

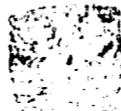
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

**"EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE  
PATRONES EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS  
MURINAS DURANTE EL PERÍODO NEONATAL"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**MIGUEL ANGEL BECERRIL GARCÍA**

ASESORES: Dr. LEOPOLDO FLORES ROMO

M. en C. MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA

CUAUTTLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX. 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA IT  
MEXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Expresión de receptores de reconocimiento de patrones en las  
células dendríticas epidérmicas murinas durante el período  
neonatal.

que presenta el pasante: Miguel Angel Becerril García  
con número de cuenta: 9401179-9 para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Junio de 2002.

PRESIDENTE Dra. Susana E. Mendoza Elvira

VOCAL Dr. Víctor M. Zendejas Buitrón

SECRETARIO M. en C. Mónica Berenice Heras Chavarría

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Angel G. Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Gabriela Escalante Reynoso

*Estudia como si fueras a vivir  
siempre, vive como si fueras a  
morir mañana.*

*San Isidro de Sevilla*

## AGRADECIMIENTOS:

Dr. Leopoldo Flores Romo: Por haberme brindado la extraordinaria oportunidad de trabajar en su laboratorio, gracias por su paciencia y confianza.

M. en C. Mónica B. Heras Chavarria: Gracias por el tiempo, las enseñanzas y toda esa dedicación para que este trabajo se realizara.

Q. B. P. Juana Calderón Amador: Sin lugar a dudas un aspecto importante es la formación, por lo cual estaré eternamente agradecido.

A todos los demás integrantes del laboratorio de Inmunología Celular (Adriana, Rene, Rafael, Raquel, Oscar, Juan Carlos, Yahir, Gina, Alex y Selene) por ser excelentes compañeros y haber participado de alguna manera en la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

Especialmente a mis padres, únicos responsables de todo lo que he logrado hasta ahora, muchas gracias por todo el apoyo, cariño, comprensión y sacrificio hacia nosotros.

A mis hermanos (Claudia y Victor) por ser excelentes compañeros y grandes amigos, (Marco A.D) por que me hubiera gustado que estuviéramos y compartiéramos esto con nosotros.

A Gloria por haber recorrido todos estos años juntos y ser una maravillosa mujer, representando uno de los motivos más significativos en mi vida para seguir adelante.

A mi familia especialmente a mi tía Paulina y mis padrinos (Virginia y Eduardo) por haber permanecido siempre cerca.

A "La Vancka" porque fueron, son y serán siempre mis mejores amigos.

A mis amigos y amigas de la Facultad especialmente a Eva, Laura y todo el grupo de los "Espermínes". Gracias por todo muchachos.

## INDICE

INDICE	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
RESUMEN	7
1.0. INTRODUCCIÓN	8
1.1. PIEL (ESTRUCTURA HISTOLÓGICA GENERAL)	11
1.1.1 EPIDERMIS	12
1.1.2 DERMIS	14
1.1.3 SISTEMA INMUNE CUTÁNEO	15
1.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATOGENOS	17
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS	18
1.3.1 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	21
1.3.2 CÉLULAS DE LANGERHANS	24
1.3.3 CAPTURA DE ANTÍGENOS	27
1.3.4 PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS	29
1.3.5 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE II	29
1.3.6 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I	31
1.3.7 MOLÉCULAS CD1	33
1.3.8 MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	33
1.3.9 INTERACCIÓN ENTRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LOS LINFOCITOS	36
2. JUSTIFICACIÓN	39
3.0 OBJETIVO GENERAL	40
3.1 OBJETIVOS PARTICULARES	40
4. MATERIALES Y METODOS	41
5. RESULTADOS	44
6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	49
7. CONCLUSIONES	54
8. PERSPECTIVAS	55
9. APENDICE	56
REFERENCIAS	58

## **Lista de abreviaturas**

ADP	Adenosindifosfato
ATP	Adenosintrifosfato
CC	Quimiocina CC (2 cisteínas consecutivas en su secuencia)
CCR	Receptor para quimiocinas CC
CLA	Antígeno leucocítico cutáneo
CPA	Célula presentadora de antígenos
CXC	Quimiocina CXC (cisteína-aminoácido-cisteína)
CXCR	Receptor para quimiocina CXC
DC	Célula(s) dendrítica(s)
DETC	Células T dendríticas epidérmicas
DDC	Células dendríticas dérmicas
Fc $\gamma$ R	Receptor para la fracción cristalizable gamma
Fc $\epsilon$ R	Receptor para la fracción cristalizable epsilon
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Flt-3-L	Receptor para factores de crecimiento en células hematopoyéticas
GB	Gránulos Birbeck
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rabano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón

IL	Interleucina
LC	Célula(s) de Langerhans
LPS	Lipopolisacárido
LTA	Ácidos lipoteicoicos
LTC	Linfocito T citotóxico (CD8 <sup>+</sup> )
LTh	Linfocito T cooperador (CD4 <sup>+</sup> )
MARCO	Receptor con estructura colagenosa expresado en macrófagos
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos (Quimiocina CC)
M-CSF	factor estimulador de colonias de monocitos
M-CSFR	Receptor de M-CSF
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIP	proteína inflamatoria de macrófagos (Quimiocina CC)
mLDL	Lipoproteínas de baja densidad modificada
MLR	Reacción mixta de linfocitos
MMP	Metaloproteasas
NF- $\kappa$ $\beta$	Factor nuclear $\kappa$ $\beta$
NK	Natural Killer
PAMP's	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR's	Receptores de PAMP's
RANK	Receptor activador del NF- $\kappa$ $\beta$
RANTES	Pertenece al grupo de quimiocinas CC
SCF	Factor de células estaminales
SDF-1	Pertenece al grupo de las quimiocinas CXC

SR	Receptor scavenger
TAP	Proteína transportadora de antígenos
TCR	Receptor de célula T
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TLR	Receptores "Toll-like"
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRANCE	Citocina inducida por activación relacionada al factor de necrosis tumoral



## RESULTADOS

Tabla 1. Expresión de distintos marcadores en la epidermis de ratones neonatos y adultos.

Gráfica1. Densidades de las DC epidérmicas para los marcadores estudiados en el periodo neonatal (día 0).

Tabla 2. Densidades de los marcadores de las DC estudiados expresados como células<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>.

Figura 1. Expresión de SR y CD14 en la epidermis de ratones neonatos (0 días de edad).

Figura 2. Las DC epidérmicas que expresan SR y CD14 tienen una distribución homogénea.

Figura 3. Las DC SR<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> tienen actividad de ATPasa.

## RESUMEN

En la epidermis del ratón adulto existen dos poblaciones de células con morfología dendrítica: células de Langerhans y DETC. Las células de Langerhans de adulto expresan MHC CII, DEC 205 y ATPasa, mientras que las de neonatos (día 0) parecen tener un fenotipo inmaduro ya que muy pocas células ATPasa<sup>+</sup> expresan CII. En el presente trabajo se estudió la expresión de ciertos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR's) en epidermis de ratones BALB/c adultos y neonatos, utilizando anticuerpos para los siguientes marcadores: DEC 205, Receptor scavenger (SR) y CD14. En los ratones neonatos se encontraron células SR<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> con morfología dendrítica típica que además tienen actividad de ATPasa; pero no se encontraron células que expresaran DEC205. Por otro lado, en ratones adultos se observó la expresión de DEC 205, pero no se encontraron células positivas para ninguno de los PRR's estudiados. Se desconoce el origen y función de las células dendríticas que expresan estos marcadores (SR y CD14) en la epidermis de los ratones neonatos. Cabe la posibilidad, dado que estos son marcadores también de monocitos, que estas DC puedan ser de un linaje similar o paralelo al mielóide. También existe la probabilidad de que la desaparición de los marcadores en las células de los animales adultos pueda deberse a la muerte de las células que los expresan, o a la simple disminución en la expresión de éstos. Sería interesante conocer como podrían afectar estos sucesos el papel de las DC durante el período perinatal temprano. Estos resultados representan el inicio de una línea de trabajo sobre el estudio de la inmunidad en el período neonatal in vivo.

## 1.0. INTRODUCCIÓN

Los animales superiores están expuestos a una gran variedad de microorganismos y compuestos extraños, pero poseen sistemas de defensa frente a tales patógenos que les permite mantener un equilibrio; dichos mecanismos tienden a distinguir lo propio de lo extraño. El sistema inmune es el conjunto de mecanismos que los animales presentan frente a agentes externos extraños (Abbas 1999). Dos sistemas generales de la respuesta inmune contra agentes infecciosos han sido seleccionados durante la evolución: inmunidad innata (inespecífica o natural) e inmunidad adquirida (específica o adaptativa) (Santos-Argumedo 1994).

Los elementos esenciales de la inmunidad innata son: 1) barreras físicas, químicas y biológicas como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en superficies epiteliales; 2) proteínas sanguíneas entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; 3) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), y otros leucocitos como las células natural killer ("NK"). La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los microorganismos y otras sustancias extrañas (Douglas 1996).

Las características fundamentales de la inmunidad adaptativa son: alta especificidad para moléculas diferentes; especialización, que las capacita para responder de forma adecuada a distintos retos antigénicos; y capacidad para "recordar" y responder con mayor fuerza tras exposiciones repetidas al mismo antígeno. Los componentes de la inmunidad específica son los linfocitos y sus productos, entre ellos los anticuerpos, básicamente la respuesta inmune adaptativa es clonal (Douglas 1996).

Los mecanismos de las respuestas inmunes innata y específica forman un sistema integral de defensa en el hospedero, en el que existe una cooperación funcional de numerosas células y moléculas.

Durante la etapa neonatal es muy frecuente la alta susceptibilidad a infecciones. Estudios realizados en hospitales mexicanos muestran que en las unidades de terapia intensiva pediátrica, el 51.9% de los ingresos es afectado por infecciones nosocomiales, mientras en el servicio de neonatología la cifra es de 44.9%, siendo estos dos los que presentan mayor porcentaje en comparación con otros (Medicina interna 15.8%; Cirugía 5.9%; Ginecobstetricia 2.6%; Pediatría 4.2%) (Tinoco 1997). Se sabe que algunos componentes celulares del sistema inmune tienen reducidas algunas de sus funciones. Tradicionalmente se ha atribuido este problema a la inmadurez de linfocitos y monocitos en neonatos, comparando con las células de adultos (Harris 1992; Taylor 1985; Tucci 1991). Sin embargo, se ha visto que los linfocitos T neonatales son capaces de cooperar en la producción de anticuerpos con los linfocitos B de adultos (Astori 1998), además de que en condiciones óptimas de estimulación los linfocitos T "vírgenes" neonatales son igualmente competentes para producir el perfil de citocinas que los linfocitos T adultos. Recientemente se han iniciado estudios en los cuales se ha prestado atención a otras células que regulan y estimulan la inmunidad específica, como las células dendríticas (DC).

Localizadas estratégicamente en tejidos periféricos no linfoides como piel y mucosas, donde cotidianamente ocurre la mayor exposición antigénica y en donde bajo condiciones normales no hay linfocitos, las células dendríticas (DC) son consideradas parte de la respuesta inmune innata y desempeñan funciones cruciales para iniciar la respuesta inmune específica: a) La captura de antígenos de origen diverso (microbianos variados como parásitos, virales y otros como antígenos químicos, celulares, etc.); b) El procesamiento de dichos antígenos (las DC tienen la capacidad de procesar antígenos tanto endógenos como exógenos); c) El transporte de los mismos desde la periferia hasta compartimentos muy específicos dentro del tejido linfoide.; d) La presentación de dichos antígenos a los escasos linfocitos antígeno específicos. Las DC expresan de manera abundante las moléculas requeridas para utilizar cualquiera de las 3 vías conocidas para presentación de antígenos: MHC clase I (antígenos endógenos protéicos

y glicoprotéicos), MHC clase II (antígenos exógenos protéicos y glicoprotéicos) y CD1 (antígenos de naturaleza lipídica) (Banchereau y Steinman 1998; Banchereau 1995).

Las DC por tanto se consideran las células centinelas por excelencia, son las únicas células presentadoras de antígenos (CPA) capaces de activar fuertemente linfocitos T vírgenes y por lo tanto de iniciar vigorosas respuestas inmunes de novo (Banchereau y Steinman 1998).

Pese a la gran cantidad de trabajos sobre las DC, aún hay muchos aspectos básicos por investigar. A pesar de que se conocen varias maneras de generar DC in vitro (Banchereau y Steinman 1998; Caux 1994; Flores-Romo 1997), se desconocen los mecanismos operantes in vivo. También se desconoce como se regula la colonización de tejidos periféricos por las DC o por precursores durante el desarrollo ontogénico, así como los mecanismos precisos de la movilización de las DC periféricas hacia los tejidos linfáticos (Kripke 1990; Moodycliffe 2000).

En comparación con los animales adultos existen pocos reportes sobre la funcionalidad de las DC en neonatos, los cuales señalan que las DC (humanas) generadas de sangre de cordón estimulan débilmente la reacción de cultivo mixto de linfocitos y la proliferación clonal de los linfocitos T (Hunt 1994; Petty 1998). También se ha visto que la capacidad endocítica de las DC obtenidas a partir de monocitos de sangre de cordón se vé disminuida, lo cual se relaciona con la menor expresión del receptor de manosa, además de expresar con menor intensidad moléculas como CD1a y MHC-II, comparadas con las DC de adulto (Liu 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el marcador DEC205 (análogo del receptor de manosa) no se expresa en DC de la epidermis de ratones neonatos, lo cual podría afectar la capacidad endocítica y su función presentadora de antígenos (Heras 2001).

Se requiere todavía de mucho trabajo respecto a la función y el fenotipo de las DC durante el período neonatal, es por eso que el siguiente proyecto tiene la finalidad de estudiar el fenotipo de las DC epidérmicas de ratón durante este periodo, comparando

con animales adultos la expresión de ciertos receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR's), moléculas importantes para el funcionamiento de las DC.

### 1.1. PIEL (ESTRUCTURA HISTOLÓGICA GENERAL)

La piel es el órgano más grande del cuerpo y la barrera física principal entre el organismo y el medio exterior. La piel puede dividirse en dos partes: una capa exterior conocida como EPIDERMIS y una capa interna conocida como DERMIS, la cual descansa sobre una capa de tejido conectivo laxo (Hipodermis) que varía de areolar a adiposo. La densidad y disposición de la capa subcutánea determina la movilidad de la piel (Figura 1A). La hipodermis a su vez, está adherida de forma laxa a una fascia profunda subyacente, o al periostio del hueso. En los labios, la nariz, los párpados, la vulva y el prepucio; la piel se continúa, a través de uniones mucocutáneas, con las membranas mucosas que revisten estas estructuras.

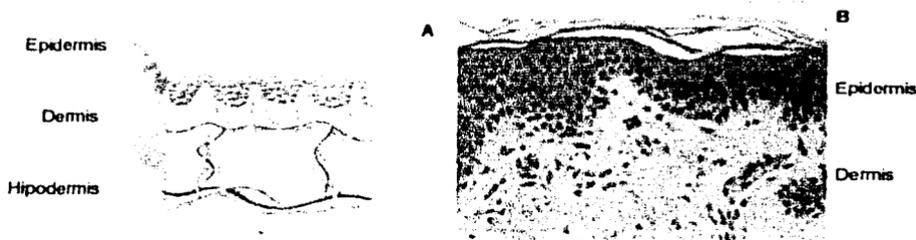


Figura 1. La piel esta formada por dos capas: Epidermis y Dermis

Las funciones específicas de la piel dependen principalmente de las propiedades de la epidermis. Este epitelio forma una cubierta ininterrumpida sobre toda la superficie del cuerpo, y se especializa localmente para formar las faneras, pelo y uñas. También da lugar a dos tipos de glándulas, una productora de la secreción acuosa, el sudor y la

otra, una secreción sebácea. Las propiedades de la piel se encuentran resumidas en la tabla 1. (Mckee 1994; Fawcett 1995)

- ▲ **Mantiene la integridad del cuerpo.**
- ▲ **Protege contra estímulos nocivos.**
- ▲ **Absorbe y excreta líquidos.**
- ▲ **Regula la temperatura.**
- ▲ **Es impermeable.**
- ▲ **Absorbe la luz ultravioleta.**
- ▲ **Detecta estímulos sensoriales.**
- ▲ **Actúa como una barrera contra microorganismos.**

**Tabla 1. Propiedades de la piel**

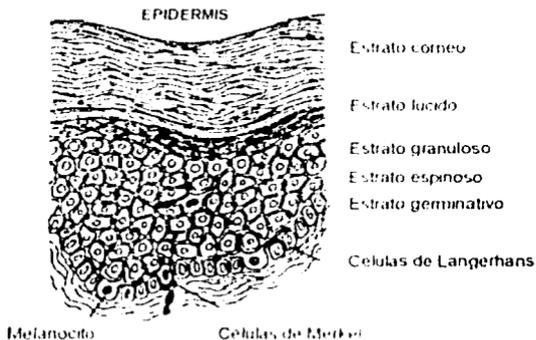
La superficie de la piel no es lisa sino que está marcada por surcos poco profundos que crean patrones que varían de una región a otra. De estos patrones, los más familiares son las crestas y surcos de las almohadillas de los dedos, que constituyen los dermatoglifos. Aquí, las crestas forman un patrón característicos en arcos, asas o verticilos que son los responsables de la individualidad de las huellas dactilares.

La interfase entre la epidermis y la dermis es también muy irregular. Un patrón intrincado de crestas y surcos por debajo de la epidermis se adaptan conforme a un patrón de surcos y crestas en la epidermis subyacente (Figura 1B). Las proyecciones de la dermis se denominan papilas dérmicas y las depresiones de la epidermis se han llamado, tradicionalmente, crestas interpapilares (Mckee 1994; Fawcett 1995).

### **1.1.1 Epidermis**

La epidermis deriva del ectodermo, es un epitelio estratificado escamoso queratinizado del cual surgen apéndices cutáneos, llamados folículos polisebáceos y glándulas sudoríparas. La epidermis está formada por queratinocitos, los cuales se renuevan continuamente por mitosis de las células de la capa basal (estrato germinativo). A medida que se forman nuevas células, éstas se desplazan lentamente hacia la superficie del epitelio. En su tránsito se diferencian, agrandan, y acumulan

cantidades crecientes de filamentos de queratina en su citoplasma. Además de los queratinocitos, los melanocitos, las células de Merkel y las células de Langerhans (LC) se localizan en la epidermis. Esta comprende cinco capas o estratos: a) estrato germinativo, b) estrato espinoso, c) estrato granuloso, d) estrato lúcido e) estrato córneo (Figura 2).



**Figura 2. Capas epidérmicas o estratos.**

El estrato germinativo se localiza inmediatamente después de la dermis, consta de una sola capa de células cilíndricas o cúbicas que contienen núcleos en muesca, limitados por un anillo de heterocromatina y con uno o dos nucleólos muy notables. Cada célula contiene prolongaciones citoplasmáticas cortas y delgadas en su cara basal. Estas prolongaciones penetran en invaginaciones y parecen anclar el epitelio a la dermis subyacente. La membrana plasmática relacionada con la lámina basal presenta muchos hemidesmosomas, los cuales se observan con frecuencia en las caras lateral y superior de las células y sirven para conservarlas unidas. En esta capa se observa mucha actividad mitótica, lo que da origen a nuevas células que son desplazadas hacia la capa superior (Fawcett 1995; Heras 2001).

El estrato espinoso consta de varias capas de células poliédricas irregulares, cuya superficie está cubierta de proyecciones citoplasmáticas cortas, que se unen con proyecciones similares en las células adyacentes formando puentes intercelulares. Su

citoplasma contiene múltiples haces de filamentos que forman las tonofibrillas, muchas de las cuales terminan en desmosomas en las proyecciones citoplasmáticas (Fawcett 1995; Heras 2001).

El estrato germinativo y el estrato espinoso en conjunto se considera como la capa de Malpighi; es en este sitio donde se encuentran los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel (Figura 2).

El estrato granuloso consta de tres a cinco capas de células aplanadas con núcleos vesiculares que carecen de nucleolos, prueba morfológica de la disminución de la actividad celular; su citoplasma contiene gránulos de queratohialina y queratinosomas. Al aumentar el tamaño y número de estos gránulos, los núcleos se hacen pálidos e imprecisos o faltan, y el citoplasma carece de mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas y aparato de Golgi (Fawcett 1995; Heras 2001).

El estrato córneo, está formado por células claras, muertas y semejantes a escamas que se aplanan y fusionan en forma progresiva. Las células córneas poseen un plasmalema engrosado con muchos pliegues que se interdigitan con las células vecinas, no tienen núcleo y el citoplasma contiene queratina blanda con poco contenido de azufre. Las capas más externas sufren descamación constante, de esta manera hay pérdida constante de células muertas que son sustituidas por células nuevas formadas como resultado de la mitosis en capas profundas (Fawcett 1995; Heras 2001).

### **1.1.2 Dermis**

Por debajo de la epidermis está la dermis o corion, una capa resistente de tejido conectivo que constituye la mayor parte del grosor de la piel. La compleja topografía de la unión dermoepidérmica no puede apreciarse completamente mediante el estudio de cortes histológicos. Sin embargo, la epidermis puede separarse de la dermis incubando una muestra de piel en una solución quelante de calcio como el EDTA. La dermis está formada por tejido conectivo denso de disposición irregular y se subdivide en dos estratos: 1) la capa papilar en contacto con la epidermis y 2) la capa reticular, debajo de ella. La capa papilar incluye las crestas y papilas que sobresalen hacia la epidermis,

tienden a presentarse en hileras dobles que con frecuencia están ramificadas. Algunas papilas contienen terminaciones nerviosas o poseen asas de vasos sanguíneos. Esta capa posee fibras de colágena, reticulares y elásticas delgadas dispuestas en una red extensa. Por el contrario, la capa reticular es el principal lecho fibroso de la dermis, consta de fibras de colágenas gruesas y entrelazadas, con las que se entremezclan algunas fibras reticulares y muchas fibras elásticas (Figura 3). En la dermis pueden encontrarse fibras musculares lisas, dispuestas en pequeños haces unidos de folículos pilosos. (Fawcett 1995; Heras 2001)



Figura 3. Componentes de la Dermis

### 1.1.3 Sistema inmune cutáneo

La piel presenta al ambiente una gran superficie continuamente expuesta a radiaciones, bacterias, parásitos, hongos y toxinas. Además de su función protectora mecánica, se ha demostrado en los últimos años que es parte integral del sistema inmune del organismo. El hallazgo en la epidermis de células que se enfrentan a sustancias antigénicas del ambiente no resulta sorprendente; observándose también una alta concentración de dichas células en la lámina propia del tubo digestivo, quizá para defenderse de microorganismos potencialmente dañinos. Durante varios años, se ha informado de la presencia de pequeñas cantidades de linfocitos en la epidermis, pero no se les atribuyó ningún significado en especial. Por otro lado se pensaba que la

función de los queratinocitos estaba limitada a la síntesis de queratina y de los componentes extracelulares de la barrera de permeabilidad, además se desconocía el significado de las células de Langerhans (Fawcett 1995). Actualmente se sabe que estas células forman parte de los componentes celulares que participan en la respuesta inmune, otorgándosele a la piel la acepción de tejido linfoide. En 1986, el grupo de Bos propuso el término sistema inmune de la piel ("SIS"), el cual se utiliza para describir a los componentes celulares y humorales presentes en la piel (Bos 1993).

Es posible que también los queratinocitos estén involucrados en diferentes alteraciones inmunológicas de la piel como activadores no específicos que responden a varios eventos dañinos. Estas células actúan como un transductor de señales pro-inflamatorias que responden a estímulos externos produciendo moléculas de adhesión y citocinas. En condiciones normales sintetizan algunas citocinas constitutivamente, pero su activación por distintos estímulos (dermatitis, radiación ultravioleta, traumas, etc.) conduce a la expresión de citocinas que afectan a las células circundantes. Además de esta función, los queratinocitos pueden presentar antígenos en el contexto moléculas MHC I (Bos 1993).

En la dermis se localiza un buen número de células cebadas de tejido conectivo, su principal característica es la expresión de receptores Fc $\epsilon$  y principalmente están involucradas en problemas alérgicos. Las células endoteliales de la microvasculatura juegan un papel importante controlando la extravasación de leucocitos expresando controladamente moléculas de adhesión e interaccionando con otras moléculas del sistema inmune en condiciones de inflamación (Bos 1993).

En la epidermis y dermis podemos encontrar células con morfología típica dendrítica, particularmente en la epidermis de ratones adultos se encuentran dos poblaciones: las células de Langerhans (LC) y las células T dendríticas epidérmicas (DETC), que forman parte de los linfocitos T  $\gamma\delta$  intraepiteliales. Ambas células expresan el antígeno leucocitario común (CD45), denotando su origen hematopoyético. Sin embargo a pesar de estas similitudes sus fenotipos son distintivos y realizan funciones diferentes (Heras 2001).

Las células dendríticas dérmicas (DDC) se encuentran en el área perivascular del plexus superficial, se caracterizan por tener el núcleo altamente arrugado. Las DDC carecen de antígenos característicos de células T, B y natural killer pero se caracterizan por expresar factor XIIIa, altos niveles de HLA-DR, HLA-DQ, CD1a, CD32, moléculas de coestimulación y adhesión como CD80, CD86 y CD83. La mayoría de estas células expresan marcadores mieloides (CD13 y CD33). Se han observado gránulos de Birbeck (estructuras características de las LC) y CD1a en las DDC cultivadas, aunque no se sabe si estas subpoblaciones de DDC pueden diferenciarse en LC (Meunier 1993; Nestle 1993-1995).

En la dermis del ratón existen dos poblaciones de DDC que se distinguen por la expresión de CD11b (antígeno monocítico). Ambas subpoblaciones expresan moléculas MHC CII y CD45 y solo algunas son DEC205<sup>+</sup> (Duraiwamy 1994).

## **1.2 RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATOGENOS**

El principal blanco de reconocimiento de la respuesta inmune innata son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's). Los PAMP's tienen varias características que son importantes para entender como se lleva a cabo dicho reconocimiento:

- Los PAMP's son estructuras moleculares producidas sólo por microorganismos patógenos.
- El reconocimiento de PAMP's por el sistema inmune innato se dá gracias a ciertos receptores exclusivos (PRR's), que le permiten distinguir entre estructuras propias y las estructuras patógenas no propias.
- Los PAMP's representan patrones moleculares conservados que son esenciales para la sobrevivencia de los microorganismos. El mejor ejemplo es el efecto bactericida de la penicilina, la cual inhibe la biosíntesis de peptidoglicano.
- Los PAMP's frecuentemente representan los llamados "códigos moleculares" de cierto patógeno en particular. Por ejemplo lipopolisacárido (LPS), ácidos lipoteicoicos (LTA), lipoarabinomanana y mananas son códigos de

reconocimiento para bacterias gram (-), gram (+) y hongos, respectivamente. Esta propiedad le permite al sistema inmune desplegar el mecanismo más eficiente para contrarrestar a una clase determinada de patógenos.

Los PRR's son proteínas estructuralmente y funcionalmente heterogéneas. Varios tipos de dominios de proteínas se encuentran involucrados, entre los más estudiados se encuentran: el dominio lectina tipo C, el dominio rico en cisteínas y la repetición rica en leucina del SR-A (Medzhitov 2000; Janeway Jr. 2002).

Funcionalmente, los PRR's pueden estar involucrados en: a) opsonización de bacterias y virus para fagocitosis, o la activación del sistema del complemento; b) captura de patógenos por fagocitos y células dendríticas; o, c) activación de señales que resultan en la transcripción de una variedad de citocinas inflamatorias y péptidos antimicrobianos.

A la fecha se han descrito una gran variedad de PRR's, entre los cuales podemos encontrar: lectina de unión a manana, proteína C reactiva, proteína de suero amiloide; secretadas todas por el hígado. Otro grupo se expresan en la superficie macrófagos y algunas poblaciones de DC como el receptor de manosa (MMR), DEC205, SR, CD14, receptores Fc, receptores "Toll-like", receptores de complemento y colectinas; dichas moléculas son cruciales para el funcionamiento de estas células (Medzhitov 2000; Janeway Jr. 2002).

### **1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas (DC) son un sistema de células presentadoras de antígenos (CPA) que destacan no sólo por sus capacidades de presentación sino también de costimulación y producción de citocinas (Banchereau y Steinman 1998; Steinman 1999). Estas células con características únicas como su morfología y movilidad, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo expresando fenotipos y posiblemente funciones diferentes (Steinman 1991; Banchereau y Steinman 1998). De este modo las DC integran todo un sistema, que de acuerdo a su localización se puede dividir en varias secciones (Heras 2001):

- DC localizadas en tejidos no linfoides (piel, epitelios y mucosas) y DC intersticiales distribuidas virtualmente en todos los órganos.
- DC en circulación: DC en sangre periférica y células veladas en la linfa aferente.
- Células interdigitantes en las áreas de células T en tejidos linfoides secundarios.
- DC en médula tímica.
- DC en folículos de células B, en los órganos linfoides secundarios.

Recientemente se ha propuesto un doble papel de las DC: amplificación de la respuesta inmune innata y la activación y dirección de la respuesta inmune adaptativa. Originados en la médula ósea, los progenitores de las DC se dispersan por la vía sanguínea hasta los tejidos no linfoides, donde se desarrollan a un estado considerado inmunológicamente inmaduro. Estas DC se caracterizan por tener altos niveles de vesículas citoplasmáticas ricas en MHC II (Ossevoort 95), poca o nula expresión de moléculas de coestimulación (presentan una pobre actividad de estimulación para los linfocitos T vírgenes), alta capacidad para capturar antígenos (expresando Fc $\gamma$ R y Fc $\epsilon$ R, así como receptores para endocitosis como los dominios lectina tipo C: receptor de manosa y DEC205) (Steinman 1991).

Una vez en contacto con los productos microbianos o mediadores inflamatorios, se promueve la migración de las DC vía la linfa aferente hacia los órganos linfoides secundarios correspondientes (dicha migración es dirigida, muy probablemente por receptores de quimiocinas), localizándose en las áreas de los linfocitos T. En estos sitios las DC se encuentran en un estado referido como inmunológicamente maduro ya que las células han sufrido un cambio dramático en sus propiedades: han perdido la habilidad para capturar antígenos (baja capacidad endocítica, y disminución en la expresión de receptores Fc), pero expresan altas cantidades de MHC CII en su membrana, y de moléculas de adhesión y coestimulación, adquiriendo una potente actividad estimuladora de los linfocitos T vírgenes (figura 4).

Al parecer las DC también tienen un papel importante en la inducción de tolerancia inmunológica. En particular, las DC tímicas presentan péptidos endógenos propios a los timocitos generados recientemente, permitiendo de este modo la eliminación de las células T autoreactivas; existe también evidencia del papel de las DC en el desarrollo de



Las investigaciones sobre las funciones de las DC han creado nuevas esperanzas para el desarrollo de vacunas celulares, terapias contra el cáncer y tratamientos para varias enfermedades infecciosas.

### 1.3.1 Origen de las células dendríticas

Actualmente se sabe que las DC pueden diferenciarse de diversos progenitores, también se sugiere que diferentes tipos de DC pueden ser generadas del mismo progenitor y que existen diferentes poblaciones de DC en los tejidos no linfoides, linfoides, en circulación sanguínea y linfática de humano y ratón (Grabbe 2000).

Diversos estudios han demostrado la existencia de un precursor mieloide tanto en humanos como en ratones (figura 5). En humano al cultivar células progenitoras CD34<sup>+</sup> obtenidas de médula ósea con GM-CSF y TNF $\alpha$ , se generan DC que expresan antígeno linfocítico cutáneo (CLA), y CD1a; bajo la influencia de TGF- $\beta$  se polariza la

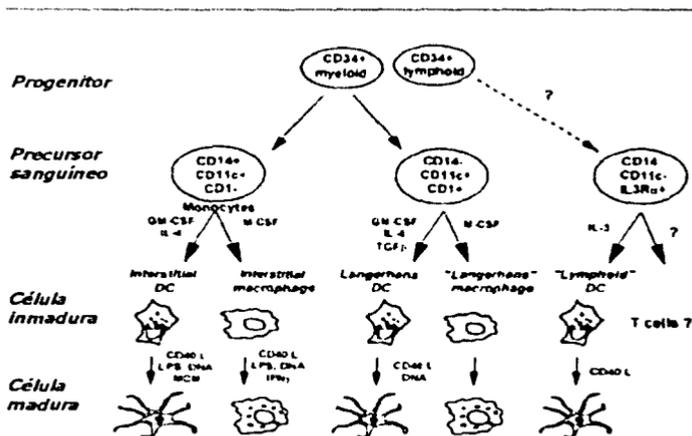


Figura 5. Desarrollo del linaje mieloide y linfóide de las DC.

diferenciación hacia DC con características de LC. Por otro lado, estas mismas células CD34<sup>+</sup> pueden diferenciarse a células CD14<sup>+</sup>, las cuales presentan el M-CSFR, y que en

presencia de M-CSF se diferencian a macrófagos, mientras que al cultivarlas en ausencia de esta citocina proliferan y se diferencian con características de DC de tipo intersticial CD1a<sup>+</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>, y CD68<sup>+</sup> (Vandenabeele y Wu 1999). Se pueden obtener en el ratón dos poblaciones de DC cultivando células progenitoras de médula ósea en con GM-CSF, TNF $\alpha$  y CSF (figura 5), generando células que se distinguen por la expresión de CD11b. Las células CD11b<sup>+</sup> expresan, homologamente al sistema humano el receptor M-CSF, dando origen tanto a macrófagos como a DC, mientras que las células CD11b<sup>-</sup> se diferencian a células con características de LC, expresando E-cadherina (Zhang 1999).

Los monocitos sanguíneos humanos CD14<sup>+</sup> son capaces de diferenciarse, en presencia de GM-CSF e IL-4, en células con características de DC inmaduras después de 5 a 7 días de cultivo. Sin embargo, en presencia de M-CSF estas células se diferencian en macrófagos. Por otra parte, si estos mismos precursores monocíticos se tratan con GM-CSF, IL-4 y TGF- $\beta$ , se generan LC que expresan E-cadherina y gránulos de Birbeck (Cella, Sallusto 1997; Vandenabeele y Wu 1999).

Las principales evidencias de la existencia del linaje linfóide se encontraron en ratón (Cella, Sallusto 1997). Al tratar precursores tímicos CD44<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> y CD4<sup>low</sup>, con IL-1, IL-3, IL-4, IL-7, SCF, GM-CSF y TNF $\alpha$ , se obtienen DC que expresan: MHC CII, CD11c, CD40, CD86 y DEC205. De manera interesante, GM-CSF no es necesario para la diferenciación de DC linfoides, mientras que parece ser el factor decisivo en el caso de la generación de DC mieloides (Vandenabeele y Wu 1999).

Estudios realizados en ratones, demostraron que precursores CD4<sup>low</sup> (baja expresión de CD4) obtenidos del timo, son capaces de generar células T, B, NK y DC. Las DC presentes en el bazo, timo y ganglios linfáticos de estos animales, expresaron uniformemente CD8 $\alpha$ . Este hallazgo dio lugar al concepto de DC linfoides (LDC), las cuales tienen al parecer una localización, función y fenotipo distinto al de las DC mieloides (Ardavin 1993; revisado en Maldonado-López 1999).

En humanos, la existencia de un precursor linfóide se demuestra por la diferenciación de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> que generan DC, los cuales bajo el estímulo de IL-1, IL-3, IL-7, SCF, GM-CSF y TNF $\alpha$  expresan HLA-DR<sup>+</sup>. Estas DC se consideran

linfoides ya que dichos progenitores también generan células T, B y NK pero no células fagocíticas (Vandenabeele y Wu 1999).

Actualmente se ha descrito en el humano un tipo celular particular llamado célula T plasmacitoide (PTC), el cual comparte características con células plasmáticas, linfocitos T y monocitos, y se propone como un precursor linfoide para DC en humanos. Las PTC corresponden a un tipo especial de célula que se encuentran en las zonas T en los órganos linfoides y han sido descritas en amígdalas, sangre periférica, sangre de cordón umbilical y médula ósea fetal. En cuanto a su fenotipo expresan CD4 (marcador de célula T), CD68, CD36 (marcador de monocitos) y CD15 (marcador de granulocitos) y presenta una morfología muy similar a las células plasmáticas (Vandenabeele y Wu 1999).

Actualmente se ha postulado la posibilidad de que estos dos linajes realicen funciones diferentes (Cella, Sallusto 1997). En ratón se cuenta con cierta evidencia indica que las células del linaje linfoide inducen respuestas tipo Th1, mientras que las mieloides inducen respuestas Th2. Sin embargo, a pesar de toda la investigación en este campo, aún no está claro cuál es la relación entre los precursores y la distribución *in situ* de las DC en las mucosas, órganos linfoides y en circulación (Grabbe, Kampgen 2000). El origen linfoide y mieloides de las DC ha sido cuestionado. Estudios del grupo de Ardavin et al han demostrado que el precursor tímico CD4<sup>low</sup> origina tanto células CD8 $\alpha^+$  como DC CD8 $\alpha^+$ , sugiriendo un origen común para estas dos poblaciones. Dicha alternativa está sustentada por Pulendran, quien analizó y clasificó las distintas poblaciones de DC presentes en bazo de ratones tratados con Flt-3-L basándose en la expresión de diversos marcadores. En éste último estudio se apreció que dichas poblaciones celulares expresan las diferentes moléculas en una especie de gradiente, lo que hace pensar que quizá representan distintos estadios de desarrollo de una única población de células, más que de ontogenias diferentes (Martin, 2000; revisado en Heras 2001).

### 1.3.2 Células de Langerhans

En 1868, un estudiante de medicina, Paul Langerhans, conducido por su interés en la anatomía de los nervios cutáneos, utilizando impregnación con sales de oro en la piel humana, descubrió una población de células en la región suprabasal de la epidermis. Estas células son ahora llamadas células de Langerhans (Stingl 1980; Maurer y Stingl 1999).

Ya que las sales de oro tienen gran afinidad por los tejidos nerviosos, Langerhans consideró a estas células como parte del sistema nervioso. Dicha teoría fue mantenida por otros investigadores hasta los años 1960's. Durante la década de los 1950's y los 1960's, surgió otra hipótesis que postuló que había una relación entre los melanocitos y las LC. De acuerdo con ésta teoría, las LC eran consideradas como melanocitos disfuncionales, como células hijas de los melanocitos en división o como melanocitos en un estado inactivo de desarrollo. Posteriormente los estudios de microscopía electrónica de Birbeck et al (revisado en Stingl 1980), revelaron que las LC contenían unos organelos citoplasmáticos únicos. Estos investigadores también apoyaban la teoría de que las LC derivaban de los melanocitos. Este postulado de relación ontogenética entre las LC y los melanocitos y la idea de que las LC eran parte del sistema nervioso fué desacreditado por los trabajos Breathnach et al (revisado en Stingl 1980). Estos investigadores demostraron que aún en ausencia de cresta neural, las LC se desarrollaban (Stingl 1980). A pesar de todo, no es hasta 1973 que se les relaciona por primera vez con el sistema inmune (Steinman 1973) iniciándose con ello una gran cantidad de trabajos acerca de su papel y funcionalidad en la respuesta inmune.



Figura 6. Células de Langerhans MHC II<sup>+</sup> en la epidermis de ratón adulto. Gracias a la técnica de capas epidérmicas se puede observar la extensa red que forman en la epidermis

Las LC derivan de la médula ósea y se localizan en la capa suprabasal de la epidermis y en otros epitelios estratificados. En el humano su densidad varía de 460-1000 células/mm<sup>2</sup> dependiendo de la región del organismo y en el ratón varía de 800-1200 células/mm<sup>2</sup>, dependiendo de la cepa. Representan aproximadamente el 1% del total de las células epidérmicas, lo que hace difícil su obtención y enriquecimiento, siendo ésta una de las causas principales que han limitado su estudio (Revisado en Heras 2001).

Las LC son una población móvil de DC inmaduras, su residencia epidérmica es sólo un paso en su ciclo de vida. Los precursores salen de médula ósea a circulación para posteriormente poblar la piel. Bajo un estímulo apropiado (químico, físico o biológico), pueden dejar su compartimiento cutáneo y migrar hacia los ganglios linfáticos regionales donde estimularán a los linfocitos T (figura 4 y 7).



**Figura 7. Células de Langerhans murinas viajando a través de los vasos linfáticos.**  
Foto tomada de Romani, 2001.

Una característica particular de las LC es que contienen organelos citoplasmáticos denominados gránulos de Birbeck (GB). Tienen forma de raqueta de tenis y están compuestos por membranas superpuestas separadas por láminas estriadas que dan una apariencia dentada ("zipper-like"). A pesar de que fueron identificados en 1961, su

origen y función siguen siendo una incógnita. Recientemente se ha identificado un nuevo receptor endocítico, La langerina, el cual se acumula en invaginaciones estriadas conocidas como estructuras citomembranales superpuestas (CMS). La Langerina es un receptor con dominios lectina tipo C, posiblemente implicado en el reconocimiento de microorganismos, internalizándolos y llevándolos a compartimentos poco convencionales de procesamiento de antígenos. Cuando se incuban las LC con anticuerpos dirigidos contra langerina, estos se internalizan y pueden ser localizados en los GB (Revisado en Valladeu 2000).

La gran densidad de las LC no puede ser apreciada en los cortes convencionales de piel que se emplean comúnmente (figura 6). Afortunadamente la técnica de separación de capas epidérmicas ha resuelto este problema. En condiciones normales estas células son la únicas en la epidermis que tienen la enzima ecto-ATPasa (la cual posee especificidad para ATP y ADP dependiente de  $Ca^{++}/Mg^{++}$ , siendo ésta un marcador también en otros tejidos (Chaker 1984; Dombrowski 1998; Maurer y Stingl 1999). La actividad de la enzima aparece tempranamente durante la ontogenia de las LC, sin embargo, desaparece durante su maduración. En estas mismas condiciones, las LC expresan moléculas MHC II, DEC205 (CD205), Mac-1 (CR3),  $Fc\gamma R$ (en humano tipo II y en ratón tipo III), antígeno F4/80 y E-cadherina (importante en la adhesión entre las LC y los queratinocitos en la epidermis) (Stingl 1980; Inaba 1986; Kimber 1999, Heras 2001).

Diversos estudios han demostrado que la alteración del medio ambiente cutáneo provoca cambios fenotípicos y funcionales en las poblaciones de LC tanto *in vivo* como *in vitro*. Sólo unas horas después de estímulos antigénicos, la expresión en la superficie de moléculas MHC II se incrementa considerablemente en la superficie y mientras tanto, disminuye el número de LC en las capas epidérmicas. Las LC tienen diferentes funciones, con implicaciones que van mucho más allá de la piel misma, dada su capacidad de capturar alérgenos y agentes infecciosos, estimular vigorosamente respuestas inmunes y mostrar propiedades migratorias que las equipan como la única posibilidad de comunicación entre la piel y los órganos linfoides secundarios. Se cree que juegan un papel determinante en enfermedades infecciosas, alergias, enfermedades

autoinmunes, reacciones inflamatorias crónicas, el rechazo a tumores y trasplantes, y en los efectos causados por radiación ultravioleta (Maurer y Stingl 1999; Kimber 1999).

### 1.3.3 Captura de antígenos

Aunque descritas como CPA profesionales, años atrás se consideraba que las DC presentaban pobre capacidad de endocitosis y fagocitosis (Caux 1999), hasta que se demostró que las células de Langerhans podían llevar a cabo todos los pasos para la endocitosis mediada por receptores y la fagocitosis de partículas relativamente grandes tales como: partículas de látex (Matsuno 1996), cuerpos apoptóticos (Albert 1998; Rubartelli 1997), virus (Barfoot 1989), bacterias (Reis y Souza 1993) y parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Moll 1993).

Las DC pueden internalizar eficientemente una gran variedad de antígenos para procesarlos y presentarlos en el contexto de MHC CII. Algunos mecanismos de captura de antígenos han sido estudiados sobre DC derivadas de monocitos, generadas en cultivo con GM-CSF e IL-4. Esta células presentan altos niveles de macropinocitosis constitutiva que les permite capturar grandes volúmenes de líquido y concentrar macrosolutos. Además, estas DC expresan Fc $\gamma$ R I y II y el receptor de manosa, que les permite capturar eficientemente complejos inmunes y antígenos manosilados, respectivamente (Cella, Sallusto 1997).

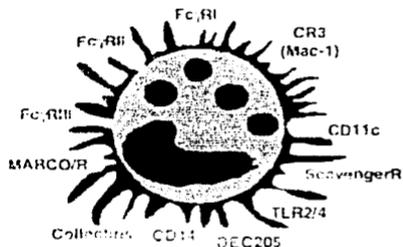


Figura 8. Las DC expresan receptores patrones moleculares asociados a patógenos.

El receptor de manosa contiene múltiples dominios de unión a carbohidratos mediante los cuales endocita o fagocita una gran variedad de antígenos que exponen residuos de fucosa o manosa. A diferencia de los receptores Fc y la inmunoglobulina de

membrana, el receptor de manosa es utilizado y reciclado a la superficie de la célula, lo que permite la internalización de ligandos de manera sucesiva, incrementando su capacidad para capturar antígenos. (Cella, Sallusto 1997)

Otros receptores también contribuyen a la habilidad de las DC para capturar antígenos exógenos (figura 8), estos incluyen receptores tipo lectina como DEC205 y el receptor para Fc $\gamma$ , (Steinman 1991-1998; Cella, Sallusto 1997), receptores de LPS como el CD14 y el receptor scavenger tipo A (SR-A) y MARCO, además reconocen ácido lipoteicoico de bacterias Gram (+) (Clark 2000; Gough 2000; Peiser 2001), receptores "Toll-like" (TLR), una nueva familia de receptores de peligro que desempeñan un papel importante en la respuesta innata contra bacterias y hongos (Yang 1998; Aderem 2000; Muzio 2000; Pulendran 2001). También expresan CD54 (ICAM-1) que además de ser el ligando para LFA-1, funciona como receptor para ciertos virus (Stites 1996). Algunos productos de la cascada del complemento también actúan como opsoninas muy potentes debido a que las DC expresan receptores del complemento en su superficie, CD11b (CR3) y CD11c (CR4); además se ha observado que una subpoblación de LC expresa CD88 (receptor para C5a). Las DC se protegen de la lisis mediada por complemento con la expresión de proteínas de membrana que no actúan como receptores, sino que controlan la activación del complemento: el CD59 es una proteína reguladora que previene el ensamblaje completo del complejo C5b-9 en las células blanco, por otro lado también están presentes CD55 y CD46, que regulan otras etapas de la cascada del complemento (Hart 1997; Clark 1999).

Las DC son capaces de capturar células apoptóticas (Albert 1998; Rubartelli 1997), y al parecer las DC inmaduras son más eficientes que las DC maduras. Aunque los macrófagos capturan cuerpos apoptóticos usando múltiples moléculas de superficie como CD14, CD36 y el receptor de fosfatidil serina, las DC parecen usar preferentemente el receptor vitronectina  $\alpha v \beta 3$  y el receptor CD36/trombospondina (Bell 1999).

De esta manera la captura de antígenos por las DC se pueden resumir en cuatro diferentes mecanismos:

1. Macropinocitosis

2. Endocitosis mediada por el receptores
3. Fagocitosis
4. Captura de cuerpos apoptóticos.

#### **1.3.4 Procesamiento de antígenos**

La mayoría de los antígenos requieren ser procesados por las CPA, sin embargo los macrófagos y las DC manejan los antígenos en diferente forma, dependiendo de si son de origen endógeno (de localización citosólica), o exógeno (de localización endosomal).

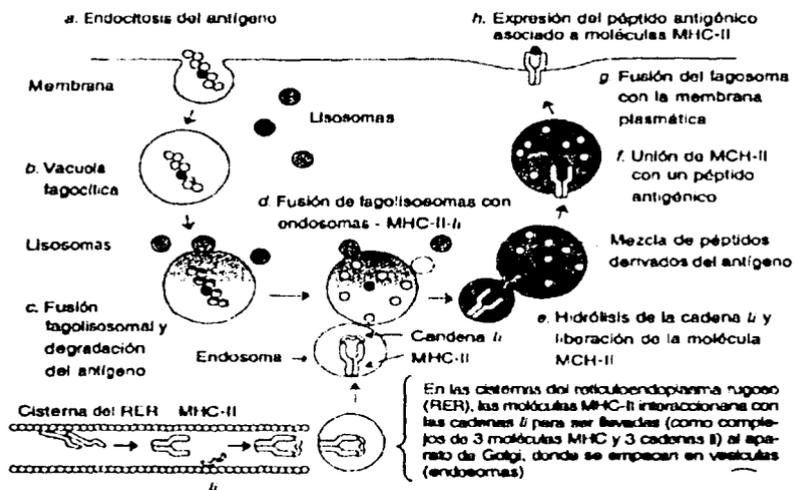
Los productos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) unen antígenos de origen protéico y los expresan en la membrana. Estos complejos MHC-péptido son presentados y/o reconocidos por el TCR del linfocito T, para iniciar una respuesta inmune (Steinman 1999).

Los antígenos intracelulares son fragmentados a pequeños péptidos en el citosol, los cuales son unidos a moléculas MHC clase I (Figura 10); por otro lado, los antígenos extracelulares que entran por una vía endocítica son procesados y generalmente unidos a las MHC clase II (figura 9) y estimulan a los linfocitos T citotóxicos (LTC) y a los linfocitos T cooperadores (LTh), respectivamente (Abbas 1999).

#### **1.3.5 Complejo principal de histocompatibilidad clase II**

Las CPA se caracterizan por su habilidad para procesar y presentar antígenos sobre moléculas MHC clase II. Estas moléculas se encuentran como dímeros de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  ensambladas en las cisternas del retículo endoplásmico con un tercer polipéptido llamado cadena invariante o cadena  $\iota$  (en realidad se trata de complejos macromoleculares formados por 3 moléculas MHC clase II y 3 cadenas  $\iota$ ). La cadena  $\iota$  bloquea el sitio de combinación de los antígenos MHC clase II impidiéndoles interactuar con otras moléculas (Mellman 1998). Dos vías de procesamiento de antígenos han sido descritas: la primera involucra las moléculas MHC-cadena  $\iota$  y la otra a los dímeros del MHC libres de la cadena  $\iota$  que son recicladas de la membrana plasmática. Los complejos MHC II-cadena  $\iota$  son llevados al aparato de Golgi donde son

empacados en vesículas o endosomas, dichas moléculas MHC II recién sintetizadas son almacenadas en un compartimento especial denominado *compartimiento rico en moléculas MHC II* (MIIC). En el citosol, los endosomas se fusionan con los fagolisosomas, descargando su contenido que lleva los complejos MHC II-cadena  $I_i$ . En estos sitios se encuentran marcadores lisosomales como HLA-DM / H-2M (en humanos y ratones respectivamente), quienes participan junto con las proteasas ácidas en la remoción de la cadena  $I_i$ , facilitando la interacción de la molécula MHC II libre con los péptidos inmunogénicos derivados del antígeno procesado. En los MIIC, las moléculas MHC II son degradadas continuamente y remplazadas por nuevos complejos MHC-cadena  $I_i$  (Rescigno 1999).



**Figura 9. Procesamiento y presentación de antígenos en el contexto de MHC-II.**  
Rojas-Espinoza 2001

Dependiendo del estado de maduración de las DC, se pueden observar vesículas que contienen moléculas MHC II, distinguibles de los endosomas tardíos o lisosomas a las cuales se les ha denominado *vesículas clase II* (CIV). En estas vesículas, las moléculas

MHC II no se encuentran unidas a la cadena invariante (Figura 11). De manera interesante, la presencia de estas vacuolas está estrechamente relacionada a la maduración de las DC y bajo el estricto control de la degradación de la cadena // (Rescigno 1999), durante la maduración, hay un estado intermedio de las células, el cual se caracteriza por la aparición de estructuras CIIV. La degradación de la cadena // está catalizada por *cathepsina S*, dicha actividad está bajo el control de su inhibidor *cistatina C*, cuyos niveles y localización están regulados por la maduración de DC (Pierre 1998). Las CIIV se fusionan con la membrana plasmática para posteriormente exponer los complejos MHC-péptido (de hasta 25 aminoácidos) en la superficie de la célula, exhibiendo ahora el fenotipo típico de DC maduras (Abbas 1999, Rescigno 1999).

### 1.3.6 Complejo principal de histocompatibilidad clase I

Los antígenos que se originan intracelularmente se denominan antígenos endógenos y comprenden las proteínas propias de la célula, los antígenos de diferenciación, los

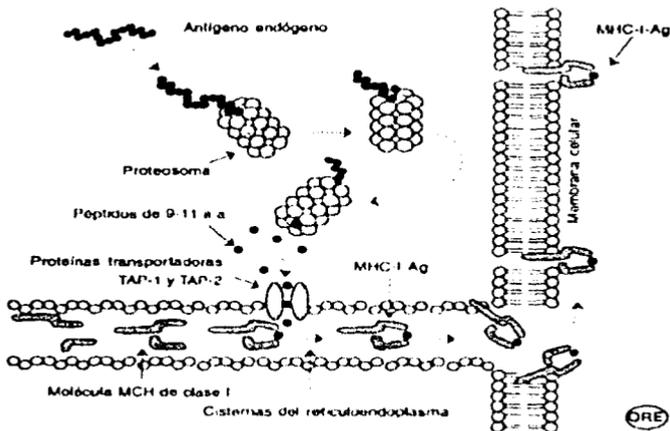


Figura 10. Procesamiento y presentación de antígenos en el contexto de MHC-I. Rojas-Espinosa 2001.

neoantígenos que aparecen en las células tumorales, los antígenos resultantes de la replicación de virus y los antígenos liberados del citosol por algunos microorganismos de vida intracelular como micobacterias, leishmanias, y otros. Los antígenos son degradados en el citoplasma por los *proteosomas*, complejos proteolíticos multi-subunitarios que se encuentran en el citoplasma de las células eucarióticas. Los péptidos resultantes son capturados por un complejo proteico localizado en la membrana del retículo endoplásmico formado por las proteínas TAP-1, TAP-2 y tapasina (figura 10). Este complejo transporta los péptidos al interior de las cisternas del retículo endoplásmico donde algunos de ellos, los afines, se asocian a moléculas MHC clase I. Los complejos MHC I-péptidos son llevados por el flujo normal de las cisternas hasta la superficie de la CPA, o son empacados en el aparato de Golgi en vesículas que más tarde se fusionan con la membrana para expresarse en su superficie (Rojas-Espinoza 2001).

Recientemente se ha demostrado que las DC tiene la capacidad de presentar sobre moléculas MHC clase I antígenos introducidos exógenamente (Rescigno 1998, Bachman 1996; Regnault 1999) vía un mecanismo que es dependiente del proteosoma y de TAP,

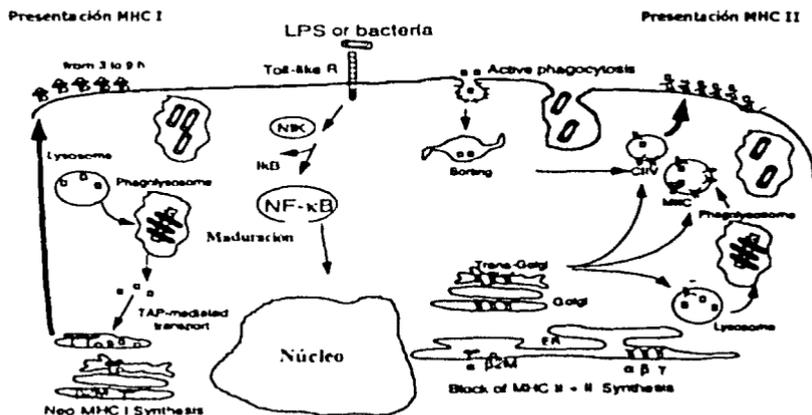


Figura 11. Procesamiento y presentación de antígenos en las Células dendríticas. Rescigno 1999.

y que se ha llamado "crosspriming", o presentación cruzada. La naturaleza del antígeno es crítica para esta presentación sobre MHC I, por ejemplo las proteínas solubles son pobremente presentadas, mientras que los antígenos introducidos vía endocitosis y fagocitosis mediada por receptores son presentados eficientemente. Resulta interesante saber por qué las DC pueden activar a los LTc, no sólo con antígenos virales sino también con antígenos bacterianos, tumorales y otros que también pueden ser internalizados en respuesta a una señal de peligro. La biosíntesis de moléculas MHC I es altamente inducida por bacterias y sus productos (Cella y Engering 1997), alcanzando el máximo a las 18 h, cuando las DC han adquirido una fuerte capacidad para estimular a los linfocitos T citotóxicos (Figura 11).

### **1.3.7 Moléculas CD1**

Las moléculas CD1 pertenecen a un linaje de glicoproteínas no polimórficas que se encuentran en la superficie celular, asociadas a  $\beta 2m$ , que ensamblan antígenos no procesados en compartimientos endosómicos-lisosómicos y los presentan de una manera independiente de TAP. Recientemente se han involucrado en la presentación de antígenos no proteicos y la modulación de las respuestas de los linfocitos T contra lípidos microbianos y glucolípidos antigénicos. Esto puede contribuir a la inmunidad microbiológica, autoinmunidad, regulación inmunológica y a la respuesta contra tumores. Existen cinco moléculas CD1 (a, b, c, d y e) presentes en el cromosoma 1 humano. Las moléculas CD1 son marcadores fenotípicos de las DC (Porcelli 1999; Steinman 1999).

### **1.3.8 Migración de las células dendríticas**

Aún en ausencia de patógenos se localizan DC en la linfa aferente que se cree llegan a las áreas de células T de los órganos linfoides secundarios, sin embargo no se han encontrado en la linfa eferente, indicando que posiblemente muchas de las DC mueren *in situ* después de su arribo a los órganos linfoides. En la sangre de humanos hay dos subgrupos de precursores de DC: CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup>, ambos subgrupos pueden entrar a

los órganos linfoides por las vénulas del endotelio alto (HEV) (Brown 1997) posiblemente con diferente destino. Las CD11c<sup>+</sup> se han localizado en áreas de las células B y las CD11c<sup>-</sup> en las áreas de las células T. Las DCs que se encuentran en los sinusoides del hígado se mueven por los vasos linfáticos hepáticos a los ganglios linfáticos más cercanos, y las DCs del intestino migran a los ganglios linfáticos mesentéricos (Kudo 1997; Matsuno 1996).

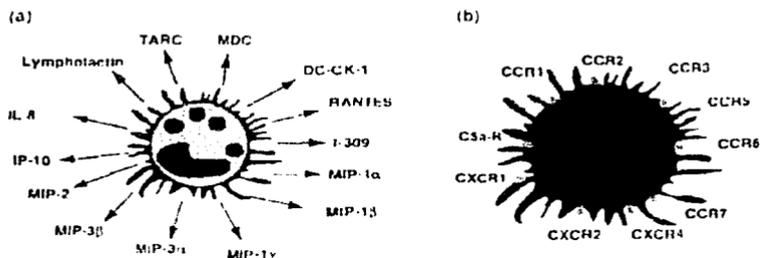
Una inyección de LPS causa un egreso masivo de DC de la piel, corazón, riñón e intestino así como el movimiento y la maduración de las DC de la zona marginal a las áreas de las células T del bazo (Banchereau and Steinman 1998).

Algunos factores que inducen la migración de las DC *in vivo* son: LPS, LTA y TNF- $\alpha$ , pero se sabe poco en cuanto a la regulación del tráfico de las DC de la sangre al tejido y de los tejidos a los órganos linfoides. El LPS estimula a una variedad de células (leucocitos polimorfonucleares) para producir citocinas y quimiocinas, por ejemplo, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1, MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$ , se sabe que estos productos regulan el movimiento y la maduración de las DC (Banchereau 2000).

Durante mucho tiempo se ha descrito a CD14 como un receptor de LPS, pero debido a la ausencia de un tallo intracitoplasmático transductor de señal, no puede ser considerado como único mediador de la activación de las DC por LPS. Recientemente, la transducción de esta señal ha sido encontrada en TLR2 y TLR4. TLR4 induce la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B vía activación de MyD88 e IRAK y análogamente, la activación por LPS es mediado por NF- $\kappa$ B (Rescigno 1998).

Las DC generadas *in vitro* expresan receptores de quimiocina CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 (expresados en DC inmaduras y que disminuye su expresión durante la maduración), CCR7 (el cual es inducido durante la maduración y se cree que dirige la migración directamente hacia los órganos linfoides) (Sozzani 1998), CXCR1, CXCR2, y CXCR4. Las DC *in vitro* migran en respuesta a quimiocinas CC como MCP-3, MCP-4, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MIP-5; y la quimiocina CXC SDF-1 (Morelli 1996; Sozzani 1995-1997). Las DC migran en respuesta a la quimiocina derivada de macrófagos (MDC), producida por macrófagos y DC (Godizka 1997). Se ha demostrado que CCR6

se expresa en células dendríticas derivadas de células CD34<sup>+</sup>, pero no en las DC derivadas de monocitos (Power 1997) (Figura 12).



**Figura 12. Quimiocinas producidas por las DC (a). Receptores de quimiocinas expresados por las DC (b).**

Varias moléculas participan en la regulación de la migración de las LC incluyendo E-cadherina (Tang 1993; Flores-Romo 2001), CLA (antígeno leucocítico cutáneo) e isoformas de CD44 (Weiss 1997). MDR-1 es una p-glicoproteína que está implicada en la temprana movilización de las LC en la piel, ya que cuando se utiliza un antagonista de MDR-1 se impide su movilización de la epidermis (Randolph 1998). Por otro lado en ratones CD40L<sup>-/-</sup> (equivalente del síndrome hiper-IgM en humanos) se observó que ante un estímulo antigénico con FITC, las LC no migran adecuadamente al órgano linfóide correspondiente (Moodycliffe 2000).

Las integrinas y moléculas de adhesión contribuyen a la migración de DC. Las DC inmaduras en circulación expresan una forma glicosilada del ligando de selectina-P (PSGL-1), capaz de unir selectina-P y E. El fenómeno de extravasación es regulado por quimiocinas producidas por células endoteliales e integrinas de superficie como VCAM-1 e ICAM-1. Las DC pueden llegar a los órganos linfoides a través de las vénulas del endotelio alto vía CD49d β-integrina. También ICAM-1 junto con ICAM-2, expresadas en las DC, pueden contribuir a la migración así como a la posterior activación de los linfocitos T (Bell 1999).

Durante la migración, las DC tienen que atravesar barreras como la membrana basal y la pared endotelial, procesos que muy probablemente requieren de enzimas con

actividades específicas. Se han encontrado en las DC varias metaloproteinasas involucradas en la degradación de matriz extracelular tales como la colagenasa intersticial (MMP-1), estromelina-2 (MMP-10) y elastasa (MMP-12) ( Revisado Caux 1999) (Figura 13).



**Figura 13. Migración de una célula de Langerhans.** Romani 2001

### **1.3.9 Interacción entre las células dendríticas y los linfocitos**

Los linfocitos T y B se consideran los efectores de la inmunidad adquirida, pero dicha función está bajo el control de las DC que capturan y procesan antígenos, expresando moléculas de adhesión y coestimulación que eficientiza la presentación de los mismos. Las DC son las únicas CPA capaces de estimular linfocitos T vírgenes y en reposo. Normalmente esta prueba se realiza con un número igual de células alogénicas, sin embargo en el caso de las DC, con sólo una de ellas es posible estimular entre 100 y 3000 linfocitos T (Banchereau y Steinman 1998).

Actualmente, la reacción de cultivo mixto de linfocitos (MLR) es el ensayo funcional más utilizado *in vitro* para demostrar la funcionalidad de las DC, ya que se estimulan tanto linfocitos CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> (Ni y O'Neill 1997).

Las DC y los linfocitos T específicos forman agregados que constituyen el medio ambiente óptimo para el desarrollo de una respuesta inmune. La interacción entre DC y linfocitos T está coordinada por dos señales. La primera señal está representada por la interacción péptido-MHC/TCR y la segunda esta provista por señales coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, altos niveles de moléculas ICAM-1 (CD54), ICAM-3 (CD50), LFA-3 (CD58),  $\beta_1$  integrina (CD29), LFA-1 (CD11a), LFA-2 (CD2) y LFA-3 (CD58) incrementan la adhesión y señalización (Figura 14).

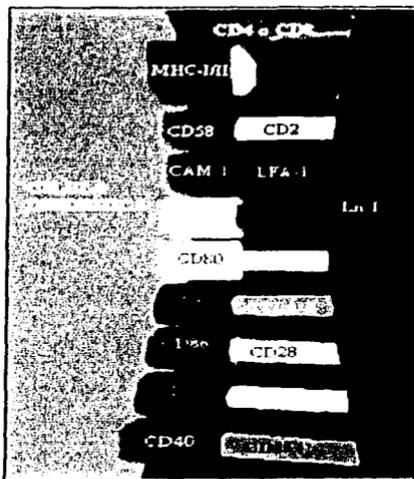


Figura 14. Interacción de las células dendríticas con los linfocitos T. Modificado de Stockwin, L. 2000.

Otras moléculas que intervienen en la señalización en las DC son los miembros de la familia de TNF y su receptor, TNFR (Hart 1997). El TNFR tipo I y el tipo II difieren en sus porciones intracelulares, lo que sugiere diferentes vías de señalización. Estudios en DC de sangre humana han confirmado la presencia de mRNA y la expresión en la superficie de ambos receptores. Se sabe que el TNF $\alpha$  es importante en la generación y diferenciación de las DC. El CD40, un miembro de la familia TNFR, se expresa en la superficie de linfocitos B, células dendríticas, progenitores hematopoyéticos, células epiteliales y tumorales. El ligando de CD40 (CD154 o CD40L) se expresa sobre linfocitos T, células activadas, plaquetas y basófilos (Lane 1999). Como resultado de esta interacción (CD40-CD40L) se incrementa la expresión de CD80/CD86 en las DC, la liberación de citocinas (IL-1, TNF, IL-12 y quimiocinas) (Caux 1994; Ridge 1998; Banchereau 2000) y se induce la expresión del ligando de OX40 (OX40L), que conduce a la síntesis de IL-4 por los linfocitos T y a la expresión de OXCR-5 lo que coopera a la interacción con los linfocitos B en los folículos de los órganos linfoides (Broker 1999). Las DC maduras expresan el ligando de 4-1BB (4-1BBL), el cual complementa la función de OX40L. 4-1BB es una molécula coestimuladora expresada sobre linfocitos T CD4 $^+$  y CD8 $^+$ , induce preferentemente la proliferación de linfocitos T CD8 $^+$  y la producción de IFN $\gamma$ , pero no de IL-4 (Kim 1998; Banchereau 2000). Otra molécula involucrada es RANK, un miembro de la familia TNFR, su ligando (RANKL/TRANSC) expresado sobre los linfocitos T activados, estimula la secreción de citocinas por las DC como IL-1, IL-6 e IL-12; ello incrementa la sobrevivencia de éstas y la proliferación de los linfocitos T en la reacción mixta de

linfocitos. Se ha demostrado que TRANCE es responsable de la activación de los LTh durante una infección viral, independientemente de CD40L, sugiriendo un papel importante y específico durante la infección (Banchereau 2000).

Los linfocitos B, a diferencia de los T, pueden reconocer directamente antígenos a través de su receptor (BCR). Los linfocitos B vírgenes responden preferentemente a las DC de tipo intersticial y a la secreción de factores solubles, incluyendo la IL-12. Las DC estimulan directamente la producción de anticuerpos, mientras que la proliferación de linfocitos B es estimulada por los linfocitos CD4<sup>+</sup> activados. El centro germinal (GC) constituye un microambiente anatómico donde las células B proliferan y sufren mutación somática, cambio de isotipo y finalmente diferenciación a célula de memoria o a célula plasmática. Los GC también contienen células T, DC foliculares, y DC de centros germinales (GCDC). Las GCDC estimulan la proliferación (independientemente de IL-12) de los linfocitos B activados y se cree que estas células dirigen su diferenciación hacia células plasmáticas, además, inducen un cambio de isotipo hacia IgG1. Así, una subpoblación de DC tiene la capacidad de dirigir y generar una respuesta inmune humoral, en la cual tienen que interactuar linfocitos CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos y linfocitos B antígeno-específicos (Banchereau 2000).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La respuesta inmune innata utiliza una variedad de receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRR's) que pueden estar expresados sobre la superficie de la célula, en compartimientos intracelulares o secretados al torrente sanguíneo. La función principal de los PRR's incluye la opsonización, activación de la cascada del complemento, fagocitosis, activación de vías de señalización proinflamatorias, producción de citocinas e inducción de apoptosis. Durante la etapa neonatal existe una alta susceptibilidad a infecciones, la cual está relacionada a la posible inmadurez de los componentes del sistema inmune. Las DC son consideradas excelentes CPA profesionales, capturan y procesan antígenos llevándolos de los órganos no linfoides como piel y mucosas hacia los ganglios linfáticos regionales para activar a los linfocitos T vírgenes. Debido a sus características, las DC representan un vínculo importante entre la respuesta inmune innata y la adquirida. Existen pocos reportes acerca de la ontogenia y funcionalidad de las DC en neonatos, sin embargo se ha visto que las DC (humanas) obtenidas de sangre de cordón estimulan débilmente la MLR y la proliferación clonal de los linfocitos T. También se ha observado que la capacidad endocítica de las DC obtenidas a partir de monocitos de sangre de cordón esta disminuida, lo cual concuerda con la menor expresión del receptor de manosa y moléculas CD1a y MHC II en comparación con los niveles de del adulto. Es posible entonces que algunas deficiencias de los linfocitos puedan relacionarse con el fenotipo y la función incompleta de las DC en la etapa neonatal.

Hace falta mucho trabajo acerca de la funcionalidad de las DC durante el período neonatal, es por este motivo que la presente investigación está enfocada a aportar información sobre la expresión de algunos marcadores durante la ontogenia de DC, particularmente la expresión de ciertos PRR's, moléculas importantes involucradas en la captura de antígenos, aspecto crucial para el funcionamiento de las DC.

### **3.0 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el fenotipo que poseen *in vivo* las células dendríticas epidérmicas en etapas ontogénicas tempranas utilizando como modelo el ratón BALB/c.

### **3.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar la expresión de receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR'S) en las células dendríticas epidérmicas, tanto en ratones neonatos como en ratones adultos.
- Comparar la expresión de marcadores clásicos de células de Langerhans (ATPasa, MHC II y DEC 205) en el periodo neonatal y en la vida adulta.
- Realizar dobles marcajes para definir el fenotipo de las subpoblaciones de DC epidérmicas durante el periodo neonatal.

## **4. MATERIALES Y METODOS**

### **Animales**

Se emplearon ratones singénicos (de 0 y 90 días de edad) de la cepa BALB/c los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándares en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

### **Separación de láminas epidérmicas**

Los ratones neonatos se sacrificaron utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico y los adultos por dislocación cervical. Se rasuró la zona abdominal (en caso de los adultos) y se obtuvo una muestra de piel, se quitó mecánicamente la grasa subcutánea para facilitar el procedimiento, y la muestra se cortó en pequeños cuadros (aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>). La piel se incubó en EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0.5 M (pH 7.4), durante 2 horas a 37°C orientando la dermis hacia abajo (las uniones de la epidermis con la dermis son dependientes de calcio, el EDTA captura el calcio facilitando la separación de estas dos capas). Finalmente se separó la epidermis por tracción con la ayuda del lomo de un bisturí. Cada lámina epidérmica se lavó con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) o SSF (solución salina fisiológica) y dependiendo del procedimiento posterior, se fijaron con acetona 20 min., se lavaron 3 veces y posteriormente se fijaron con cloroformo 20 min. (para inmunohistoquímica); ó solo con formaldehído-cacodilato 2 hrs. (para determinar actividad de ATPasa).

### **Inmunohistoquímica**

La epidermis se fijó con acetona fría, se lavó 3 veces con SSF y se cortaron secciones de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, posteriormente se realizó un bloqueo de peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en SSF (sólo si se utiliza peroxidasa durante el resto del proceso), se lavaron 3 veces con SSF y se realizó otro bloqueo (de sitios inespecíficos) incubando las epidermis con suero de cabra 1% durante 30 minutos a temperatura

ambiente. Después se incubaron durante 12-14 horas con los anticuerpos primarios (tabla 1) a la dilución apropiada, a 4°C. Se utilizó IgG de rata 1µg/mL como control de isotipo. El exceso de anticuerpo primario se eliminó lavando cuatro veces con BSA 0.5% (albúmina sérica bovina) en SSF o PBS (pH 7.3). Se utilizaron sistemas de amplificación biotina-avidina, por lo que hubo un segundo período de incubación de una hora, a temperatura ambiente, con anticuerpos biotinados anti-IgG de rata (según dilución señalada). Se lavaron con la solución de BSA 4 veces y se incubaron con estreptavidina peroxidasa (según dilución señalada), 45 minutos a temperatura ambiente. Después de 4 lavados finales con BSA, la reacción se desarrolló con diaminobencidina, azul gris o aminoetil carbazol. Cuando se utilizó estreptavidina conjugada a fosfatasa alcalina, la reacción se reveló con una mezcla de naftol fosfato AsMx y Fast red. Las preparaciones se montaron con resina Polymount (Polisciences) y finalmente se analizaron al microscopio.

### **Actividad de ATPasa en las células de Langerhans**

Las láminas epidérmicas obtenidas se fijaron en una solución de formaldehído-cacodilato-sacarosa. Se lavaron 3 veces en solución salina fisiológica y se incubaron durante una hora a 37°C con la mezcla de reacción, preparada justo antes de realizar la técnica. Dicha solución contiene el sustrato de la enzima: ATP, PbNO<sub>3</sub>, MgSO<sub>4</sub> en amortiguador Trizmal. Al finalizar la incubación se lavaron 3 veces con SSF y la reacción se desarrolló manteniendo la epidermis en una solución de sulfuro de amonio al 5% en H<sub>2</sub>O destilada por un minuto. La reacción se detuvo lavando 3 veces con agua destilada y las muestras se montaron con glicerol al 90%.

### **Cálculo de la densidad celular**

Se contó el número de células en al menos 10 campos (40X) por muestra, y se trabajaron al menos seis ratones por condición experimental. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener la densidad celular por mm<sup>2</sup>: diámetro del campo ocular = cifra de campo ocular / aumento del objetivo; esto permite calcular el área ( $\pi r^2$ ) del campo

ocular y obtener el número de células por unidad de área. Los valores están expresados como la media +/- la desviación estándar de los resultados.

Anticuerpo monoclonal	Conjugado con	Clona	Isotipo	Casa comercial
$\alpha$ ratón CD14	-	rm C5-3	Rat IgG1K	PharMingen
$\alpha$ ratón MHC II	-	NIMR4CII	Rat IgG2b	Donación
$\alpha$ ratón DEC205	-	NLDC-145	Rat IgG2a	SEROTEC
$\alpha$ ratón SR I/II	-	2F8	Rat IgG2b	SEROTEC

**Tabla 1. Anticuerpos monoclonales primarios utilizados en el análisis fenotípico de las células dendríticas epidérmicas murinas.**

## 5. RESULTADOS

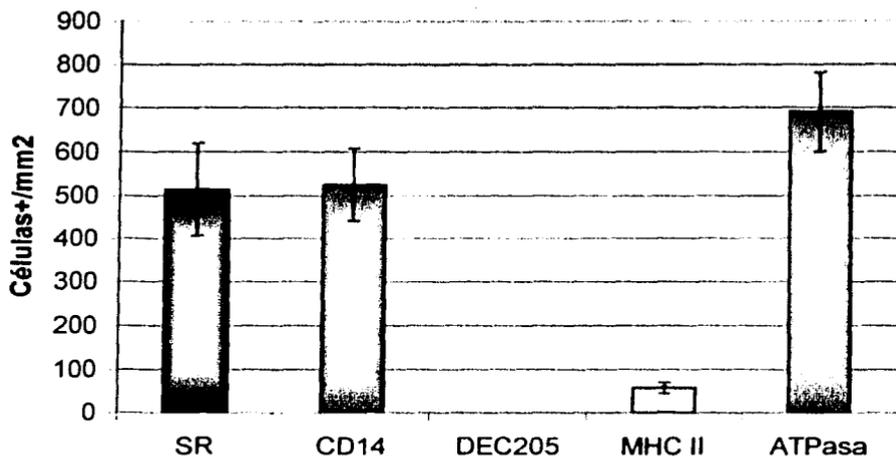
### a) Análisis fenotípico de las células dendríticas epidérmicas de ratones neonatos y adultos.

En ratones neonatos se encontraron células SR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, (CD16/CD32)<sup>+</sup> con morfología dendrítica típica (figura 1), pero no se encontraron células que expresaran DEC205 (tabla 1).

MARCADORES	RN (0 días)	ADULTOS (90 días)
ATPasa	+	+
MHC II	+	-
SR	+	-
CD14	+	-
DEC205	-	+

Tabla 1. Expresión de distintos marcadores en la epidermis de ratones neonatos y adultos.

La distribución de las poblaciones celulares SR<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> a lo largo de las láminas epidérmicas fue homogénea, encontrándose en raras ocasiones pequeños agregados celulares (figura 2). Por otro lado, en los ratones adultos se observaron células DEC205<sup>+</sup> formando una extensa red uniformemente distribuida en la epidermis, sin embargo, en el adulto no pudo detectarse marca para ninguno de los demás PRR's estudiados. También se analizó la expresión de marcadores típicos de células dendríticas como MHC CII (moléculas involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos) (Tabla 1). Al analizar la expresión de PRR's al día 0 de edad se encontró un promedio de 513 células/mm<sup>2</sup> que expresan SR y 524 células/mm<sup>2</sup> que expresan CD14. Así mismo, al día 0 de edad, 691 células/mm<sup>2</sup> presentan actividad de ATPasa, 57 células/mm<sup>2</sup> expresan moléculas MHC II y no se encuentran células DEC205<sup>+</sup>. La cantidad de células que tienen actividad de ATPasa se mantuvo constante con cambios relativamente pequeños durante el período de estudio (Tabla 2).



**Gráfica 1.** Densidades de las DC epidérmicas para los marcadores estudiados en el periodo neonatal (día 0). Los datos se muestran como la media +/- la desviación estandar de tres experimentos, c/u consta de al menos un promedio de 3 ratones .

Edad	SR	CD14	MHC II	DEC205	ATPase
0d	513	524	57	0	691
90d	0	0	736	889	710

**Tabla 2.** Densidades de los marcadores de las DC estudiados expresados como células<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>. Los datos son el promedio de la menos 30 campos por cada edad (se contaron al menos 10 campos por cada muestra y por cada edad un promedio de 3 ratones).

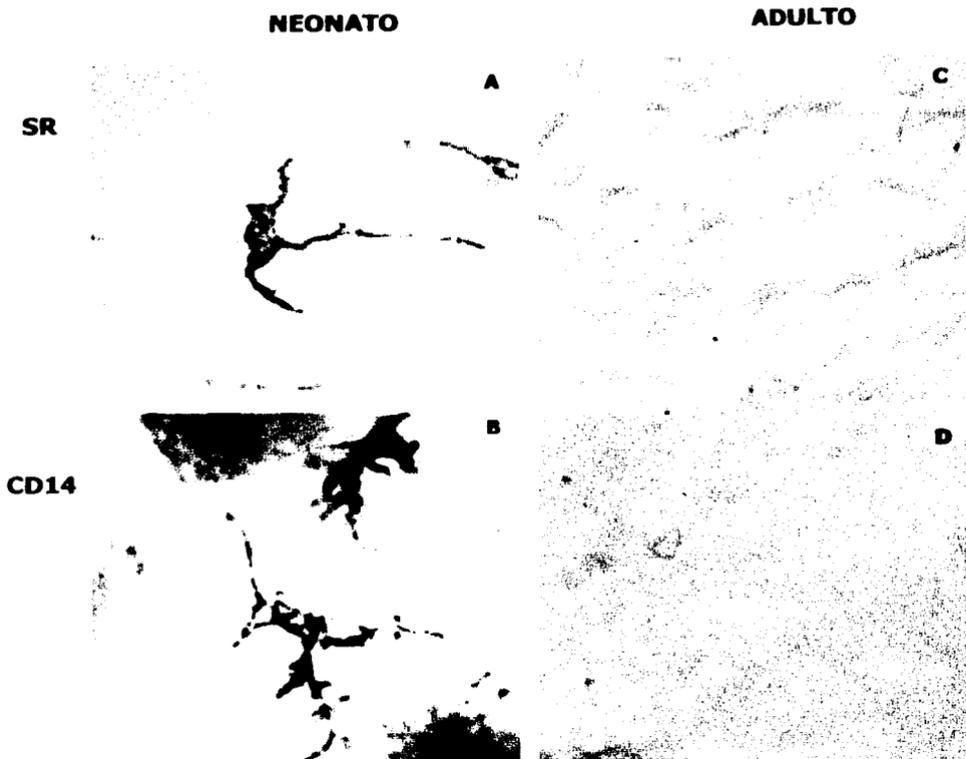
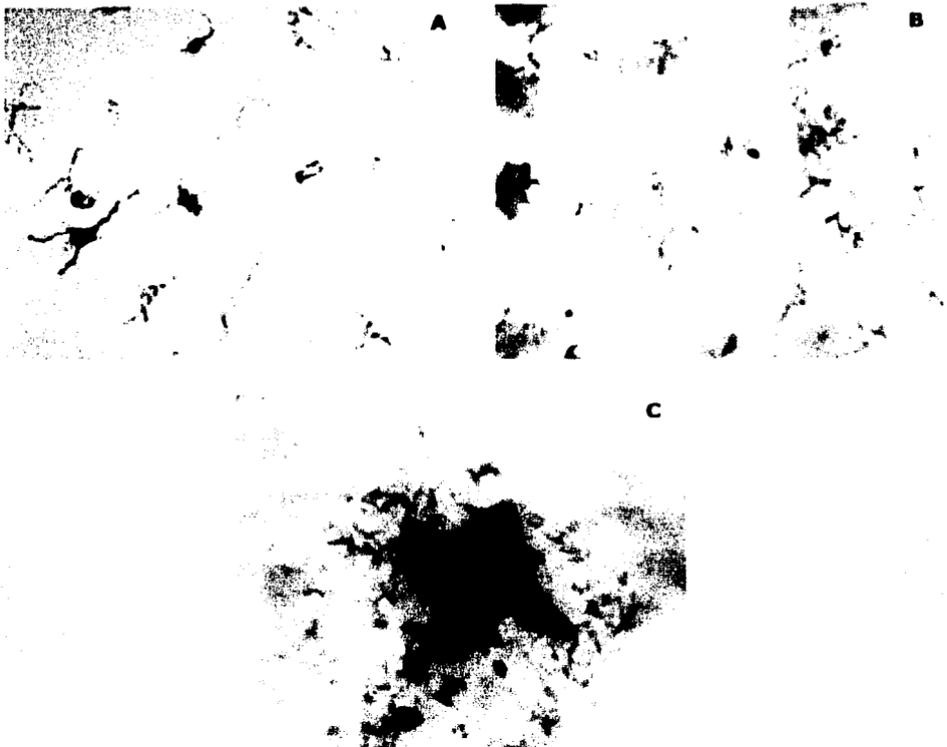


Figura 1. Expresión de SR y CD14 en la epidermis de ratones neonatos (0 días de edad). Las células dendríticas epidérmicas neonatales expresan SR y CD14 (A y B), a diferencia del ratón adulto que no

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



**Figura 2.** Las DC epidérmicas que expresan SR y CD14 tienen una distribución homogénea. Las células SR<sup>+</sup> (A) y CD14<sup>+</sup> (B) fueron reveladas con el sistema biotina-avidina peroxidasa con marca azul y roja, respectivamente. En la figura C se muestran agregados de DC SR<sup>+</sup> en la epidermis de ratones neonatos.(20X)

**b) Las células dendríticas SR<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> epidérmicas tienen actividad de ATPasa.**

Para demostrar si las DC que expresan SR, CD14 o Fc $\gamma$ R están relacionados con las células de Langerhans, se realizaron dobles marcajes analizando si estas células poseen actividad de la enzima ATPasa. Primero se procesaron las láminas epidérmicas para demostrar la actividad de la enzima ATPasa en las células de Langerhans de ratones neonatos y posteriormente se realizó la inmunohistoquímica con el anticuerpo correspondiente (SR, CD14 o Fc $\gamma$ R). Se encontraron células con morfología dendrítica típica SR<sup>+</sup>-ATPasa<sup>+</sup> (figura 17), SR<sup>-</sup>-ATPasa<sup>+</sup>, células CD14<sup>+</sup>-ATPasa<sup>+</sup> (figura 17), CD14<sup>-</sup>-ATPasa<sup>+</sup> y células Fc $\gamma$ R<sup>+</sup>-ATPasa<sup>+</sup>, Fc $\gamma$ R<sup>-</sup>-ATPasa<sup>+</sup>.



Figura 3. Las DC SR<sup>+</sup> y CD14<sup>+</sup> tienen actividad de ATPasa. Se realizaron dobles marcajes evidenciando primero la actividad de ATPasa (café) y posteriormente la marca roja con el correspondiente anticuerpo SR (A) y CD14 (B). Como se puede observar en las figuras A y B, se ven células dobles marcadas (café y rojo) y en la figura C únicamente se demostró actividad de ATPasa (café) (100x).

## 6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Las LC son CPA profesionales que se localizan en la capa suprabasal de la epidermis. Aunque es bien sabido que las LC derivan de la médula ósea, se desconoce el trayecto preciso que siguen desde su salida de su sitio de origen (médula ósea) hasta su lugar de residencia (epidermis). Tampoco se conocen los mecanismos precisos que dirigen y regulan su ruta, ni se sabe con exactitud cuál es el estado fenotípico y funcional que tienen las LC en las etapas ontogénicas más tempranas.

En estudios previos se ha demostrado que la epidermis murina es colonizada por células derivadas de la médula ósea antes del día 17 de gestación. Dichas células carecen de muchas características fenotípicas de las LC del ratón adulto (Romani 1986, Elbe 1989).

Las LC en la epidermis murina adulta sana, son las únicas células que expresan moléculas MHC II y el receptor DEC205. También poseen la ecto-enzima ATPasa y CD45, este último denota su origen hematopoyético. También expresan altos niveles de E-cadherina, molécula que participa en la adhesión entre dichas células y los queratinocitos en la epidermis, y se diferencian de otras poblaciones de DC por la presencia citoplasmática de gránulos de Birbeck, organelos pentalaminares con forma de bastón o de "raqueta de tenis".

En el presente trabajo se muestra que la enzima ATPasa es el marcador que aparece más tempranamente, encontrándose en niveles equivalentes a los observados en la epidermis del adulto.

Quizá este hallazgo podría considerarse predecible ya que es un marcador filogenéticamente muy conservado, aunque no necesariamente lo sea ontogénicamente. Las ecto-ATPasas en general están pobremente caracterizadas tanto bioquímica como molecularmente y su presencia no se limita a las LC en la epidermis, si no que también se encuentran en muchas otras células del sistema inmune. Sin embargo, la función que desarrollan en cada caso no se conoce exactamente. Se ha visto que esta enzima se induce tras la activación de linfocitos T CD4 y CD8, células NK y linfocitos B. Además algunas funciones de estas células se inhiben cuando se emplean antagonistas de la enzima al parecer impidiendo la movilización de  $Ca^{++}$ , que es un paso esencial en las señales de

transducción que rigen muchas de las funciones de las células del sistema inmune. Como se ha mencionado, la actividad de la enzima ATPasa aparece tempranamente durante la ontogenia de las LC, sin embargo desaparece cuando las células salen de la epidermis (se vuelven "inmunológicamente maduras") o cuando son cultivadas con GM-CSF.

Sería importante saber cuáles son las funciones específicas que tiene esta enzima, particularmente en células tan activas y extraordinariamente potentes en la inducción de respuestas inmunes, como lo son las LC. Asimismo, quizá sería posible predecir la repercusión de su presencia en la fisiología de las LC en la etapa neonatal.

En la periferia, por ejemplo la epidermis, las LC son muy hábiles para capturar antígenos. Schuler y Steinman han encontrado que al contrario de las DC esplénicas, las LC pinocitan HRP muy eficientemente. Incluso se ha observado que las LC son capaces de fagocitar además de levaduras y partículas de látex, bacterias intactas como *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium parvum* (Schuler 1985, Reis e Souza 1993).

Las DC generadas "in vitro" a partir de células estaminales de médula ósea cultivadas con GM-CSF, las cuales tienen similitudes con las LC, son capaces de internalizar BCG y *M. tuberculosis* transitoriamente.

Otros estudios indican que las LC que se encuentran en el epitelio vaginal y cervical son capaces de fagocitar células epiteliales apoptóticas durante el metaestro (Parr 1991).

Sin duda, la fagocitosis no es el único proceso por el que las DC en la periferia pueden internalizar antígenos. Experimentos realizados *in vitro* indican que las DC macropinocitan constitutivamente, siendo capaces de internalizar su propio volumen en cuestión de minutos (Reis e Souza 1993).

Además, las DC capturan antígenos por medio de una serie de receptores denominados en conjunto receptores endocíticos, dentro de los cuales se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR's), lo que confiere a estas células no solo la capacidad de internalización sino también de cierta selección (Sallusto 1995).

En el presente trabajo se analizó la expresión de de ciertos receptores endocíticos, incluyendo algunos pertenecientes a la familia de los PRR's como: CD14, SR y DEC205. Consideramos que lo que se ha encontrado en este trabajo es interesante, especialmente

en el contexto de la fisiología de las DC en la periferia durante las etapas tempranas del desarrollo neonatal.

Los receptores endocíticos analizados son los pertenecientes a la familia de PRR's, SR, CD14 y DEC205. Es bien sabido que las LC clásicas, es decir, las que se han estudiado en la vida adulta expresan la lectina tipo C, DEC205, sin embargo, en la etapa neonatal temprano no encontramos este receptor.

DEC205 es un receptor que no sólo está involucrado en la endocitosis de antígenos manosilados, sino que también hace más eficiente su presentación a linfocitos T específicos. La carencia de esta molécula podría estar relacionada con una capacidad disminuída tanto de captura como de presentación antigénica, implicando probablemente una deficiencia notable de las LC en la etapa neonatal para estimular a los linfocitos T correspondientes.

La expresión de SR-A tipo I y II y de CD14 en las DC epidérmicas neonatales resulta un dato interesante, sobre todo porque las células positivas para estos marcadores desaparecen rápidamente, no encontrándose expresión en la epidermis de ratones de 90 días de edad.

Los receptores scavenger comprenden una familia de moléculas capaces de reconocer una variedad de componentes celulares microbianos, además de ligandos endógenos como lipoproteínas modificadas. Este hecho los coloca en una posición importante en el sistema inmune innato. Los SR unen tanto LPS presente en bacterias gram negativas como ácido lipoteicoico de bacterias gram positivas (Peiser 2001).

Se ha descrito la expresión de SR-A en células de Kúpffer, macrófagos alveolares y en macrófagos de lámina propia en intestino, sin embargo, se ha demostrado también el aumento de su expresión en granulomas inducidos tras la inoculación de BCG y en cerebro de ratón tras la inyección de LPS (Gough 2000).

El reconocimiento de los diferentes ligandos por los SR conduce a la producción de TNF $\alpha$  y óxido nítrico, eventos precedidos por un aumento en los niveles de Ca<sup>++</sup> intracelular y activación transcripcional por NF- $\kappa$ B.

Los SR también son capaces de unir y fagocitar células apoptóticas por lo que se sugiere además su participación en la homeostasis. Utilizando el anticuerpo monoclonal

anti-SR-A (2F8), se ha observado que estos receptores son también importantes en adhesión celular (Fraser 1993).

Hasta ahora no se ha descrito la expresión de SR en LC, pero tomando en cuenta el papel que tienen éstas moléculas en otras células que las expresan, lo encontrado en el presente trabajo pudiera indicar que las LC neonatales, aunque poseen un fenotipo "inmaduro", tienen ciertas características que pudiera permitirles realizar adecuadamente su función de centinelas del sistema inmune, o bien, pudieran desempeñar algún papel en homeostasis en etapas tempranas del desarrollo cuando, por ejemplo el recambio celular es intenso.

CD14 se expresa en células mieloides y recientemente se ha descrito que CD14 humano coexpresa y forma un complejo con TLR2. Se sabe que la expresión de CD14 aumenta por la adición de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y componentes bacterianos.

El CD14 reconoce LPS unido a CD14 soluble o a la proteína que una al LPS (LBP), y ésto conduce a la internalización del complejo, sin embargo, también es capaz de reconocer componentes o extractos de bacterias gram positivas, espiroquetas y hongos. Se ha identificado que algunos TLR que en su región intracelular muestran homología por el receptor de IL1, son los responsables de la transducción de señales que conducen a la activación de NF- $\kappa$ B. Además del LPS, el peptidoglicano, ácido lipoteicoico, lipoproteínas bacterianas y componentes micobacterianos utilizan TLR2 y TLR4 para el señalamiento bioquímico intracelular. En monocitos, CD14 es responsable de la producción de TNF inducida por LPS, y dosis bajas induce la síntesis de IL-6, IL-8, prostaglandinas y anión superóxido (Wright 1990)

En leucocitos polimorfonucleares, CD14 participa en la adhesión a fibrinógeno dependiente de integrinas, en la fagocitosis independiente de complemento de bacterias gram negativas, así como en la fagocitosis de células apoptóticas.

La expresión de CD14 en DC epidérmicas en el neonato es interesante, debido a su papel en el sistema inmune innato.

Respecto a la expresión de los marcadores endocíticos, SR y CD14, es fácil apreciar que las DC que expresan SR y CD14 quizá correspondan a una misma población, dado que su variación numérica en el período neonatal es prácticamente la misma. Lamentablemente no

se pudo realizar el doble marcaje que confirmara esta premisa. La desaparición de las células positivas para estos marcadores pudiera ser debida a varias causas, 1) maduración del fenotipo: que las DC ATPase+SR+CD14+Dec205-MHCII- cambien su repertorio molecular y se conviertan en las clásicas LC presentes en la epidermis de ratones adultos ATPase+SR-CD14-Dec205+MHCII+. 2) Muerte celular *in situ*, que las DC epidérmicas SR+CD14+ representen progenitores de las LC, y después de pasar un lapso de tiempo en este epitelio mueran por apoptosis. y 3) emigración de las DC SR+ CD14+ fuera de la epidermis. Algunas de estas hipótesis podrían ser consideradas para ser probadas más adelante formando parte de las perspectivas del trabajo.

## 7. CONCLUSIONES

- ❖ En la piel de ratones neonatos, las DC no expresan DEC205, marcador clásico de las LC en el adulto, pero si poseen la enzima ATPasa.
- ❖ A diferencia de las DC epidérmicas de adulto, las de neonato (0 días) sí expresan SR y CD14.
- ❖ Las DC epidérmicas de los ratones neonatos al día 0 de edad que expresan SR y CD14 se encuentran en mucho mayor densidad que las DC que expresan MHC II.
- ❖ Las DC epidérmicas de ratones al día 0 de edad que expresan SR y CD14 presentan actividad de la enzima ATPasa, verificando con ello que son células de Langerhans.

## 8. PERSPECTIVAS

- ❖ Definir si las poblaciones de DC epidérmicas en el neonato comparten marcadores como SR, CD14, MHC II.
- ❖ Analizar si las DC presentes en la epidermis de ratones neonatos y adultos expresan otros receptores también importantes en la inmunidad innata como lo son los receptores "toll-like" (TLR).
- ❖ Evaluar la capacidad funcional de las DC epidérmicas neonatales que expresan SR y CD14 ante estímulos antigénicos aplicados localmente.

## 9. APENDICE

### Reactivos

#### a) Solución Salina Fisiológica

- 0.85 g NaCl
- Disolver y aforar a 100 mL de H<sub>2</sub>O destilada

#### b) BSA 0.5 % ( Albúmina Sérica Bovina)

- 2.5 g Albúmina sérica bovina.
- Disolver y aforar a 500 mL de Solución Salina Fisiológica.

#### c) PBS 1X

- Pesar 1.74g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Pesar 4.25g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Pesar 5.97g NaCl
- Disolver, verificar pH 7.2 – 7.4
- Aforar a 1000mL.

#### d) EDTA 0.5M

- Pesar 46.52 g de EDTA sódico
- Mezclar 50 mL de H<sub>2</sub>O destilada con 50 mL de NaOH 0.5M
- Agregar el EDTA sódico a la solución anterior, disolver y ajustar a pH 7.4.
- Aforar a 250 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

#### e) Reactivos para ATPasa

##### • Mezcla de Incubación

- Tris-Mal a 37°C.
- Pesar Nitrato de Plomo 0.01g y disolver en 0.5 mL de H<sub>2</sub>O destilada hirviendo.
- Pesar Sulfato de Magnesio 0.05g y disolver en 1 mL de H<sub>2</sub>O destilada hirviendo.
- Pesar ATP 1mg y disolver en 4.2 mL de Tris-Mal

- Agregar 500 $\mu$ L de la solución de MgSO<sub>4</sub> a la solución de Tris-ATP.
- Agregar a la solución anterior 300 $\mu$ L de la solución de PbNO<sub>3</sub> (Usar punta distinta) poco a poco e ir disolviendo (Mezcla de incubación).

f) Acetona.

g) Cloroformo.

## REFERENCIAS

- Abbas, Abul K. et al. *Inmunología celular y molecular*. 3ª edición, editorial Mc Grawhill, 1999.
- Aderem Alan and Ulevich J. Richard. Toll-like receptors in the induction of the Innate immune response. *Nature*, 2000. 406:782-787.
- Albert, M. L., S. F. A. Pearce, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via  $\alpha\beta$ , and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med*, 1998. 188:1359-1368.
- Albert, M. L., B. Sauter, et al. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*, 1998. 392:86-89.
- Anjuere, F., P. Martín, et al. Definition of dendritic cells subpopulations present in the spleen, peyer's patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood*, 1999. 93(2):590-598.
- Ardavin C., et al. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*, 1993. 362:761-763.
- Astori, M., et al. Development of T-B cell collaboration in neonatal mice. *Int Immunol*, 1998. 11:445-451.
- Bachman M. F., et al. Dendritic cells process exogenous viral proteins and virus-like particles for class I presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol*, 1996. 26:2595-2600.
- Banchereau J. and D. Schmitt. *Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology*: Vol. 2, Plenum Press, New York, 1995. 227-230.
- Banchereau J. and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998. 392:245-252.
- Banchereau J. et al. Immunobiology of the Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*, 2000. 18:767-811.
- Barfoot R., et al. Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph. *Immunology*, 1989. 68:233-239.
- Bell, D., J. Young and J. Banchereau. Dendritic cells. *Adv Immunol*, 1999. 72:255-323.

- Bos, J. and M. Kapsenberg. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today*, 1993. 14:75-78.
- Breathnach, S., and S Katz. Thy-1<sup>+</sup> dendritic cells in murine epidermis are bone marrow derived. *J Invest Dermatol*, 1984. 83:74-77.
- Broker, T.; et al. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells on B follicles *Eur J Immunol*, 1999. 29:1610-1616.
- Brown, K. A. et al. Human blood dendritic cells: binding to vascular endothelium and expression of adhesion molecules. *Clin Exp Immunol*, 1997. 107:601-607.
- Caux, C., et al. Activation of human dendritic cells through CD40 crosslinking. *J Exp Med*, 1994.180: 1263-1272.
- Caux, C., et al. Developmental pathways of Human Myeloid Dendritic Cells. *Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 5:63-92.
- Cella, M., Engering, A., et al. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 1997. 388:782-787.
- Cella, M., Sallusto, F., et al. Origin, maturation and antigen presenting function of Dendritic cells. *Current Opinion Immunol*, 1997. 9:10-16.
- Chaker, M., et al. Rodent epidermal Langerhans cells demonstrate greater histochemical specificity for ADP than for ATP and AMP. *J invest Dermatol*, 1984. 82:496-500.
- Clark, G. J., et al. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and infection*, 2000. 2:257-272.
- Clark, G. J. and Hart D. N. J. Phenotypic Characterization of Dendritic Cells. *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 29:555-572.
- Dombrowski, K., et al. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunol Rev*, 1998. 161:111-118.
- Douglas T. F., Richard M. L. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 1996. 252: 50-54.
- Duraiswamy, N., Tse, Y., Hammerberg, c., et al. Distinction of class II MHC<sup>+</sup> Langerhans cell-like interstitial dendritic antigen-presenting cells in murine dermis from dermal macrophages. *J Invest Dermatol*, 1994. 103.5:678-683.

Elbe, A., E. Tschachler., et al. Maturation steps of bone marrow derived dendritic murine epidermal cells. Phenotypic and functional studies on Langerhans cells and Thy-1<sup>+</sup> dendritic epidermal cells in the perinatal period. *J. Immunol*, 1989. 143:2431-2438.

Elomaa, O., et al. Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region. *J Biol Chem*, 1998. 273:4530-4538.

Fawcett D. W. *Histología*. 12ª edición, McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España 1995.

Flores-Romo, L, Bjorck P, Banchereau J et al. CD40 ligation on human CD34<sup>+</sup> progenitor cells induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J Exp Med*, 1997. 185: 341-349.

Flores-Romo, L. In vivo maturation and migration of Dendritic cells. *Immunology*, 2001. 102:255-262.

Fraser, I. *Nature*, 1993. 364:343-346.

Geissman, F., et al. Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med*, 1998; 187:961-966.

Godiska, R., et al. Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived Dendritic cells, and natural killer cells. *J Exp Med*, 1997. 185:1595-1604.

Gough, P. J. and Gordon, S. The role of scavenger receptor in the innate immune system. *Microbes and Infection*, 2000. 2:305-311.

Grabbe, S., et al. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunology Today*, 2000. 21(9):431-433.

Harris, DT, et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1992. 89: 10006.

Hart D. N. J. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the primary immune Response. *Blood*, 1997. 90:3245-3287.

Heras Chavarría Mónica B. *Estudio fenotípico y funcional de las células dendríticas en la epidermis del ratón durante el periodo perinatal*. Tesis, IPN, ENCB, Depto. de Inmunología. México, D. F. 2001.

Hunt, D.W.C. et al. Studies of human cord blood dendritic cells: evidence for functional immaturity. *Blood*, 1994. 84: 4333-4343.

Inaba, K., et al. Immunologic properties of purified epidermal Langerhans cells. *J Exp Med*, 1986. 164:605-613.

Janeway, Jr, Ch. A. and Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*, 2002. 20:197-216.

Kim, Y. J., et al. Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell response. *Eur J Immunol*, 1998. 28:881-890.

Kimber, I., et al. Langerhans Cell Migration and Cellular Interactions. *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 17.

Kripke M et al. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol*, 1990. 145: 2833.

Kudo, S., et al. A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: Hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med*, 1997. 185:777-784.

Kurosaki, T., et al. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of FcγRIII. *Nature*, 1989. 342:805-807.

Landmann, R., Müller, B., Zimmerli, W. CD14, new aspects of ligand and signal diversity. *Microbes and infection*, 2000. 2:295-304.

Lane, Peter J. L., et al. Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr Opin Immunol*, 1999. 11:308-313.

Liu E, Tu W, Law HK, Lau YL. Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br J Haematol* 2001;113(1):240-246.

Maldonado-López, R., et al. CD8α<sup>+</sup> and CD8α<sup>-</sup> subclasses of Dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med*, 1999. 189:587-592.

Martin, P., et al. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8α<sup>-</sup> and CD8α<sup>+</sup> dendritic cells lineages are generated from CD4<sup>low</sup> lymphoid-committed precursors. *Blood*, 2000. 96: 2511-2519.

Matsuno, K., et al. A life stage of particle-laden rat Dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to draining lymph. *J Exp Med*, 1996. 183:1865-1878.

Maurer, D., and Stingl G. Dendritic cells in the Context of Skin Immunity. *Dendritic cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 7. 111-118.

McKee, P. H. *Pathology of the skin with clinical correlations*. Ed Mosby-Wolfe. London, England. 1994.

Medzhitov, R., and Janeway Jr, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, 2000. 173:89-97.

Mellman I., et al. Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends cell Biol*, 1998. 8:231-237.

Meunier, L., et al. Heterogeneous Populations of Class II MHC<sup>+</sup> Cells in Human dermal Cell Suspensions: Identification of Small Subset Responsible for Potent Dermal Antigen-Presenting Cell Activity with Features Analogous to Langerhans Cells. *The Journal of Immunology*, 1993. 151(8):4067-4080.

Moll, H., et al. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol*, 1993. 23:1595-1601.

Moodycliffe A, et al. CD40-CD40 ligand interactions in vivo regulate migration of Ag-bearing dendritic cells from the skin to draining lymph nodes. *J Exp Med*. 2000, 191: 2011-2020.

Morelli, A. et al. Expression and modulation of C5a receptor (CD88) on skin dendritic cells. Chemotactic effect of C5a on skin migratory dendritic cells. *Immunology*, 1996. 89:126-134.

Muzio, M., and Mantovani, A. Toll-like receptors. *Microbes and infection*, 2000. 2:251-255.

Nestle, F. O., et al. Characterization of Dermal Dendritic Cells Obtained from Normal Human Skin Reveals Phenotypic and Functionally Distinctive Subsets. *The Journal of Immunology*, 1993. 151:6535-6545.

Nestle, F. O. and B. Nickoloff. Dermal dendritic cells are important members of the skin immune system. *Dendritic cells in fundamental Immunology*, J. Banachereau and D. Schmitt, Editors. 1995, Plenum Press: New York. P. 111-116.

Ni, K., and H. O'Neill. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunology and Cell Biology*, 1997. 75:223-230.

Ossevoort, M., et al. Functional and ultrastructural aspects of antigen processing by dendritic cells. *Dendritic cells in fundamental Immunology*, J. Banchereau and D. Schmitt, Editors. 1995, Plenum Press: New York. P. 227-230.

Peiser, L., and Gordon, S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes and Infection*, 2001. 3:149-159.

Petty, R and D. Hunt. Neonatal dendritic cells. *Vaccine* 1998. 16: 1378-1382.

Pierre, P., and Mellman, I. Development regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell*, 1998. 93:1135-1145.

Porcelli, S. A., et al. THE CD1 SYSTEM: Antigen-Presenting Molecules for T Cell Recognition of Lipids and Glycolipids. *Ann Rev Immunol*, 1999. 17:297-329.

Power, C. A., et al. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med*, 1997. 186:825-835.

Pugin, J., et al. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1994. 509-516.

Pulendran, B., et al. Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science*, 2001.293:253-256.

Randolph, G. J., et al. A physiology function for p-glycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from the skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95:6924-6929.

Regnault, A., et al. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*, 1999. 189:371-380.

Reis e Sousa, C., et al. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J Exp Med*, 1993. 178:509-519.

Rescigno, M., et al. Bacterial-induced neobiosintesis, stabilization and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998. 95:317-328.

Rescigno, M., et al. Dendritic cells survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*, 1998. 188:2175-2180.

Rescigno, M., F. Granucci and P. Ricciardi-Castagnoli. Dendritic cells at the end of the Millennium. *Immunol Cell Biol*, 1999. 77:404-410.

Ridge, J. P., et al. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and T-killer cell. *Nature*, 1998. 393: 474-478.

Rojas-Espinosa, O. *Inmunología (de memoria)*. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. 2001.

Romani, N., Ratzinger, G., et al. M of dendritic cells into lymphatics-The langerhans cells example: Routes, regulation, and relevance. *International Review of Cytology*, 2001. 207:237-270.

Romani, G. Schuler, and P. Fritsch. Ontogeny Ia-positive and Thy-1 positive leukocytes of murine epidermis. *J Invest Dermatol*, 1986. 86:129-133.

Rubartelli, A., et al. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the  $\alpha V\beta 3$  integrin and requires intracellular and extracellular calcium. *Eur J Immunol*, 1997. 27:1893-1900.

Santos-Argumedo, L. Principios básicos de la respuesta inmunológica, *Perinatal. Reprod. Hum.* Vol. 8 N° 1, enero-marzo, 1994.

Sallusto, F., M. Cella, C. Daniel., et al. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment; downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med*, 1995. 182:389-400.

Sozzani, S., et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and distinct set of chemokines. *J Immunol*, 1995. 155:3292-3295.

Sozzani, S., et al. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol*, 1997. 159: 1993-2000.

Sozzani, S., et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*, 1998. 161:1083-1086.

Steinman, R., Pack, M., Inaba K. Dendritic cells I the areas of Lymphoid organs. *Immunological Reviews*, 1997. 156:25-37.

Steinman, R. And Z. A. Cohn. Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*, 1973. 137:1142-1162.

- Steinman, R. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 1991. 9:271-296.
- Steinman, R. Dendritic cells. *Fundamental Immunology*. W. E. Paul. Philadelphia, USA., Lippincott-Raven. 1999.
- Stingl, G., K. Tamaki and S. Katz. Origin and function of Langerhans cells. *Immunol Rev*, 1980. 53:149-174.
- Stites. P. D. Inmunología Básica y Clínica. Ed. El manual Moderno, 8ª edición; México D. F., 51-84, 133-71.
- Stockwin, H. L., McGonagle, D., Martin, G. Dendritic cells: Immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and cell biology*, 2000. 78:91-102.
- Susuki, H., et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 1997. 386:292-296.
- Tang, A., et al. Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature*, 1993. 361:82-85.
- Taylor S and YJ. Bryson. Impaired production of  $\gamma$ -interferon by newborn cells in vitro is due to functionally immature macrophage. *J Immunol* 1985.135: 1493.
- Thomas, C. A., et al. Protection from lethal Gram-positive infection by macrophage scavenger receptor dependent phagocytosis. *J Exp Med*, 2000. 191:147-156.
- Tinoco JC, Salvador-Moysen J, et al. Epidemiología de las infecciones nosocomiales en un hospital de segundo nivel. *Salud Publica Mex*. 1997; 39: 25-31.
- Tucci A, et al. Are cord blood B cells functionally mature?. *Clin Exp Immunol* 1991. 84: 389.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*, 2000. 12:71-81.
- Vandenabeele, S., and Wu, L. Dendritic cell origins: Puzzles and paradoxes. *Immunol Cell Biol*, 1999. 77:411-419.
- Weiss. J. M., et al. An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic function. *J Cell Biol*, 1997. 137: 1137-1147.
- Write. *Science*, 1990. 249:1431-1433.

Yang, R. B., et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 1998. 395:284-288.

Zhang, Y., Y. Y. Zhang, et al. Transforming growth factor-beta 1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte-macrophage differentiation pathway. *Blood*, 1999. 93: 1208-1220.

Ziegler-Heitbrock, H. W., Ulevitch, R. J. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today*, 1993. 14:121-125.