:
Dra. Rosana Pelayo Camacho
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

Expresión de TLRs en subpoblaciones de
células dendríticas de sangre periférica
en reposo y activadas

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

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

P R E S E N T A

Q. F. B. Iliana Donají Palomec Nava

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

COMITÉ TUTOR:
Dra. Rosana Pelayo Camacho
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de junio de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **PALOMEC NAVA ILIANA DONAJÍ** con número de cuenta 402065805, con la tesis titulada **“EXPRESIÓN DE TLRs EN SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN REPOSO Y ACTIVADAS.”** realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO:**

Presidente:	DRA. YVONNE ROSENSTEIN AZOULAY
Vocal:	DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Secretario:	DRA. KARINA CHÁVEZ RUEDA
Suplente:	DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
Suplente:	DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de junio de 2012

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

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

Al CONACyT por la beca otorgada durante la realización de los estudios de maestría. No. De registro de becario 233694.

Al Programa de Formación de Investigadores de la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS por el apoyo económico otorgado durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonzo y los miembros del Comité Tutor: Dra. Rosana Pelayo Camacho y Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay, por su apoyo para la realización del proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte fundamental de mi formación académica y personal. A cada uno de mis profesores por la formación recibida durante mis estudios.

A la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonso por confiar en mí y ser mi guía, por su asesoría brindada en el desarrollo del presente trabajo y lo aportado para mi formación.

A las Dras. Rosana Pelayo Camacho e Yvonne Rosenstein Azoulay por todo el tiempo y asesoría dedicados a enriquecer este proyecto.

A los demás miembros del jurado revisor por sus sugerencias y asistirme en la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Lourdes Arriaga Pizano y Gibrán Pérez Montesinos por la asistencia técnica en el uso del citómetro BD FACS Aria del Centro de Instrumentos del Hospital de Especialidades del CMN S. XXI. A la Dra. Gloria Soldevilla y Carlos Castellanos por las facilidades y apoyo otorgado en el poco, pero no menos importante, uso del citómetro BD FACS Aria de la Unidad de Citofluorometría del IIB de la UNAM.

Al Banco de Sangre Central del CMN S. XXI y del H. Infantil de México “Federico Gómez” por las facilidades otorgadas para la obtención de muestras de concentrados leucocitarios.

A Luz Ma., Rosa, Gibrán, Eli, las “Patys” y demás miembros de la otrora UIMEA y de la UIMIQ por su compañerismo, ayuda y consejos.

DEDICATORIAS

A mis padres por su cariño, por creer en mí y darme la oportunidad de llegar hasta aquí y alentarme a seguir adelante.

A mi abu, Cui y Omar, por estar conmigo y apoyarme; son una parte importante en mi vida.

A Luz Ma. y Rosita por su amistad de tantos años; por compartir sus conocimientos y proporcionarme herramientas para ser no sólo una mejor profesionista sino un mejor ser humano.

A Gus, Chayo, Karina, Mario, Bety, Lorenzo y demás telerines y amigos por brindarme su amistad y por todos los momentos compartidos sin los cuales hubiera sido más difícil cumplir con esta meta.

A la Dra. Laura Bonifaz por todo el tiempo, apoyo y fomentar constantemente el interés por la investigación. Gracias por sus valiosos consejos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aspectos generales de las células dendríticas (DCs)	2
1.2. Origen de las DCs	3
1.3. Poblaciones de DCs en sangre periférica	4
1.4. Estado de maduración de las DCs	5
1.4.1. Receptores de DCs de la familia B7	6
1.4.2. Citocinas y DCs	7
1.5. Activación de DCs	9
1.6. Receptores tipo Toll (TLRs)	10
2. ANTECEDENTES DIRECTOS AL TRABAJO	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVO GENERAL	16
6. OBJETIVOS PARTICULARES	16
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1. Muestras de sangre periférica	17
7.2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	17
7.3. Conteo de PBMCs	17
7.4. Análisis de marcadores de superficie y expresión de TLRs mediante citometría de flujo	17
7.5. Aislamiento de distintas poblaciones linaje negativas a partir de sangre periférica	18
7.6. Cultivo celular	18
7.7. Extracción de RNA	19

7.8. RT-PCR	19
8. RESULTADOS	20
8.1. Aislamiento de poblaciones a partir de sangre periférica.	20
8.2. Expresión de transcrito de los TLRs.	21
8.3. Expresión a nivel de proteína de los TLRs en poblaciones Lin- en estado basal.	23
8.4. Expresión de TLRs en las poblaciones Lin- después de su cultivo <i>in vitro</i> .	27
8.5. Evaluación funcional de receptores de la subfamilia de TLR-9 en las poblaciones Lin-.	
8.5.1. Características morfológicas de las poblaciones Lin- aisladas y después de cultivo <i>in vitro</i> .	27
8.5.2. Expresión de marcadores de activación o inhibición y producción de citocinas en las poblaciones Lin-.	30
9. DISCUSIÓN	37
10. CONCLUSIONES	42
11. BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	56
FIGURAS SUPLEMENTARIAS	56
MEDIOS	60
A. Medio RPMI	
SOLUCIONES	60
B. Amortiguadora de fosfatos 10X	
C. Solución FACS	
D. Solución MACS	
E. Gel de Agarosa (2 % w/v)	
F. Amortiguadora de corrida TBE 10X	
G. Amortiguadora de carga para RNA 2X	
H. Amortiguadora de carga para DNA 6X	

I. Amortiguadora B	
J. Amortiguadora Inv	
TÉCNICAS DE LABORATORIO	61
K. Tinción de inmunofluorescencia	
L. PCR	
M.Extracción de DNA	
N. Preparación del complejo LL37DNA	
O. Detección de citocinas	

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Expresión basal de transcrito de TLRs 1-10 en las poblaciones Lin-.

Figura 1. Interacción de una célula dendrítica con un linfocito T.

Figura 2. Clasificación de DCs.

Figura 3. Diferencias morfológicas entre pDC y cDC.

Figura 4. Cambio de morfología de pDC.

Figura 5. Miembros de la familia B7.

Figura 6. Características que cambian durante el proceso de maduración de una DC.

Figura 7. Familia de TLRs en humanos.

Figura 8. Fenotipo de la población nDC.

Figura 9. Cambios morfológicos en la población nDC después de cultivo.

Figura 10. Separación de poblaciones de células Lin-.

Figura 11. Pureza de poblaciones de células Lin- aisladas.

Figura 12. Expresión basal de transcrito de TLRs 1-10 en PBMCs.

Figura 13. Perfil de expresión basal de TLRs 1-10 a nivel de transcrito en las poblaciones Lin- aisladas.

Figura 14. Expresión de TLRs a nivel de proteína en PBMCs.

Figura 15. Identificación de las poblaciones celulares Lin-.

Figura 16. Expresión basal de TLRs a nivel de proteína en las poblaciones nDC, pDC y cDC.

Figura 17. Incremento en la expresión de TLRs de superficie y de TLR-8 en las nDC en comparación con las pDC y cDC después de cultivo *in vitro*.

Figura 18. Las nDC presentan morfología alargada al cultivarse en presencia de IL-3 y forma agregados al estimularse con virus e IL-3.

Figura 19. La población nDC presenta cambios morfológicos y forma agregados celulares después de estimularse con IL-3 y ligandos de TLRs

Figura 20. La población nDC presenta cambios morfológicos y después de estimularse con IL-3 y LL37DNA

Figura 21. Expresión de marcadores de CD86 y PD-L2 en la población nDC en respuesta a señales exógenas y de daño endógenas.

Figura 22. Expresión de moléculas de superficie en las nDC después del cultivo *in vitro* en comparación con las pDC y cDC.

Figura 23 A. Producción de TNF- α , IFN- α , IL-1 β e IL-6 en las poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*.

Figura 23 B. Producción de IL-10, IL-12p70, IL-13 e IL-9 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*.

Figura 24. Producción de IL-8 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*.

Figura 25. Producción de TGF- β 1 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*.

SUPLEMENTARIAS

Figura I. Expresión basal de TLRs 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 a nivel de proteína en poblaciones Lin-.

Figura II. Expresión de TLRs de superficie en células Lin- después de cultivo.

Figura III. Expresión de TLRs intracelulares en células Lin- después de cultivo.

Figura IV. Morfología de la población nDC a través del tiempo después de cultivo con ligandos de TLR.

Figura V. Expresión de TNF- α e IFN- α intracelular en las nDC después del cultivo *in vitro* en comparación con las pDC y cDC.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

%= por ciento

°C= grados Celsius

ALR= receptor tipo AIM2 (*AIM2 like receptor*, en inglés)

$A_{\lambda, Znm}$ = valor de absorbancia a una longitud de onda de Z nanómetros

BCR= receptor de linfocito B

BDCA= antígeno de células dendríticas presentes en sangre periférica (*blood dendritic cell antigen*, en inglés).

β MeOH= beta mercaptoetanol

BSA= albúmina sérica bovina (*bovine serum albumin*, en inglés)

CD= grupo de diferenciación (*cluster of differentiation*, en inglés)

cDC= célula dendrítica convencional

cDNA= DNA complementario

CLA= antígeno leucocitario cutáneo (*cutaneous leukocyte antigen*, en inglés)

cm= centímetros

CO₂= dióxido de carbono

CPA= célula presentadora de antígeno

DAMPs= patrones moleculares asociados a daño (*danger associated molecular patterns*, en inglés)

DC= célula dendrítica (*dendritic cell*, en inglés)

DNA= ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*, en inglés)

EtOH= etanol

FACS= separación de células activadas por fluorescencia (*fluorescence activated cell sorting*, en inglés)

FLT3= receptor clase III de tirosina cinasa relacionado con fms (*fms-related tyrosine kinase 3*, en inglés)

g= gramos

GAPDH= gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF= factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte and macrophage colony stimulating factor*, en inglés)

h= horas
H₂O_m= agua miliQ
hi= intensidad de fluorescencia alta
HLA-DR= antígeno humano leucocitario clase II (*human leukocyte antigen class II*, en inglés)
HR= humedad relativa
IFN- γ = interferón gamma
IgG= inmunoglobulina G
IL= interleucina
L= litro
lo= intensidad de fluorescencia baja
LPS= lipopolisacárido
LTA= ácido lipoteicoico
M= molaridad o concentración Molar (mol/L)
MACS= separación de células asociada a magnetos (*magnet associated cell sorting*, en inglés)
M-DC8= quimiocina 8 derivada de macrófago (*macrophage-derived chemokine 8*, en inglés)
 μ g= microgramo
mg= miligramo
MHC= complejo principal de histocompatibilidad
mid= intensidad de fluorescencia intermedia
min= minuto
 μ m= micrómetro
mM= milimolar
 μ L= microlitro
mL= mililitro
NaCO₃= carbonato de sodio
nDC= población celular linaje negativa caracterizada en la UIMIQ
NLR= receptor tipo NOD (*NOD like receptor*, en inglés)
NOD= dominio de oligomerización de unión a nucleótido (*nucleotide binding oligomerization domain*, en inglés)
PAMPs= patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen associated molecular patterns*, en inglés)

pb= pares de bases
PBS= solución amortiguadora de fosfatos (*phosphate buffer solution*, en inglés)
PD-1= dominio programado de muerte celular-1 (*programmed cell death-1*, en inglés)
PD-L1= ligando 1 de PD-1 (*PD-1 ligand 1*, en inglés)
PD-L2= ligando 2 de PD-1 (*PD-1 ligand 2*, en inglés)
pDC= célula dendrítica plasmacitoide
pH= potencial de hidrógeno
RIG-I= gen inducible por ácido retinoico (*retinoic acid inducible gene*, en inglés)
RLR= receptor tipo RIG-I
rpm= revoluciones por minuto
RNA= ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*, en inglés)
RNAm= RNA mensajero
s= segundo
SDS= dodecil sulfato de sodio (*sodium dodecyl sulfate*, en inglés)
SP= Sangre Periférica
TCR= receptor de linfocito T
TGF- β = factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor beta*, en inglés)
TGF- β 1= isoforma 1 del factor de crecimiento transformante beta
Th1= subpoblación de linfocitos T cooperadores tipo 1
TLR= receptor tipo Toll (*Toll like receptor*, en inglés)
TNF- α = factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, en inglés)
Treg= supoblación de linfocitos T reguladores
V= Volt
VHB= virus de la hepatitis B
VHC= virus de la hepatitis C
VIH= virus de la inmunodeficiencia humana
v/v= volumen / volumen
w/v= peso / volumen (*weight / volume*, en inglés)

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son células de la inmunidad innata que sirven de puente con la inmunidad adaptativa y representan a una población heterogénea de células originadas en médula ósea y que están ampliamente distribuidas en el organismo. En la sangre periférica (SP) de individuos sanos se identifican dos poblaciones de DC, las DC convencionales (cDC) y las DC plasmacitoides (pDC). En la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del CMN S. XXI se identificó una tercera población negativa para los marcadores de linaje CD3, CD19, CD14 y CD56 (Lin-) que presenta el fenotipo HLA-DR^{lo}/CD123⁺/CD11b⁺/CD11c^{lo}. A esta población, aún no descrita en la literatura, se le denominó nDC y adquiere tanto morfología como fenotipo característicos de DCs al ser cultivada *in vitro* en presencia de un coctel de citocinas (GM-CSF, IL-3 y FLT3). Además esta población celular muestra un gran potencial de migración a sitios como piel en condiciones de inflamación. Es posible que la población nDC de periferia se encuentre en un estado inmaduro y sea capaz de diferenciarse a DC, así como de responder a diferentes estímulos de maduración tanto exógenos como endógenos por una vía TLR-dependiente. En el presente trabajo se evaluó el perfil de expresión de TLRs de las nDC en comparación con las cDC y pDC presentes en la SP de individuos sanos, en estado de reposo y después de estimularlas con IL-3 en presencia o ausencia de PAMPs o DAMPs. La población nDC expresa los TLR-2, 4, 7 y 9 de manera basal y, a diferencia de las cDC y pDC, incrementa la expresión de TLRs bajo ciertos estímulos. Sin embargo, la consecuencia de la activación de la población nDC en presencia de distintos ligandos de TLRs fue distinta a la reportada para las cDC y las pDC, ya que presentó un fenotipo tolerogénico o regulador ante señales exógenas (virus A/H3N2/2008) o de daño endógenas (complejos de LL37-DNA) caracterizado por la baja expresión de HLA-DR y moléculas coestimuladoras y la no producción de citocinas pro-inflamatorias en contraste con la expresión de moléculas coinhibidoras y la producción de citocinas anti-inflamatorias. De esta manera, se propone que la población nDC participe activamente en la regulación de la respuesta inmune en procesos patológicos como los presentes en infecciones o enfermedades autoinmunes.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are immune cells that bridge innate with adaptive immunity and represent a heterogeneous population of cells originated in the bone marrow that are widely distributed in the body. Two subsets of DC, conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC), have been identified in the peripheral blood (PB) of healthy individuals. At the Medical Research Unit on Immunochemistry of the National Medical Centre “S. XXI” we identified a third population negative for the lineage markers CD3, CD19, CD14 and CD56 (Lin⁻) that has the phenotype HLA-DR^{lo}/CD123⁺/CD11b⁺/CD11c^{lo}. This population, not yet described in the literature, has been designated as “nDC” and acquires both morphology and phenotype typical of DCs when grown *in vitro* in the presence of a cytokine cocktail (GM-CSF, IL-3 and FLT3). Furthermore, this cell population shows great potential for migration to sites like skin under inflammation conditions. It is possible that the population nDC exists in an immature state in the periphery and could be able to differentiate into DC, as well as to respond to both exogenous and endogenous stimuli of maturation by a TLR-dependent pathway. This study evaluated the expression profile of TLRs of the nDC compared with the cDC and pDC present in the PB from healthy individuals in the steady state and after stimulated with IL-3 in the presence or absence of PAMPs or DAMPs. In the steady state, the nDC population expresses the TLR-2, 4, 7 and 9 and, unlike the cDC and pDC, it increases the expression of TLRs under certain stimuli. However, the consequence of the activation of the population nDC in the presence of different TLRs' ligands was different to that reported for the cDC and pDC, since it showed a tolerogenic or regulatory phenotype in response to exogenous (A/H3N2/2008 virus) or endogenous damage (LL37-DNA complex) signals, that was characterized by the low expression of HLA-DR and costimulatory molecules and non-production of pro-inflammatory cytokines in contrast to the expression of coinhibitory molecules and production of anti-inflammatory cytokines. Thus, it is proposed that the population nDC actively participates in the regulation of immune responses in pathological processes such as those present in infections or autoimmune diseases.

1. INTRODUCCIÓN

El término inmunidad deriva de la voz latina *immunitas* y significa protección contra la enfermedad. Desde el punto de vista funcional, el sistema inmune puede dividirse en innato y adaptativo. La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a agentes extraños, comprende mecanismos bioquímicos y celulares que están preparados para responder con rapidez ante los distintos insultos. Los principales componentes de la inmunidad innata consisten en: barreras físicas y químicas (como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales); células fagocíticas (como neutrófilos y macrófagos); componentes del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación que regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata [Abbas, 2004]. Las células dendríticas (DCs) forman parte de la inmunidad innata pero - mediante la expresión de distintas citocinas pro- y anti-inflamatorias y su capacidad de presentar antígenos tanto por moléculas de clase I como clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) - tienen la capacidad de servir como puente de conexión con la inmunidad adaptativa.

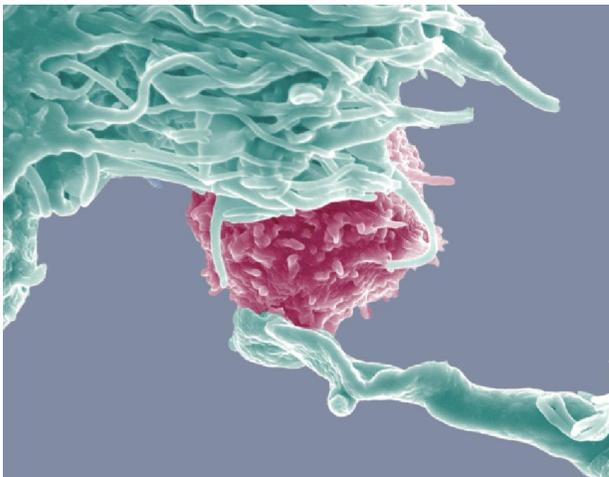


Figura 1. Interacción de una célula dendrítica con un linfocito T. La microfotografía electrónica de barrido muestra el reconocimiento de la superficie de un linfocito (rojo) por parte de una célula dendrítica (verde), etapa vital en la cascada de eventos que alertan al sistema inmunitario de nuestro cuerpo. (tomada de <http://www.sciencephoto.com/media/305598/view>).

La presentación antigénica se da en el contexto de moléculas de superficie celular codificadas por genes del MHC; las células que presentan péptidos asociados al MHC se denominan células presentadoras de antígeno (CPA) [Abbas, 2004]. Para la activación de los linfocitos T se requiere del reconocimiento antigénico a través del MHC en la superficie de una CPA profesional. Además de las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos B son también considerados como CPA profesionales. Sin embargo, las DCs son las CPA más eficaces para iniciar una respuesta inmune (RI) mediada por linfocitos T (figura 1), ya que tienen la capacidad de expresar moléculas accesorias o coestimuladoras necesarias para la activación adecuada de los mismos [Janeway, 2001]. Por otra parte, las DCs pueden participar en la inducción

de tolerancia inmunológica (TI) dependiendo del estado de maduración en el que se encuentren, ya que, en estado de reposo o en presencia de ciertos estímulos la consecuencia de la presentación de antígeno es la inducción de TI [Hawiger, 2001; Hernández, 2001; Bonifaz, 2002; Liu, 2001; Probst, 2003; Steinman, 2003]. Por otro lado, existen subpoblaciones de DCs con características funcionales especializadas que parecen ser definidas durante su proceso de diferenciación [Albert, 1998; Dudziak, 2007; Grouard, 1997; Heath, 2009; Henri, 2010; Huang, 2000; Liu, 2005; Naik, 2008; Wu, 2007], se ha reportado además que las DCs – dependiendo del ambiente molecular y celular en el que se encuentren - pueden cambiar su fenotipo y función y a esto se le ha denominado plasticidad [Caux, 1996; Palucka, 1998; Banchereau, 2000; Liu, 2001; Shortman, 2002].

En los últimos años, considerando las evidencias obtenidas sobre la función de las distintas poblaciones de DCs en la regulación del sistema inmune, la investigación relacionada con la biología de las DCs ha cobrado un auge importante principalmente con el fin de entender su participación en la patogenia de distintas enfermedades y utilizarlas en el desarrollo de nuevas terapias que resulten menos tóxicas y más eficientes para su tratamiento (como es el caso de cáncer, trasplantes, autoinmunidad e hipersensibilidades), así como en el diseño de vacunas contra agentes infecciosos.

1.1. Aspectos generales de las células dendríticas (DCs)

Las DCs fueron descritas en 1973 por Ralph Steinman y Zanvil A. Cohn en la Universidad de Rockefeller. Al igual que otros grupos de investigación, ellos estaban enfocados al estudio del desarrollo de la inmunidad celular con la propuesta de que se requería tanto de linfocitos T como de “células accesorias”, las cuales poseían identidad y función incierta. Se pensaba que estas células accesorias eran macrófagos. No obstante, Steinman y Cohn identificaron una población celular con morfología y movimientos inusuales que no había sido descrita. Dado que Steinman visualizó en dichas células muchas prolongaciones o dendritas, las nombró células dendríticas [Steinman, 1973].

Después de múltiples investigaciones ahora sabemos que las DCs desempeñan un papel crucial en el inicio, dirección y control de la magnitud y calidad de la RI [Ueno, 2007]. En los distintos tejidos del organismo las DCs se especializan en la captura y procesamiento de antígenos para luego transportarlos a los sitios de inicio de RI y presentarlos a los linfocitos T. La interacción entre las DCs y los linfocitos T puede dar lugar tanto a la inducción de RI como al proceso contrario denominado TI; y además dependiendo de las condiciones de activación

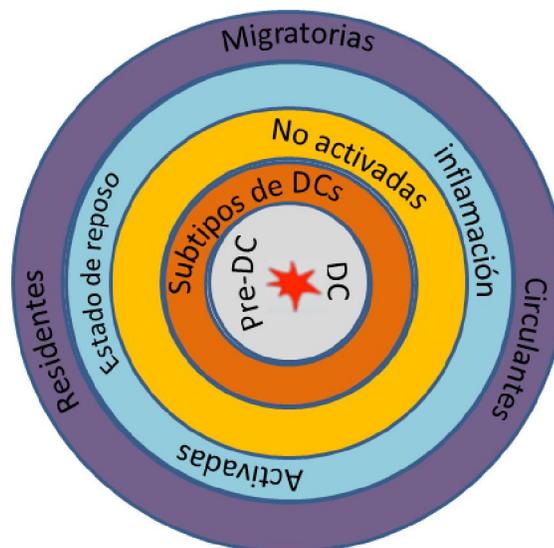
de las DCs, éstas pueden polarizar la RI hacia Th1, Th2 u otras subpoblaciones de linfocitos T [Heufler, 1996; Liu, 1998; Kaliński, 1999; Liu, 2001; Tschöep K, 2003; Fukaya, 2010]

Para entender cómo una misma célula puede participar en dos mecanismos opuestos - RI o TI e incluso modular el tipo de RI iniciada – vale la pena revisar algunas características en cuanto al origen, subpoblaciones, fenotipo, localización y activación de las DCs.

1.2. Origen de las DCs

Las DCs representan a una población heterogénea de células originadas en médula ósea que se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo en tejidos linfoides y no linfoides (como piel, pulmón, intestino, sangre, bazo y ganglios) [Manz, 2001; Naik, 2007]. Los precursores de las DCs dan origen a DCs “inmaduras” que se localizan en tejido periférico cuya función principal es capturar antígenos del medio que los rodea, así como detectar la presencia de agentes externos [Banchereau, 2000] o de daño endógeno [Lande, 2007; Gilliet, 2008]. Muchas de la DCs localizadas en la periferia tienen la capacidad de migrar a los ganglios linfáticos más cercanos; la migración de la DCs se da constitutivamente y puede incrementarse por la presencia de receptores de superficie capaces de cambiar fenotípica y/o funcionalmente a un estado “maduro” e incluso generar subpoblaciones con distintos fenotipos con el potencial de realizar funciones diversas [Naik, 2005; Piqueras, 2006; Schmid, 2010; Steinman, 2007]. A la fecha se han considerado varios criterios para clasificar a las DCs, en la figura 2 se representa una categorización.

Figura 2. Clasificación de DCs. Dentro de esta rueda, se representan algunos criterios generales a partir de los cuales pueden categorizarse las células dendríticas [Naik S, 2008]



1.3. Poblaciones de DCs en sangre periférica

En contraste con los numerosos estudios en modelos murinos que identifican subpoblaciones de DCs en órganos linfoides, la mayoría de los trabajos en humanos se enfocan al estudio de subpoblaciones de DCs en sangre periférica (SP) [Hartmann, 1999; Liu, 2001; Piccioli, 2007; Romani, 1994; Shortman, 2002; Wu, 2007], en donde se han identificado dos poblaciones bien definidas por la expresión de marcadores de superficie, precursores y función.

Las subpoblaciones mejor caracterizadas hasta el momento en SP incluyen a las DCs convencionales (cDC) y las DCs plasmacitoides (pDC) [O'Doherty, 1994; Kohrgruber, 1999; MacDonald, 2002] (figura 3); además, de acuerdo con la expresión de los marcadores de superficie CLA y M-DC8 podemos identificar dos subpoblaciones dentro de las cDC. Las DCs M-DC8⁺ se han denominado inflamatorias (DCin) por su capacidad de producir grandes cantidades de TNF- α e IL-12p70 [Schäkel, 2002; Schäkel, 2006]. Prácticamente no existen reportes de la función de las cDC CLA⁺.

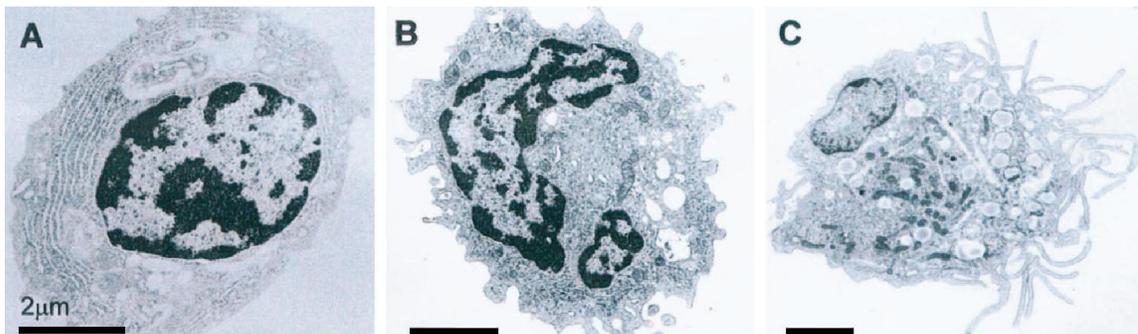


Figura 3. Diferencias morfológicas entre pDC y cDC. Las imágenes corresponden a pDC (A) y cDC (B) recién aisladas a partir de SP. Es evidente como las pDC exhiben un retículo endoplásmico prominente y una membrana sin protuberancias, lo opuesto sucede en las cDC. Éstas (C) despliegan numerosas proyecciones de su membrana después de ser estimuladas dos días con IL-4 y GM-CSF [Kohrgruber, 1999].

En humanos, las cDC constituyen del 1 al 5 % de las células mononucleares en sangre periférica (PBMCs). Pese a que no expresan marcadores de linaje de linfocitos T y B, células NK, monocitos, etc. (linaje negativas), las cDC en SP son positivas para la expresión de CD11c, CD11b y moléculas clase II del MHC (HLA-DR) [Ito, 1999; Almeida, 1999]. Estas células también expresan niveles basales importantes de la molécula coestimuladora CD86 y después de activarse producen citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-6 [Almeida, 1999; Shortman, 2007]. Las cDC son células presentadoras de antígeno profesionales capaces de activar a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ para iniciar una respuesta inmune adaptativa [MacDonald, 2002]. En términos

generales, se considera que las cDC de SP se encuentran en un estado inmaduro; sin embargo, se ha descrito que éstas pueden dar lugar rápidamente a una DC madura aún al ser cultivadas *in vitro* en ausencia de citocinas o estímulos.

Las pDC constituyen del 0.2 al 0.8 % de las PBMCs y en estado basal o reposo tienen una morfología de célula plasmática, de ahí su nombre (figura 4). Al igual que las cDC, son células linaje negativas que expresan CD4, la cadena alfa del receptor de IL-3 (CD123) y HLA-DR; los cuales son marcadores que comparten con otras poblaciones celulares. Para su identificación es necesario partir de células linaje negativas que expresen CD123 [Kohrgruber, 1999]. El fenotipo de las pDCs en estado basal o de reposo es: CD4⁺/CD45RA⁺/CD123⁺/HLA-DR⁺/BDCA-2,4⁺. Las pDC expresan bajos niveles de CD11c y producen preferentemente IFN tipo I en respuesta a virus [Colonna, 2004; Dalod, 2003; Dzionek, 2000; Jego, 2003; McKenna, 2005; Rasmussen, 2007; Siegal, 1999; Strobl, 1998]. Recientemente se describió una subpoblación de pDC que expresa el marcador CD2 y que es capaz de producir altos niveles de IL-12p40 y de la molécula coestimuladora CD80, además se ha reportado que es más eficiente en inducir la proliferación de células T naïve alógenas [Matsui, 2009]. Bajo estímulos de maduración adecuados, las pDC pueden diferenciarse a DCs maduras, con morfología típica y alta capacidad para estimular linfocitos T [Colonna, 2004; Grouard, 1997; McKenna, 2005; Reizis, 2011].

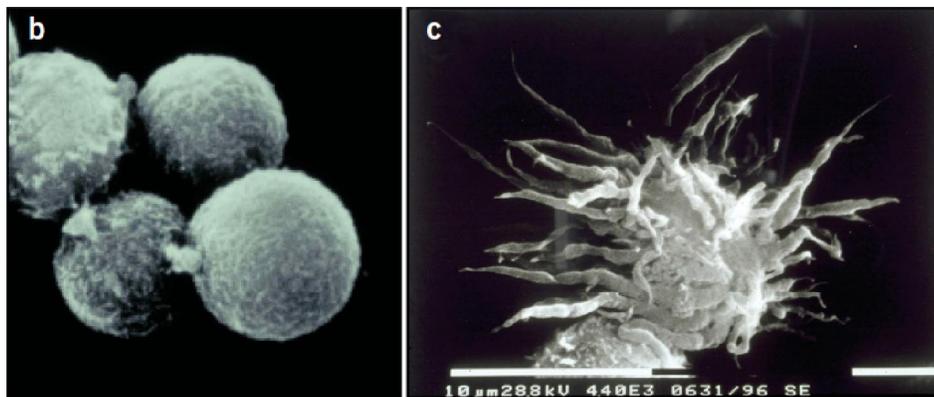


Figura 4. Cambio de morfología de pDC. Las fotografías corresponden a pDC en reposo (izq) y 6 días después de ser activadas con IL-3 y CD40L (der) [Grouard, 1997; Colonna, 2004].

1.4. Estado de maduración de las DCs

En la mayoría de los tejidos, las DCs se encuentran en lo que se denomina estado inmaduro, ya que expresan abundantemente receptores endocíticos (como receptores de lectina tipo C, DEC-205 y Fcγ), moléculas de HLA-DR intracelular y baja o nula cantidad de moléculas

coestimuladoras (como CD40, CD80 y CD86) por lo que son incapaces de iniciar una respuesta mediada por linfocitos T. Estas DCs inmaduras son muy eficientes para capturar antígenos, algunos receptores que utilizan para ello son capaces de inducir su maduración y migración; sin embargo, muchos otros receptores endocíticos no lo hacen y, por lo tanto, se necesitan señales adicionales capaces de inducir la maduración y movilización de las DCs a los órganos linfoides [Banchereau, 1998; Kohrgruber, 1999; Sallusto, 1999; Ueno, 2007]. Las DCs activadas que han migrado a órganos linfoides, son capaces de actuar sobre los linfocitos T a través de al menos tres familias de moléculas: citocinas, miembros de la familia de B7 y miembros de la familia de TNF.

1.4.1. Receptores de DCs de la familia B7

Los miembros de la familia B7 desempeñan funciones esenciales tanto en la regulación de inmunidad mediada por células T como en tolerancia. Esta familia se integra por las moléculas CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), ICOSL, PD-L1 (B7-H1), PD-L2 (B7-DC), B7-H3 y B7-H4; cada una de éstas puede ser expresada diferencialmente en subpoblaciones de DCs y macrófagos [Greenwald, 2005; Okazaky, 2007; Ueno, 2007].

A pesar de que las glucoproteínas CD80 y CD86 se utilizan comúnmente como marcadores de maduración de DCs, su sobreexpresión no necesariamente implica que son capaces de inducir inmunidad (figura 5). Lo anterior se debe a que CD80 y CD86 pueden interactuar con dos moléculas distintas promoviendo señales de activación o de inhibición. La interacción de CD80 y CD86 con CD28 sinergiza la señalización del TCR promoviendo la activación de la célula T [Lenschow, 1996; Lanzavecchia, 1999]. Contrariamente, la interacción de CD80 y CD86 con CTLA-4 antagoniza la señal mediada por CD28-TCR y genera señales inhibitorias [Walunas, 1996; Brunner, 1999].

Otra molécula involucrada en el control negativo de la respuesta de la célula T es la proteína PD-1, cuyos ligandos son PD-L1 y PD-L2. La interacción PD-1 con PD-L1 y PD-L2 inhibe la proliferación y producción de citocinas mediada por el TCR en células T activadas previamente [Freeman, 2000; Dong, 1999; Latchman, 2001] y también guía el arresto del ciclo celular [Carter, 2002]. Por lo tanto, la vía PD-L:PD-1 (DC:linfocito T) es capaz de generar potentes señales inhibitorias al antagonizar la señal activadora a través de B7-CD28. PD-L1 se expresa constitutivamente en células del sistema inmune, mientras que la expresión de PD-L2 se limita a DCs y macrófagos. Dado lo anterior, PD-L2 es una molécula con gran potencial de regulación de la respuesta de células T [Baecher, 2001; Keir, 2007; Fukaya, 2010; Mendoza, 2011].

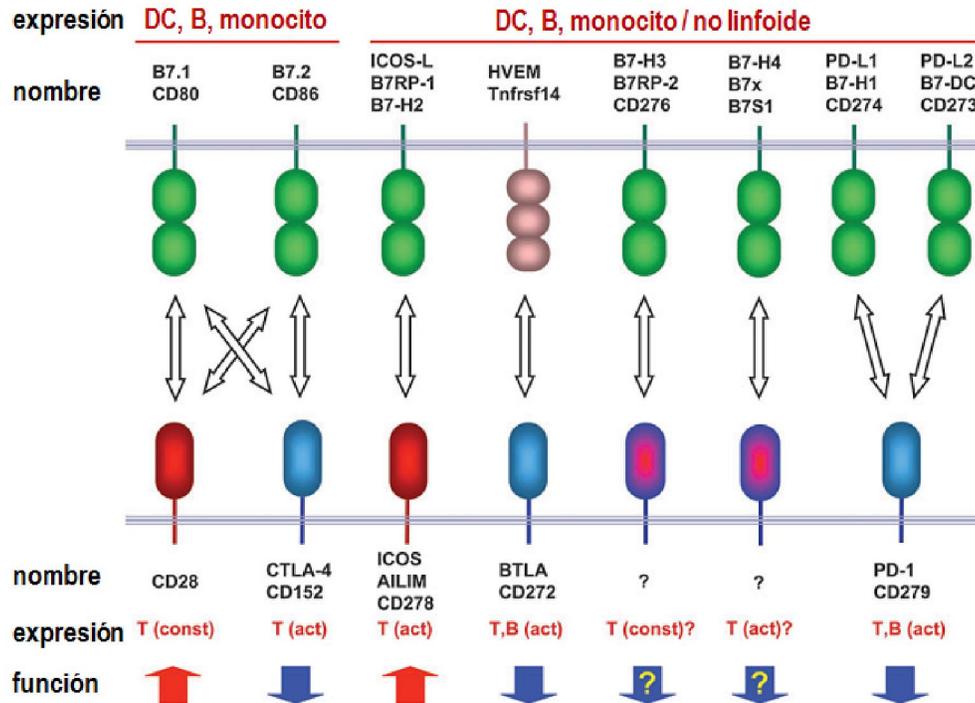


Figura 5. Miembros de la familia B7. Se representa el perfil de expresión y función de algunas moléculas en DC y monocitos. Las flechas rojas representan funciones de coestimulación/activación, y las flechas azules representan funciones de coinhibición; act: expresión tras activación, const: expresión constitutiva. [Okazaki, 2007].

1.4.2. Citocinas y DCs

Una vez activadas o aún en condiciones de reposo, las DCs se dirigen a tejidos linfoides donde pueden completar su maduración e interactuar con linfocitos T. Las DCs maduras presentan abundante expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas codificadas en el MHC-II, siendo capaces de activar tanto a linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺, además presentan cambios en su morfología (como pérdida de estructuras de adhesión, adquisición de alta motilidad celular y rearrreglos en su citoesqueleto que inhiben su actividad endocítica y/o fagocítica).

El complejo proceso de maduración de las DCs no sólo implica modificación de sus marcadores de superficie (figura 6), sino también la expresión de citocinas que modulan la inducción y polarización de la RI. La DCs maduras migratorias se caracterizan por tener un tiempo de vida corto y por la activación de un programa de diferenciación irreversible que culmina con la muerte celular por apoptosis [Foti, 2006; Sallusto, 1999; Ueno, 2007].

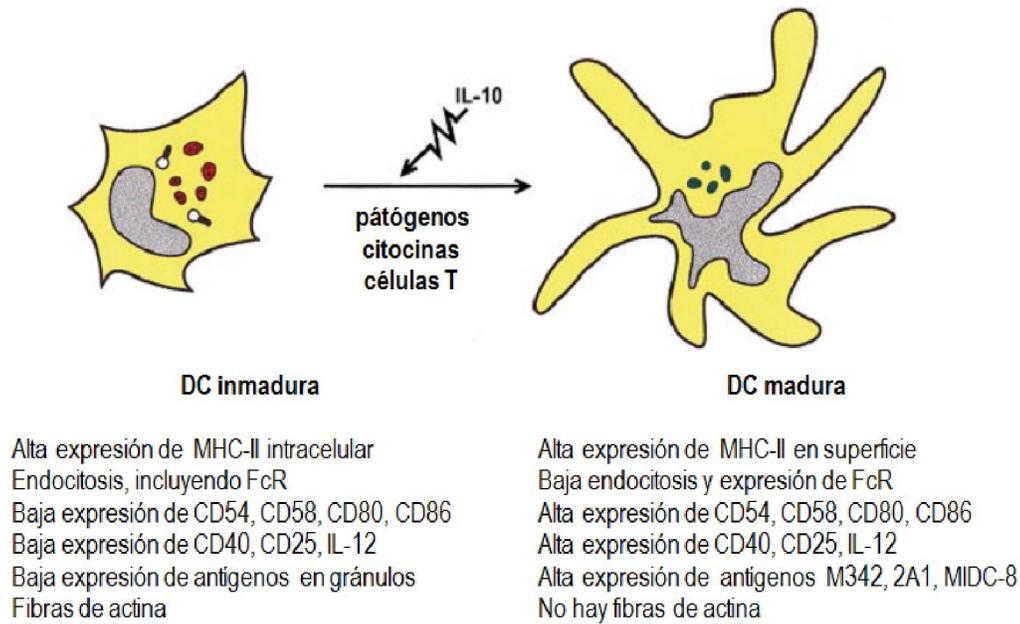


Figura 6. Características que cambian durante el proceso de maduración de una DC [Banchereau, 1998].

La producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e interferones tipo I favorece que la RI sea tipo Th1, mientras que un ambiente de citocinas anti-inflamatorias como IL-9, IL-10 o IL-13 direcciona hacia respuestas tipo Th2. Algunas citocinas también son capaces de inducir la conversión de células T a otras poblaciones, por ejemplo hacia Th17 (por la combinación de IL-1, IL-6, IL-23 y TGF- β 1) o hacia Treg (por ácido retinocico junto con TGF- β 1). A continuación se describen ejemplos de citocinas y su relación con las DCs.

La IL-8 es una quimiocina que interviene en procesos de fagocitosis y exocitosis al participar en mecanismos de estrés oxidativo en células endoteliales de vías aéreas y polimorfonucleares. [Bachmann, 2006; József, 2006; Koff, 2008; Mahanonda, 2007]. Se ha descrito a la IL-8 como una de las citocinas pro-inflamatorias involucradas en el reclutamiento de células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) [Bertók, 2005]. A su vez, la IL-8 es producida por DCs inmaduras en respuesta a estímulos bacterianos [Sallusto, 1999; Öz, 2006; Feijoó, 2005]. Esta citocina es capaz de inducir la migración de DCs hacia tejido inflamado [Alfaro, 2011; Feijoó, 2005] y se ha propuesto como un mediador pro-inflamatorio en estados patológicos como psoriasis, gingivitis y cáncer [Oude, 2003; Celestin, 2001].

La IL-13 e IL-9 participan en respuestas tipo Th2 como alergia, asma y defensa contra helmintos. La IL-13 también se ha utilizado para generar DCs *in vitro* y es capaz de favorecer la maduración y activación de las cDC e incrementar su capacidad para inhibir la secreción de IFN- γ en las células T CD4⁺ [Alters, 1999; Morse, 1999; Webb, 2007]. Además, se ha reportado que la IL-13 modula el fenotipo de las pDC en respuesta a virus y bacterias [Tel, 2011]. Por otro lado, se ha denominado Th9 a un tipo de células T CD4⁺ caracterizadas por producir IL-9 [Ma, 2010]. Recientemente, se ha descrito que la combinación de TGF- β con IL-4 promueve la conversión de células tipo Th2 a células tipo Th9 e incluso se ha reportado que la IL-9 puede ser producida por células Th17. También se ha propuesto que la IL-9 puede tener actividad anti-inflamatoria y participar en mecanismos de tolerancia periférica, ya sea actuando como factor de supervivencia o incrementando la actividad supresora de células Treg [Beriou, 2010].

La IL-10 es una citocina con potente capacidad inmunomoduladora, ya que inhibe significativamente funciones de DCs como su capacidad de presentación antigénica, producción de citocinas pro-inflamatorias y activación de células T, en las cuales también regula negativamente la proliferación y activación al inhibir la producción de citocinas como IFN- γ o IL-2 [Asadullah, 2003; Díaz, 2011; O'Garra, 2009; Said, 2010]. Aún más, se ha reportado que esta citocina anti-inflamatoria favorece la inducción de un fenotipo tolerogénico en DCs [Illaregui, 2009; Wakkach, 2003].

El TGF- β es un péptido multifuncional del cual se han identificado cinco isoformas, de entre las cuales TGF- β 1 es producido predominantemente por leucocitos. TGF- β 1 no sólo ha sido descrito como citocina anti-inflamatoria, sino que controla una gran variedad de procesos en diferentes tipos celulares, o bien, en células que se encuentran en distintos estadios de desarrollo. El estudio de TGF- β 1 ha sido relevante debido a las potentes propiedades inmunorreguladoras que posee; algunos ejemplos que involucran a esta proteína con la función de las DCs son: i) puede regular la maduración y funciones de DCs, como la capacidad de procesamiento y presentación de antígeno a células T [Strobl, 1999; Yoshimura, 2010]; ii) las células de Langerhans epidermales lo necesitan producir para promover su desarrollo y supervivencia [Geissmann, 1999; Henri, 2010; Kaplan, 2007]; iii) contribuye para que las DCs induzcan la conversión de linfocitos T CD4⁺ naïve hacia células Th17 o T reguladoras Foxp3⁺ (iTregs) [Bonnefoy, 2011; Coombes, 2007]; iv) puede modificar la respuesta inmune antitumoral al intervenir en la maduración y función de las DCs [Almand, 2000; Yoshimura, 2010]. Por lo tanto, el TGF- β 1 es capaz de conducir a las DCs hacia distintos fenotipos con funciones tolerogénicas o inmunogénicas [Belladonna, 2008; Geissmann, 1999; Henri, 2010].

1.5. Activación de las DCs

Las DCs pueden cambiar sus funciones efectoras dependiendo de su estado de maduración y de las señales de activación que reciben a partir de moléculas derivadas de microorganismos, citocinas y su ambiente celular. Las DCs también son activadas por células en proceso de muerte y moléculas presentes en células tanto del sistema inmune innato como adaptativo.

Las células del sistema inmune cuentan con una gran diversidad de receptores para responder ante diferentes patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), los cuales son moléculas microbianas altamente conservadas tanto en comensales como en patógenos (en cuyo caso se denominan PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos) [Sirard, 2007]. También se han descrito receptores que son capaces de reconocer señales de daño endógenas y se han denominado patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Muchos DAMPs son proteínas citosólicas que, cuando se liberan de la célula o se exponen en la superficie celular ante una lesión, se movilizan de un medio reductor a uno oxidativo; lo cual resulta en su desnaturalización. Otros ejemplos de DAMP son: el DNA de células tumorales que se libera al espacio extracelular como consecuencia de muerte celular; péptidos antimicrobianos, proteínas de choque térmico, BCL2, HMGB-1, LDL oxidadas, heparán sulfato, ácido hialurónico, fibronectina y metabolitos de la vía de las purinas (como el ATP, ácido úrico y adenosina) [Barber, 2011; Kool, 2011; Kumar, 2011; McDonald, 2010; Sirisinha, 2011].

El LL37 es un péptido antimicrobiano que se ha identificado como único miembro de la familia de las catelicidinas en el humano y es producido por diversas células, incluyendo neutrófilos, mastocitos, queratinocitos y células epiteliales [Mookherjee, 2006]. El LL37, al igual que otros péptidos antimicrobianos, lleva a cabo múltiples funciones además de la lisis directa de microorganismos, por ejemplo actuando como factor quimiotáctico de granulocitos, linfocitos y monocitos [Rivas, 2006]. Además, el LL37 puede unirse a los ácidos nucleicos endógenos y formar complejos estables. De manera interesante, se ha descrito que en enfermedades inflamatorias cutáneas (como psoriasis) los complejos de DNA o RNA con el péptido LL37 pueden activar a las pDC o cDC y, a su vez, esta activación puede ser crucial en la iniciación de las placas psoriáticas [Ganguly, 2009; Gilliet, 2008; Lande, 2007].

Se han identificado cuatro familias de sensores de patógenos: receptores tipo toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs) y receptores tipo AIM2 (ALRs) [Creagh, 2006; Unterholzner, 2010]. Los TLRs y NLRs forman parte de los llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen PAMPs.

Los NLRs, RLRs y ALRs participan en la inmunidad innata al detectar productos citosólicos de microorganismos intra- y/o extracelulares [Dostert, 2008; NIH-PA, 2008]. Ciertos NLRs llevan a cabo funciones específicas que dependen de la activación de señalización de TLRs, por ejemplo NOD1 y NOD2 producen pro-IL-1 β y pro-IL-18 a través de la activación de NF- κ B. Esto revela que se requiere de una interacción entre TLRs y NLRs para la producción de tales precursores de citocinas [Creagh, 2006; Sirard, 2007]. Los RLRs comparten con los NLRs la característica de poseer dominios de reclutamiento de caspasas (CARD); y presentan similitud con los TLRs en que detectan ácidos nucleicos virales, en la activación de señal de NF- κ B e IRF3 (miembro de la familia de factores reguladores de IFN) e inducción de genes que codifican IFN tipo I [Creagh, 2006; Sirén, 2006]. Los ALRs (como AIM2 e IFI16) son un tipo de receptores descritos recientemente, sus miembros pertenecen a la familia de proteínas PHYN y actúan como sensores de DNA citosólico; señalizan directamente para inducción de IFN- α/β y otros mediadores pro-inflamatorios [Goubau, 2010]. Es evidente que durante una RI innata existen interacciones entre las vías de señalización de las familias de receptores [Kawai, 2011].

Las DCs son los centinelas centrales del sistema inmune que inician respuestas tanto innatas como adaptativas. Para detectar patógenos y otras formas de daño las DCs están equipadas con variedad de PRRs, de entre los cuales el estudio de los TLRs ha cobrado un gran interés en años recientes [Kumar, 2009].

1.6. Receptores tipo Toll (TLRs)

Los TLRs son una familia de proteínas transmembranales de tipo I que reconocen PAMPs a través de sus dominios extracelulares con repeticiones ricas en leucina (LRRs). Su dominio intracitoplásmico presenta alta homología con el receptor de IL-1 por lo que se le denominó dominio Toll-IL-1 R (TIR), el cual se requiere para formar multímeros con moléculas adaptadoras que contienen TIR como MyD88, Mal (TIRAP), TRIF y TRAM [Creagh, 2006; Janeway, 2001].

Se han descrito 13 y 10 TLRs en ratón y en humano, respectivamente [Medzhitov, 2001]. Cada TLR tiene la capacidad de reconocer un número discreto de ligandos, presentes en bacterias, virus, hongos y protozoos. Los TLRs pueden clasificarse con base en la homología de su secuencia de aminoácidos, su localización celular, uso de moléculas adaptadoras o la naturaleza de sus ligandos específicos (figura 7).

Los TLR-7, 8 y 9 se agrupan juntos en la subfamilia de TLR-9 debido a que comparten alta similitud en su secuencia de aminoácidos, localización celular en endosomas, la necesidad de acidificación endosomal para la unión a ligando y relación estructural entre sus ligandos (ácidos nucleicos). La localización endosomal en DCs y el reconocimiento de ácidos nucleicos también es un atributo del TLR-3, sin embargo, presenta pobre homología de aminoácidos con respecto a la subfamilia TLR-9; por lo tanto, el TLR-3 es el único miembro de su grupo. Los miembros de la subfamilia de TLR-2 (TLR-1, 2 y 6) o TLR-4 ó 5 se localizan en la membrana extracelular y reconocen ligandos de TLR extracelulares. No obstante, se ha descrito que el TLR-2 es reclutado en fagosomas tras su activación; por lo que aún los TLRs unidos a la membrana celular pueden cambiar su distribución subcelular tras su estimulación [Hochrein cap7 en Handbook of DC 2006]

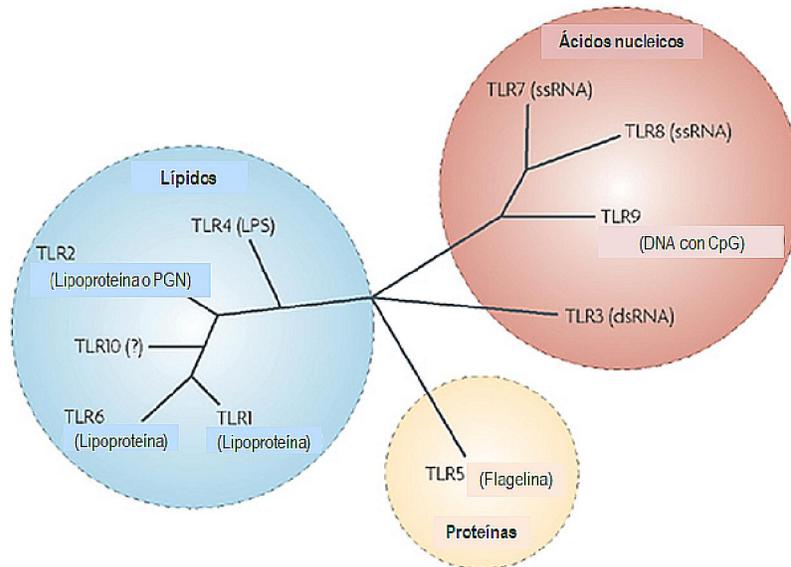


Figura 7. Familia de TLRs en humanos [Gilliet, 2008]

Algunos miembros de la familia de receptores tipo Toll son capaces de reconocer DAMPs, por ejemplo TLR-2 y TLR-4 reconocen gp96, hsp70 y HMGB-1 [Chen, 2010], otro ejemplo es TLR-9 que reconoce complejos del péptido LL37 con ácidos nucleicos [Lande, 2011].

En DCs de sangre periférica se ha detectado la expresión de distintos TLRs, no obstante, aún no se conoce la consecuencia de la unión de los distintos ligandos con sus receptores en la activación de estas células y cómo esto podría repercutir en la inducción de distintos tipos de RI e incluso con la inducción de TI. Además es posible que la expresión diferencial de los

receptores tipo Toll en las distintas poblaciones de DCs pueda llevar a distintas consecuencias en el control de la respuesta inmune [Brimmes, 2003; Gilliet 2008; Kadowaki, 2001; Lore, 2003; López, 2004; Phipps, 2008; Wong, 2009]. Finalmente es posible que la expresión del mismo TLR en dos células distintas pueda llevar a diferentes consecuencias funcionales. En la literatura se ha reportado la expresión diferencial de TLRs en cDC (TLR-1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8) y pDC (TLR-7 y 9) [Jarrossay, 2001; Kadowaki, 2001; Krug, 2001; Ito, 2002; McKenna, 2005; Seya, 2005; Negishi, 2006; Schmitz, 2007; Ueno, 2007; Benítez, 2008; Gilliet, 2008; Mancuso, 2009; Takeuchi, 2010], en donde se ha sugerido que por esta expresión diferencial las cDC podrían ser más efectivas en el control de bacterias y las pDC en respuesta a virus. Existen pocos reportes de la expresión de los TLRs en estas poblaciones celulares después de activación [Kawai, 2011; Latz, 2004; Hornung, 2002; Ito, 2002].

2. ANTECEDENTES DIRECTOS AL TRABAJO

En el laboratorio de Inmunología celular de la Unidad de Investigación Médica en Inmunquímica se ha identificado una tercera población linaje negativa en sangre periférica de humano. En la figura 8 se representa el fenotipo basal de esta población que se ha denominado “nDC”. Además de ser negativa para los marcadores de compromiso a linaje CD3, CD19, CD14 y CD56 (Lin-), la población nDC expresa altos niveles de CD123 pero bajos niveles de HLA-DR. Esta población tampoco expresa marcadores característicos de basófilos, eosinófilos, neutrófilos, monocitos o células progenitoras (como CD177, IL-5R, CD66, CD16 o CD34, respectivamente). Interesantemente, la población nDC tiene alta expresión de CD38 y CD13. En cuanto a los marcadores de DCs, las nDC poseen una expresión de BDCAs similar a las cDC pero bajos niveles de CD11c y es la población que más expresa CD11b en comparación con las pDC y cDC.

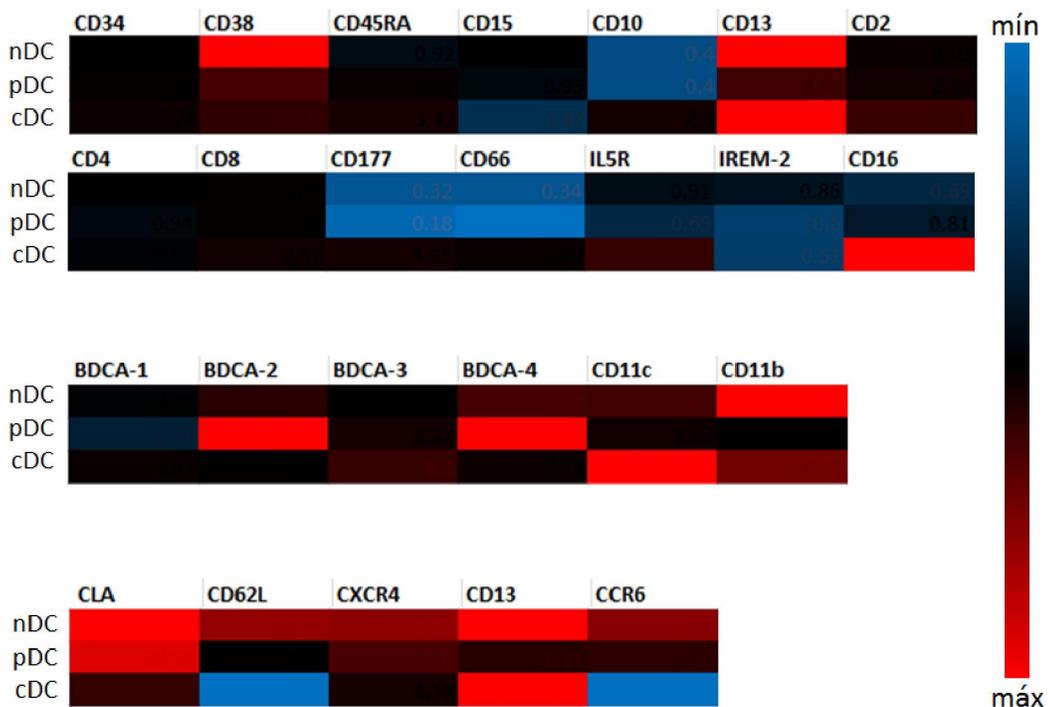


Figura 8. Fenotipo de la población nDC. Se representa en forma de mapa de colores la expresión de marcadores de linaje (parte superior), marcadores de DCs (parte media) y marcadores de migración (parte inferior). Los mapas se construyeron a partir de la relación de los valores de intensidad de fluorescencia con respecto al control de isotipo correspondiente.

Esta población celular tiene alta expresión de receptores de migración (como CD62L, CD13, CLA y CXCR4) y muestra una gran capacidad de movilización ante estímulos inflamatorios presentes en la piel en condiciones de inflamación [Castro, 2011; Torres, 2012]. La población nDC ha llamado nuestra atención porque está disminuida en la sangre periférica de pacientes con una enfermedad inflamatoria cutánea crónica como psoriasis [Mora, 2010].

En cuanto a su morfología, las nDC recién aisladas de SP son redondas y después de cultivo *in vitro* en presencia de IL-3 cambian y exhiben una marcada morfología alargada incluso a las pocas horas de cultivo (figura 9). Este cambio morfológico es más evidente e incluye formación de agregados celulares después de cultivar a las nDC en presencia de un coctel de citocinas (GM-CSF, IL-3 y FLT3).

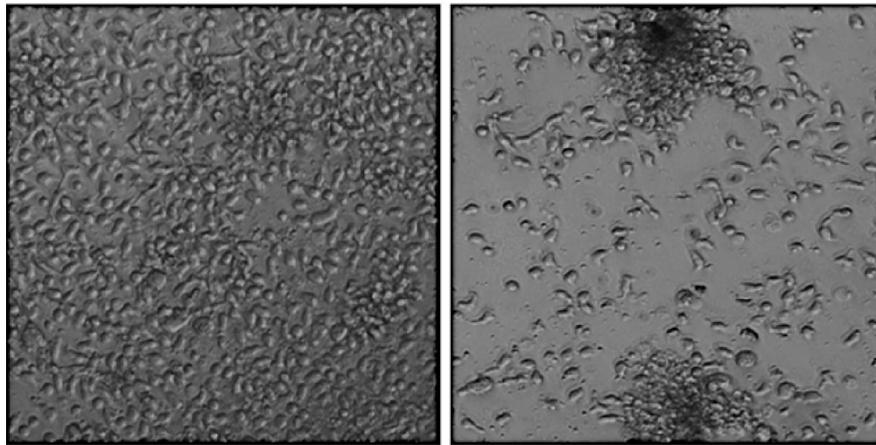


Figura 9. Cambios morfológicos en la población nDC después de cultivo. Las fotografías muestran como las nDC adquieren una forma de célula alargada después de cultivarse por 4 días en presencia de IL-3 (izquierda) o de un coctel de citocinas (derecha) [Mora, 2010].

En condiciones basales la población nDC expresa bajos niveles de moléculas coestimuladoras, no obstante expresa moléculas involucradas en el freno de la respuesta inmune como los ligandos del receptor de muerte PD-1.

De acuerdo con lo anterior, es posible que la población nDC de periferia se encuentre en un estado inmaduro y sea capaz de diferenciarse a DC ante estímulos como la IL-3, así como de responder a diferentes estímulos de maduración tanto exógenos (virales) como endógenos por una vía TLR dependiente.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La población nDC (CD123⁺/HLA-DR^{lo}), aún no descrita en la literatura, es capaz de adquirir tanto morfología como fenotipo de célula dendrítica al ser cultivada *in vitro* en presencia de IL-3, GM-CSF y FLT3. El perfil de marcadores que expresa tanto en estado de reposo como activado muestra un fenotipo combinado entre las poblaciones de DCs presentes en la sangre periférica (cDC y pDC). Sin embargo, se desconoce si esta población expresa TLRs y, en el caso de que así sea, cuál sería la consecuencia funcional de la activación a través de estos receptores. De esta manera, resulta importante determinar si la población nDC expresa TLRs y si existen diferencias en el patrón de expresión de estos receptores con respecto a las subpoblaciones cDC y pDC en condiciones basales y después de estimulación. También resulta necesario conocer si la población nDC puede activarse por señales de daño endógenas y cuáles serían las consecuencias funcionales de esta activación en cuanto a la expresión de receptores de superficie y de citocinas pro- o anti-inflamatorias.

4. HIPÓTESIS

- La población denominada nDC expresa receptores tipo Toll y, a través de éstos, puede responder tanto a señales exógenas (virus) como a señales de daño endógenas.

5. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de TLRs en la población nDC, así como evaluar la activación de estas células en respuesta a señales exógenas (virus) y señales de daño endógenas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar a las poblaciones de células Lin⁻ (cDC, pDC y nDC) a partir de SP.
- Determinar el perfil de expresión de los 10 TLRs de las poblaciones Lin⁻ en condiciones basales.
- Confirmar la expresión de transcrito de los TLRs mediante la expresión de la proteína en condiciones basales y bajo estímulo con ligandos de TLRs.
- Determinar las consecuencias funcionales de la activación de las células Lin⁻ a través de TLRs ante estímulos exógenos o endógenos.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Muestras de sangre periférica

Para la obtención de células mononucleares se utilizaron concentrados leucocitarios de sangre periférica (SP) de sujetos sanos (negativos para VIH, VHC, VHB y Chagas) obtenidos del Banco de Sangre Central del Centro Médico Nacional s. XXI.

7.2. Obtención de Células Mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Se partió de un volumen inicial entre 45 y 70 mL de sangre y se diluyó 1:1 con solución buffer de fosfatos (PBS 1X) para obtener las células mononucleares por medio de un gradiente de densidad con Ficoll (Lymphoprep): se centrifugó a 700 g durante 30 min y se colectaron las PBMCs de la interfase Ficoll-plasma, a continuación se sometieron a tres lavados con PBS 1X y centrifugación por 10 min (dos a 400 g y el otro a 90 g); finalmente el botón celular se resuspendió en PBS 1X.

7.3. Conteo de PBMCs

Se tomó una pequeña alícuota de la suspensión celular obtenida y se hizo una dilución 1:10 con azul de tripano (colorante vital), de ésta dilución se tomó nuevamente una alícuota de 10 μ L y se colocó en la cámara de Neubauer para realizar el conteo de células en el microscopio.

7.4. Análisis de Marcadores de Superficie y expresión de TLRs mediante citometría de flujo.

Se realizaron tinciones de inmunofluorescencia para analizar las distintas subpoblaciones de células dendríticas (DCs) presentes en SP a partir de PBMCs; los marcadores empleados fueron: CD14, CD56, CD3 y CD19 como marcadores específicos de linajes diferentes a las DCs (monocitos, células NK y linfocitos T y B, respectivamente); además de HLA-DR, CD123, M-DC8 y BDCA-1 (para identificar las poblaciones de cDC, pDC y nDC) y TLR-1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 (para identificar la expresión basal de TLRs de superficie e intracelulares). El análisis de las células se realizó por citometría de flujo de 7 colores, utilizando un citómetro BD FACS Aria; los datos de citometría de flujo se analizaron con el software FlowJo (Tree Star Inc.). En el anexo K se describen los detalles técnicos.

En las tinciones de inmunofluorescencia se incluyeron controles negativos de tinción denominados FMO (del inglés “fluorescence minus one”) y se compararon con los controles de isotipo respectivos para cada anticuerpo y fluorocromo. Los FMO son útiles para delimitar poblaciones y analizar marcadores que se expresan en bajos niveles, sobre todo para comparar el comportamiento de las poblaciones celulares de interés con respecto a algún marcador intracelular cuya expresión resulta difícil de definir.

7.5. Aislamiento de distintas poblaciones linaje negativas a partir de sangre periférica

Las PBMCs se tiñeron con anticuerpos monoclonales para linaje conjugados con PE y se sometieron a un proceso de enriquecimiento con perlas magnéticas anti-PE (Anti-PE Microbeads, MACS Miltenyi Biotec) a 4 °C utilizando columnas LD (MACS Miltenyi Biotec). Posteriormente, las células Lin⁻ enriquecidas se lavaron una vez con solución MACS por 10 min a 300 g y se tiñó con anticuerpos para HLA-DR APC-Cy7 y CD123 PE-Cy5; el paquete celular se lavó una vez más, se resuspendió en solución FACS (a una concentración de 5 x10⁶ células por mL) y se realizó la separación de las diferentes poblaciones Lin⁻ en un citómetro de flujo BD FACSAria, el cual es capaz de separar a la vez hasta cuatro poblaciones distintas, con un alto grado de eficiencia y pureza (>95%).

Por un lado, las poblaciones Lin⁻ aisladas se colectaron en medio RPMI suplementado y se centrifugaron a 400 g por 5 min; el botón celular se lavó con PBS 1X y se agregó buffer de lisis (buffer RLT, RNeasy Microkit de QIAGEN) para la posterior extracción de RNA y análisis de la expresión de TLRs mediante RT-PCR. Por otro lado, se colectaron más células de las poblaciones Lin⁻ aisladas para su estimulación *in vitro* con diferentes ligandos de TLRs.

7.6. Cultivo celular

Las células aisladas se cultivaron en una placa de 96 pozos (para el caso de PBMCs se cultivaron en placa de 24 pozos) a 37 °C durante 18-70 h bajo una atmósfera de CO₂ al 5 % en medio RPMI suplementado en presencia de IL-3 y ligandos de TLR-2 (LTA), TLR-4 (LPS), TLR-7 (CL264), TLR-8 (ORN02), TLR-9 (ODN 2216), complejo LL37-DNA o virus de influenza A/H3N2/2008 inactivado por calor. La preparación del complejo del péptido LL37 con DNA se detalla en el anexo N.

Concluido el tiempo de cultivo, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se congelaron a -70 °C para la posterior determinación de proteínas (anexo O). Los pozos se lavaron con

solución FACS y se colectaron las células para la tinción de inmunofluorescencia correspondiente.

Se evaluaron los cambios en la expresión de marcadores relacionados con la maduración y/o activación de las DCs tales como HLA-DR *de novo*, CD40, CD80, CD86 y B7-H1; así como la expresión de TLRs de superficie e intracelulares.

7.7. Extracción de RNA

Se utilizó un kit comercial (RNeasy Microkit de QIAGEN) y se realizó la extracción de RNA con columna de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. El botón celular se resuspendió en buffer de lisis, se favoreció la lisis por pipeteo repetido y se mezcló con vórtex por ~1 min; según aplicó el caso la mezcla se congeló a -70 °C, o bien, se continuó con la extracción de RNA. Se utilizaron entre 14 y 18 µL de agua libre de RNasas para eluir el RNA de la columna. El RNA se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND-2000, Thermo Fisher Scientific Inc.) y se obtuvieron las relaciones A260/A280 y A260/A230 para verificar pureza del RNA extraído. Si la cantidad de RNA lo permitía, se corrió un gel de agarosa al 2 % para corroborar la calidad del RNA (que no estuviera degradado).

7.8. RT-PCR

El RNA obtenido se retrotranscribió con un kit comercial (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems). El cDNA se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND-2000, Thermo Fisher Scientific Inc.), se amplificó para un gen constitutivo (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa, GAPDH) y a la par se metieron controles de RNA sin retrotranscribir para, en su caso, detectar contaminación de DNA genómico (ya que los primers para GAPDH están diseñados sobre más de un exón). Posteriormente, se corrieron las reacciones de PCR para los 10 genes de TLRs humanos. Los detalles técnicos se describen en el anexo L.

Las condiciones de PCR para la amplificación de los genes en estudio, se estandarizaron utilizando GelRed como colorante para visualizar los productos de reacción en geles de agarosa, debido a que tiene una mayor sensibilidad de detección con respecto al BrEt y posee menor toxicidad. Las PBMCs resultaron útiles como controles positivos para el análisis del transcrito de TLRs en las poblaciones celulares estudiadas.

8. RESULTADOS

8.1. Aislamiento de poblaciones a partir de sangre periférica.

A partir de concentrados leucocitarios de individuos sanos, se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica y se aislaron las poblaciones de células linaje negativas (Lin-) con base en la expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II (HLA-DR) y CD123. De esta manera, como se observa en la figura 10, se identificaron a las tres poblaciones de interés para este estudio: las cDC, pDC y nDC. Las cDC muestran una expresión alta de HLA-DR y baja de CD123; las pDC muestran una alta expresión de CD123 y HLA-DR. La población nDC se identificó por su alta expresión de CD123 y baja expresión de HLA-DR.

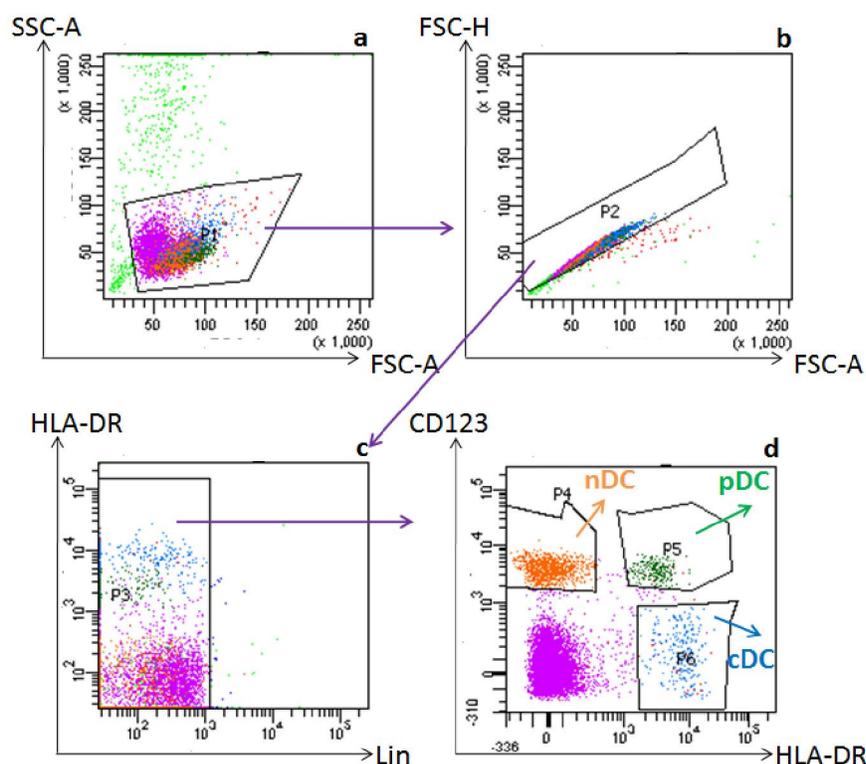


Figura 10. Separación de poblaciones de células Lin-. Se muestra un esquema representativo de los criterios de elección para aislar a las poblaciones de interés. A partir de la región P1 de células (plot a) se eligieron eventos individuales P2 (plot b), después se seleccionó la región P3 de células Lin- (plot c) y finalmente se delimitaron las regiones de poblaciones nDC, pDC y cDC.

Las tres poblaciones celulares se separaron de acuerdo a los criterios mencionados utilizando un citómetro de flujo BD FACS Aria. La pureza obtenida en general en los distintos experimentos realizados fue de 99.3% para las cDC, 95.6% para las pDC y 97.3 % para las nDC (figura 11).

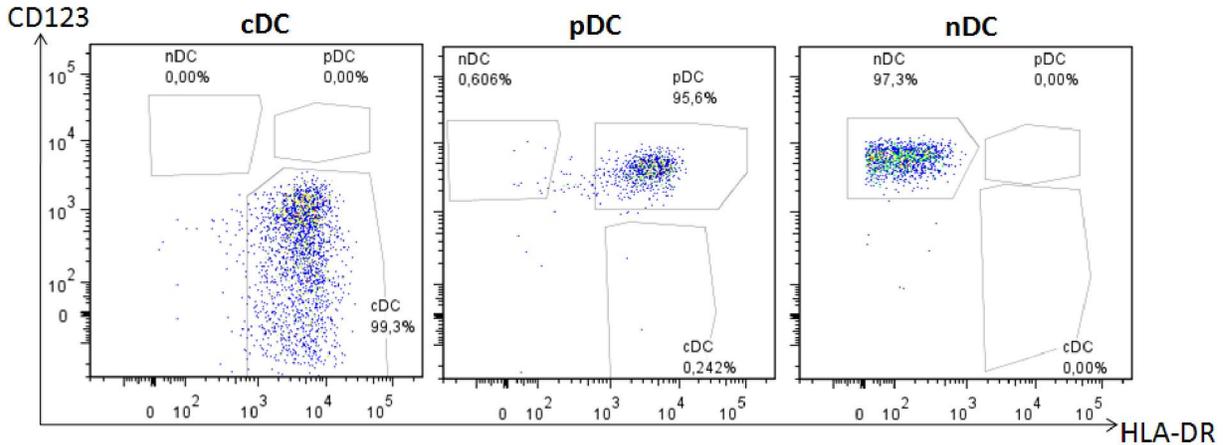


Figura 11. Pureza de poblaciones de células Lin- aisladas. Gráficas representativas de las regiones correspondientes a las poblaciones cDC, pDC y nDC en un plot de CD123 vs HLA-DR (purezas >95%).

A partir de las células aisladas, se extrajo el RNA para realizar RT-PCR y se determinó la expresión de transcrito de los diez TLRs descritos en humano en cada una de las poblaciones.

8.2. Expresión de transcrito de los TLRs.

Las condiciones de amplificación de los diez TLRs evaluados se establecieron utilizando cDNA de PBMCs totales (células obtenidas del mismo concentrado leucocitario de las que posteriormente se purificaron las poblaciones Lin-). El tamaño en pares de bases (pb) de los productos de PCR fueron: TLR-1 890, TLR-2 615, TLR-3 320, TLR-4 167, TLR-5 446, TLR-6 1108, TLR-7 545, TLR-8 637, TLR-9 332, TLR-10 659 y GAPDH 339.

En las PBMCs se detectaron los transcritos de RNAm de los diez TLRs (figura 12 A y B).

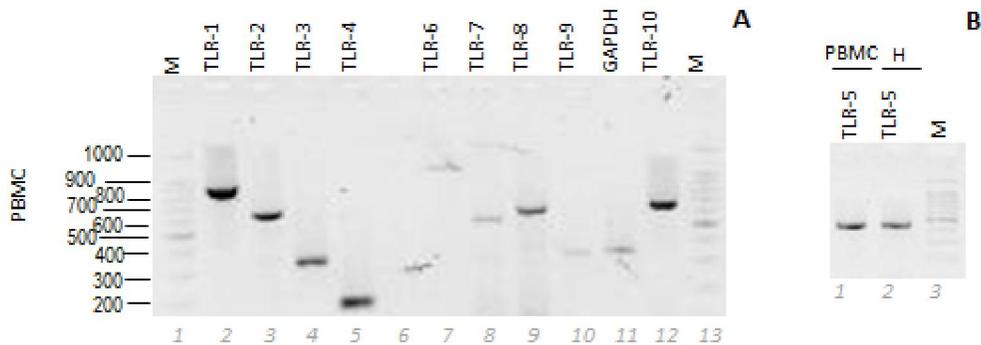


Figura 12. Expresión basal de transcrito de TLRs 1-10 en PBMCs. Se muestran los productos de PCR de los TLRs y GAPDH. El carril 2 del gel B corresponde al producto de PCR de células HEK293 que expresan TLR-5 de manera constitutiva. Los geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed se corrieron a 60V por 30min y 75V por 1h. El núm. de carril se indica en la parte inferior de cada imagen.

Podemos afirmar que las cDC expresaron RNAm de todos los receptores tipo Toll (A, B y C de la figura 13). En esta población celular el amplicón de TLR-6 logró detectarse partiendo del doble de cantidad de cDNA en comparación con el resto de los otros TLRs (carril 2 de 13E).

Las pDC expresaron el transcrito de TLR-1, 7, 9 y 10 (D y E de la figura 13). La banda tenue del amplicón de TLR-8 que se observó en el carril 9 de la figura 13D probablemente fue un falso positivo, ya que cuando se repitió la PCR de este transcrito partiendo de cuatro veces la cantidad de cDNA (carril 2 de la figura 13E) o corriendo mayor número – 38 – de ciclos de PCR, no se detectó banda alguna.

Para la población nDC se observó la expresión del transcrito de TLR-2, 4, 7 y 9 (F, G y H de la figura 13). En las nDC el amplicón de TLR-2 se logró detectar partiendo del doble de cantidad de cDNA (carril 3 de la figura 13G), y el amplicón de TLR-7 se detectó corriendo mayor número – 38 – de ciclos de PCR (carril 3 de la figura 13H).

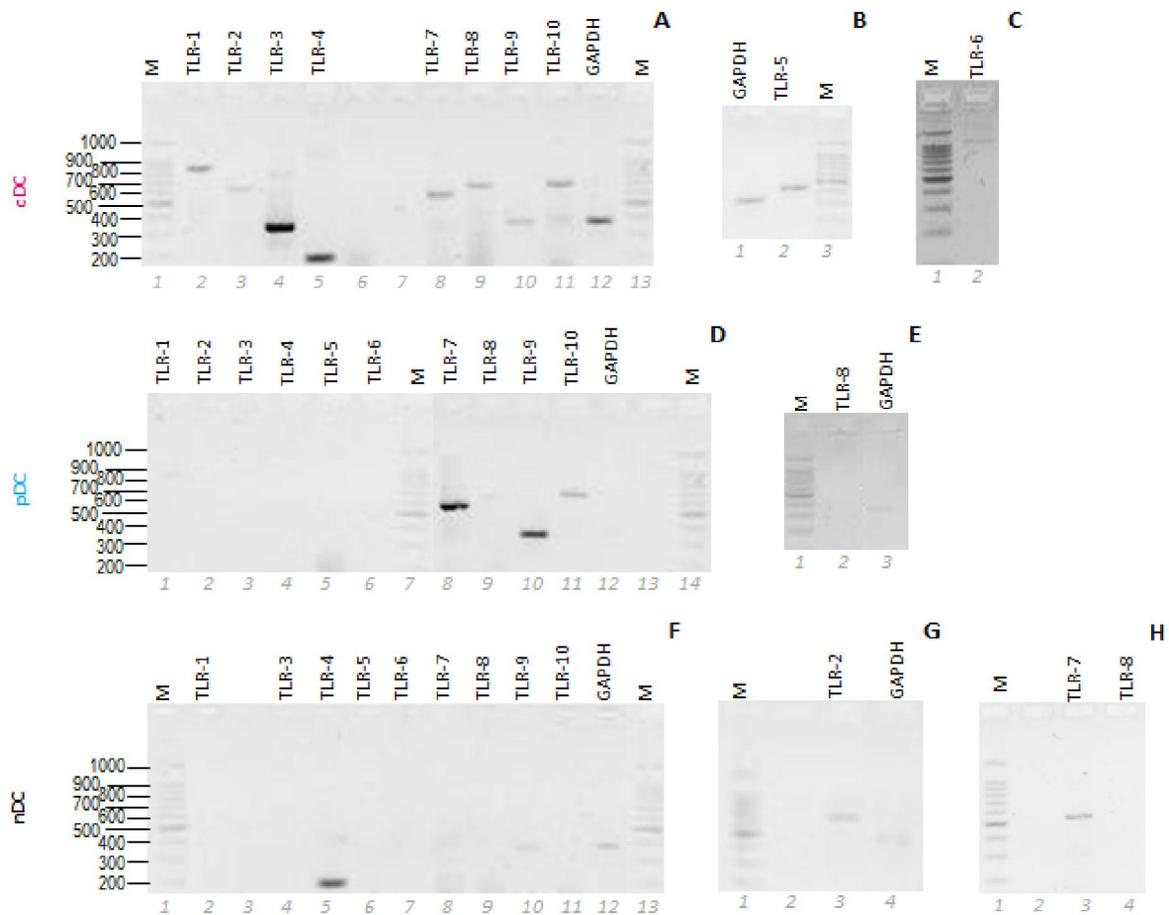


Figura 13. La población nDC expresa el transcrito de TLR-2, 4, 7 y 9. Se muestra el perfil de expresión basal de TLRs 1-10 a nivel de transcrito en las poblaciones Lin- aisladas: cDC (A, B y C), pDC (D y E) y nDC (F, G y H). Los geles de agarosa al 2% teñidos con GelRed se corrieron a 60V por 30min y 75V por 1h. El núm. de carril se indica en la parte inferior de cada imagen.

La tabla 1 resume los resultados cualitativos obtenidos de la expresión de transcrito de los TLRs en las poblaciones estudiadas.

TLR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pDC	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
nDC	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-

Tabla 1. Expresión basal de transcrito de TLRs 1-10 en las poblaciones Lin-. El signo + indica expresión positiva y el signo - indica expresión negativa.

8.3. Expresión a nivel de proteína de los TLRs en poblaciones Lin- en estado basal.

Posteriormente, se evaluó si la expresión de transcrito de los TLRs se reflejaba a nivel de proteína en las distintas poblaciones Lin- mediante citometría de flujo. Inicialmente, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia en PBMCs totales para determinar la expresión de los TLRs 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 (de superficie e intracelulares).

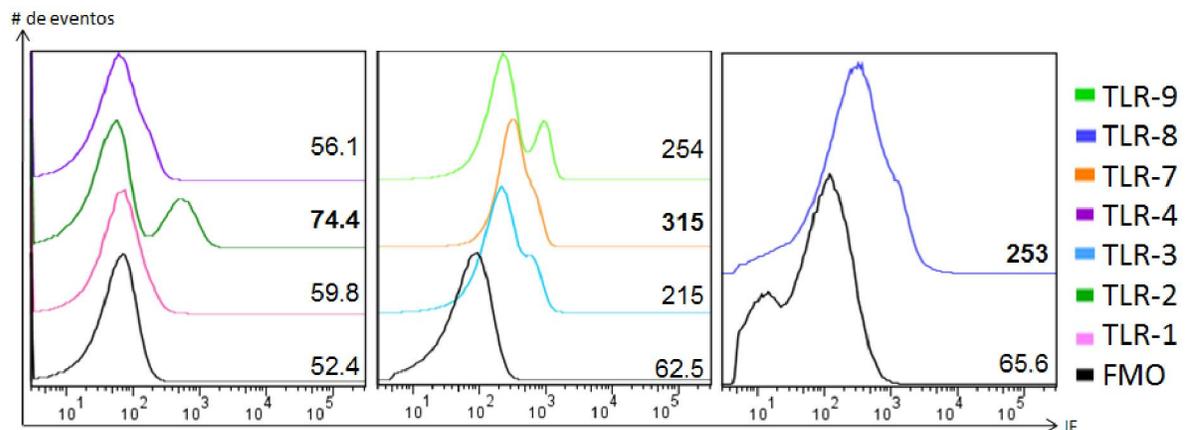


Figura 14. Expresión de TLRs a nivel de proteína en PBMCs. Los histogramas mostrados son representativos de 6 experimentos independientes. Los valores de la media geométrica de intensidad de fluorescencia (MGIF) se indican en el extremo derecho de cada histograma. FMO: control *fluorescence minus one*.

En las PBMCs se detectó expresión de todos los TLRs evaluados (figura 14) y se observó claramente la presencia de una población minoritaria que expresa altos niveles de TLR-2, así como de TLR-9. Las PBMCs en conjunto expresaron mayores niveles de TLRs intracelulares (3, 7, 8 y 9) que de TLRs de superficie (1, 2 y 4).

El análisis de la expresión de los TLRs en las poblaciones cDC, pDC y nDC se realizó de la misma manera en que se separaron a las poblaciones celulares, es decir, identificándolas a partir de células Lin- y utilizando los marcadores HLA-DR y CD123 (figura 15).

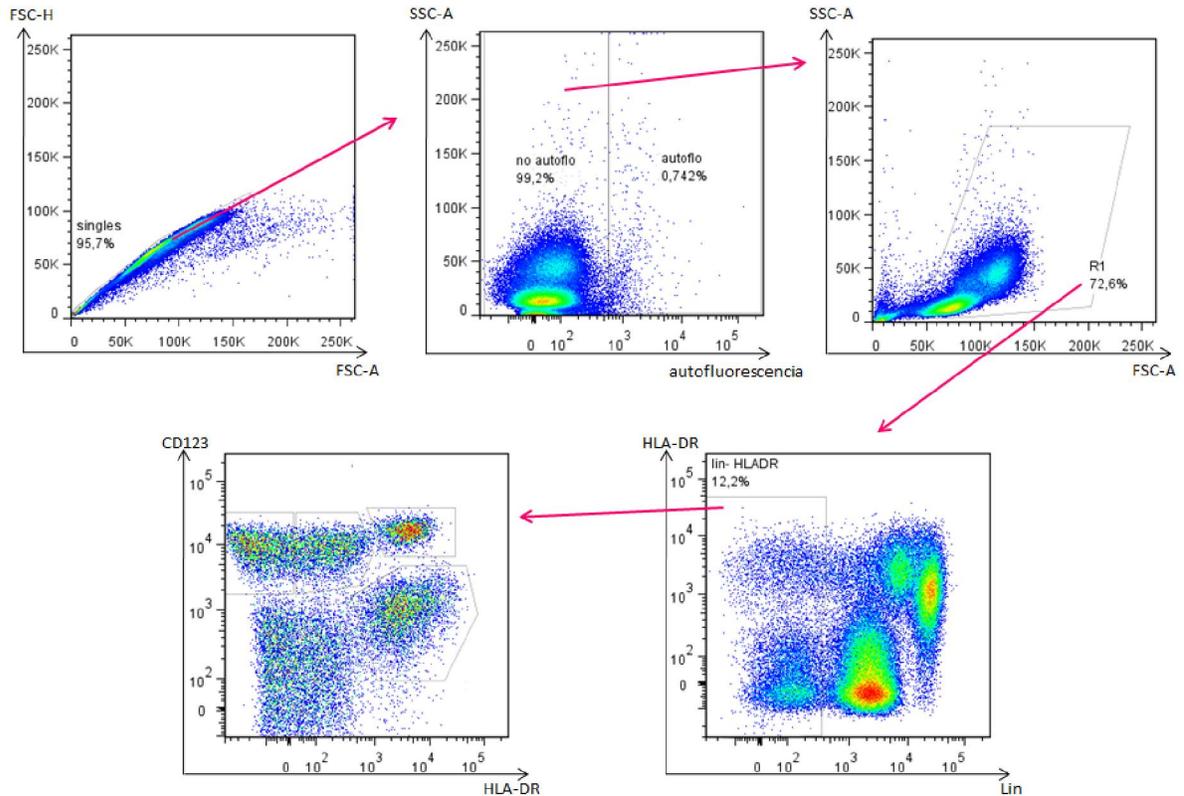


Figura 15. Identificación de las poblaciones celulares Lin-. Se muestra un esquema representativo de los criterios de elección para las poblaciones nDC, pDC y cDC. A partir de una región de eventos individuales se eliminó autofluorescencia celular, después se seleccionó la región correspondiente a morfología de DC y se eligieron células Lin-; por último, se delimitaron las regiones de las poblaciones de interés con respecto a los marcadores CD123 y HLA-DR.

Los resultados de la expresión basal de TLRs en las tres poblaciones Lin- se representaron gráficamente como un mapa de colores a partir de los datos de citometría (los cuales se muestran en la figura suplementaria I). Para construir este mapa se utilizó la relación de la media geométrica de intensidad de fluorescencia de los marcadores con respecto al control de isotipo.



Figura 16. La población nDC expresa TLRs tanto de superficie como intracelulares a nivel de proteína. Se muestra la expresión basal de TLRs a nivel de proteína en las tres poblaciones Lin⁻. El mapa de colores se construyó en la plataforma de Microsoft Office Excel, a partir de los valores de la MGIF de cada marcador con respecto al control de isotipo.

Como se observa en la figura 16, las cDC expresaron bajos niveles de TLR-1 y de TLR-4 y son la población que más expresó TLR-2. En las pDC, el TLR-1 – aunque en niveles discretos - es el único TLR de superficie evaluado que se expresó de manera basal. Las nDC no expresaron TLR-1 pero sí TLR-2 aunque en menores niveles con respecto a las cDC; sucede lo contrario a esto con el TLR-4, ya que la población nDC expresó mayores niveles de TLR-4 que las cDC.

En cuanto a la expresión de TLRs intracelulares, las cDC son las únicas en las que se detectó expresión de TLR-3; también expresaron TLR-7 en niveles similares a los de las pDC, así como TLR-8 y TLR-9. Las pDC expresaron TLR-7 y 8 y fueron la población que más expresó TLR-9. En la población nDC se observó expresión de TLR-7 y TLR-9 aunque menor comparada con las otras poblaciones, y fue la población en la que se observó mayor expresión del TLR-8.

Contrastando la expresión de TLRs a nivel de transcrito y proteína: los resultados obtenidos de RT-PCR coinciden con lo observado por citometría de flujo, con excepción del TLR-8, lo cual se discutirá más adelante.

8.4. Expresión de TLRs en las poblaciones Lin⁻ después de su cultivo *in vitro*.

Posteriormente se determinó la expresión de los TLRs a nivel de proteína después de cultivar PBMCs totales durante 18-20 h con IL-3 sola o en combinación con distintos ligandos de TLRs: ligando de TLR-4 (lipopolisacárido, LPS), ligando de TLR-2 (ácido lipoteicoico, LTA), ligando de TLR-7 (CL264), ligando de TLR-9 (ODN2216) o el virus de la influenza inactivado (A/H3N2/2008).

La expresión de TLR-1, 2 y 4 en la población cDC se mantuvo después del cultivo *in vitro*. En las pDC tampoco se observaron diferencias sustanciales en la expresión de dichos TLRs después de cultivarlas *in vitro*. En contraste, en la población nDC se detectaron cambios marcados en la expresión de los TLRs de superficie después del cultivo *in vitro*, ya que, expresaron TLR-1 en presencia de LPS e IL-3 e incrementaron la expresión de TLR-2 y 4 después de ser cultivadas en presencia de los ligandos para ambos receptores (LTA y/o LPS) e IL-3 (columna derecha de la figura suplementaria II).

En cuanto a los TLRs intracelulares, observamos que ninguna de las tres poblaciones estudiadas presentaron cambios sustanciales en la expresión de TLR-3 y TLR-7 después de cultivarlas *in vitro*. Tampoco hubo cambios importantes en la expresión de TLR-8 y TLR-9 en las cDC ni en las pDC. En contraste, se observó que las nDC incrementaron la expresión de TLR-8 después de cultivarlas con IL-3 sola o en combinación con ligandos de TLR; siendo IL-3 más virus de influenza la condición de cultivo en la que se detectó el mayor incremento de dicho TLR. La población nDC también tuvo incremento en la expresión de TLR-9 después del cultivo *in vitro*, con la IL-3 sola o en presencia de CL264 o virus (extremo derecho de la tercera y cuarta fila de la figura suplementaria III).

La expresión de TLRs en las tres poblaciones Lin- después del cultivo *in vitro* se representó gráficamente como mapas de colores (figura 17) a partir de los datos obtenidos por citometría de flujo (figuras suplementarias II y III).

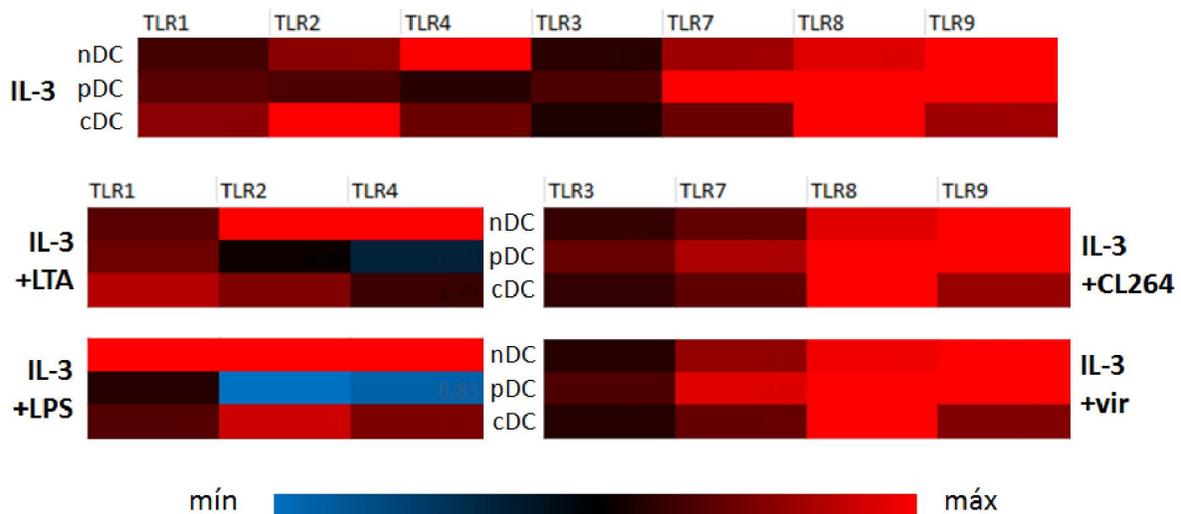


Figura 17. La población nDC incrementa la expresión de TLR-2, 4 y 8 después de su cultivo *in vitro*. Se muestran los mapas de colores construidos en la plataforma de Microsoft Office Excel a partir de los valores de la MGIF de cada marcador con respecto al control de isotipo en las tres poblaciones Lin- después de cultivo *in vitro*.

En resumen, las cDC y pDC mantienen la expresión de sus TLRs después del cultivo *in vitro*. A diferencia de estas dos subpoblaciones de DCs, la población nDC es capaz de expresar TLR-1 e incrementar la expresión de TLR-2 y 4 (al estimularse con ligandos de TLR-2 y 4 e IL-3), así como de TLR-8 y 9 (al estimularse con ligandos de TLR-7/8 e IL-3).

8.5. Evaluación funcional de receptores de la subfamilia de TLR-9 en las poblaciones Lin-.

Si bien la población nDC expresa tanto TLRs de superficie como intracelulares este trabajo se enfocó en el estudio de la consecuencia funcional de la activación a través de los TLRs de la subfamilia de TLR-9; para lo cual se analizaron los cambios morfológicos así como la expresión de marcadores de superficie y producción de citocinas en la población nDC en comparación con las otras poblaciones Lin- de sangre periférica. Para ello, las poblaciones de interés se separaron por citometría de flujo siguiendo los criterios mencionados en la figura 8. Posteriormente, se cultivaron en presencia o ausencia de IL-3 y distintos ligandos de los receptores tipo Toll; se utilizaron ligandos tanto sintéticos como naturales para los distintos TLRs intracelulares. El virus de influenza se utilizó como una fuente de PAMPs capaz de ser reconocido por TLR-7/8. También se utilizó el complejo formado por el péptido antimicrobiano LL37 con DNA genómico fragmentado, ya que puede actuar como señal de daño endógeno (DAMP) al ser reconocido por TLR-9 ^[Gilliet, 2008; Lande, 2007; Lande, 2011].

8.5.1. Características morfológicas de las poblaciones Lin- aisladas y después de cultivo *in vitro*.

Una característica de las células dendríticas es su capacidad de cambiar morfológicamente y formar agregados celulares cuando son cultivadas *in vitro*. De esta manera, las poblaciones Lin- aisladas se cultivaron con distintos ligandos de TLRs en presencia o ausencia de IL-3 y se observaron al microscopio para evaluar sus características morfológicas.

Las cDC mostraron cambios morfológicos y formación de agregados celulares. Estos agregados se distinguieron marcadamente desde las 18 h después de cultivo con el virus en presencia de IL-3 (extremo superior derecho de la figura 18). Después de cultivo durante 45 - 70 h se observaron agregados celulares más evidentes en presencia de IL-3 y CL264 o el complejo de LL37-DNA (extremo superior izquierdo de la figura 19 ó 20, respectivamente).

Por otro lado, las pDC también formaron agregados celulares desde las 18 h después de cultivo en presencia de IL-3 sola o en combinación con el virus (fila central de la figura 18). Después de estimular a las pDC con IL-3 y virus o LL37-DNA por más tiempo (45-70 h) la formación de agregados de pDC fue aún más evidente, ya que éstos se observaron de mayor tamaño (extremo superior derecho de la figura 19 y fila central de la figura 20). En todos los cultivos la población pDC fue homogénea en cuanto a que se observaron células redondas en un inicio que posteriormente formaron agregados celulares.

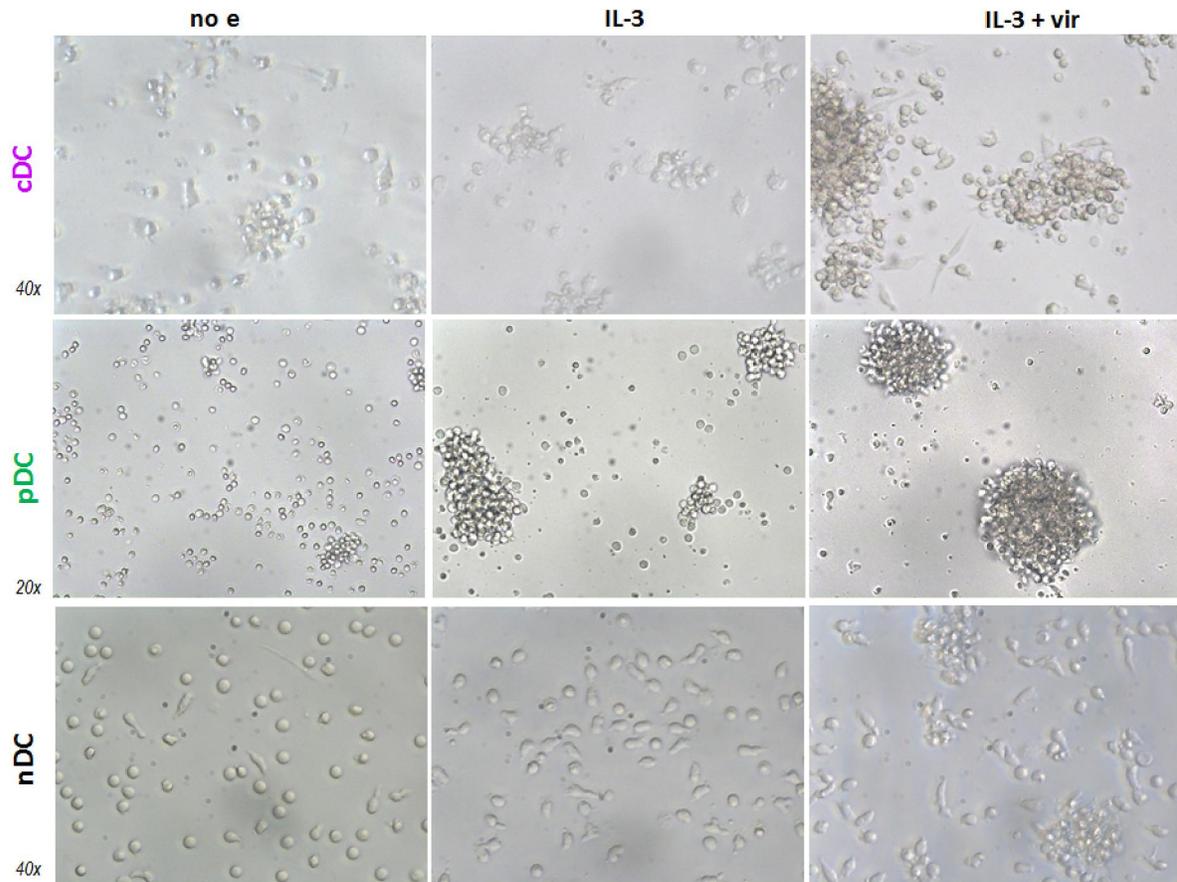


Figura 18. Las nDC presentan morfología alargada al cultivarse en presencia de IL-3 y forma agregados al estimularse con virus e IL-3. Se muestran los cambios morfológicos de las cDC, pDC y nDC después de cultivarlas por 18-20 h (las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes). El aumento al que fueron capturadas las fotografías se indica en el extremo izquierdo de cada fila. Se utilizó un microscopio de transmisión de luz invertido (Axiovert 200M de Carl Zeiss).

Las nDC mostraron cambios morfológicos después de su cultivo *in vitro* incluso únicamente con IL-3. Tal como puede apreciarse en la fila inferior de la figura 18, se distinguieron claramente dos subpoblaciones de nDC: una con morfología redonda y otra que es alargada, la cual predomina en presencia de IL-3.

El mayor cambio observado en la población nDC en cuanto a morfología y presencia de agregados celulares se presentó al cultivarla con IL-3 en combinación con el virus (extremo inferior derecho de la figura 18). Estos agregados se identificaron de manera más clara a mayor tiempo de cultivo (fila central de la figura 19, extremo inferior derecho de la figura 20 y columna derecha de la figura suplementaria IV).

En contraste, después de estimular a las nDC sólo con ligandos de TLRs (como CL264 o virus) observamos que la gran mayoría de las células permanecieron redondas (fila inferior de la figura 19) y no formaron agregados excepto cuando el estímulo fue ODN (extremo inferior central de la figura 19).

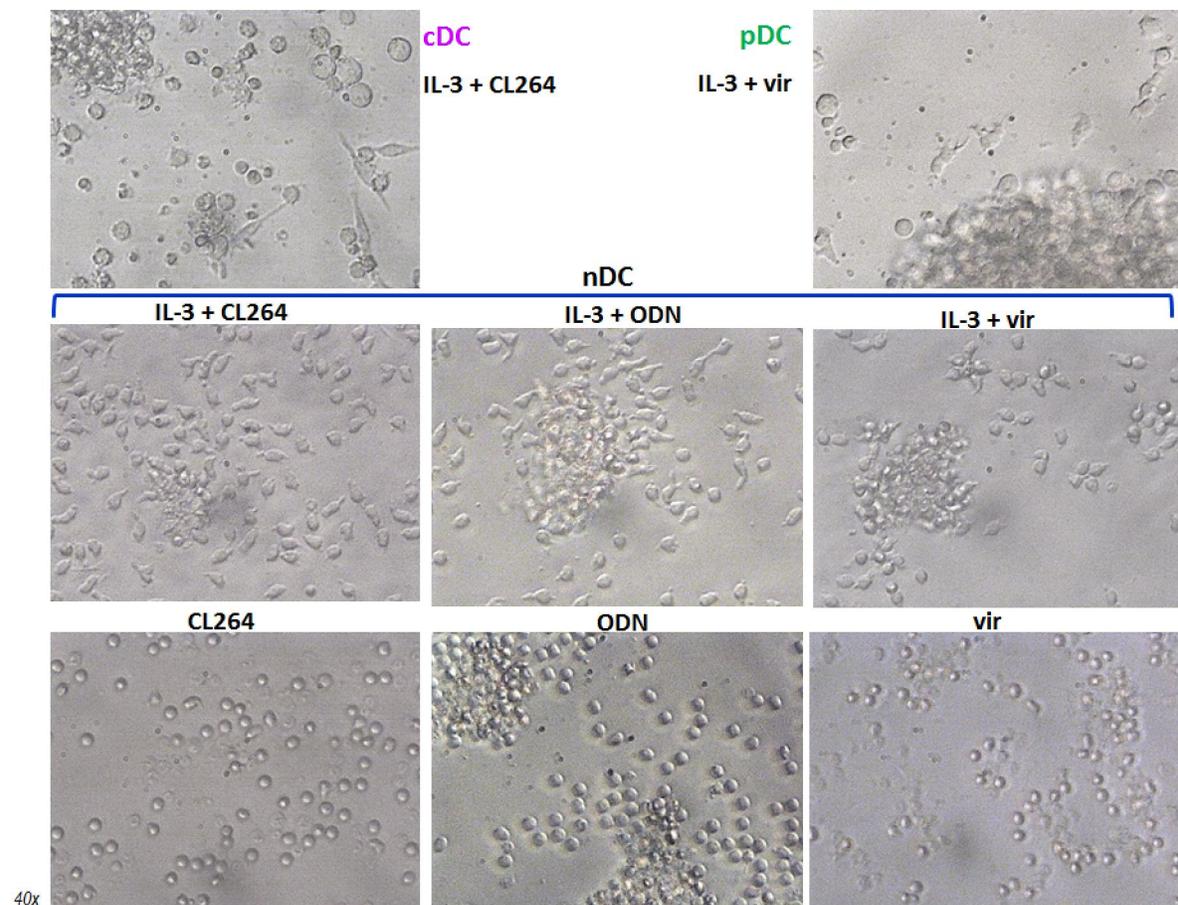


Figura 19. La población nDC presenta cambios morfológicos y forma agregados celulares después de estimularse con IL-3 y ligandos de TLRs. Se muestran los cambios morfológicos de las cDC, pDC y nDC después de cultivarlas por 45 h. El aumento al que fueron capturadas las imágenes se indica en el extremo inferior izquierdo (fotografías representativas de dos a tres experimentos independientes). Se utilizó un microscopio de transmisión de luz invertido (Axiovert 200M de Carl Zeiss).

En presencia del complejo LL37-DNA en combinación con IL-3 (extremo inferior izquierdo de la figura 20), las nDC mostraron cambios en su morfología similares a los observados por el cultivo únicamente con IL-3 (extremo inferior central de la figura 18).

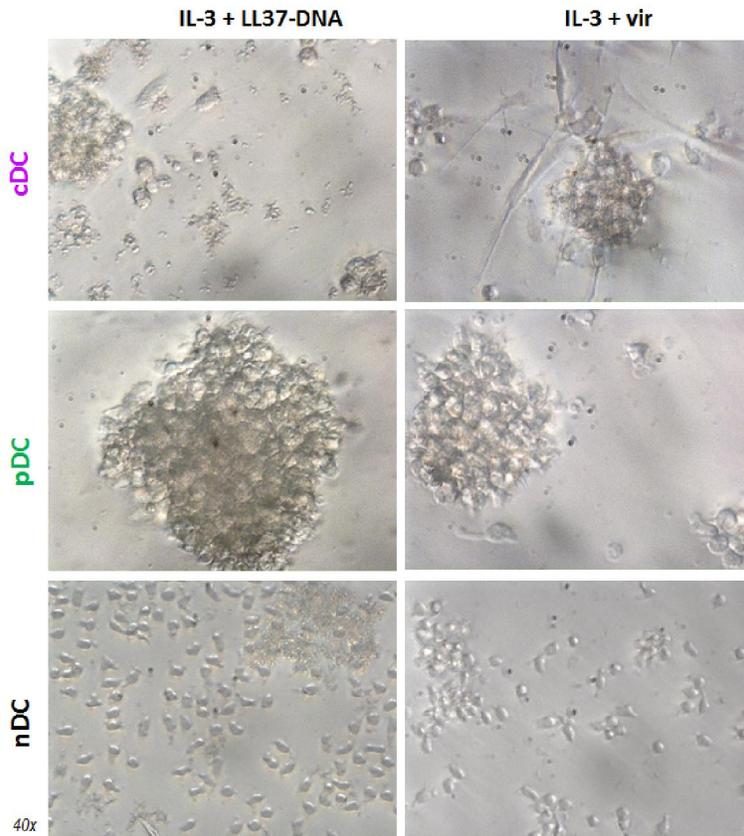


Figura 20. La población nDC presenta cambios morfológicos y después de estimularse con IL-3 y LL37DNA. Se muestran los cambios morfológicos de las cDC, pDC y nDC después de cultivarlas por 70 h. El aumento al que fueron capturadas las imágenes se indica en el extremo inferior izquierdo (fotografías representativas de uno a tres experimentos independientes). Se utilizó un microscopio de transmisión de luz invertido (Axiovert 200M de Carl Zeiss).

8.5.2. Expresión de marcadores de activación o inhibición y producción de citocinas en las poblaciones Lin-.

Con el fin de determinar si los cambios morfológicos y la formación de agregados celulares observados en los cultivos de las distintas poblaciones Lin- y en particular en las nDC correlacionaban con la expresión de marcadores de activación o inhibición, se evaluó mediante citometría de flujo la expresión de HLA-DR, CD86, CD40, PD-L1 y PD-L2 en las tres poblaciones Lin- después del cultivo *in vitro* bajo distintas condiciones.

En la figura 21 se muestra la expresión de CD86 y PD-L2 después del cultivo con IL-3 y ligandos naturales de TLR-7/8 ó 9. Se observa que la expresión de CD86 tuvo un incremento

discreto en la población nDC aislada después de activarla con IL-3 en combinación con el virus o el complejo de LL37-DNA. Las células se estimularon solamente con el complejo ya que previamente se determinó que el DNA o el péptido no son capaces de activar a ninguna de las poblaciones en estudio (ver inciso N de la sección Anexos). Los niveles de expresión de CD86 en las nDC fueron similares a los de las pDC aisladas y cultivadas bajo los mismos estímulos. La población cDC fue la que mostró mayor expresión de dicha molécula después de activación.

Por otro lado, la expresión de PD-L2 incrementó en las nDC después de activarse con IL-3 sola o en combinación con virus o LL37-DNA. En comparación con las otras poblaciones, los niveles de expresión de PD-L2 en las nDC fueron parecidos a los de las pDC cultivadas bajo los mismos estímulos; las cDC después de activarse mostraron la mayor expresión de dicho marcador.

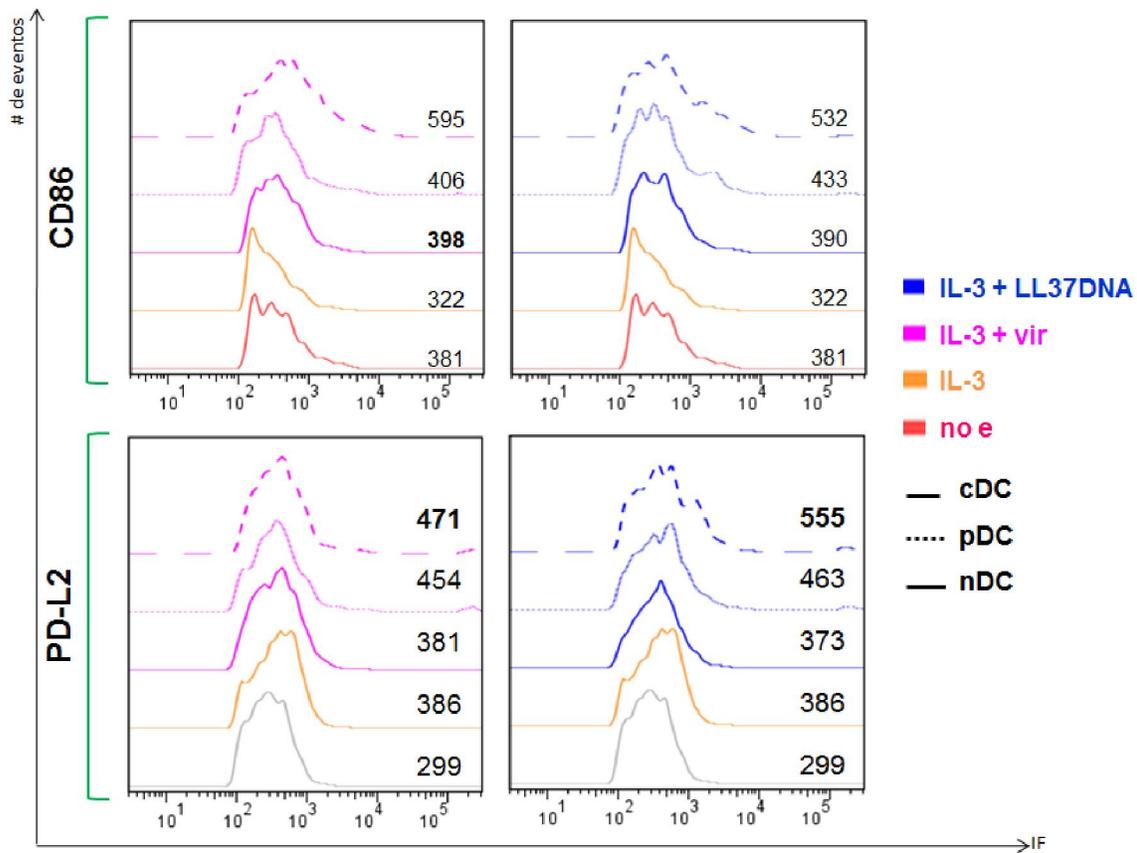


Figura 21. Expresión de marcadores de CD86 y PD-L2 en la población nDC en respuesta a señales exógenas y de daño endógenas. Se muestra la expresión de los marcadores en las tres poblaciones Lin-después de cultivarlas 70 h con IL-3 y virus o LL37-DNA. Los histogramas mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores de IMGF se indican en el extremo derecho de cada histograma.

En cuanto a la expresión de otras moléculas de superficie, los resultados se representaron gráficamente como un mapa de colores (figura 22) a partir de los datos obtenidos por citometría de flujo. Se observó que la población nDC no estimulada tuvo una expresión baja de HLA-DR, CD40 y PD-L1 e incrementó la expresión de estas tres moléculas después de cultivarla en presencia de IL-3 y virus. Sin embargo, los niveles de expresión de HLA-DR no alcanzan a ser los mismos que los expresados por las cDC o pDC sugiriendo que la población nDC no es capaz de activarse eficientemente por el virus de influenza.

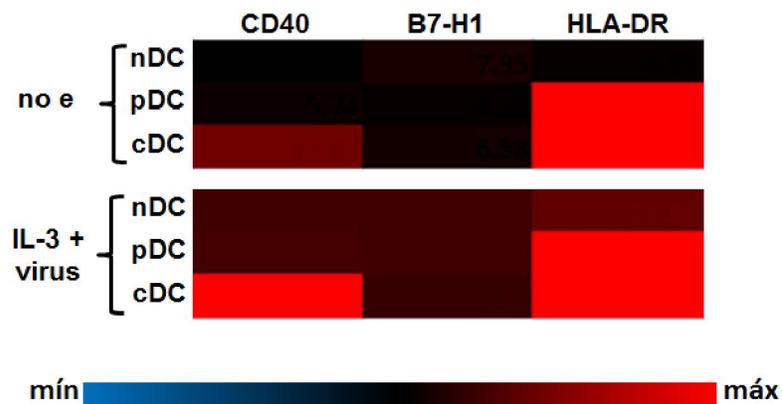


Figura 22. Expresión de moléculas de superficie en las nDC después del cultivo *in vitro* en comparación con las pDC y cDC. Se muestra la expresión de los marcadores en las tres poblaciones después de estimularlas con IL-3 y/o virus. Las gráficas tipo mapa de colores se construyeron, a partir de los datos de citometría de flujo, en la plataforma de Microsoft Office Excel.

Para evaluar si la activación de las nDC a través de sus TLRs era funcional se cuantificó la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias.

Contrario a lo que sucede con las cDC y pDC, la población nDC no produjo TNF- α ni IFN- α después de cultivarse con IL-3 y ligandos de TLRs (figuras 23 A y suplementaria V).

En la figura 23 A y B se muestra que las nDC tampoco produjeron citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6 o IL-12p70 después de ser estimuladas.

En contraste, la población nDC expresa IL-10 en ausencia de estímulo y fue capaz de incrementar la producción de esta citocina después del estímulo con ligandos de TLR-9

(LL37DNA u ODN) en combinación con IL-3, aunque los niveles de esta citocina fueron menores a los detectados para las pDC y cDC.

También se detectó producción de IL-13 e IL-9 por parte de las nDC, aunque en menores cantidades en comparación con la IL-10 (figura 23 B). La producción de IL-13 por las nDC se observó por el cultivo con IL-3 y fue mayor con respecto a la producida por las pDC y cDC. La mayor producción de IL-9 por las nDC se dio bajo el estímulo de LL37DNA en presencia de IL-3 y bajo esta condición la producción fue similar a la producida por las pDC y cDC.

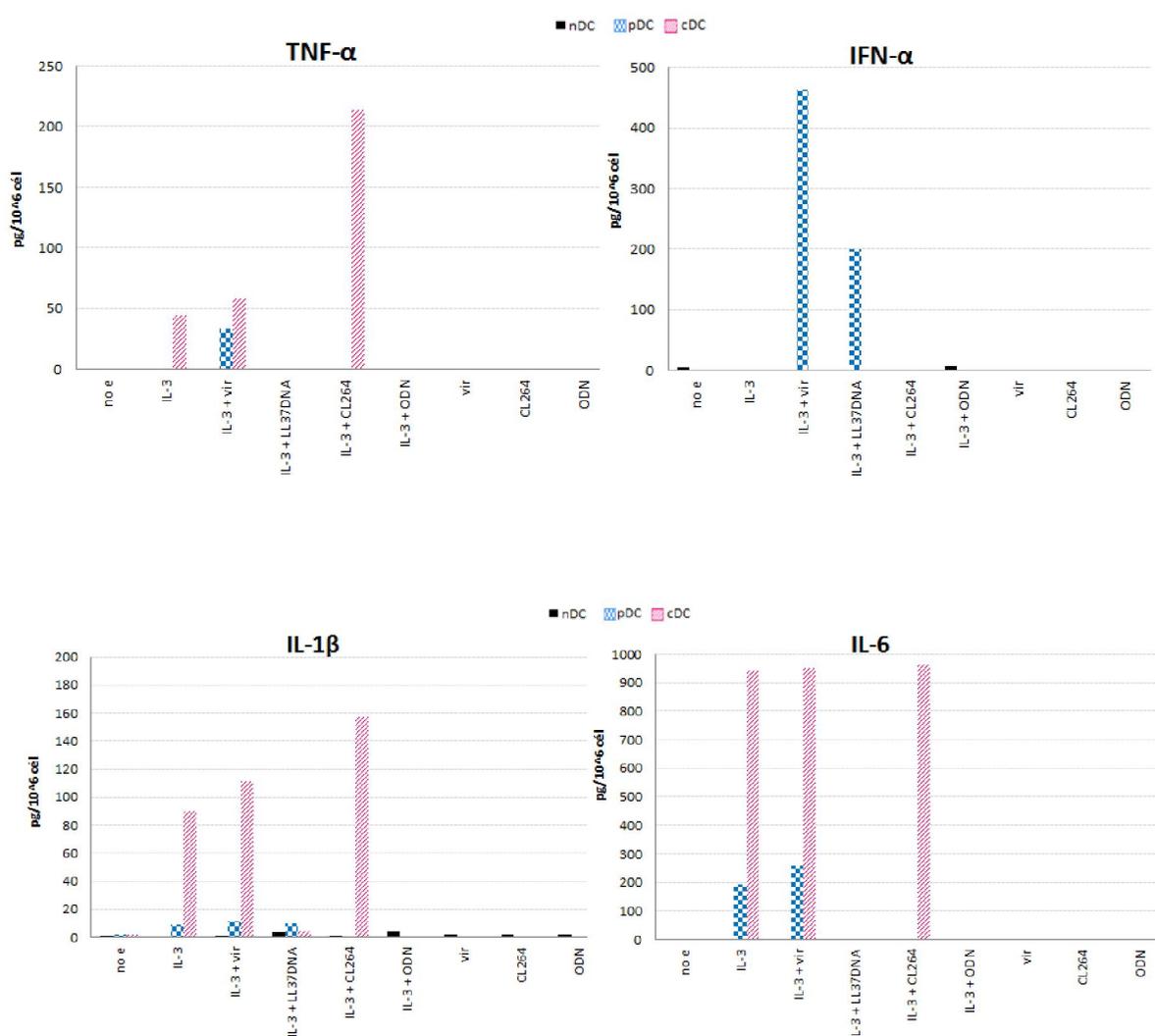


Figura 23 A. Producción de TNF- α , IFN- α , IL-1 β e IL-6 en las poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*. Se muestra la producción de las citocinas después de cultivo por 18 h con IL-3 sola o en presencia de ligandos de TLRs.

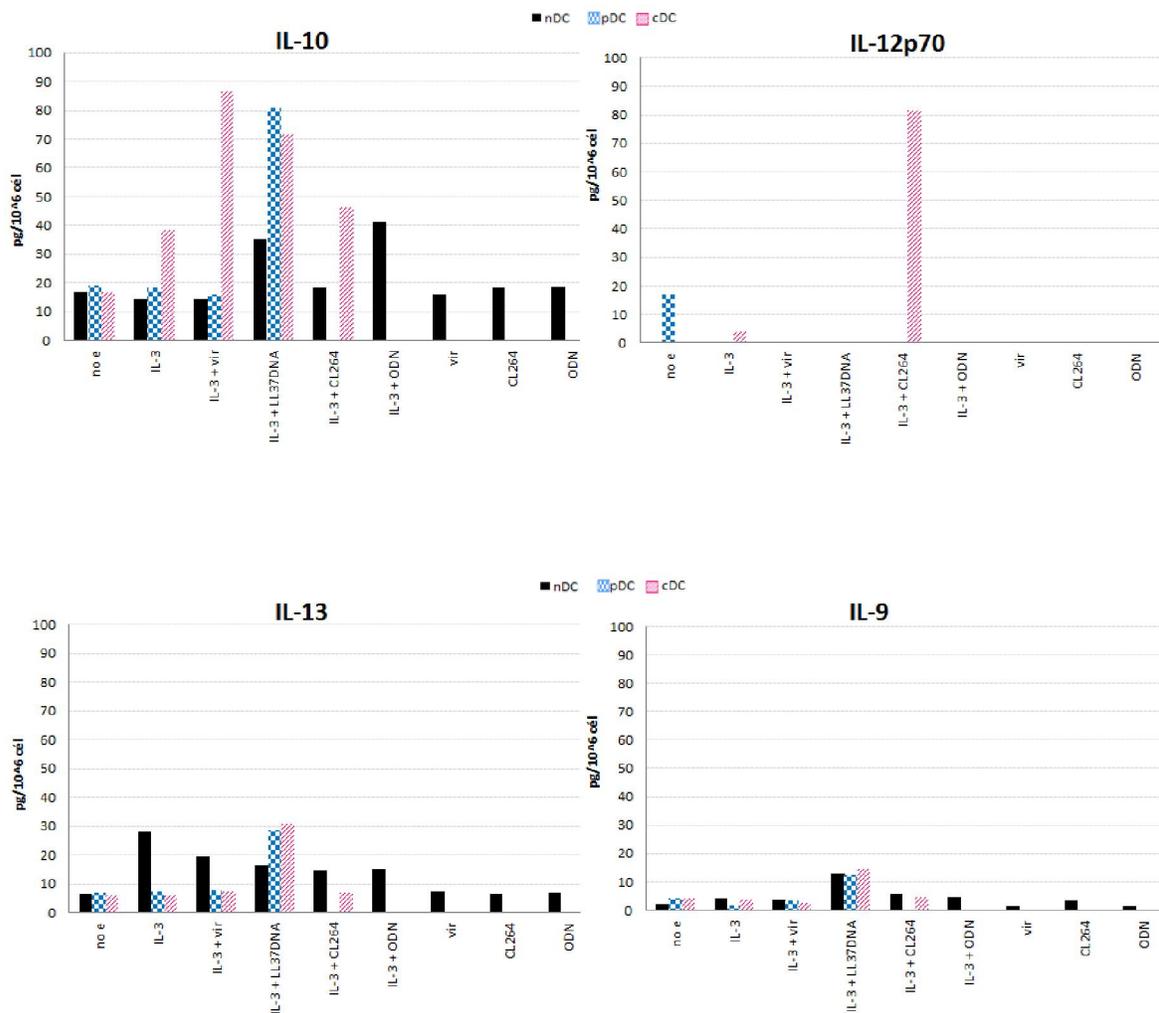


Figura 23 B. Producción de IL-10, IL-12p70, IL-13 e IL-9 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*. Se graficó la cantidad (pg/10⁶ cél) de citocina detectada en sobrenadantes (SN) de las nDC cultivadas 70 h, tomando como controles positivos los SN de cDC y pDC. Valores representativos de al menos 2 experimentos independientes.

De manera interesante, la población nDC produjo predominantemente IL-8 y TGF- β 1 ante los distintos estímulos evaluados. Como se observa en la figura 24 (lado izquierdo), la población nDC fue capaz de producir IL-8 después de cultivo en presencia de IL-3 sola o en combinación con virus de la influenza o LL37-DNA, y no así en presencia de los estímulos individuales con ligandos de TLRs. Interesantemente, se detectó que las nDC activadas con IL-3 y ligandos naturales de TLR-7, 8 ó 9 (virus o LL37-DNA) son capaces de producir mayores cantidades de IL-8 con respecto a las activadas sólo con IL-3. Incluso, bajo este

último estímulo las nDC produjeron mayores niveles de IL-8 en comparación con el estímulo de IL-3 en combinación con ligandos sintéticos de TLRs (como CL264 u ODN). El estímulo con el que se indujeron los mayores niveles de IL-8 en la población nDC fue la combinación de IL-3 con el complejo LL37-DNA. En la figura 24 (lado izquierdo) se muestra también que bajo el estímulo de IL-3 más virus tanto las cDC como las pDC produjeron más IL-8 que las nDC. No obstante, al evaluar la producción de IL-8 en las células activadas con respecto a las células no estimuladas (lado derecho de la figura 24) observamos que las nDC produjeron mayores niveles de IL-8 en comparación con las otras dos poblaciones (cDC y pDC), ya que estas últimas producen dicha citocina aún en ausencia de estímulo.

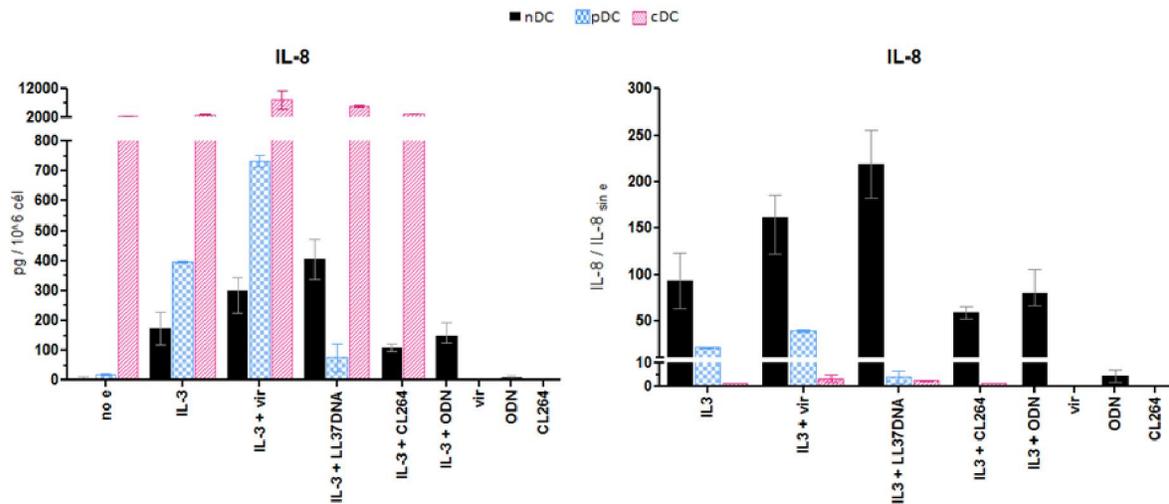


Figura 24. Producción de IL-8 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*. Se graficó la cantidad (pg/10⁶ células) de citocina (izquierda) y la cantidad de citocina normalizada con respecto a las células no estimuladas (derecha) detectada en sobrenadantes (SN) de las nDC cultivadas por 70 h. Se tomaron como controles positivos los SN de cDC y pDC. Valores representativos de al menos 2 experimentos independientes.

Notablemente la población nDC también fue capaz de expresar TGF- β 1 en respuesta al virus de influenza en combinación con IL-3 (figura 25). El cultivo con IL-3 más LL37-DNA fue el estímulo que indujo los mayores niveles de producción de esta citocina.

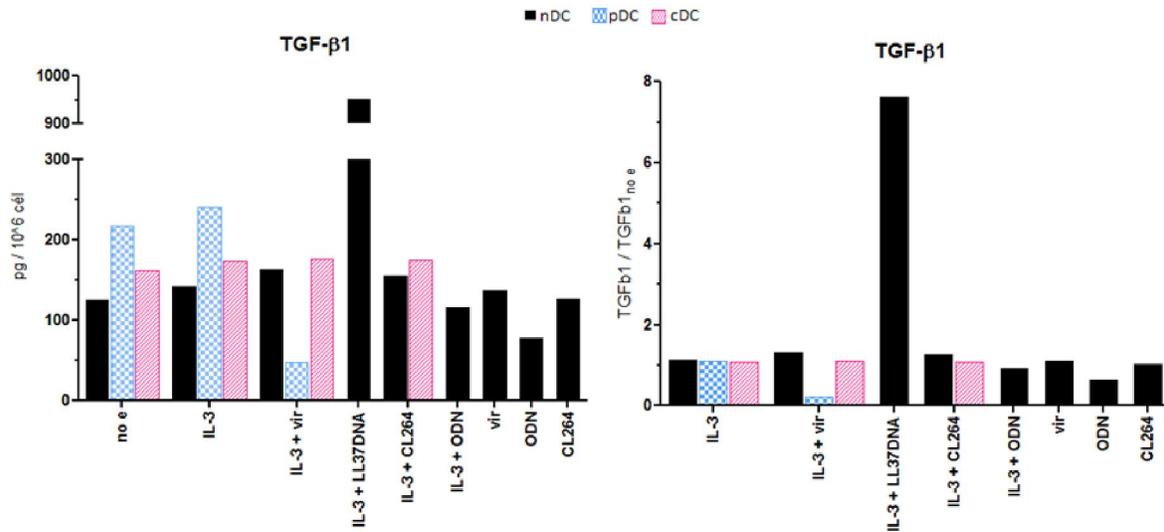


Figura 25. Producción de TGF-β1 en poblaciones Lin- aisladas después del cultivo *in vitro*. Se graficó la cantidad (pg/10⁶ células) de citocina citocina (izquierda) y la cantidad de citocina normalizada con respecto a las células no estimuladas (derecha) detectada en sobrenadantes (SN) de las nDC cultivadas 70 h. Se tomaron como controles positivos los SN de cDC y pDC.

La producción de IL-8 y TGF-β1 en las nDC fue mayor en respuesta a ligandos naturales de TLR-7/8 y 9 que a ligandos sintéticos. Estos resultados indican que la población nDC es capaz de responder a señales exógenas (virus de influenza) y señales de daño endógenas (LL37-DNA). Sin embargo, como consecuencia de esta activación no produce citocinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6, IL-12p70 y TNF-α o interferones tipo I ni expresan niveles importantes de moléculas coestimuladoras, pero tienen la capacidad de expresar moléculas coinhibidoras como PDL-1/2 y de producir quimiocinas como IL-8 y citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF-β1.

9. DISCUSIÓN

En el laboratorio de Inmunología celular de la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica estamos caracterizando a una población celular linaje negativa denominada nDC, la cual está presente en la sangre periférica (SP) de individuos sanos. La población nDC, al igual que las poblaciones de células dendríticas descritas (cDC y pDC), es negativa para los marcadores de linaje CD3, CD19, CD14 y CD56 y en estado de reposo expresa CD123 como las pDC pero expresa bajos niveles de HLA-DR y de CD11c. Las nDC son capaces de adquirir tanto morfología como fenotipo característicos de célula dendrítica después de ser cultivadas *in vitro* en presencia de IL-3, GM-CSF y FLT3 [Mora, 2010]. Sin embargo, se desconocía si esta población expresaba receptores tipo Toll y, de ser así, si podía ser activada ante ligandos de estos receptores y a señales de daño endógenos. Los resultados de este trabajo indicaron que la población nDC expresa receptores tipo Toll; sin embargo, la consecuencia funcional de la activación a través de estos receptores es distinta a lo descrito para las cDC y pDC, ya que coinduce a un fenotipo regulador caracterizado por la baja expresión de MHC-II, moléculas coestimuladoras y la no expresión de citocinas pro-inflamatorias en contraste con la expresión de moléculas coinhibidoras y producción de TGF- β 1.

Nuestros resultados iniciales mostraron que la población nDC en condiciones basales comparte expresión de TLRs con las poblaciones de DCs de sangre periférica (cDC y pDC), ya que expresó TLR-2, 4, 7, 8 y 9 indicando el potencial de esta población para activarse a través de estos receptores. Al comparar la expresión de los TLRs en las nDC con las poblaciones de DCs descritas en la literatura, encontramos que las cDC expresaron a nivel de transcrito los 10 TLRs reportados en humano y a nivel de proteína se confirmó la expresión de TLR-1, 2, 3, 4, 7 y 9. Esto es consistente con lo reportado [Jarrosay, 2001; Seya, 2005; Negishi, 2006; Ueno, 2007; Gilliet, 2008]

A diferencia de lo descrito en varios reportes [Ito, 2005; Jarrosay, 2001; Liu, 2005; Seya, 2005; Takeuchi, 2010], en el presente trabajo observamos que las pDC - además de expresar los TLRs intracelulares 7 y 9 - expresan el TLR-1 (aunque en niveles discretos), lo cual abre la posibilidad de que esta población sea capaz de desempeñar funciones adicionales a la producción de IFN tipo I lo cual es crucial para respuestas inmunes antivirales. Resultará interesante confirmar la expresión de TLR-10 a nivel de proteína, ya que este receptor se ha categorizado como perteneciente a la subfamilia de TLR-2 puesto que comparte alta homología de secuencia con TLR-1 y 6 [Chuang, 2001], además se ha reportado que el TLR-10 es capaz de formar heterodímeros con algunos miembros de esta subfamilia (específicamente TLR-1 y 2) [Hasan, 2005; Kim, 2010].

En las tres poblaciones estudiadas la expresión de transcrito de los TLRs coincidió con la expresión a nivel de la proteína, excepto para TLR-8. Una posibilidad que podría explicar este resultado es que, tal como se ha reportado para otros TLRs [Franch, 2006; NCBI database Gene ID: 7096, 7098, 7099, 54106 y 81973], se hayan generado variantes del transcrito de TLR-8 por mecanismos de poliadenilación alternativa. Si se generaron transcritos de RNAm de menor tamaño, éstos pudieron haber perdido parte de la secuencia que hibridaba con los primers utilizados para amplificar TLR-8 y, por consiguiente, no se inició la PCR de este transcrito. Otra posibilidad es que el anticuerpo biotinilado utilizado para detectar TLR-8 intracelular haya tenido un reconocimiento cruzado. Será pertinente realizar la tinción de inmunofluorescencia para TLR-8 en células HEK293 transfectadas que expresen únicamente este TLR para confirmar la especificidad del anticuerpo.

En cuanto a las consecuencias funcionales de la activación a través de los TLRs, se encontraron diferencias marcadas en las nDC con respecto a las otras poblaciones de DCs. Nuestros resultados mostraron que tanto las cDC como las pDC presentaron cambios morfológicos, formación de agregados celulares, incremento en la expresión de moléculas de coestimulación y producción de citocinas pro-inflamatorias después de cultivarse *in vitro* con ligandos de TLRs en combinación con IL-3, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura [Ahonen, 1999; Ebner, 2002; Grouard, 1997; Liu, 2005; Reis, 2004]. En contraste, la población nDC si bien es capaz de presentar cambios en su morfología y de formar agregados celulares después del cultivo con IL-3 y distintos ligandos de los receptores tipo Toll, no expresó niveles importantes de moléculas coestimuladoras y tampoco produjo citocinas pro-inflamatorias ni interferones tipo I, pero sí expresó moléculas coinhibidoras y produjo citocinas anti-inflamatorias (TGF- β 1) e IL-8.

Una posible explicación de estos resultados es que la población nDC se active a través de TLRs en respuesta a PAMPs o DAMPs presentando un fenotipo tolerogénico o regulador de la respuesta inmune. Varios de los resultados encontrados en este trabajo apoyan el hecho de que la población nDC, incluso después de ser activada por ligandos de los TLRs, adquiera un fenotipo tolerogénico, ya que a pesar de expresar TLRs intracelulares (TLR-7, 8 y 9) no mostró un incremento sustancial en los niveles de expresión de HLA-DR y CD86 en su superficie y tampoco produjo citocinas pro-inflamatorias ni interferones tipo I pero sí expresó PD-L1/2 y produjo niveles considerables de TGF- β 1, la cual es una citocina anti-inflamatoria con gran capacidad inmunorreguladora. La respuesta de la población nDC activada con los ligandos naturales de TLR-7/8 y 9 se acompañó de una producción importante de IL-8 indicando que esta población es capaz de señalizar en respuesta a los ligandos de los TLRs utilizados en este trabajo [József, 2006; Koff, 2008; Mahanonda, 2007; Öz, 2006; Sallusto, 1999], sin embargo, la

consecuencia no es la misma que la observada en las otras poblaciones de DCs presentes en la sangre periférica.

Otro resultado que apoya que la población nDC presente un fenotipo tolerogénico fue el incremento observado en la expresión de PD-L2 y la producción preferentemente de TGF- β 1 e IL-10 tras cultivarse con IL-3 y LL37-DNA. Las potentes propiedades inmunomoduladoras de TGF- β 1 e IL-10 están involucradas con varias funciones de las DCs, como maduración, desarrollo, supervivencia, presentación de antígeno, producción de citocinas o incluso tolerancia inmunológica [Bonnefoy, 2011; Coombes, 2007; Geissmann, 1999; Henri, 2010; Illaregui, 2009; Kaplan, 2007; O'Garra, 2009]. Puesto que el TGF- β 1 es una de las cinco isoformas de TGF- β y se expresa constitutivamente en leucocitos, sería importante evaluar la producción de TGF- β 2 - que es una isoforma inducible - en la población nDC. Además de TGF- β 1 e IL-10, las nDC también produjeron IL-13 e IL-9 que son citocinas capaces de direccionar hacia una respuesta tipo Th2, la cual es uno de los mecanismos del sistema inmune para inhibir respuestas inflamatorias [Moser, 2000; Tanaka, 2000; Tel, 2010; Webb, 2007]. Aún más, se ha propuesto que la IL-9 puede ser producida por células Th17, así como favorecer la supervivencia y actividad supresora de células T reguladoras [Beriou, 2010]. En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la población nDC en presencia de señales de daño exógenas (virus de influenza) y, de manera interesante, ante señales de daño endógeno (LL-37-DNA) es capaz de activarse y llevar a cabo funciones inmunorreguladoras. La posibilidad de que la población nDC pudiera ser capaz de participar activamente en procesos de tolerancia inmunológica o modulación de la respuesta inmune, tiene repercusiones importantes en varias patologías como enfermedades autoinmunes, cáncer o infecciones por patógenos extra e intracelulares.

El complejo LL37-DNA fue utilizado en este trabajo como un DAMP con capacidad de activar a TLR-9, el cual es uno de los receptores tipo Toll que se han asociado con enfermedades autoinmunes [Christensen, 2000; Douglas, 2009; Quintana, 2000; Wu, 2006; Wu, 2007]. Se ha descrito que la endocitosis de complejos del péptido antimicrobiano LL37 con ácidos nucleicos endógenos es crucial para activar vías de señalización en pDC presentes en la piel de pacientes con psoriasis [Ganguly, 2009; Gilliet, 2008; Lande, 2007]. La posibilidad de que la población nDC activada por DAMPs a través de TLR-9 presente un fenotipo regulador sugiere que podría desempeñar un papel importante en la modulación de la respuesta inmune en enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

Dado que la activación de las nDC a través de los receptores de la subfamilia de TLR-9 tuvo consecuencias funcionales diferentes a las descritas para las otras dos poblaciones Lin- (cDC y pDC), será importante el estudio de los mecanismos involucrados. Es posible que se estén

modulando las vías de TLRs que convergen en la translocación de NF- κ B. Cada uno de los miembros de la familia de NF- κ B induce específicamente distintas citocinas, por ejemplo RelA (pero no p50 ni cRel) induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. La no producción de citocinas pro-inflamatorias en las nDC podría estar relacionada con la inhibición de la translocación de RelA al núcleo o con la actividad de RelB, el cual funciona como un regulador negativo que silencia los genes pro-inflamatorios [Chen, 2009; Kiebal, 2010; Wang, 2010]. Una opción alternativa es que se favorezca un incremento en la expresión del gen que codifica TGF- β 1 por autoinducción o a través de elementos reguladores selectivamente activados por señales específicas durante la activación o diferenciación de las nDC, y se amplifiquen los efectos anti-inflamatorios de esta citocina [Kaplan, 2007; Peralta, 2001].

Otra posible explicación de los resultados obtenidos en el presente trabajo es que la población nDC en la sangre periférica se encuentre en un estadio más temprano de diferenciación y que para diferenciarse un requerimiento indispensable sea su movilización a sitios especializados y, una vez ahí, sea capaz de activarse en respuesta a estímulos como PAMPs o DAMPs. Esta propuesta es consistente con lo reportado para los precursores de DCs en modelos murinos [Naik, 2008; Steinman, 2011], y con el hecho de que la población nDC expresa una alta expresión de marcadores de migración y una alta movilización a sitios como piel [Castro, 2011; Torres, 2011]. Finalmente la capacidad de la población nDC de responder a IL-3 apoya la propuesta de que esta población celular requiera de un proceso de diferenciación. La IL-3 es una citocina que promueve el crecimiento y diferenciación en varias estirpes celulares incluyendo las que se encuentran en estadios más tempranos de diferenciación como las células hematopoyéticas progenitoras y precursoras [Hara, 1996; Mangi, 1999].

En cuanto a la expresión de TLRs en células poco diferenciadas, se ha reportado que las células progenitoras expresan distintos TLRs a lo largo de su diferenciación y se ha propuesto que estos receptores podrían participar en el direccionamiento de la hematopoyesis hacia diferentes linajes [Mazo, 2011; Nagai, 2006; Schmid, 2011; Sioud, 2006]. Sería importante determinar si la expresión de los TLRs en la población nDC pudiera tener una participación durante su proceso de diferenciación. De manera interesante, las nDC fueron capaces de expresar TLR-1 e incrementar la expresión de TLR-2 y 4 después de cultivarlas con IL-3 en combinación con LTA o LPS. Estos resultados nuevamente apoyan la posibilidad que la población nDC sea un precursor y que, como parte de su proceso de diferenciación, incremente la expresión de los TLRs para su posterior activación. Resultará relevante evaluar las consecuencias funcionales de la activación a través de estos TLRs de superficie, contemplando además la posibilidad de que se den interacciones heterotípicas entre los distintos TLRs con implicaciones importantes, como el caso de la interacción de TLR-1 con TLR-4 que ha mostrado ser inhibitoria para la

señalización de TLR-4 en respuesta a LPS [Spitzer, 2002; Wang, 2006]. En relación a los TLRs intracelulares en la población nDC, también se observó un incremento en su expresión después de cultivarse con IL-3 en combinación con algunos ligandos de TLRs de la subfamilia de TLR-9, aunque el incremento fue más notorio para los TLRs de superficie.

En resumen, en este trabajo encontramos que la población nDC presente en la sangre periférica de individuos sanos expresa TLRs tanto de superficie como intracelulares indicando que posee un gran potencial de respuesta ante señales exógenas y señales de daño endógeno. Sin embargo, las consecuencias de la activación por distintos ligandos de TLRs en las nDC fueron la expresión de moléculas coinhibidoras, así como la producción de citocinas anti-inflamatorias en ausencia de citocinas pro-inflamatorias; por lo que es posible que si esta población celular corresponde a una DC, participe en la regulación de la respuesta inmune lo cual es crítico en infecciones por patógenos y diversas patologías como enfermedades autoinmunes.

10. CONCLUSIONES

- La consecuencia funcional de la activación de la población nDC a través de sus TLRs es distinta a lo descrito para las cDC y pDC, presentando un fenotipo regulador caracterizado por la baja expresión de MHC-II, moléculas coestimuladoras y la no expresión de citocinas pro-inflamatorias en contraste con la expresión de moléculas coinhibidoras y producción de TGF- β 1.
- Es posible que la población nDC se encuentre en un estadio más temprano de diferenciación, en el cual la consecuencia de su activación por ligandos de TLRs no conduzca a la producción de citocinas pro-inflamatorias y que requiera estímulos de diferenciación adicionales para responder adecuadamente vía receptores tipo Toll.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. y Litchman, A. *Inmunología celular y molecular*. 5ª ed. España. Elsevier. 2004.
- Albert, M., Sauter, B. and Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998. 392:86–89.
- Alfaro, C., Suárez, N., Martínez, I., Palazón, A., Rouzaut, A., Solano, S., Feijoo, E., Gúrpide, A., Bolaños, E., Erro, L., Dubrot, J., Hervás, S., Gonzalez, A., Perez, J. and Melero, I. Carcinoma-derived interleukin-8 disorients dendritic cell migration without impairing T-cell stimulation. *PLoS One*. 2011. 6(3): e17922.
- Almand, B., Resser, J., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J., Kwon, E., Carbone, D. and Gabrilovich, D. clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2000. 6:1755-66.
- Almeida, J., Bueno, C., Alguero, M., Sanchez, M., Cañizo, M., Fernandez, M., Vaquero, J., Laso, F., Escribano, L., San Miguel, J. and Orfao, A. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II⁺/lineage⁻ cells. *Clin Exp Immunol*. 1999; 118:392-401
- Alters S., Gadea J., Holm B., Lebkowski J. and Philip R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother*. 1999. 22(3):229-36.
- Asadullah, K., Sterry, W. and Volk, H. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev*. Jun, 2003. 55(2):241-69.
- Baecher, C., Brown, J., Freeman, G. and Hafler, D. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001.167:1245-53.
- Banchereau, J. and Steinman, R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998. 392:245-52.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B. and Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*. 2000. 18:767–811.
- Banchereau, J. The long arm of the immune system. *Sci Am*. 2002. 287(5):52-9.
- Barber, G. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol* 23(1): 10-20.
- Belladonna, M., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M., Grohmann, U. and Puccetti, P. Cutting Edge: Autocrine TGF- β sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *J Immunol*. 2008. 181:5194-8.
- Benítez, D., Tacken, P., Punt, C., de Vries, I. and Figdor, C. Activation of Human Plasmacytoid Dendritic Cells by TLR9 Impairs Fc γ RII-mediated uptake of immune complexes and presentation by MHC class II. *J Immunol*. 2008. 181:5219-24

Berg, E. The cutaneous lymphocyte antigen is a skin lymphocyte homing receptor for the vascular lectin endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1. *J Exp Med* 1991 174:1461-66

Beriou, G., Bradshaw, E., Lozano, E., Costantino, C., Hastings, W., Orban, T., Elyaman, W., Khoury, S., Kuchroo, V., Baecher, C. and Hafler, D. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *J Immunol.* 2010. 185(1):46-54.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Maknke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. and Steinman, R. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 2002. 196(12):1627-38.

Bonnefoy, F., Couturier, M., Clauzon, A., Rémy, J., Gaugler, B., Tiberghien, P., Chen, W., Saas, P. and Perruche, S. TGF- β -exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment. *J Immunol* 2011. 186(11):6157-64.

Bosinger, S., Hoisawa, K., Cameron, C., de Vries, M., Coombs, J. and Kelvin, D. "Molecular control of leukocyte trafficking – internal regulatory circuits of the immune system: leukocyte circulation and homing". *Natural immunity*. 1st edition. Bertók, L. and Chow, D. Amsterdam. Elsevier. 2005. p. 191-2. <http://books.google.com.mx>

Brimmes, M., Bonifaz, L., Steinman, R. and Moran, T. Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med* 2003. 198(1):133-144.

Brunner, M., Chambers, C., Chan, F., Hanke, J., Winoto, A. and Allison, J. CTLA-4 mediates inhibition of early events of T cell proliferation. *J Immunol.* 1999. 162:5813–20.

Carter, L., Fouser, L., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G., Carreno, B. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol.* 2002. 32(3):634-43.

Castro, O. 2011. Migración de células dendríticas de sangre periférica en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en la piel de pacientes con psoriasis activa. Licenciatura en Químico Farmacéutico-Biólogo de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois B., de Saint, B., Dezutter, C., Jacquet, C., Schmitt, D. and Banchereau, J. CD34 + hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF α . *J Exp Med.* 1996. 184:695-706.

Celestin, J., Rotschke, O. Falk, K., Ramesh, N., Jabara, H., Strominger, J. and Geha, R. IL-3 induces B7.2 (CD86) expression and costimulatory activity in human eosinophils. *J Immunol.* 2001. 167:6097-104.

Chen, G. and Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol.* 2010. 10(12):826-37.

Chen, X., El Gazzar M., Yoza, B. and McCall C. The NF κ B factor RelB and histone H3 lysine methyltransferase G9a directly interact to generate epigenetic silencing in endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* 2009.27:857-65.

Colonna, M., Trinchieri, G. and Liu, Y. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immun. Rev.* 2004. 5(12):1219-26.

Coombes, J., Siddiqui, K., Arancibia, C., Hall, J., Sun, C., Belkaid, Y. and Powrie, F. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204(8): 1757-64.

Creagh, E. and O'Neill, L. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol.* 2006. 27(8):352-7.

Christensen, S., Shupe, J., Nickerson, K., Kashgarian, M., Flavell, R. and Shlomchik, M. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity.* 2006. 25(3):417-428.

Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar, T., Henry, S., Hamilton, J. and Biron, C. Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J Exp Med.* 2003. 197(7): 885-98

Di Matteo, P., Arrigoni, G., Alberici, L., *et al.* Enhanced expression of CD13 in vessels of inflammatory and neoplastic tissues. *J Histochem Cytochem.* 2011. 59(1): 47-59.

Díaz, N., Manterola, L., Belsúe, V., Riezu, J., Larrea, E., Echeverria, I., Llopiz, D., López, J., Lerat, H., Pawlotsky, J., Prieto, J., Lasarte, J., Borrás, F. and Sarobe, P. Improved dendritic cell-based immunization against hepatitis C virus using peptide inhibitors of interleukin 10. *Hepatology.* 2011. 53(1):23-31.

Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. and Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999.5(12):1365-9.

Dostert, C., Meylan, E. and Tschopp, J. Intracellular pattern-recognition receptors. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008. 60(7): 830-840.

Douglas, K., Windels, D., Zhao, J., Gadeliya, A., Wu, H., Kaufman, K., Harley, J., Merrill, J., Kimberly, R., Alarcón, G., Brown, E., Edberg, J., Ramsey, R., Petri, M., Reveille, J., Vila, L., Gaffney, P., James, J., Moser, K., Alarcón, M., Vyse, T., Gilkeson, G., Jacob, C., Ziegler, J., Langefeld, C., Ulgiati, D., Tsao, B. and Boackle, S. Complement receptor 2 polymorphisms associated with systemic lupus erythematosus modulate alternative splicing. *Genes Immun.* 2009. 10(5):457-69.

Dudziak, D., Kamphorst, A., Heidkamp, G., Buchholz, V., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H., Park, C., Steinman, R. and Nussenzweig, M. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science.* 2007. 315:107-11.

Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. and Schmitz, J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2000. 165: 6037-46.

Ebner, S., Hofer, S., Nguyen, V., Fürhapter, C., Herold, M., Fritsch, P., Heufler, C. and Romani, N. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol.* Jun 15, 2002. 168(12):6199-207.

- Feijoo, E., Afrao, C., Mazzolini, G., Serra, P., Peñuelas, I., Arina, A., Huarte, E., Tirapu, I., Palencia, B., Murillo, O., Ruiz, J., Sangro, B., Richter, J., Prieto, J. and Melero, I. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer*. 2005. 116(2): 275-281.
- Foti, M., Granucci, F., Pelizzola, M., Pavelka, N., Beretta, O., Vizzardelli, C., Urbano, M., Zanoni, I., Capuano, G., Mingozzi, F., Trottein, F., Aebischer, T. and Ricciardi, P. Dendritic cells as sentinels of the immune system: tissue-resident DC and migratory DC. *Handbook of DC: Biology, Diseases and Therapies*. 1st ed. Lutz, M., Romani, N. and Steinkasserer, A. Germany. WILEY-VCH. 2006. 175-77.
- Freeman, G., Long, A., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M., Horton, H., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M., Carreno, B., Collins, M., Wood, C. and Honjo, T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000.192(7):1027-34.
- Fukaya, T., Takagi, H., Sato, Y., Sato, K., Eizumi, K., Taya, H., Shin, T., Chen, L., Dong, C., Azuma, M., Yagita, H., Malissen, B. and Sato, K. Crucial roles of B7-H1 and B7-DC expressed on mesenteric lymph node dendritic cells in the generation of antigen-specific CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in the establishment of oral tolerance. *Blood*. 2010. 116(13): 2266-2276.
- Ganguly, D., Chamilos, G., Lande, R., Gregorio, J., Meller, S., Facchinetti, V., Homey, B., Barrat, F., Zal, T. and Gilliet, M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med*. 2009. 206(9): 1983-1994.
- Geissmann, F., Revy, P., Regnault, A., Lepelletier, Y., Dy, M., Brousse, N., Amigorena, S., Hermine, O. and Durandy, A. TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J Immunol*. 1999. 162:4567-75.
- Gilliet, M., Cao, W. and Liu, Y. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol*. 2008. 8:594-606.
- Gilliet, M. and Lande, R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr. Op. Immunol*. 2008. 20:401-7.
- Goubau, D., Rehwinkwl, J. and Resi e Sousa, C. PYHIN proteins: center stage in DNA sensing. *Nat Immun*. 2010. 11(11):984-6.
- Grouard, G., Risoan, M., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J. and Liu, Y. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997. 185:1101-11
- Hara, T. and Miyajima, A. Function and signal transduction mediated by the interleukin 3 receptor system in hematopoiesis. *Stem Cells*. 1996. 14(6):605-18.
- Hartmann, G., Weiner, G. and Kreig, A. CpG DNA: A potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1999. 96:9305-10.
- Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guiet, C., Brière, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. and Bates, E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*. 2005. 174:2941-50.

Hawiger, D., Inabam K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J., Steinman, R. and Nussenzweig, M. Dendritic Cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001. 194(6):769-79.

Heath, W. and Carbone, F. Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat Immunol*. 2009. 10(12): 1237-1244.

Henri, S., Guilliams, M., Poulin, L., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Dalod, M. and Malissen, B. Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunol Cell Biol*. 2010. 88(4): 366-375.

Hernández, J., Aung, S., Redmond, W. and Sherman, L. Phenotypic and functional analysis of CD8+ T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 2001. 194(6):707-17.

Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R., Romani, N. and Schuler, G. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol*. 1996 Mar;26(3):659-68.

Hochrein, H. and Wagner, H. Toll-like receptors. *Handbook of DC: Biology, Diseases and Therapies*. 1st ed. Lutz, M., Romani, N. and Steinkasserer, A. Germany. WILEY-VCH. 2006. 119-24.

Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S. and Hartmann, G. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1–10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides *J Immunol*, 2002, 168: 4531–4537.

Huang, F., Platt, N., Wykes, M., Major, J., Powell, T., Jenkins, C. and MacPherson, G. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000. 191:435–43

Illarregui, J., Croci, D., Bianco, G., Toscano, M., Salatino, M., Vermeulen, M., Geffner, J. and Rabinovich G. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol*. 2009. 10(9):981-91.

Ito, T., Inaba, M., Inaba, K., Toki, J., Sogo, S., Iguchi, T., Adachi, Y., Yamaguchi, K., Amakawa, R., Valladeau, J., Saeland, S., Fukuhara, S. and Ikehara, S. A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol*. 1999. 163:1409-19.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S. and Fukuhara, S. Interferon-alpha and Interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002. 195(11):1507–12.

Ito, T., Wang, Y. and Liu Y. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immun*. 2005. 26:221-9.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York. Garland Science. 2001. NCBI Bookshelf. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10757/>. Sep 2009.

- Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J Immunol.* 2001. 31: 3388–93.
- Jego, C., Palucka, A., Blanck, J., Chalouni, C., Pascual, V. and Banchereau, J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity.* 2003. 19(2): 225-34.
- József, L., Khreiss, T., El Kebir, D. and Filep, J. Activation of TLR-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol.* 2006. 176:1195-1202.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R., Kastelein, R., Bazan, F. and Liu, Y. Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001. 194(6):863–9.
- Kaliński, P., Hilkens, C., Wierenga, E. and Kapsenberg, M. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology today.* 1999. 20(12):561-7.
- Kaplan, D., Li, M., Jenison, M., Shlomchik, W., Flavell, R. and Shlomchik, M. Autocrine/paracrine TGFβ1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med.* 2007. 204(11): 2545-2552
- Kawai, T. and Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 2011. 34: 637-50.
- Keir, M., Francisco, L. and Sharpe, A. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007. 19(3): 309-314.
- Kiebała, M., Polesskaya, O., Yao, Z., Perry, S. and Maggirwar, S. Nuclear factor-kappa B family member RelB inhibits human immunodeficiency virus-1 Tat-induced tumor necrosis factor-alpha production. *PLoS One.* Jul 29, 2010. 5(7):e11875.
- Kim, D., Kim, Y., Koh, H., Jang, T., Park, H. and Kim, J. Reactive oxygen species enhance TLR10 expression in the human monocytic cell line THP-1. *Int J Mol Sci.* 2010. 11(10): 3769-3782.
- Koff, J., Shao, M., Ueki, I. and Nadel, J. Multiple TLRs activate EGFR via a signaling cascade to produce innate immune responses in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008. 294:L1068-75.
- Kohrgruber, N., Halanek, N., Gröger, M., Winter, D., Rappersberger, K., Schmitt, M., Stingl, G. and Maurer, D. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol.* 1999 163:3250-59.
- Kool, M., Willart, M., van Nimwegen, M., Bergen, I., Pouliot, P., Virchow, J., Rogers, N., Osorio, F., Reis, C., Hammad, H. and Lambrecht, B. An unexpected role for uric acid as an inducer of T helper 2 cell immunity to inhaled antigens and inflammatory mediator of allergic asthma. *Immunity.* 2011. 34(4): 527-540.
- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A. and Hartmann, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J Immunol* 2001. 31: 3026–37.

Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009. 388(4): 621-625.

Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011. 30(1): 16-34.

Lande, R., Gregorio, J., Facchinetti, V., Chatterjee, B., Wang, Y., Homey, B., Cao, W., Wang, Y., Su, B., Nestle, F., Zal, T., Mellman, I., Schröder, J., Liu, Y. and Gilliet, M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature.* 2007. 449(7162): 564-569.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciari, V., Bassett, R., Amuro, H., Fukuhara, S., Ito, T., Liu, Y. and Gilliet, M. Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med.* 2011. 3(73):73ra19

Lanzavecchia, A., Lezzi, G. and Viola, A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell.* 1999.96:1-4.

Latchman, Y., Wood, C., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A., Brown, J., Nunes, R., Greenfield, E., Bourque, K., Boussiotis, V., Carter, L., Carreno, B., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A. and Freeman, G. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001. 2(3):261-8.

Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K., Monks, B., Knetter, C., Lien, E., Nilsen, N., Espevik, T. and Golenbock, D. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004. 5(2):190-8.

Lenschow, D., Walunas, T. and Bluestone, J. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233-58.

Liu, L., Rich, B., Inobe, J., Chen, W. and Weiner, H. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4⁺ T cells to secrete IL-4. *Int Immunol.* 1998. 10(8):1017-26.

Liu, Y., Kanzler, H., Soumelis, V. and Gilliet, M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2001. 2(7):585-9.

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

Lore, K., Betts, M., Brenchley, J., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M., Seder, R. and Koup, R. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol.* 2003, 171:4320-8.

López, C., Moltedo, B., Alexopolou, L., Bonifaz, L., Flavell, R. and Moran, T. TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses. *J Immunol.* 2004. 173:6882-9.

Ma, C., Tangye, S. and Deenick, E. Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. *Immunol Cell Biol.* 2010. 88(6):621-623.

MacDonald, K., Munster, D., Clark, G., Dzionek, A., Schmitz, J. and Hart, D. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002. 100(13): 4512-4520.

Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Montreekachon, P., Pimkhaokham, A., Yongvanichit, K., Fukuda, M. and Pichyangkul, S. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*. 2007. 178:1151-7.

Mancuso, G., Gambuzza, M., Midiri, A., Biondo, C., Papasergi, S., Akira, S., Teti, G. and Beninati, C. Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol*. 2009. 10(6):587-94.

Manfred, B., Nikolaus, R. and Alexander, S. *Handbook of Dendritic Cells. Biology, Diseases, and Therapies*. WILEY-VCH. 2006.

Mangi, M. and Newland, A. Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1999. 5(2):87-95.

Manz, M. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood*. 2001. 97(11): 3333-41.

Matsui, T., Connolly, J., Michnevitz, M., Chaussabel, D., Yu, C., Glaser, C., Tindle, S., Pypaert, M., Freitas, H., Piqueras, B., Banchereau, J. and Palucka, A. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol*. 2009. 182:6815–6823.

Mazo, I., Massberg, S. and von Adrian, U. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol*. 2011. 32(10): 493-503.

Mc Donald, B., Pittman, K., Menezes, G., Hirota, S., Slaba, I., Waterhouse, C., Beck, P., Muruve, D. and Kubes, P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science*. 2010. 330(6002): 362-366.

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

Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001. 1:135-45.

Méndez, A. Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas en lupus discoide. 2009. Maestría en Ciencias del Programa de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. 47.

Mendoza, E. Modulación de la respuesta Th1 inducida por BCG como consecuencia de la interacción de células dendríticas con *Mycobacterium avium*. 2011. Doctorado del Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. 107.

Mookherjee, N., Brown, K., Bowdish, D., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F., Mu, R., Doho, G., Pistolic, J., Powers, J., Bryan, J., Brinkman, F. and Hancock, R. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*. Feb 15, 2006. 176(4):2455-64.

Mora, L. Caracterización y evaluación de la función de una posible subpoblación de células dendríticas en sangre periférica. 2010. Maestría en Ciencias del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. 64.

- Morse, M., Lysterly, H. and Li, Y. The role of IL-13 in the generation of dendritic cells *in vitro*. *J Immunother.* 1999 Nov; 22(6):506-13.
- Moser, M and Murphy, K. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 2000. 1(3):199-205.
- Nagai, Y., Garrett, K., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K. and Kincade, P. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity.* 2006. 24(6):801–12.
- Naik, S., Proietto, A., Wilson, N., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M., O'Keeffe, M., Shao, Q., Chen, W., Villadangos, J., Shortman, K. and Wu, L. Generation of Splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol.* 2005. 174:6592-7.
- Naik, S., Sathe, P., Park, H., Metcalf, D., Proietto, A., Dakic, A., Carotta, S., O'Keeffe, M., Bahlo, M., Papenfuss, A., Kwak, J., Wu, L. and Shortman, K. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived *in vitro* and *in vivo*. *Nat Immunol.* 2007. 8(11): 1217-26.
- Naik, S. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol.* 2008. 86: 439–52.
- Naik, S., Dendritic cell development, lineage issues and haematopoiesis at the single cell level in chapter 4 from *Cell determination during hematopoiesis.* 2008.
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T. and Honda, K. Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *PNAS.* 2006. 103(41):15136–41.
- NIH-PA (2008). The NLR gene family: An official nomenclature. *Immunity.* 28(3):285–7
- O'Doherty, U., Peng, M., Gzelter, S., Swiggard, W., Betjes, M., Bhardwaj, N. and Steinman, R. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology.* 1994. 82:487-93.
- O'Garra, A. and Murphy, K. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce TH1 development. *Nat Immunol.* 2009. 10(9):929-32.
- Okazaki, T. and Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol.* 2007. 19(7): 813-824.
- Oude Nijhuis, C., Vellenga, E., Daenen, S., Kamps, W. and De Bont, E. Endothelial cells are main producers of interleukin 8 through Toll-like receptor 2 and 4 signaling during bacterial infection in leukopenic cancer patients. *Clin Vaccine Immunol.* 2003. 10(4): 558-63.
- Oz-Arslan, D., Ruscher, W., Myrtek, D., Ziemer, M., Jin, Y., Damaj, B., Sorichter, S., Idzko, M., Norgauer, J. and Maghazachi, A. IL-6 and IL-8 release is mediated via multiple signaling pathways after stimulating dendritic cells with lysophospholipids. *J Leukoc Biol.* 2006. 80(2): 287-297.

Palucka, K., Taquet, N., Sanchez, F. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol.* 1998. 160:4587-95.

Peralta, O., Lagunas, A. y Madrid, V. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Publica Mex.* 2001. 43:340-51.

Phipps, H., Seto, J., Sealfon, S., Moran, T. and Fernandez, A. Interferon-beta pretreatment of conventional and plasmacytoid human dendritic cells enhances their activation by influenza virus. *PLoS Pathog.* 2008. 4(10) e1000193: 1-11.

Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sarmiceli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F. and Wack, A. Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood.* 2007. 109:5371-9.

Piqueras, B., Connolly, J., Freitas, H., Palucka, A. and Banchereau, J. Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. *Blood.* 2006. 107:2613-18.

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

Quintana, F., Rotem, A., Carmi, P. and Cohen, I. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonobese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa heat shock protein autoimmunity. *J Immunol.* 2000. 165(11):6148-6155.

Rasmussen, S., Sorensen, L., Malmgaard, L., Ank, N., Baines, J., Chen, Z. and Paludan, S. Type I interferon production during herpes simplex virus infection is controlled by cell-type-specific viral recognition through Toll-like receptor 9, the mitochondrial antiviral signaling protein pathway, and novel recognition systems. *J Virol.* 2007. 81(24): 13315-13324.

Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol.* 2004. 16(1):27-34.

Rivas, B., Sada, E., Hernández, R. y Tsutsumi, V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública de México.* 2006. 48(1):62-71.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P., Steinman, R. and Schuler, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994. 180:83-93.

Said E., Dupuy, F., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S., Van Grevenynghe J., Boulassel, M., Bruneau, J., Shoukry, N., Routy, J., Douek, D., Haddad, E. and Sekaly, R. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nat Med.* 2010. 16(4):452-9.

Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J Immunol* 1999. 29: 1617-25.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med.* 1999. 189(4):611-14.

- Schäkel, K., Kannagu, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M. and Rieber, E. 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity*. 2002. 17:289-301.
- Schäkel, K., von Kietzell, M., Hansel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A., Randolph, G., Meurer, M. and Rieber, E. Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity*. 2006. 24:767-77.
- Schmid, M., Kingston, D., Boddupalli, S. and Manz, M. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunol Rev*. 2010. 234:32-44.
- Schmid, M., Takizawa, H., Baumjohann, D., Saito, Y. and Manz, M. Bone marrow dendritic cell progenitors sense pathogens via Toll-like receptors and subsequently migrate to inflamed lymph nodes. *Blood*. 2011. 118(18):4829-40.
- Schmitz, F., Heit, A., Guggemoos, S., Krug, A., Mages, J., Schiemann, M., Adler, H., Drexler, I., Haas, T., Lang, R. and Wagner, H. Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN- β production in myeloid dendritic cells. *Eur. J Immunol*. 2007. 37:315-27.
- Seya, T., Funami, K., Taniguchi, M., et al. Antibodies against human Toll-like receptors (TLRs): TLR distribution and localization in human dendritic cells. *J Endotoxin Res*. 2005. 11(6):369-74.
- Shimizu, T., Tani, K., Hase, K., Ogawa, H., Huang, L., Shinomiya, F. and Sone, S. CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2002. 46(9): 2330-2338.
- Shortman, K. and Liu, Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002. 2:151-61.
- Shortman, K. and Naik, S. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2007. 7:19-30.
- Siegal, F. The nature of the principal type 1-interferon-producing cells in human blood. *science*. 1999. 284:1835-7.
- Sirard, J., Vignat, C., Dessein, R. and Chamaillard, M. Nod-like receptors: cytosolic watchdogs for immunity against pathogens. *PLoS Pathogens*. 2007. 3(12) e152: 1829-36.
- Sirisinha, S. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pae J Allergy Immunol*. 2011. 29:1-14.
- Steinman, R. and Cohn, Z. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 1973. 137:1142-62.
- Steinman, R., Hawiger, D. and Nussenzweig, M. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003. 21: 685-711.
- Steinman, R. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur. J Immunol* 2007. 37:S53-60.
- Steinman, R. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol*. 2012. 30:1-22.

Strobl, H., Scheinecker, C., Riedl, E., Csmarits, B., Bello, C., Pickl, W., Majdic, O. and Knapp, W. Identification of CD68⁺ Lin⁻ peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J Immunol* 1998. 161:740–748.

Strobl, H. and Knapp, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes Infect.* 1999. 1(15):1283-90.

Söderberg, C., Giugni, T., Zaia, J., Larsson, S., Wahlberg, J. and Möller, E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. *J Virol.* 1993. 67(11):6576-85.

Takeuchi, O. and Akira, S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010. 140:805–20.

Tanaka, H., Demeure, C., Rubio, M., Delespesse, G. and Sarfati, M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med.* Aug 7, 2000. 192(3):405-12.

Torres, I. Migración de células linaje negativas de sangre periférica de individuos sanos en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en piel inflamada. 2011. Licenciatura en Químico Farmacéutico-Biólogo de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tschoep, K., Manning, T., Harlin, H., George, C., Johnson, M. and Gajewski, T. Disparate functions of immature and mature human myeloid dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *J. Leukoc. Biol.* 1003. 74: 69 – 80.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J., Pascual, V., Palucka, A. and Banchereau, J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007. 219:118–42.

Unterholzner, L., Keating, S., Baran, M., Horan, K., Jensen, S., Sharma, S., Sirois, C., Jin, T., Latz, E., Xiao, T., Fitzgerald, K., Paludan, S. and Bowie, A. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immun.* 2010. 11(11):997-1004.

Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, J., Cottrez, F. and Groux, H. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* May, 2003. 18(5):605-17.

Walunas, T., Bakker, C. and Bluestone, J. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med.* 1996. 183:2541-50.

Wang, J., Shao, Y., Bennett, T., Shankar, R., Wightman, P. and Reddy, L. The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem.* 2006. 281(49): 37427-37434.

Wang, J. Understanding the role of NF-kappaB RelA subunit in TLR and RLR pathways. 2010. Ph. D. Columbia University. 157. <http://udini.proquest.com/view/understanding-the-role-of-nf-kappab-goid:205439938/>.

Webb, D., Cai, Y., Matthaei, K. and Foster, P. Comparative roles of IL-4, IL-13, and IL-4Ralpha in dendritic cell maturation and CD4⁺ Th2 cell function. *J Immunol.* 2007 Jan 1; 178(1):219-27.

Wong, J., Christopher, M., Viswanathan, S., Karpoff, N., Dai, X., Das, D., Sun, L., Wang, M. and Salazar, A. Activation of toll-like receptor signaling pathway for protection against influenza virus infection. *Vaccine.* 2009. 27:3481–3.

Wu, X. and Peng, S. Toll-like receptor 9 signaling protects against murine lupus. *Arthritis Rheum.* 2006. 54(1):336-42.

Wu, L. and Liu, Y. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* 2007. 26:741-50.

Wu, H., Sawaya, H., Binstadt, B., Brickelmaier, M., Blasius, A., Gorelik, L., Mahmood, U., Weissleder, R., Carulli, J., Benoist, C. and Mathis D. Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med.* 2007. 204(8):1911-22.

Wulfaenger J, Niedling S, Riemann D. and Seliger, B. Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion. *Mol Membr Biol.* 2008. 25(1):72-82.

Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. and Mori, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem.* 2010. 147(6): 781-792.

ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

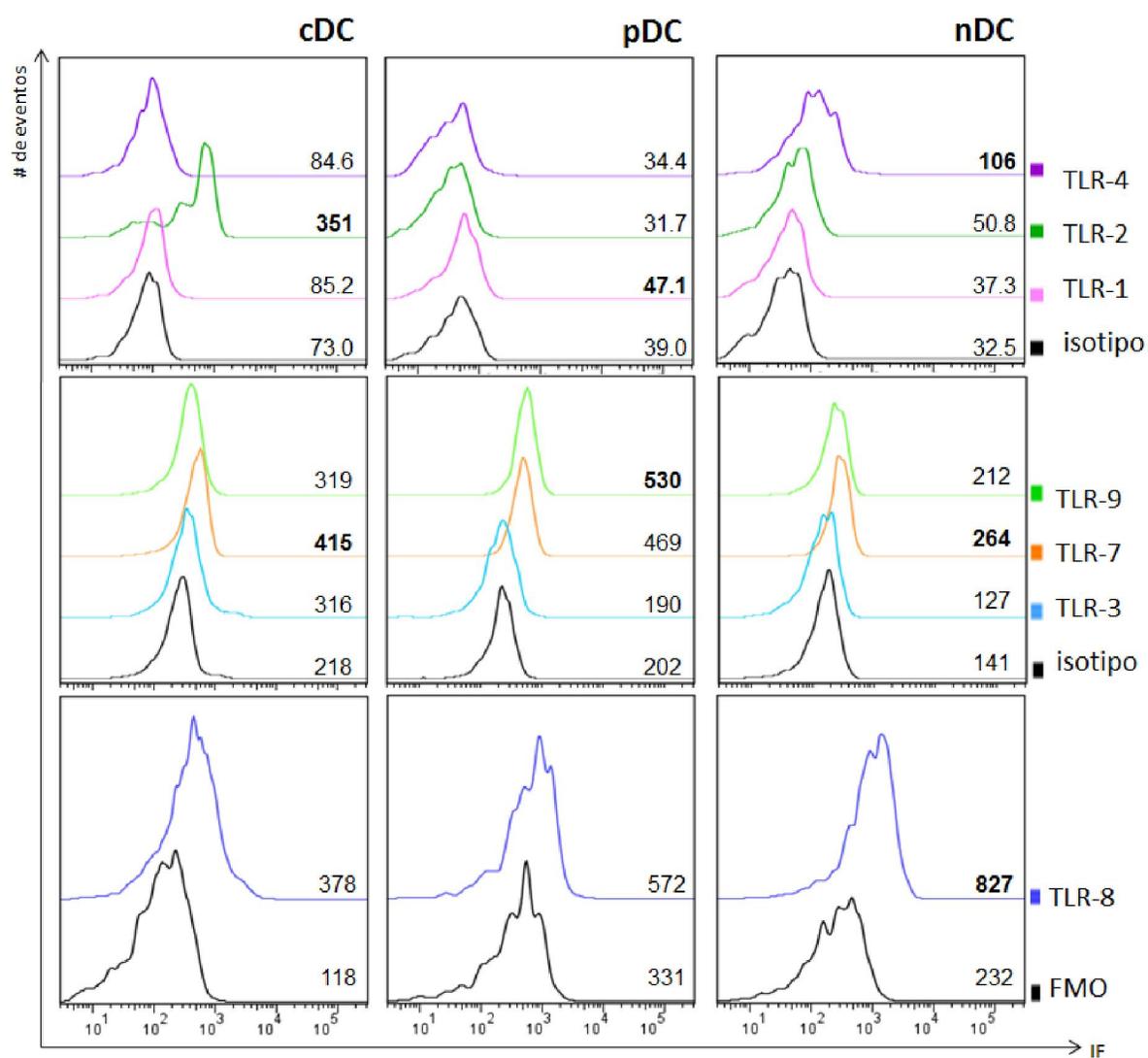


Figura I. Expresión basal de TLRs 1, 2, 3, 4, 7, 8 y 9 a nivel de proteína en poblaciones Lin⁻. Los histogramas mostrados son representativos de 6 ó 7 experimentos independientes (3 en el caso del TLR-7). Los valores de la intensidad media geométrica de fluorescencia (IMGF) se indican en el extremo derecho de cada histograma.

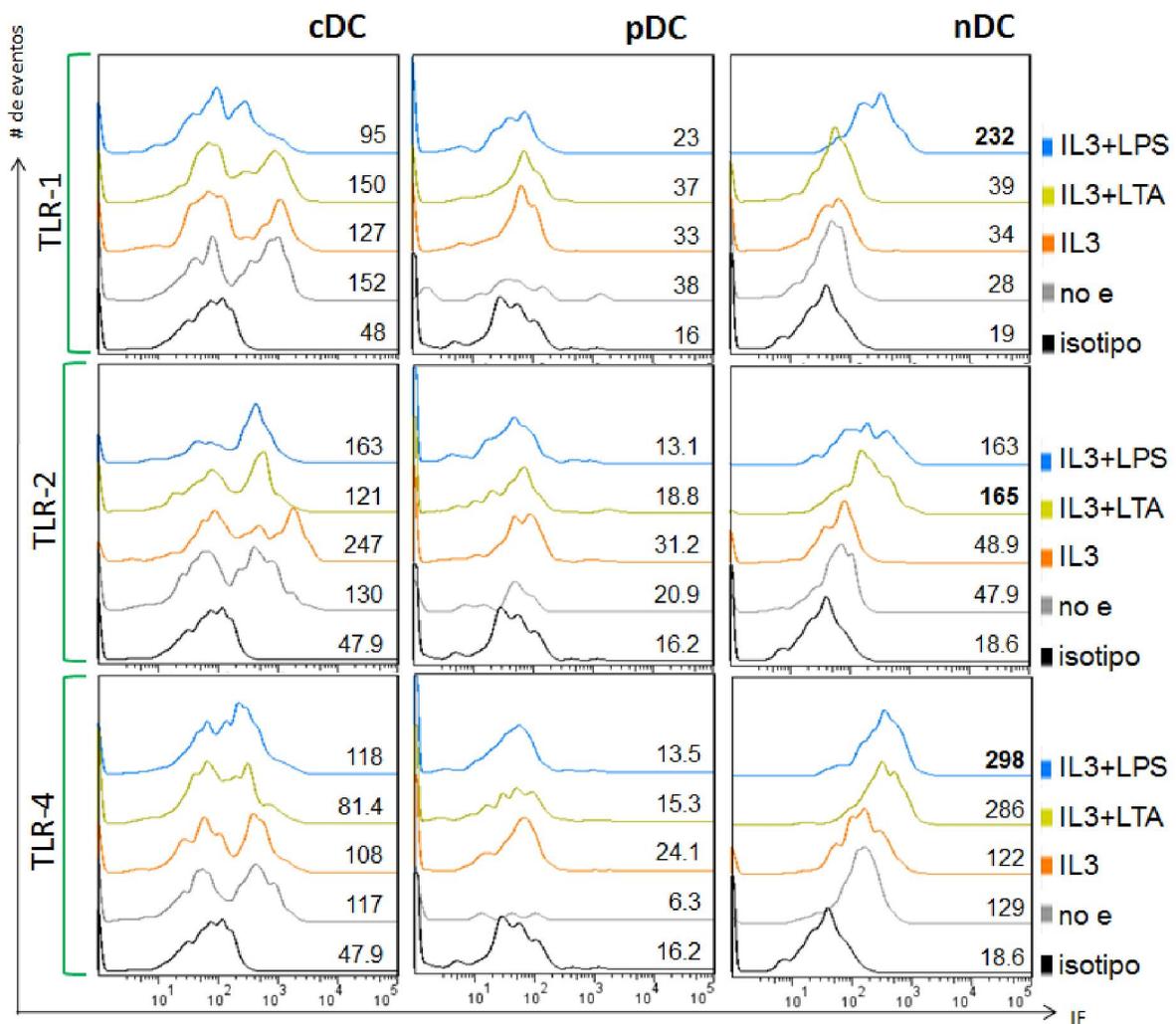


Figura II. Expresión de TLRs de superficie en células Lin- después de cultivo. Se muestra la expresión de TLR-1, 2 y 4 en las distintas poblaciones después de 20 h de cultivo bajo distintos estímulos. Los histogramas mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores de IMGF se indican en el extremo derecho de cada histograma.

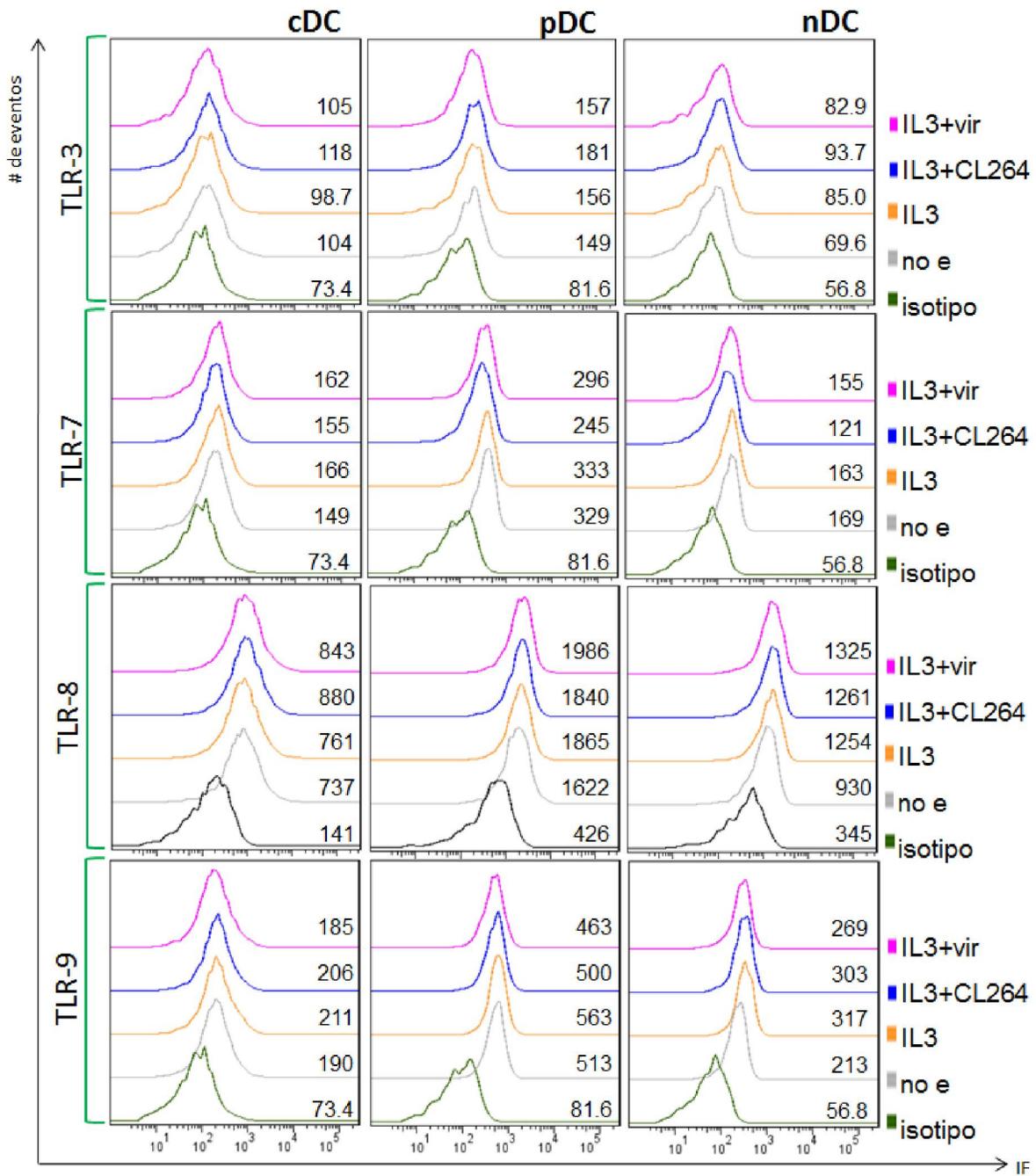


Figura III. Expresión de TLRs intracelulares en células Lin⁻ después de cultivo. Se muestra la expresión de TLR-3, 7, 8 y 9 en las tres poblaciones estudiadas después de cultivarlas 18 h con distintos estímulos. Los histogramas mostrados son representativos de 2 experimentos independientes. Los valores de IMGF se indican en el extremo derecho de cada histograma.

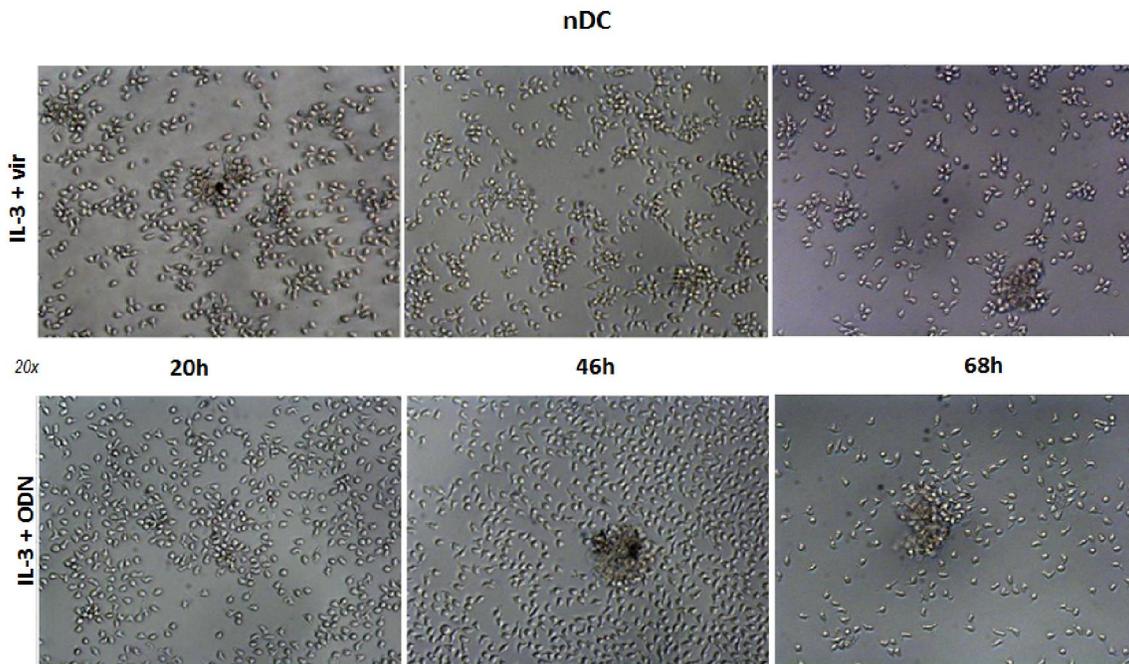


Figura IV. Morfología de la población nDC a través del tiempo después de cultivo con ligandos de TLRs. Se muestran los cambios morfológicos de las nDC a distintos tiempos de cultivo con IL-3 en presencia de virus u ODN. El aumento al que fueron capturadas las imágenes se indica en el extremo central izquierdo.

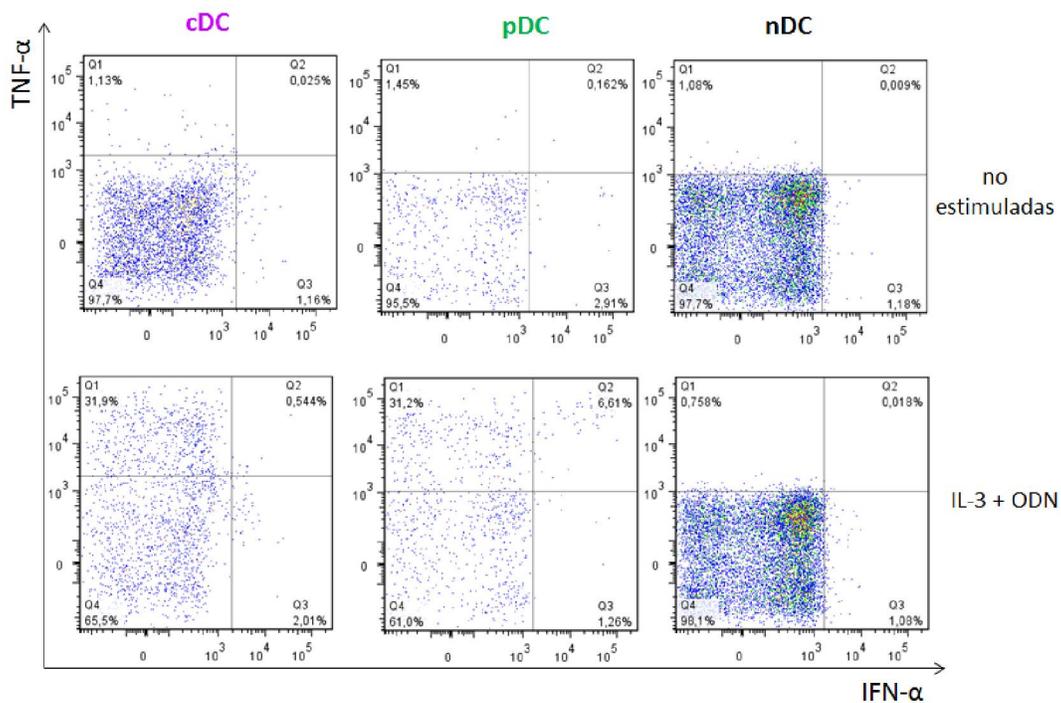


Figura V. Expresión de TNF- α e IFN- α intracelular en las nDC después del cultivo *in vitro* en comparación con las pDC y cDC. Se muestra la expresión de las citocinas las tres poblaciones después de estimularlas por 18 h con IL-3 sola o en presencia de ligandos de TLRs.

MEDIOS

A. Medio RPMI

Se utilizó medio RPMI comercial (GIBCO®) suplementado con suero fetal bovino al 10 % descomplementado, HEPES 1 M, penicilina, estreptomycin, ciprofloxacino, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y piruvato.

SOLUCIONES

B. Amortiguadora de fosfatos (PBS) 10X

NaCl 140 mM, KCl 2.1 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM.

Para 1L: disolver 82 g de cloruro de sodio, 1.56 g de cloruro de potasio, 11.5 g de fosfato disódico anhidro y 3.42 g de fosfato de potasio monobásico en 900 mL de H₂O, ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con HCl 1 M y llevar a volumen. Esterilizar por calor húmedo a 121 °C por 15 min a 15 lb/in² y almacenar a temperatura ambiente

C. Solución FACS

EDTA 5 mM, NaN₃ 0.05 %, suero de caballo 2 %.

Para 1L: adicionar 10 mL de suero de caballo, 5 mL de EDTA 0.5 M y 1.25 mL de azida de sodio 20% a 484 mL de PBS 1X. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenar a 4 °C.

D. Solución MACS

EDTA 2 mM, BSA 0.5%.

Para 1L: adicionar 5 g de BSA y 4 mL de EDTA 0.5 M a 486 mL de PBS 1X. Ajustar a pH 7.2 con HCl 1 M, esterilizar por filtración con membrana de 0.22 µm y almacenar a 4 °C.

E. Gel de Agarosa (2 % w/v)

Para 30 mL: disolver 0.6 g de agarosa (grado biología molecular) en 30 mL de buffer de corrida TBE 1X y fundir en horno de microondas (evitar pérdidas de volumen). Una vez fundida la agarosa, dejar atemperar un poco y agregar 3 µL de colorante GelRed 10000X (BiotiumTM), mezclar bien, verter sobre una base para gel previamente montada con peines y dejar gelificar por 10 – 15 min.

F. Amortiguadora de corrida TBE 10X

Tris base 0.89 M, H₃BO₃ 0.89 M, EDTA 0.02 M.

Para 1L: disolver 108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico y 40 mL de EDTA 0.5 M en 900 mL de H₂O, ajustar a pH 8.3 y llevar a volumen. Almacenar a temperatura ambiente. El TBE 1X debe tener un pH entre 8.2 – 8.4.

G. Amortiguadora de carga para RNA 2X

Formamida 95 % w/v, SDS 0.025 % w/v, azul de bromofenol 0.025 % w/v, xilen cianol FF 0.025 % w/v, EDTA 0.5 mM.

Disolver en H₂O y almacenar protegido de la luz a 4 °C (a -20 °C por periodos más largos). Para preparar la muestra, se mezcla en relación 1:1.

H. Amortiguadora de carga para DNA 6X

Azul de bromofenol 0.25 % w/v, xilen cianol FF 0.25 % w/v, glicerol 30% v/v

Disolver el azul de bromofenol en 6.7 mL H₂O, agregar xilen cianol y glicerol y mezclar, almacenar protegido de la luz a 4 °C (a -20 °C por periodos más largos). Para preparar la muestra, se mezcla en relación 1:5.

I. Amortiguadora “B”

Solución comercial 10X (Fermentas) con (NH₄)₂SO₄ 200mM, Tris-HCl (pH 8.8) 750 mM, y Tween 20 al 0.1% (v/v).

J. Amortiguadora “Inv”

Solución comercial 10X (Invitrogen) con KCl 500 mM y Tris HCl (pH 8.4) 200 mM.

TÉCNICAS DE LABORATORIO

K. Tinción de inmunofluorescencia

El paquete celular obtenido se resuspendió en solución FACS (fluorescence-activated cell sorting) y las PBMCs se repartieron en una placa de 96 pozos para realizar tinciones de inmunofluorescencia correspondientes. La incubación de células en solución FACS a 4°C por 15 min tiene la finalidad de bloquear los receptores Fc para evitar el pegado inespecífico de anticuerpos.

Anticuerpo	Conjugado a:
Lin - (CD3, CD19, CD14, CD56) ^a	PE (Ficoeritrina)
HLA-DR ^b	APC-Cy7 (Alofocianina-Cy7)
CD123 ^b	PE-Cy5 (Ficoeritrina-Cy5)
TLR-1 ^c , TLR-2 ^d , TLR-4 ^c TLR-3 ^a , TLR-7 ^c , TLR-9 ^a TLR-8 ^c	FITC (isotiocianato de fluoresceína), AF 488, PE biotina
M-DC8 ^f BDCA-1 ^f	biotina APC (Alofocianina)
CD86 ^b , CD80 ^b , CD83 ^a , B7-H1 ^a , PD-L2 ^b	FITC biotina

a. eBioscience, b. BDBioscience, c. InvivoGen, d. Invitrogen, e. Imgenex, f. Miltenyi Biotec

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

Las tinciones se realizaron incubando con las diferentes combinaciones de anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos en solución FACS, después de cada incubación se realizaron dos lavados con la misma solución para eliminar el exceso de anticuerpos.

Los paneles con la combinación de marcadores utilizada para realizar las tinciones se muestran en la siguiente tabla:

Panel	Anticuerpo	Conjugado a:
A	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-1	PE APC-Cy7 PE-Cy5 FITC
B	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-2	PE APC-Cy7 PE-Cy5 AF 488
C	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-4	PE APC-Cy7 PE-Cy5 AF 488
D	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-3 TLR-8	FITC APC-Cy7 PE-Cy5 PE biotina

E	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-7	FITC APC-Cy7 PE-Cy5 PE
F	Lin -, HLA-DR, CD123, TLR-9	FITC APC-Cy7 PE-Cy5 PE

Cuando se partió de una cantidad inicial mayor a 1×10^6 células se realizó la tinción para evaluar la viabilidad de las células analizadas, como se describe a continuación. Después de realizar la tinción, se hizo un lavado y se tiñó con el colorante vital Hoechst33342 a 4°C por 5 min, transcurrido el tiempo se realizaron dos lavados con FACS. Finalmente las células se fijaron incubando con paraformaldehído al 4% a 4°C por 20 min, se hizo un lavado con FACS, las células se resuspendieron en FACS y se almacenaron a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis en el citómetro de flujo.

Para las tinciones intracelulares, después de la tinción de superficie las células se trataron por 30 min a 4°C con solución de permeabilización y fijación (BD Cytotfix/Cytoperm™) y se lavaron con solución permeabilizadora 1X (BD Perm/Wash™). A continuación, se realizó la tinción intracelular (la mezcla de los anticuerpos correspondientes se preparó en solución permeabilizadora 1X) incubando por 30 min a temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Por último, se realizaron dos lavados con la misma solución para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células se resuspendieron en FACS y se almacenaron a 4°C protegidas de la luz hasta su análisis por citometría de flujo.

El análisis de las células se realizó por citometría de flujo de 7 u 8 colores, utilizando un citómetro BD FACS Aria. El análisis de datos de citometría de flujo se realizó con el software FlowJo (Tree Star Inc.).

L. PCR

Colocar $1 \mu\text{L}$ de cDNA en el fondo de un tubo de PCR previamente enfriado a 4°C y preparar la mezcla de reacción correspondiente. Mezclar bien el cDNA con la mezcla de reacción, dar spin a tubo de reacción y colocar en el termociclador. En todos los casos, se corrió el siguiente programa de amplificación:

1. 94 °C 3 min
2. 94 °C 35 s
3. T_{hibridación} 25 ó 30 s
4. 72 °C 35 ó 40 s
5. # ciclos
6. 72 °C 10 min
7. ∞ 4 °C

La mezcla de reacción para PCR se preparó con agua libre de RNAsas (grado Biología Molecular, Sigma), buffer de PCR, MgCl₂ 1.0 – 1.75 mM, dNTPs 0.2 mM, primers (F y R) 0.15 - 0.2 μM y Taq ADN polimerasa (recombinante) 0.075 U/μL.

Las condiciones de PCR se ajustaron para amplificar partiendo de 100 ng de cDNA de acuerdo a la siguiente tabla:

gen	buffer ^{a, b}	[MgCl ₂] (mM) ^c	tiempo de hi- bridación (s) ^d	T de hibrida- ción (°C)	# de ciclos de PCR
GAPDH	B	1.0	25	59	30
TLR-1	Inv	1.0	30	60	37
TLR-2	Inv	1.0	25	60	30
TLR-3	B	1.25	30	55	37
TLR-4	B	1.5	30	57	30
TLR-5	Inv + B	1.75	30	57	33
TLR-6	B	1.0	30	58	37
TLR-7	Inv	1.5	30	57	33
TLR-8	Inv	1.0	30	57	33
TLR-9	B	1.25	25	57	34
TLR-10	Inv	1.0	30	57	37

^a: las mezclas de reacción se prepararon con: dNTPs 10mM cada uno y Taq polimerasa recombinante 5 U/μL (ambos de Fermentas)

^b: los componentes de los buffer “B” e “Inv” se indican en los incisos I y J de la sección anexos.

^c: concentración final (mM) de MgCl₂ en la mezcla de reacción; se usó solución de trabajo 25 mM (Fermentas).

^d: la concentración final de los primers (Forward y Reverse) en la mezcla de reacción fue 0.15 y 0.2 μM para TLR1-10 y GAPDH, respectivamente; se utilizaron soluciones de trabajo 10 μM.

Las secuencias de los primers utilizados para los genes estudiados fueron:

	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
GAPDH	ACCATCTTCCAGGAGCGAGAT	AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
TLR		
1	CGTAAACTGGAAGCTTTGCAAGA	CCTTGGGCCATTCCAATAAGTCC
2	GGCCAGCAAATTACCTGTGTG	TGGTGTCATTATCTTCCGCA
3	ATTGGGTCTGGGAACATTTCTCTTC	GTGAGATTTAAACATTCTCTTCGC
4	TGAGCAGTCGTGCTGGTATC	CAGGGCTTTTCTGAGTCGTC
5	CATTGTATGCACTGTCACTC	CCACCACCATGATGAGAGCA
6	TAGGTCTCATGACGAAGGAT	GGCCACTGCAAATAAGTCCG
7	AGTGTCTAAAGAACCTGG	CTTGGCCTTACAGAAATG
8	CAGAATAGCAGGCGTAACACATCA	AATGTCACAGGTGCATTCAAAGGG
9	TTATGGACTTCCTGCTGGAGGTGC	CTGCGTTTTGTCGAAGACCA
10	CAATCTAGAGAAGGAAGATGGTTC	GCCCTTATAAACTTGTGAAGGTGT

M. Extracción de DNA

Se utilizó un kit comercial (Wizard® genomic DNA purification kit de Promega) y se realizó la extracción de DNA genómico (DNAg) a partir de sangre periférica de individuos sanos de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. El DNA se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop ND-2000, Thermo Fisher Scientific Inc.) y se obtuvieron las relaciones A260/A280 y A260/A230 para verificar pureza del DNA extraído. Se corrió un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed para corroborar la calidad del DNA (que no estuviera degradado). Una vez que se verificó la integridad del DNAg extraído, se hizo un pool y se almacenó en refrigeración.

N. Preparación del complejo LL37DNA

El complejo del péptido LL37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES, Innovagen) con DNA genómico (DNAg) se preparó mezclándolos a una relación de 16:1, de manera que 15 µg de LL37 se mezclaron con 1 µg de DNAg y se llevó a un volumen final de 10 µL con medio RPMI suplementado. La mezcla se incubó por 30 min a TA (22-27 °C) y se agregó al cultivo, con 290 uL de medio RPMI, de modo que en el cultivo el

LL37 y el DNAg se utilizaron a una concentración final de 50 µg/mL y 3.3 µg/mL, respectivamente.

La actividad biológica se vio por el complejo LL37DNA y no por el péptido o el ácido nucleico por separado, ya que no se observaron cambios en la expresión de moléculas de superficie (como CD86 o PD-L2) en la población nDC de los cultivos realizados con células Lin- enriquecidas en presencia únicamente de LL37 o DNA genómico; tampoco se detectaron cambios morfológicos ni formación de agregados celulares en estos cultivos.

O. Detección de citocinas

Los sobrenadantes de los cultivos almacenados a -80°C se descongelaron para realizar la detección de citocinas por ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

La cantidad de TGF-β1 producida se determinó mediante un ELISA de alta sensibilidad (eBioscience) en un volumen de muestra de 70 µL siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Mediante esta misma técnica se confirmó la producción de IL-8 (BD OPTeia). La detección de otras citocinas se determinó por ensayo multiplex (FlowCytomix, eBioscience) mediante citometría de flujo a partir de un volumen de muestra de 25 µL siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.