



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DISTRIBUCIÓN *IN VIVO* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
INTESTINALES EN PRESENCIA DE UN
ANTÍGENO BACTERIANO ORAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

SELENE MEZA PÉREZ

ASESORES:

DR. LEOPOLDO FLORES ROMO

BIOL. ADRIANA FLORES LANGARICA

REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

2003





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*La vida cobra sentido cuando se hace
de ella una aspiración a no renunciar
a nada*

José Ortega y Gasset

*La sabiduría suprema es tener sueños bastante
grandes para no perderlos de vista mientras
se persiguen.*

William Faulkner

Agradecimientos

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por confiar en mí y darme la extraordinaria oportunidad de trabajar en su laboratorio.

A la Biol. Adriana Flores Langarica por sus valiosas enseñanzas, por toda la atención, el apoyo y la paciencia que me brindó para realizar este trabajo.

A mis sinodales por sus sugerencias y comentarios, especialmente a la M. en C. Rosario González por brindarme su ayuda.

A la Q.B.P. Juana Calderón por la ayuda, asesoría y buenos comentarios para la realización de las técnicas y el desempeño en el laboratorio.

A todo el laboratorio de Inmunología Celular (Yahir, Gina, Alex, Raquel, Rene, Marcela, Jay y Adriana) por contribuir en la realización de este trabajo, son un excelente grupo de trabajo. Especialmente a Miguel por corregir y aportar sus conocimientos a mi trabajo y a Oscar por revisar a detalle mi escrito y sobre todo por su "inmunoamistad".

Al laboratorio de la Dra. Estrada, especialmente a Héctor por proporcionarme las bacterias para llevar a cabo este trabajo.

A mi gran amiga y hermana académica Corina por su apoyo (tanto en las buenas como en las malas, en un laboratorio o en otro) y amistad a lo largo de toda la carrera. Has sido parte importante de mi formación.

A mis amigos de toda la vida Liliana, Ma. Dolores y Víctor, por creer en mis capacidades y seguir siendo parte elemental de mi existencia.

A Jose Luis y Omar que siempre tienen una sonrisa para mí.

A todos aquellos en mi familia que han creído que lo que hago vale la pena.

A mis abuelos (Manuel y Trinidad) por su apoyo y sus consejos.

A todos aquellos profesores y amigos en la carrera que han participado en mi formación y crecimiento personal.

Dedicatoria

A mis padres (Hilda y Porfirio) por ser ejemplo de vida, dedicación y fortaleza, por alentarme a perseguir mis sueños y porque sin su apoyo y cariño no habría conseguido llegar a este punto. Ustedes son y serán siempre el pilar de mi vida.

A Daniel por el largo camino recorrido a mi lado, por creer en mí y en mi trabajo, por su paciencia, cariño y apoyo y por seguir formando parte fundamental de la realización de muchos sueños.

| | |
|--|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 2 |
| LISTA DE FIGURAS Y GRAFICAS | 4 |
| RESUMEN..... | 5 |
| INTRODUCCIÓN | 6 |
| Características Histológicas Generales del Tracto Gastrointestinal | 6 |
| <i>Mucosa</i> | 6 |
| <i>Submucosa</i> | 9 |
| <i>Muscular externa</i> | 9 |
| <i>Serosa o adventicia</i> | 9 |
| <i>Intestino Delgado</i> | 10 |
| <i>Intestino Grueso</i> | 11 |
| <i>Sistema Sanguíneo y Linfático del intestino</i> | 12 |
| Tejido Linfoide Asociado a Mucosas | 13 |
| Microflora residente | 15 |
| <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC) en intestino..... | 17 |
| Inmunología intestinal..... | 19 |
| Células Dendríticas | 21 |
| <i>Linaje de Células Dendríticas</i> | 22 |
| <i>DC inmaduras y maduras</i> | 25 |
| <i>Migración de DC</i> | 28 |
| <i>Distribución de células dendríticas</i> | 29 |
| <i>Activación de linfocitos T</i> | 31 |
| <i>Activación de linfocitos B</i> | 32 |
| Descripción de DC en el GALT..... | 32 |
| JUSTIFICACIÓN | 35 |
| OBJETIVO GENERAL | 36 |
| Objetivos Particulares | 36 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 37 |
| <i>Animales</i> | 37 |
| <i>Inoculación de Ratones con ETEC</i> | 37 |
| <i>Obtención de intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos</i> | 37 |
| <i>Inmunohistoquímica</i> | 38 |
| <i>Cuantificación celular</i> | 40 |
| <i>Análisis Estadístico</i> | 40 |
| RESULTADOS | 41 |
| DISCUSIÓN..... | 48 |
| CONCLUSIONES..... | 52 |
| PERSPECTIVAS | 52 |
| APÉNDICE..... | 53 |
| REFERENCIAS..... | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| AMP | Adenosín monofosfato |
| APC | Célula Presentadora de antígeno |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| DAB | Diaminobencidina |
| DC | Célula dendrítica |
| CC | Quimiocina (2 cisteínas consecutivas en su secuencia) |
| CCR | Receptor para quimiocinas CC |
| CLA | Antígeno linfocítico cutáneo |
| CP | Criptoplasmas |
| CT | Toxina del cólera |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica |
| FAE | Epitelio asociado al folículo |
| Fc | Fracción cristalizante de un anticuerpo |
| GALT | Tejido linfóide asociado al intestino |
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos |
| GMP | Guanosín monofosfato |
| ICAM | Molécula de adhesión molecular |
| IDC | Célula dendrítica interdigitante |
| IFN | Interferón |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| LC | Célula de Langerhans |
| LP | Lámina propia |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LT | Enterotoxina termo lábil |
| LTA | Ácidos lipoteicóicos |
| MALT | Tejido linfóide asociado a mucosas |
| M-CSF | Factor estimulador de colonias de monocitos |
| MHC-Cl | Complejo principal de histocompatibilidad clase I |
| MHC-CII | Complejo principal de histocompatibilidad clase II |
| MNL | Ganglio linfático mesentérico |
| NK | Célula citotóxica natural |

| | |
|--------|-------------------------------------|
| PBS | Amortiguador de fosfatos |
| PP | Placa de Peyer |
| PTC | Célula T plasmacitoide |
| TCR | Receptor de células T |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| SAVPOX | Estreptavidina peroxidada |
| SED | Domo subepitelial |
| SS | Solución salina |
| ST | Enterotoxina termo estable |
| VIH | Virus de inmunodeficiencia humana |

LISTA DE FIGURAS Y GRAFICAS

| | |
|-----------|---|
| Fig. 1 | Corte histológico de intestino de ratón |
| Fig. 2 | Tracto digestivo de ratón |
| Fig. 3 | Esquema general de un ganglio linfático |
| Fig. 4 | Micrografía de <i>Escherichia coli</i> |
| Fig. 5 | Esquema general del mecanismo de patogenicidad de ETEC |
| Fig. 6 | Representación general de inmunología intestinal |
| Fig. 7 | Fotografía de célula dendrítica de cérvix humano |
| Fig. 8 | Linajes de células dendríticas |
| Fig. 9 | Representación de los estados de maduración de células dendríticas |
| Fig. 10 | Ciclo de vida de células dendríticas |
| Fig. 11 | Representación de la ubicación de células dendríticas |
| Fig. 12 | Diagrama de flujo de la metodología para la obtención de Intestino delgado y MLN |
| Fig. 13 | Diagrama de flujo que ilustra la técnica inmunohistoquímica empleando los anticuerpos CD11c y CD205 para muestras de ratones control e inoculados con ETEC. |
| Fig. 14 | Inmunohistoquímica en lamina propia intestinal para dos marcadores 40x |
| Fig. 15 | Inmunohistoquímica en MLN para dos marcadores 10x |
| Fig. 16 | Inmunohistoquímica en MLN para dos marcadores 40x |
| Gráfica 1 | Densidad celular en LP de ratones normales |
| Gráfica 2 | Densidad celular en MLN de ratones normales |
| Gráfica 3 | Densidad celular en LP de ratones normales e inoculados con ETEC |
| Gráfica 4 | Densidad celular en MLN de ratones normales e inoculados con ETEC |
| Tabla 1 | Número de células positivas en LP |
| Tabla 2 | Número de células positivas en MLN |
| Tabla 3 | Incremento y disminución en la densidad celular de DC en LP y MLN |

RESUMEN

Las células dendríticas (DC) son las células presentadoras de antígeno (APC) más eficientes descritas hasta ahora. Estas células capturan antígenos en tejidos periféricos no linfoides, los procesan y transportan a órganos linfoides secundarios donde los presentan a los linfocitos. Sin duda, la mucosa intestinal representa una superficie de alto contacto antigénico en la que se han descrito diversas subpoblaciones de DC. Aunque *Escherichia coli* es considerada una bacteria comensal, existen cepas patógenas como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), agente causal de la llamada diarrea del viajero. Considerando lo anterior, se estudiaron *in vivo* las variaciones en las poblaciones de DC en la lámina propia (LP) y ganglio linfático mesentérico (MLN) en presencia de ETEC en un modelo murino de colonización bacteriana. Para ello se realizaron inmunohistoquímicas en criocortes de MLN e intestino delgado, utilizando CD11c y CD205 como marcadores de DC. En el caso del modelo de colonización (ETEC), se observó un incremento en la densidad celular de DC CD11c⁺ en la LP así como en MLN de animales, en relación a los controles. Respecto a CD205 se observó incremento en LP, mientras que en MLN se observó disminución en la densidad celular de DC después de la inoculación con ETEC. El antígeno empleado fue una bacteria viva no invasiva (ETEC), inoculada oralmente (entrada fisiológica normal del antígeno) y ante el cual observamos una respuesta a las 24 hrs. posterior a la inoculación.

INTRODUCCIÓN

Las mucosa del tracto gastrointestinal, constituida por varias capas, forma la mayor interfase entre el ambiente externo y el interno del organismo, es en este sitio donde se lleva a cabo la digestión y la absorción de nutrientes (Kato and Owen, 1994). La mucosa intestinal está expuesta a antígenos muy variados que van desde componentes de los alimentos, microorganismos comensales hasta agentes patógenos como virus, parásitos y bacterias (Fawcett, 1995).

Esta constante amenaza de penetración de la barrera epitelial por toxinas y por organismos patógenos ha dado lugar al desarrollo de mecanismos especiales de defensa inmune, donde los principales participantes son linfocitos, células plasmáticas, células cebadas, macrófagos y células dendríticas (Fawcett, 1995).

Características Histológicas Generales del Tracto Gastrointestinal

Aunque el tubo digestivo está formado básicamente por cuatro regiones anatómicas (esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso), todos ellos presentan cuatro capas o tunicas que son semejantes a todo lo largo del tubo digestivo, denominadas: mucosa, submucosa, muscular (Fig. 1) y serosa o adventicia. (Leeson y Leeson, 1990). Sin embargo, cada una de ellas manifiesta modificaciones y especializaciones particulares.

Mucosa

Está formada por un epitelio cilíndrico simple que descansa sobre una lámina basal, una capa subyacente de sostén formada por tejido conjuntivo laxo que se conoce como lámina propia, la cual está vascularizada, alberga glándulas, vasos linfáticos y ganglios linfáticos ocasionales (Gartner y Hiatt, 1997), por último una capa externa de músculo liso, denominada *muscularis mucosae* que está dispuesta por lo general en dos estratos uno interno circular y otro externo longitudinal. La contracción de esta capa ayuda a la digestión y absorción de nutrientes (Leeson y Leeson, 1990). En resumen, el epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa se denominan de manera conjunta Mucosa.

La superficie del intestino delgado posee modificaciones para incrementar su área y realizar eficientemente el proceso de digestión. En la mayor parte de las regiones la mucosa es irregular y presenta prolongaciones digitiformes hacia la luz intestinal, denominadas vellosidades, las cuales aumentan la superficie de contacto (Leeson y Leeson, 1990). Las vellosidades son evaginaciones de la mucosa compuestas por un núcleo de tejido conjuntivo laxo constituido de lámina propia, contiene en su mayoría células del sistema inmune, que se sitúan sobre una delicada trama de fibras elásticas y reticulares (Geneser, 1997), además existe una rica red de capilares, una arteriola, una vénula y un vaso linfático o quilífero central. Este vaso linfático es un delgado vaso que termina en forma ciega hacia la parte distal de la vellosidad. Los vasos linfáticos son ramas terminales de un plexo ubicado en la submucosa; además las contracciones periódicas de la *muscularis mucosae* promueven que los vasos linfáticos vacíen su contenido hacia el plexo, desde donde fluye hacia los linfáticos mesentéricos (Fawcett, 1995).

Epitelio

La mucosa intestinal está revestida por un epitelio cilíndrico simple, compuesto por diversos tipos celulares como: enterocitos, células caliciformes, células enteroendócrinas y células de Paneth.

Enterocitos (células de absorción): Son células cilíndricas, con núcleo alargado y localizado en la porción basal de la célula. La superficie luminal presenta un prominente borde en cepillo o estriado constituido por microvellosidades, las cuales son proyecciones cilíndricas fijas a la membrana en la superficie apical (luminal). Estas estructuras solo pueden observarse por microscopía electrónica de transmisión (Gartner y Hiatt, 1997), se disponen radialmente desde las puntas de los enterocitos, mezclándose entre sí formando una cubierta de superficie o glucocáliz (Fawcett, 1995) y representan otro mecanismo para incrementar la superficie del intestino delgado. La función principal de los enterocitos es la digestión terminal y absorción tanto de agua como de nutrientes (Gartner y Hiatt, 1997).

Células caliciformes: Aparecen distribuidas de forma difusa entre los enterocitos (Fawcett, 1995). Estas células tienen una base estrecha, y un vértice que se expande para darles su forma típica (forma de cáliz) por la acumulación de gránulos de secreción mucosa. Son células productoras de mucígeno, cuya forma hidratada es la mucina, componente del moco que forma una capa protectora que reviste al epitelio (Gartner y Hiatt, 1997). El moco secretado forma una película protectora sobre el glucocáliz (Leeson and Lesson, 1990), la cual protege de la abrasión e impide la adherencia e invasión de algunas bacterias patógenas.

Células enteroendócrinas: Son de tamaño variable, en las criptas tienden a ser ovoides piramidales y en las vellosidades son casi cilíndricas, poseen gránulos de secreción concentrados en la porción basal, su estrecha región apical suele extenderse hacia la luz, donde presentan un borde en cepillo (Geneser, 1997; Fawcett, 1995). Los péptidos que secretan son reguladores activos que participan en la secreción gástrica, la motilidad intestinal, la secreción pancreática y la contracción de la vesícula biliar (Leeson y Leeson, 1990). En general contienen una sola hormona aunque la misma célula puede contener diferentes hormonas como gastrina, somatostatina y secretina (Fawcett, 1995).

Células de Paneth: Estas células son de forma piramidal, con un núcleo redondeado u oval orientado hacia la porción basal. Cuentan con numerosos gránulos de secreción hacia la parte apical de la célula, además muestran gran actividad de síntesis proteica. Estas células no migran ascendentemente en las vellosidades, sino que permanecen en grupos en la base de las criptas de Lieberkühn. En el humano, los gránulos secretores de las células de las Paneth son homogéneos y de elevada densidad electrónica, pero en los roedores muestran una parte central pálida rodeada por un halo periférico más denso pero presentan lisozima, proteína capaz de digerir la pared de ciertas bacterias (Fawcett, 1995). Asimismo, las células de Paneth secretan péptidos microbicidas que forman una barrera contra los microorganismos externos. Estos péptidos se denominan defensinas y contienen gran cantidad de cisteínas, funcionando como antibióticos de amplio espectro contra una amplia gama de bacterias y hongos. La síntesis de estos péptidos aumenta en respuesta a citocinas inflamatorias como interleucina 1 (IL, del inglés interleukine) y el factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés tumor necrosis factor). Este mecanismo de respuesta inmune innata es muy importante para proteger la integridad de la capa epitelial del intestino delgado (Ayabe *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000).

Además, el epitelio intestinal que cubre las vellosidades se continúa en glándulas intestinales denominadas criptas de Lieberkühn, ubicadas en la porción basal de las vellosidades. El epitelio del tracto intestinal se renueva continuamente por la proliferación de células en las criptas de Lieberkühn, las células aquí originadas migran desde la base hasta la porción apical de las vellosidades, donde se eliminan o exfolian. El epitelio intestinal se renueva por completo en 2 ó 3 días (aproximadamente) en roedores de laboratorio y en 3 a 6 días (promedio) en el humano (Fawcett, 1995).

Submucosa

La submucosa se extiende entre la mucosa y la lámina muscular externa y consta de tejido conjuntivo fibroblástico denso irregular, con menos células que la lámina propia, a menudo se observan cúmulos de tejido linfoide, contiene también vasos sanguíneos y linfáticos así como un plexo nervioso parasimpático que controla la motilidad de la mucosa y las actividades secretoras de las glándulas (Gartner y Hiatt, 1997). En el duodeno está ocupada en gran parte por glándulas tuboalveolares ramificadas cuyas porciones secretorias se parecen a las glándulas de Brunner (Gartner y Hiatt, 1997), su producto de secreción es alcalino (pH entre 8.2 y 9.3) y su principal función es proteger a la mucosa frente a los posibles efectos nocivos del jugo gástrico (Fawcett, 1995).

Muscular externa

Consta por lo menos de dos capas de músculo liso, además de una capa de tejido conjuntivo (Geneser, 1997). El músculo se dispone en una capa circular interna y una longitudinal externa. Aunque también existen algunas bandas de fibras musculares que pasan de una a otra capa (Fawcett, 1995). Entre las dos hay un plexo vascular y un plexo nervioso (plexo nervioso mesentérico) con relación a abundantes ganglios linfáticos (Leeson y Leeson, 1990). Esta capa muscular es la responsable de la peristaltis (Gartner y Hiatt, 1997).

Serosa o adventicia

Es la capa más profunda, con relación al lumen y está formada por tejido conjuntivo acrolar relativamente denso y elástico, tiene una cubierta continua formada por células mesoteliales y está separada de la capa muscular subyacente por una fina capa de tejido conjuntivo laxo (Fawcett, 1995). Cuando se mezcla con el tejido conjuntivo de las estructuras vecinas recibe el nombre de adventicia, pero en muchas otras regiones está cubierta por el peritoneo y entonces se denomina serosa. Contiene vasos sanguíneos y linfáticos (Leeson y Leeson, 1990).

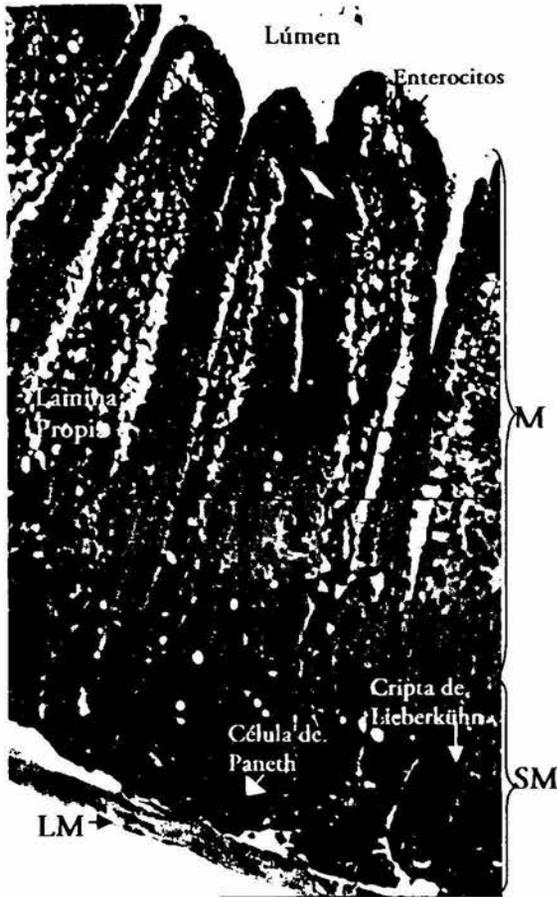


Fig. 1. Corte histológico de intestino de ratón teñido con hematoxilina-eosina (H-E), en el que se muestran la mucosa (M), submucosa (SM), lámina muscular (LM) y las vellosidades intestinales formadas por una capa de epitelio simple (enterocitos), en la parte central de cada vellosidad se observa la lámina propia y hacia la lámina muscular, se observan las criptas de Lieberkühn (20x) (Flores-Langarica, 2001).

Intestino Delgado

El intestino delgado digiere el material alimenticio y absorbe los productos terminales de la digestión (Gartner y Hiatt, 1997), en el humano y en el ratón se divide macroscópicamente en tres segmentos sucesivos: duodeno, yeyuno e íleon (Foster *et al.*, 1983) (Fig. 2), los cuales se describen brevemente a continuación.

Duodeno

El duodeno esta firmemente adherido a la pared dorsal del abdomen y se localiza en el retroperitoneo en casi todo su trayecto, no posee mesenterio en la mayor parte de su longitud. Rodea la cabeza del páncreas y se continúa con el yeyuno (Fawcett, 1995).

Yeyuno

El yeyuno está suspendido de la pared dorsal de la cavidad abdominal por medio del mesenterio y se mueve libremente sobre éste. Representa las dos quintas partes proximales de la longitud del intestino delgado en humano, mientras que en el ratón representa alrededor de dos cuartas partes (Gartner y Hiatt, 1997; Cook, 1983).

Íleon

El íleon está situado en la porción inferior de la cavidad abdominal, unido al mesenterio en el humano constituye aproximadamente las tres quintas partes, mientras que en el ratón representa tres cuartas partes (Fawcett, 1995; Cook, 1983).

Intestino Grueso

El intestino grueso comprende la última parte del tubo digestivo. Se divide en 3 secciones: colon, recto y conducto anal (Fig. 2), que en conjunto forman el intestino terminal. En el intestino grueso se realiza la reabsorción del agua. La secreción más importante es la de mucina, sintetizada por células caliciformes, abundantes en esta región (Geneser, 1997).

Colon

Constituye casi toda la longitud del intestino grueso, las vellosidades están poco desarrolladas y se observan criptas de Lieberkühn, carece de células de Paneth. La lámina propia, muscular de la mucosa y submucosa son semejantes a las del intestino delgado (Gartner y Hiatt 1997).

Recto y Conducto anal

La histología es parecida a la del colon, el epitelio de la mucosa anal es cúbico simple, y las criptas de Lieberkühn son más profundas y menos frecuentes (Gartner y Hiatt 1997).

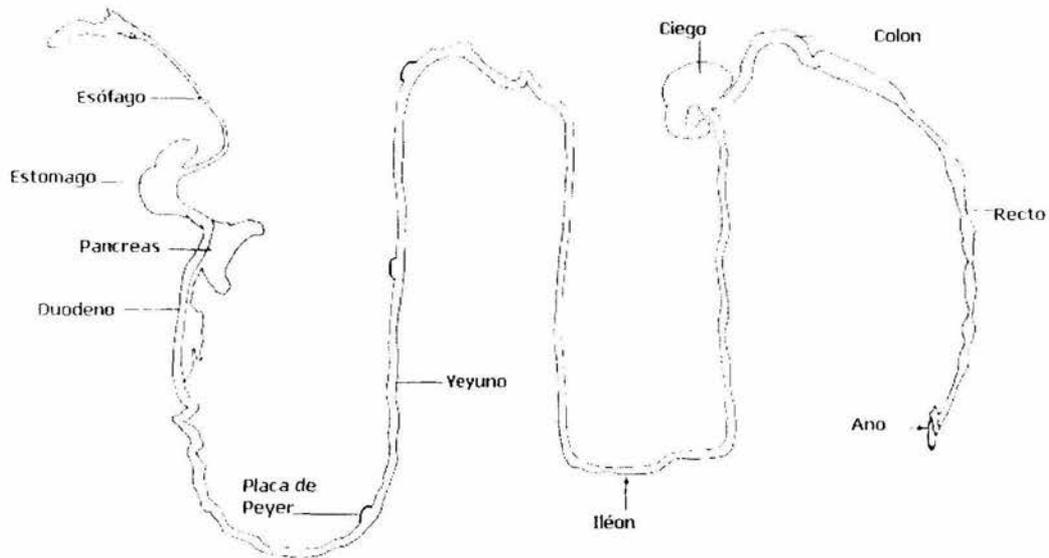


Fig. 2. Tracto digestivo de ratón. se observa la longitud y proporción de las secciones anatómicas del intestino delgado y grueso, incluyendo la localización de las Placas de Peyer (Cook, 1983).

Sistema Sanguíneo y Linfático del intestino

En la mayor parte de su extensión, el intestino está suspendido de la pared posterior del abdomen mediante un mesenterio, que consiste en una fina lámina doble de células mesoteliales a través de la cual los vasos sanguíneos irrigan el intestino.

Los vasos sanguíneos forman una red capilar en la lámina propia, de manera que cada vellosidad recibe una y en ocasiones dos arteriolas, las cuales desembocan en un gran plexo vascular ubicado en la submucosa; las cuales atraviesan y salen de la muscular externa conectándose con la irrigación sanguínea que se dirige al mesenterio.

Por otro lado, los vasos linfáticos siempre se sitúan junto a los capilares sanguíneos. Desde el plexo submucoso, los vasos linfáticos atraviesan la muscular externa y reciben numerosos vasos procedentes del plexo linfático de la capa muscular que llegan al tejido conectivo situado entre las glándulas, en cada vellosidad se encuentra un vaso quilífero central que descarga su contenido en el plexo linfático submucoso (Fawcett, 1995).

Tejido Linfoide Asociado a Mucosas

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, del inglés mucosal-associated lymphoid tissue) puede dividirse en varios componentes, los cuales se localizan en distintas regiones del cuerpo como en el intestino, el árbol bronquial, área nasofaríngea, glándulas mamarias, salivales y lagrimales, y en los órganos genitourinarios (Croitoru and Bienenstock, 1994).

De todos los componentes del MALT, el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, del inglés gastrointestinal-associated lymphoid tissue) es el más estudiado dada la importancia de la respuesta inmune local debido a su alta interacción con el ambiente externo.

El GALT consiste en agregados linfoides, representados por las placas de Peyer (PP, del inglés Peyer's patch), los ganglios linfáticos mesentéricos (MLN, del inglés mesenteric lymph nodes), los ganglios linfáticos solitarios (Croitoru and Bienenstock, 1994) y las criptoplasmas (Kanamori *et al.*, 1996), en conjunto con la lámina propia.

Las estructuras linfoides organizadas del tracto gastrointestinal tienen características que las distinguen de otros tejidos linfoides, como la falta de una cápsula definida, o linfáticos aferentes y la presencia de células especializadas en el epitelio que facilitan el transporte de antígenos del lumen intestinal (MacDonald and Spencer, 1994).

En particular, los ganglios linfáticos (Fig. 3) son pequeñas estructuras encapsuladas de forma arriñonada con una parte cóncava denominada hilio, en las cual se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos. Por estos órganos linfoides circula la linfa, y es aquí donde se inicia la respuesta inmune adaptativa (Abbas *et al.*, 2000). Cada ganglio linfático posee una cápsula de tejido conjuntivo fibroso, en ocasiones existe además tejido adiposo. Tiene una superficie convexa, perforada por vasos linfáticos aferentes que vacían su linfa en el seno subcapsular, éste se continúa con los senos corticales o paratrabeculares que descargan su linfa en los senos medulares (Gartner y Hiatt, 1997). La linfa deja al ganglio por vasos linfáticos eferentes localizados a nivel del hilio (Weiss and Greep, 1997). Desde el punto de vista histológico, el ganglio se encuentra subdividido en tres regiones: corteza, paracorteza y médula.

La corteza se subdivide en compartimentos que se extienden hacia el hilio, llamados trabéculas. Suspendida de la cápsula y de las trabéculas hay una red de tejido conectivo reticular que forma la

estructura de todo el ganglio linfático (Gartner y Hiatt, 1997). También existen en la corteza compartimentos que albergan folículos linfoides poblados por linfocitos B y a menudo contienen centros germinales (Junqueira *et al.*, 1998).

La paracorteza es la región del ganglio linfático entre la corteza y la médula, ésta alberga principalmente linfocitos T y células presentadoras de antígeno, que migran hacia esta región donde presentan antígenos en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés Major Histocompatibility Complex), a los linfocitos T (Gartner y Hiatt, 1997).

La médula está compuesta de grandes senos linfáticos rodeados por células linfoides organizadas en acúmulos que se denominan cordones medulares, en los cuales encontramos linfocitos, células plasmáticas y macrófagos (Gartner y Hiatt, 1997).

Los ganglios linfáticos mesentéricos (ubicados en la región intestinal), están formados por un ganglio alargado situado en el mesenterio y pequeños ganglios adicionales que drenan en la cavidad peritoneal y en una larga sección del intestino. Representa uno de los ganglios más prominentes en el ratón. El flujo aferente lleva antígenos, células presentadoras de antígeno y células linfoides, por su parte la vía eferente rara vez lleva células presentadoras pero está enriquecida con anticuerpos (Cook 1983).

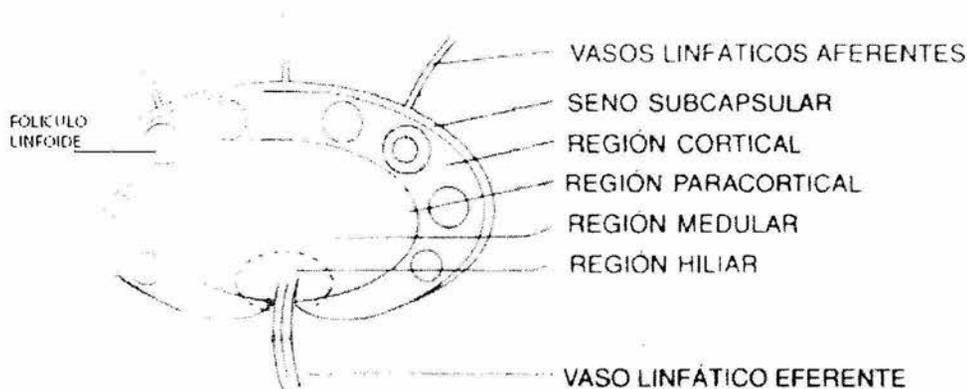


Fig. 3. Esquema de la organización de un ganglio linfático (Rojas-Espinosa, 2001).

Las Placas de Peyer son agregados linfoides inicialmente descritas por Peyer en 1677 (MacDonald and Spencer, 1994). Estas estructuras se ubican en el lado opuesto al mesenterio en la parte distal del intestino delgado, alojadas entre la lámina propia y submucosa, apareciendo entre las vellosidades intestinales y la superficie de la serosa (Croitoru and Bienenstock, 1994). Histológicamente se observan ganglios, cada uno

de los cuales presenta un centro germinal cercano a la muscular externa y un casquete o corona en contacto con el epitelio (Ventura y Campos, 1992).

Histológicamente, en las placas de Peyer se pueden definir tres porciones: el epitelio asociado al folículo (FAE, del inglés follicular associated epithelium), el área parafolicular y el área folicular. En el FAE destacan células con morfología diferente a la de los enterocitos; poseen un espacio extracelular llamado hueco central o bolsillo, dentro del cual se han descrito linfocitos, macrófagos y células dendríticas (Kato and Owen, 1994); además presentan micropliegues, por lo que se denominan células M (Ventura y Campos, 1992). Las células M juegan un papel importante en la captura de antígenos del lumen intestinal, debido a que tienen una alta capacidad pinocítica y transportan moléculas de la luz intestinal a los tejidos subepiteliales (Abbas *et al.*, 2000). Dadas estas características, las PP son quizá las mejores vías de captación de antígenos del lumen hacia las células del sistema inmune (MacPherson and Liu, 1999).

En el área parafolicular se describen células dendríticas, al igual que linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. En contraste, en el área folicular se encuentran linfocitos B así como macrófagos y células dendríticas foliculares (Kellsal and Strober, 1996).

Recientemente se han identificado agregados de tejido linfoide en la lamina propia de ratón, denominados Criptoplasmas (CP del inglés criptopatches). En estos agregados existe maduración extratímica de linfocitos T $\gamma\delta$ (Kanamori *et al.*, 1996).

Microflora residente

El intestino de los mamíferos contiene una flora compleja, dinámica y diversa, de bacterias comensales. El tracto gastrointestinal es colonizado por diversos organismos desde el momento del nacimiento, y sigue albergando diversas poblaciones a lo largo de la vida del hospedero (Murray *et al.*, 2002), de hecho se ha estimado que el cuerpo humano tiene aproximadamente 10^{14} células, de las cuales el 90% corresponde a microorganismos viviendo sobre o dentro de él (Hooper *et al.*, 1998).

Los miembros de la microbiota intestinal pueden clasificarse en dos grupos: los microorganismos de la flora comensal que representan especies que habitan normalmente el intestino, y los microorganismos

ajenos que normalmente no ocupan ese ambiente ecológico y cuya presencia irrumpe en la estabilidad de la flora comensal, por ejemplo cepas patógenas de *Escherichia coli* (Fig. 4). Estas especies pueden entrar o llegar al intestino por comida o agua contaminada (Hooper *et al.*, 1998).

En la microflora comensal del tracto gastrointestinal del ratón se han descrito bacterias con forma fusiforme como *Clostridium sp.*, bacteroides, espiroquetas, propionibacterias, lactobacilos, grupo N estreptococo y la familia *Arthromitacea* (Foster *et al.*, 1983), esta última soporta las condiciones de peristaltis presentes en el intestino delgado, gracias a una estructura que le permite anclarse a las células epiteliales, principalmente en el íleon distal (es una bacteria gram-positiva, su tamaño oscila entre 0.7 y 11.8µm de ancho y entre 20 a 80µm de largo) (Foster *et al.*, 1983). La microflora residente está formada por más de 400 especies diferentes de bacterias, y la mayor parte corresponde a estreptococos, lactobacilos y enterobacterias (Kato and Owen 1994).

La microflora comensal que coloniza inicialmente puede fungir como una primera línea de defensa inespecífica contra la invasión de organismos exógenos, patógenos u oportunistas, ya que la flora comensal utiliza los recursos. Los estudios de las asociaciones que ocurren entre las bacterias y su hospedero típicamente se han enfocado en la interacciones con organismos patógenos (Hooper *et al.*, 1998).

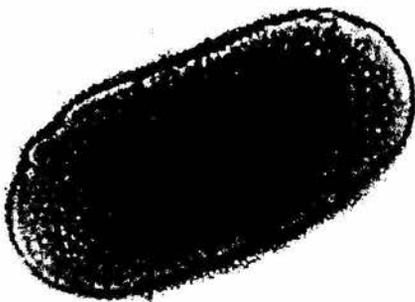


Fig. 4. Micrografía electrónica de *Escherichia coli* que muestra las fimbrias principal mecanismo de colonización.

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) en intestino

Las infecciones intestinales son una de las interacciones en las cuales participan agentes patógenos tales como virus, protozoarios, helmintos y principalmente bacterias con la mucosa intestinal (Levine and Nataro, 1994).

A nivel global, la disentería, las fiebres entéricas y las diarreas son problemas predominantes en países subdesarrollados, muchos niños y jóvenes sufren de estas enfermedades (Levine and Nataro, 1994); sin embargo en los países industrializados constituyen un problema de salud menor.

La lista de agentes etiológicos que causan infecciones intestinales es larga entre ellos destacan; *E. coli* enteropatógena, *Shigella sp.*, *Shigella desintereae*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* y *Entamoeba histolytica*, sin embargo uno de los agentes más citado como patógeno entérico y de importancia en salud pública es *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, del inglés enterotoxigenic *E. coli*) (Levine *et al.*, 1983), ya que es el agente causal de un número considerable de muertes infantiles por diarrea en países en desarrollo (entre ellos México) (Souza *et al.*, 2002) y es considerada una de las causas más comunes de diarrea, siendo el agente causal de la llamada diarrea del viajero (Wenneras *et al.*, 1999).

ETEC es un miembro de la familia de las enterobacterias que se caracterizan por su respiración facultativa, ya que son aeróbicos en presencia de oxígeno pero viven anaeróbicamente en el intestino, por ende no puede concluir su ciclo de vida en un ambiente externo al tracto gastrointestinal (Souza *et al.*, 2002).

La ETEC se adhiere a la mucosa del intestino delgado y secreta enterotoxinas que conducen a un aumento de la secreción intestinal (Levine *et al.*, 1983). El factor de colonización es de tipo fimbria la cual se adhiere a los enterocitos (Levine and Nataro 1994). Las fimbrias pueden ser estructuras rígidas de 6-7 nm de diámetro mientras que otras consisten en una fimbria, delgada y flexible de aproximadamente 3 nm de diámetro (Levine *et al.*, 1984). Anteriormente se ha descrito que las cepas de ETEC pueden manifestar invasiones limitadas en cultivos *in vitro*, pero esto no ha sido demostrado *in vivo* (Nataro and Kaper, 1998) (Fig. 5).



Fig. 5. Esquema general del mecanismo de patogenicidad de ETEC, las bacterias se adhieren a los enterocitos por medio de fimbrias, una vez que se lleva a cabo la colonización se secretan las enterotoxinas (ST y LT), ocasionando diarrea (Nataro and Kaper, 1998).

Las infecciones causadas por ETEC resultan en copiosas diarreas que aparentemente no causan daño morfológico a la mucosa intestinal ya que se le considera una bacteria no invasiva (Wenneras *et al.*, 1999). Funcionalmente, esta infección puede ser considerada una intoxicación intracelular que conduce a una disrupción de las vías bioquímicas de los enterocitos (Levine and Nataro, 1994). La alteración bioquímica inducida en los enterocitos es causada por la secreción de dos tipos de enterotoxinas: una enterotoxina termo lábil (LT, del inglés heat-labile toxin) y una termo estable (ST, del inglés heat-stable toxin). La LT es una toxina oligomérica, similar en estructura y función a la enterotoxina del cólera (CT, del inglés cholera toxin), que activa la adenil ciclasa de los enterocitos aumentando la concentración intracelular de adenosin monofosfato (AMP), lo cual disminuye su capacidad de absorción provocando una diarrea osmótica, (diarrea del viajero) debido a la acumulación en el contenido luminal de iones (Nataro and Kaper 1998).

Por su parte, la ST es un péptido pequeño de 18-19 residuos de amino ácidos, rico en cisteínas, esta toxina activa a la guanilato ciclasa lo cual aumenta la concentración intracelular de guanósín monofosfato (GMP), incrementando la secreción intestinal (Levine and Nataro, 1994). No obstante, la ST actúa más rápido debido a la localización apical del receptor de guanilato ciclasa, causando una infección sintomática en niños y adultos inmunosuprimidos (Nataro and Kaper, 1998). La diarrea producida por ETEC tiene un periodo de incubación de 1-2 días y persiste en promedio durante 3-4 días (Murray *et al.*, 2002). La causa principal de la infección es por contaminación fecal de la comida o agua (Souza *et al.*, 2002).



La mucosa intestinal es considerada la superficie de contacto más amplia en el organismo, por lo tanto el número de antígenos al cual esta expuesta es muy alto. En esta superficie se asienta flora normal y en ocasiones es la vía de ingreso para una gran variedad de agentes patógenos (Acosta y Cruz, 1992).

IZT.

Además de las bacterias patógenas y comensales, otro recurso de estimulación antigénica dentro del GALT viene por proteínas de los alimentos, sin embargo no se genera respuesta inmune a este tipo de antígenos solubles ya que se presenta tolerancia oral. La tolerancia oral es la supresión específica celular y/o humoral de la respuesta inmune a antígenos que son administrados por vía oral, probablemente para prevenir las reacciones de hipersensibilidad a las proteínas de los alimentos y a los antígenos bacterianos presentes en la flora comensal (Weiner, 2000; Nagler-Anderson, 2001).

En la mucosa intestinal (como en otras mucosas) se producen altos niveles de inmunoglobulina A (IgA), aproximadamente el 80% de las células plasmáticas localizadas en la lámina propia son productoras de IgA (dimérica), en humanos alrededor del 60 al 70% de la secreción total de anticuerpos es de IgA, la cual se secreta a través del epitelio a la luz intestinal. Esta Ig es el principal elemento de la respuesta inmune humoral ya que se une a microorganismos y toxinas presentes en el lumen, neutralizándolos y bloqueando su entrada al hospedero (Abbas *et al.*, 2001; Fagarasan and Honjo, 2003).

La respuesta inmune del tracto intestinal puede iniciarse en tres sitios: placas de Peyer, Lámina propia (LP, del inglés lamina propria) y Ganglios linfáticos mesentéricos, que en su conjunto constituyen el GALT (MacPherson and Liu, 1999). La lámina propia del intestino contiene una población mixta de células incluyendo linfocitos T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$), linfocitos B activados, células plasmáticas, macrófagos, eosinófilos y células dendríticas (Kato and Owen, 1994) (Fig. 6).

En el ratón el 20% de las células en la lámina propia son linfocitos B y de ellos, el 1.6% son células plasmáticas. Por su parte los macrófagos residentes en la mucosa intestinal proliferan abundantemente; la mayoría de estas células presentan antígenos en el contexto de las moléculas del MHC, ya que poseen alta capacidad fagocítica, de procesamiento y presentación antigénica (Ventura y Campos, 1992).

Las placas de Peyer son acúmulos linfoides constituidos por un número variable de folículos linfoides los cuales poseen una zona central formada por linfocitos B productores de IgA, estos representan el 70-

85% del total de linfocitos B, fuera de los folículos encontramos linfocitos T cooperadores, macrófagos y células dendríticas (Fawcett, 1995). Asimismo existen linfocitos B que migran a la lámina propia desde las placas de Peyer, para diferenciarse en células plasmáticas productoras de IgA e IgE (Ventura y Campos, 1992).

Los ganglios linfáticos son el principal sitio de inducción de respuestas inmunes, debido a que contienen distintas regiones, áreas de linfocitos T y áreas de linfocitos B, a través de las que existe una continua recirculación. Durante este flujo, los linfocitos vírgenes pueden interactuar con células presentadoras de antígeno (APC del inglés antigen presenting cells), e iniciar respuestas inmunes; además en los folículos se encuentran células dendríticas foliculares (FDC, del inglés follicular dendritic cell) que retienen antígenos en su estado nativo, los cuales pueden interactuar principalmente con linfocitos B (Steinman *et al.*, 1997).

La capacidad del GALT para llevar a cabo sus funciones protectoras depende en parte de las células que se encargan de la captura, reconocimiento y presentación de antígenos, las APC, un ejemplo de ello son las células dendríticas (DC del inglés dendritic cell) (Mellman *et al.*, 1998).

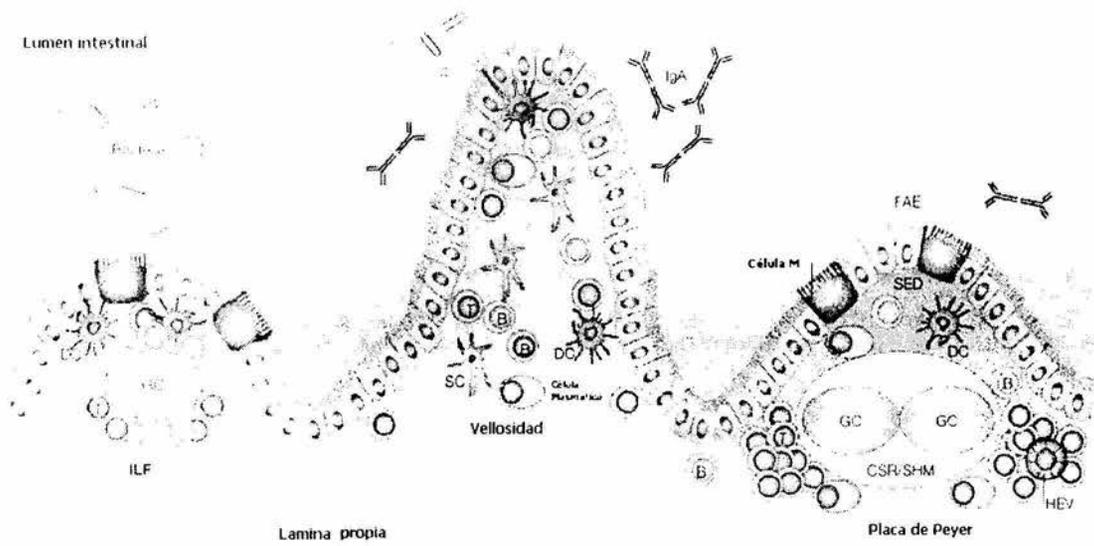


Fig. 6. Representación general de inmunología intestinal que muestra la vía de entrada antigénica, la organización celular de las placas de Peyer (epitelio asociado al folículo FAE, área subepitelial SED y las vénulas de endotelio alto HEV) y la lamina propia así como la secreción de IgA dimérica hacia el lumen intestinal (Fagarasan and Honjo, 2003).

Células Dendríticas

Las células dendríticas fueron descritas por primera vez en 1868 por Paul Langerhans en piel; utilizando impregnación con sales de oro en piel humana, descubrió una población de células en la región suprabasal de la epidermis, Langerhans consideró a estas células como parte del sistema nervioso (Stingl *et al.*, 1980), por lo que no se les adjudicó ningún papel en la respuesta inmune. Posteriormente en 1973, Ralph Steinman describió una subpoblación celular en órganos linfoides murinos; empleando suspensiones celulares de bazo observó células no adherentes que se caracterizaban por contar con prolongaciones citoplasmáticas a manera de pseudópodos las cuales se retraían y extendían constantemente en condiciones de cultivo, por lo que las denominó “Células Dendríticas” (Steinman and Cohn, 1973). Estas células poseen un núcleo irregular, baja actividad endocítica, abundante citoplasma, sus dendritas miden aproximadamente 10µm son delgadas y finas, además de ser identificadas por su morfología irregular (Fig. 7), presentan altos niveles de expresión de moléculas del MHC de clase II (Bell *et al.*, 1999).

Las DC son un sistema de células presentadoras de antígenos que destacan no sólo por capacidades de presentación por tres vías moleculares (MHC clase I, II y CD1) sino también de coestimulación (utilizando moléculas como CD40, CD80 y CD86) y producción de citocinas (IL-12, etc.), por lo que se les considera iniciadoras y moduladoras de la respuesta inmune; debido a estas características se les ha otorgado el termino de APC “profesionales” (Banchereau and Steinman, 1998; Steinman, 1999; Flores-Romo, 2001).

Las DC se originan en la médula ósea y sus precursores se dirigen por vía sanguínea a los tejidos periféricos no linfoides (piel, pulmón, intestino, mucosa genital, entre otros), donde se consideran inmaduras, este estado se caracteriza por una alta capacidad de captura y procesamiento de antígenos (las DC muestrean, atrapan, engloban y digieren a los antígenos) pero una baja capacidad de estimulación de linfocitos T. Tanto antígenos bacterianos como algunos mediadores inflamatorios promueven la maduración y migración de estas células por vía linfática hacia el ganglio linfático regional donde presentan en las áreas de linfocitos T los antígenos capturados y procesados. En este punto se les considera maduras, y se caracterizan porque disminuye su capacidad de capturar antígenos (baja capacidad endocítica, y disminución en la expresión de receptores Fc) pero incrementan su capacidad de estimulación de linfocitos T vírgenes, ya que expresan altas cantidades de MHC CII así como moléculas de coestimulación, adhesión y señalización (por ejemplo: CD28/B7-1 y 2, LFA-3/CD58, ICAM-1/CD54,) que interactúan con los receptores correspondientes en los linfocitos T (Cella *et al.*, 1997; Banchereau and Steinman, 1998; Flores-Romo, 2001).

Al parecer, las DC también tienen un papel importante en la inducción de tolerancia inmunológica. En particular, las DC tímicas presentan péptidos propios a los timocitos, permitiendo de este modo la eliminación de las células T autoreactivas; existe también evidencia del papel de las DC en el desarrollo de la tolerancia periférica (Bell *et al.*, 1999; Harper *et al.*, 1996).

Por lo tanto las DC tienen un importante papel en el control de la inmunidad adaptativa, ya que funcionan como centinelas *in vivo* gracias a que su distribución optimiza la captura de antígenos y su migración a los órganos linfoides más cercanos, hace más eficiente la selección clonal de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Son potentes estimuladoras de la respuesta inmune específica puesto que se requiere de un pequeño número de DC con bajas dosis de antígeno para provocar una fuerte respuestas de linfocitos T (Steinman, 1999; Banchereau and Steinman, 1998).

Actualmente se realizan una serie de investigaciones sobre las funciones de las DC para el desarrollo de terapias contra el cáncer y para combatir enfermedades como el lupus y para la patogénesis de infecciones virales como el VIH (Steinman, 1999).



Fig. 7. Fotografía de célula dendrítica CD1a⁺ de cérvix humano en la que se muestran la morfología típica dendrítica 100x (Balderas-Carrillo, 2002).

Linaje de Células Dendríticas

Las DC son una población celular heterogénea, ya que presentan diferencias tanto en fenotipo como en función cuando se originan *in vitro* y cuando se encuentran *in vivo* en sitios anatómicos (Grabbe *et al.*, 2000).

En humano, las DC se originan de una célula progenitora totipotencial en médula ósea, la cual genera células CD34⁺ (Yamaguchi and Ogawa, 1999). Las células progenitoras CD34⁺ de sangre de cordón umbilical de humano cultivadas en presencia del factor estimulador de colonia granulocito/macrófago (GM-CSF, del inglés granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) y TNF generan diversos tipos de celulares dentro de los que se encuentran DC (Cella *et al.*, 1997) (Fig. 8).

Existen dos subpoblaciones de DC que pueden derivarse de precursores humanos CD34⁺ de médula ósea o sangre de cordón umbilical; en presencia de GM-CSF y TNF- α . Estas subpoblaciones se identifican por la expresión de CD1a y CD14. Los precursores CD14⁺ CD1a⁺ presentan características de células de Langerhans (LC, del inglés Langerhans cells), cuentan con gránulos de Birbeck, expresan antígeno linfocítico cutáneo (CLA, del inglés cutaneous lymphocyte antigen), antígeno Lag y la molécula de unión E-cadherina (Shortman and Caux, 1997). Las células CD14⁺CD1a⁻ presentan características de DC intersticiales y expresan CD2, CD9, CD68, factor de coagulación XIIIa y no existe expresión de CLA pero se expresa CD14 (Shortman and Caux 1997; Vandenabeele and Wu, 1999).

Hace algunos años se describió un tipo celular denominado células T plasmacitoides cuyo nombre se debe a su parecido morfológico con las células plasmáticas; poseen un fenotipo muy particular, ya que expresan CD4 que es un marcador de linfocitos T, también expresan CD68, CD36 marcadores de monocitos, y CD15 marcador de granulocitos. Las células plasmacitoides corresponden a un tipo especial de célula que se localiza en las zonas de linfocitos T de los órganos linfoides, (amígdalas, aunque también se observaron en sangre periférica, sangre de cordón umbilical y en médula ósea fetal). Se consideran precursores de DC de origen linfoide en humanos (Vandenabeele y Wu, 1999; Grouard *et al.*, 1997).

Por otro lado la existencia de DC relacionadas con el linaje linfoide se han descrito en ratón, diversos estudios sugieren que el precursor de linfocitos T en el timo genera además células citotóxicas naturales (NK, del inglés natural killer) y DC (Vandenabeele and Wu, 1999). En contraste con los progenitores de la médula ósea, el precursor linfoide expresa CD44, c-Kit, el antígeno Sca-2 y bajos niveles de CD4 (Romani 1994).

Interesantemente, el GM-CSF parece ser indispensable para generar células de linaje mieloide tanto en humano como en ratón, pero no es requerido en el caso del precursor linfoide; las DC generadas empleando GM-CSF, expresan todos los marcadores de una DC madura (altos niveles de moléculas del MHC clase II, CD11c, CD40, CD86 y CD205) (Vandenabeele and Wu, 1999).

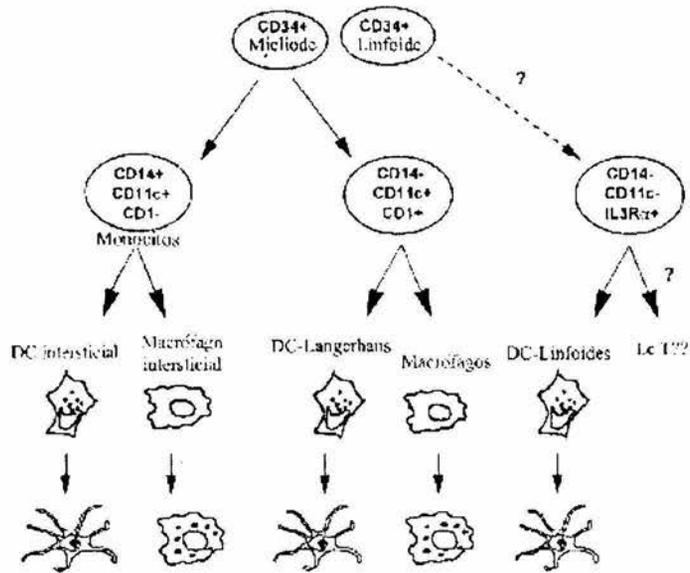


Fig. 8. Desarrollo del linaje linfóide y mielóide de las DC en humanos. Los progenitores CD34⁺ mieloides que se diferencian hacia el fenotipo CD14⁺CD11c⁺CD1⁻, bajo la influencia de GM-CSF e IL-4 generan DC inmaduras; mientras que los progenitores que se diferencian a CD14⁻CD11c⁺CD1⁺, bajo la influencia de GM-CSF, TGF-β e IL-4 generan LC inmadura. El precursor linfóide se diferencia a DC inmaduras en respuesta a IL-3 (Banchereau *et al.*, 2000).

Hasta ahora el marcador que permite diferenciar entre los dos linajes es CD8α, el cual forma un homodimero (αα) en las DC linfoides (CD8α⁺) mientras que en las poblaciones mieloides no está presente (CD8α⁻) (Banchereau *et al.*, 2000). Marcadores como CD205 y CD1d tienen altos niveles de expresión en DC linfoides, aunque pueden expresarse en DC mieloides generadas *in vitro* (Vremec and Shortman, 1997). *In vivo*, ambas subpoblaciones parecen activar linfocitos T CD4⁺ eficientemente (Puledran *et al.*, 1999).

En ratones, los monocitos CD45RA⁺CD11c⁺CD11b⁺ aislados de sangre pueden generar DC maduras en cultivo, utilizando GM-CSF y TNF-α. Estas células representan a la subpoblación DC1 mieloides. Un segundo precursor de DC ha sido aislado recientemente de tejido linfóide y sangre de ratón, este precursor DC2 es equivalente al precursor DC2 en humanos con morfología plasmacitoide; esta población plasmacitoide es un potente productor de IFN-α e IFN-β (Shortman and Liu, *et al.*, 2002).

En ratón existe evidencia de distintas funciones inmunoregulatoras, por ejemplo las DC de origen linfóide inducen respuestas Th1 y las DC de origen mielóide inducen respuestas Th2; en contraste en humanos las DC linfoides generan predominantemente respuestas Th2 y las DC mieloides generan

respuestas Th1. Sin embargo las DC pueden adquirir la capacidad para inducir respuestas de células T (Th1 y Th2), favoreciendo el concepto de que el tipo de respuesta inducido por DC sobre los linfocitos T, parece depender de la naturaleza del estímulo que active a las DC y no tanto a la ontogenia (Grabbe *et al.*, 2000).

Resumiendo, se ha demostrado claramente que distintos tipos de DC pueden ser generados de progenitores de varios linajes (mieloide o linfoide), pero poco se conoce si estos subtipos diferentes de DC están presentes *in vivo* y si tienen propiedades funcionales peculiares (Grabbe *et al.*, 2000).

DC inmaduras y maduras

En los tejidos periféricos no linfoides como piel, vías áreas, intestino, entre otros (en los cuales existe un mayor contacto antigénico) las DC se encuentran en un estado denominado de inmadurez inmunológica, caracterizado por una gran capacidad para la captura y procesamiento de antígenos (Cella *et al.*, 1997). Estas células no son tan potentes para activar linfocitos T ya que expresan bajos niveles de moléculas de coestimulación (Banchereau and Steinman, 1998) (Fig. 9).

Las DC inmaduras cuentan con diversos mecanismos para la captura eficiente de antígenos, sin embargo la macropinocitosis parece ser el mecanismo más usado, es dependiente del citoesqueleto e involucra la formación de vesículas. En las DC, la macropinocitosis es constitutiva, y una sola célula es capaz de tomar un gran volumen de fluido (aproximadamente la mitad del volumen de la célula por hora). Las DC también cuentan con otros mecanismos como la endocitosis mediada por receptor (tipo lectina C, como el receptor de manosa, CD-205), receptores Fcγ tipo I (CD64) y tipo II (CD32); este tipo de receptores es utilizado en la captura de antígenos vía Igs (Bell *et al.*, 1999). En las DC se ha descrito la internalización de diversas sustancias como: perlas de latex, cuerpos apoptóticos y necróticos, virus, bacterias y parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Banchereau *et al.*, 2000; Cutler *et al.*, 2001).

De manera importante las DC expresan altos niveles del receptor de manosa, el cual contiene dominios de unión a carbohidratos que intervienen en la internalización de una variedad de glicoproteínas. Los receptores de manosa pueden jugar un papel crítico en la fagocitosis de partículas y microorganismos (Bell *et al.*, 1999). CD205, homólogo al receptor de manosa, es un receptor multilectina específico de DC;

el tallo citoplásmico de CD205 contiene secuencias que regulan la señalización intracelular. Tanto el receptor de manosa como CD205 tienen motivos de tirosina y una vez que ocurre la internalización de microorganismos o partículas, forma vesículas cubiertas con clatrina (Figdor *et al.*, 2002). Este receptor se encuentra sobre DC en las áreas de células T de los órganos linfoides y en las DC cercanas a los epitelios (Steinman *et al.*, 1997).

Los antígenos exógenos capturados son presentados en moléculas del MHC-CII (Cella *et al.*, 1997). Dentro de las DC inmaduras existen abundantes compartimentos ricos en moléculas del MHC de clase II (MIICs). Durante la maduración de las DC, estos compartimentos se unen con vesículas que transportan antígenos proteicos, para convertirse en vesículas no lisosomales que descargan sus complejos MHC-péptido a la superficie de la DC (Banchereau and Steinman, 1998). La capacidad de presentación antigénica de las DC supera la de los macrófagos y linfocitos B activados (Mellman *et al.*, 1998) ya que se ha demostrado que si se ponen en interacción poblaciones de linfocitos con DC existe una potente estimulación (75 a 90%), mientras que con macrófagos y linfocitos B activados no ocurre estimulación (Steinman *et al.*, 1983).

Por su parte, los antígenos endógenos son presentados en el contexto de MHC de clase I. Esta vía endógena opera con la degradación de proteínas citosólicas que son transportadas por proteínas (TAP 1 y TAP 2) al retículo endoplásmico donde se unen a las moléculas de MHC- CI (Banchereau *et al.*, 2000). Los péptidos presentados en este contexto sobre las DC pueden derivarse de proteínas solubles o células apoptóticas (Bell *et al.*, 1999). Otra vía de presentación se lleva a través de las moléculas CD1, las cuales son glicoproteínas no polimórficas que están involucradas en la presentación de lípidos y glicolípidos a los linfocitos T (Banchereau *et al.*, 2000). Estas moléculas son marcadores fenotípicos de las DC (Steinman, 1999).

Debido a los altos niveles de expresión de moléculas presentadoras (MHC-CI, CII y CD1), y la presencia de moléculas de coestimulación las DC activan eficientemente a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Steinman, 1999; Bell *et al.*, 1999).

Durante el proceso de maduración se da un incremento en la expresión de moléculas de MHC clase I y II, moléculas de coestimulación (CD80, CD86 y CD40) y moléculas de adhesión como ICAM-1 y VLA4 (Cutler *et al.*, 2001). Entre las moléculas que inducen la maduración se incluyen CD40, TNF y algunas interleucinas. Asimismo, algunos productos derivados de patógenos como LPS, DNA bacteriano y RNA de

doble cadena, entre otros, pueden inducir la maduración, además de señales inflamatorias y antiinflamatorias en el microambiente local que incluyen TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β , prostaglandinas y señales (citocinas) derivadas de linfocitos T (Banchereau *et al.*, 2000) (Fig. 9).

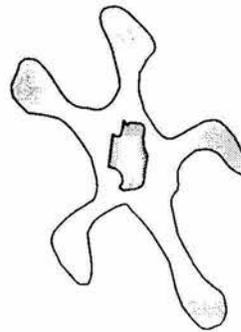
De este modo, la maduración es un proceso asociado con varios eventos coordinados como los niveles en los receptores endocíticos/fagocíticos y de quimiocinas, aumento en la expresión de moléculas de coestimulación (CD40, CD58, CD80 y CD86) así como cambio en su morfología (reorganización del citoesqueleto y adquisición de alta motilidad celular) (Winzler *et al.*, 1997; Banchereau *et al.*, 2000).

A) DC INMADURA



- ↑ Captura de Antígenos
- ↑ Fagocitosis
- ↑ Endocitosis
- ↑ CCR1, CCR5, CCR6
- ↓ CCR7
- ↓ CD80, 86, 54, 58
- ↓ CD40

B) DC MADURA



- ↑ Presentación de Antígenos
- ↓ Fagocitosis
- ↓ Endocitosis
- ↓ CCR1, CCR5, CCR6
- ↑ CCR7
- ↑ CD80, 86, 54, 58
- ↑ CD40

Fig. 9. Representación esquemática de los estados de maduración de DC. A) Características fenotípicas principales de las DC inmaduras localizadas en tejidos periféricos. B) Fenotipo presente en DC maduras en órganos linfoides importantes en la presentación y activación de linfocitos.

De manera importante, el ligando de CD40 incrementa la viabilidad de las DC e induce su maduración manifestada por el incremento de CD80, CD83 y CD86, además esta interacción produce diversas citocinas, incluyendo IL-1, TNF, quimiocinas y de manera importante IL-12, la cual participa en la generación de las respuestas Th1 (Bell *et al.*, 2000).

En la maduración de las DC se incrementa la expresión de un receptor de quimiocina, CCR7, por lo que las DC adquieren sensibilidad a MIP-3 β y a 6Ckine; de este modo las células en proceso de maduración salen de los tejidos y entran al torrente linfático, dirigido potencialmente por 6Ckine expresada

en los vasos linfáticos, por lo tanto las células que entran en los ganglios linfáticos se conducen dentro del área paracortical en respuesta a la producción de MIP-3 β (esta quimiocina se expresa preferentemente dentro de la paracorteza de los órganos linfoides secundarios) y/o 6Ckine por células en las áreas de linfocitos T (Banchereau *et al.*, 2000; Dieu *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1999).

Las DC salen de los tejidos no linfoides hacia los vasos linfáticos aferentes para llegar a las áreas de linfocitos T en los ganglios linfáticos. Después de la captura del antígeno, disminuye la expresión del receptor CCR5 por lo que la respuesta de las DCs inmaduras a MIP-3 α (quimiocina específica para DC inmaduras) no se dá. Consecuentemente, las DC que están en el proceso de maduración escapan del gradiente de MIP-3 α (Dieu *et al.*, 1998).

Las bacterias y sus componentes como el lipopolisacárido (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA) son buenos activadores de la maduración DC tanto en humanos como en ratón, ya que pueden ser reconocidas por receptores como el receptor de manosa a través de los receptores Fc, que se expresan en la superficie de las DC y causan en estas células un aumento en la expresión de moléculas del MHC- CI y CII , de moléculas de coestimulación (CD80, CD86 y CD40) así como moléculas de adhesión (ICAM-1 e VLA4) (Rescigno *et al.*, 2000).

Migración de DC

Un importante atributo de las DC en varios estados de su maduración es su movilidad. Esta propiedad capacita a las DC para moverse del torrente sanguíneo a los tejidos periféricos y de estos tejidos a los órganos linfoides. Los mecanismos que controlan el reclutamiento y migración de DC han sido poco definidos, sin embargo se ha demostrado que la IL-1 y TNF- α participan en la activación y movilización de las células de Langerhans hacia los ganglios linfáticos regionales (Bell *et al.*, 1999) (Fig. 10).

Las DC pueden producir y responder a las quimiocinas, debido a que poseen receptores específicos como CCR1, CCR5 y CCR6 que se expresan sobre células dendríticas inmaduras, mientras que las DC maduras expresan el receptor de quimiocinas CCR7 (Bell *et al.*, 1999).

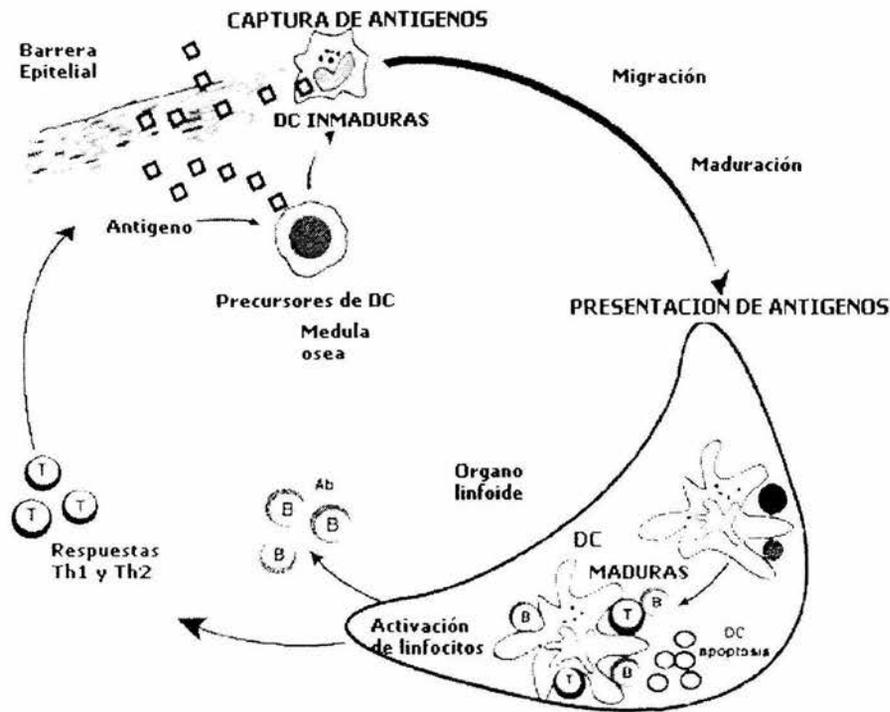


Fig. 10. Ciclo de vida de DC. Los precursores circulan vía sanguínea provenientes de la médula ósea y entran a los tejidos (piel, intestino, pulmón, entre otros) como DC inmaduras, estas células tienen la capacidad de capturar antígenos. Después de la captura antigénica migran hacia los órganos linfoides (DC maduras) presentando el antígeno en el contexto de moléculas del MHC-Cl y CII a los linfocitos T y B vírgenes, los cuales son activados produciendo una expansión y diferenciación clonal, posiblemente en este punto las DC mueren (Banchereau *et al.*, 2000).

Algunos factores que inducen la migración *in vivo* son: $TNF-\alpha$, LTA y LPS este último estimula a diversas células (leucocitos polimorfonucleares) para producir citocinas y quimiocinas, por ejemplo, GM-CSF, $TNF-\alpha$, IL-1, MIP-1 α y β y se sabe que estos productos regulan el tráfico de las DC de la sangre al tejido y de los tejidos a los órganos y pueden inducir su maduración (Banchereau *et al.*, 2000).

Distribución de células dendríticas

DC interdigitantes (IDCs, del inglés interdigitating dendritic cell); se encuentran ubicadas en las zonas de linfocitos T de los ganglios linfáticos. Son células de mayor tamaño que los linfocitos T ($> 9 \mu m$), con diversos procesos citoplásmicos (dendritas) extendidas entre los linfocitos, expresan moléculas del MHC-Cl y CII, de coestimulación como CD40, CD54 y CD86, así como CD11c un miembro de la familia de las β_2

integrinas (Shelley *et al.*, 2002), además existe una baja expresión de receptores para la toma o captura de antígenos, como CD205 (Steinman, 1999; Steinman *et al.*, 1997) (Fig. 11).

Células veladas; se localizan en los vasos linfáticos aferentes, estas son células de mayor tamaño que los linfocitos T ($> 9 \mu\text{m}$) con procesos móviles. En los vasos linfáticos estas células muestran morfología dendrítica y capacidad de estimular linfocitos T, pero no internalizan partículas (Steinman, 1999) (Fig. 11).

Células de Langerhans. Se localizan en la capa suprabasal de la epidermis y en otros epitelios estratificados como los de vagina y tráquea. Son una población de DC inmaduras que se caracterizan por la presencia de gránulos de Birbeck, estructuras que sólo se observa por microscopía electrónica, las cuales tienen forma de raqueta de tenis y están compuestas por membranas superpuestas por láminas estriadas que dan una apariencia dentada. Las LC expresan moléculas del MHC CII, CD205, Fc γ R, antígeno F4/80 y una molécula de unión estrecha llamada E-cadherina. Además en condiciones normales las LC son las únicas en la epidermis que expresan MHC-CII y que tienen la enzima ecto-ATPasa (específica para ATP y ADP) dependiente de calcio (Ca $^{++}$) (Stingl *et al.*, 1980; Dombrowski *et al.*, 1998).

DC en órganos periféricos no linfoides: Son células similares a las LCs se encuentran en diversos epitelios y mucosas como vagina, cérvix, ano, esófago, vías aéreas del pulmón e intestino (Maric *et al.*, 1996). Las DC pueden extenderse dentro del epitelio y pueden estar listas para el contacto con el espacio intraepitelial. Como marcador característico presentan gran cantidad de moléculas del MHC de clase II (Steinman, 1999) (Fig. 11).

DC intersticiales: Ubicadas dentro de los espacios intersticiales como en los espacios entre las fibras musculares del corazón ó dermis, entre otros; en los cuales drena la linfa proveniente de los vasos linfáticos aferentes, son DC ricas en moléculas del MHC II (Steinman, 1999). Su función en estos órganos no ha sido bien establecida se piensa que pueden estar involucradas en el mantenimiento de la tolerancia y en los procesos de homeostasis de los tejidos (Steptoe and Thomson, 1999) (Fig. 11).

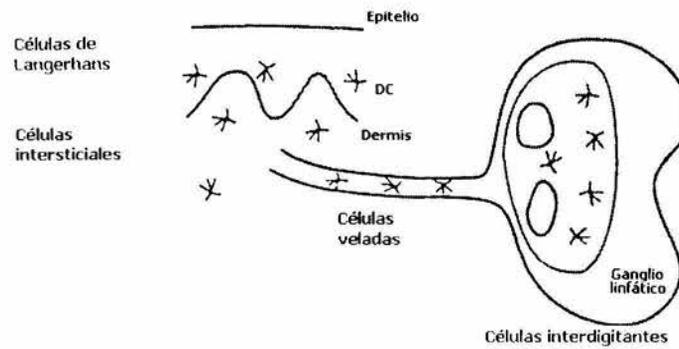


Fig. 11. Representación de la ubicación de DC en diferentes compartimentos. De acuerdo al sitio en el que se encuentren reciben diferentes nombres, pero mantienen características similares en términos de morfología, fenotipo y función (Steinman, 1999).

Activación de linfocitos T

La capacidad de activar linfocitos T vírgenes constituye una de las principales funciones de las DC, tanto *in vitro* como *in vivo* (Steinman, 1999). La activación de linfocitos T CD4' y CD8' se inicia cuando estos reconocen el antígeno presentado en el contexto de MHC CII y CI respectivamente (complejo péptido-MHC), por las células presentadoras de antígeno (Banchereau *et al.*, 2000).

El reconocimiento de los complejos péptido-MHC sobre las células dendríticas es gracias al receptor de célula T (TCR, del inglés T cell receptor), el cual se localiza en la superficie de los linfocitos T, la interacción entre estas dos moléculas constituye la primera señal de la activación (Cella *et al.*, 1997). Además de esta interacción se requiere la participación de moléculas de adhesión parecidas a las integrinas como $\beta 1$ y $\beta 2$, así como miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (CD2, CD50, CD54 y CD58) (Bell *et al.*, 1999). La segunda señal involucra la interacción de moléculas de coestimulación expresadas en la superficie de la DC y sus ligandos correspondientes expresados en la superficie de los linfocitos T, como CD28 y TCR (Banchereau *et al.*, 2000).

Los linfocitos T además pueden activarse vía CD40-CD40L, con lo cual se incrementa la expresión de CD80/CD86 y la liberación de citocinas como IL-1, TNF, IL-12 y quimiocinas (Banchereau *et al.*, 1994; Inaba *et al.*, 1994). La capacidad y la eficiencia para generar esa segunda señal (expresión de

moléculas para la activación de células T) permitió que se les otorgara a las DC, el termino de “APC profesionales” (Mellman *et al.*, 1998).

Activación de linfocitos B

Las DC pueden activar directamente linfocitos B vírgenes y de memoria; promoviendo a los linfocitos B activados a diferenciarse a células plasmáticas, esto mediado por diversas citocinas como; IL-12 e IL-16 (Banchereau *et al.*, 2000).

Cuando existe la interacción a través CD40 se secretan citocinas como IL-4 e IL10, estos elementos son clave para la proliferación y cambio de isotipo de los linfocitos B para la producción de IgM, IgG e IgA. Las DC inducen la expresión de IgA de superficie y de secreción en los linfocitos B vírgenes activados a través de CD40, esto es mediado por TGF β (Bell *et al.*, 1999; Banchereau *et al.*, 1994).

Las DC tienen la capacidad para regular directamente las respuestas de los linfocitos B, para generar una respuesta inmune humoral (Banchereau *et al.*, 2000).

Descripción de DC en el GALT

Diversos estudios han descrito la distribución de las DC a lo largo del GALT (placa de Peyer, lámina propia y ganglio linfático mesentérico), sin embargo la descripción fenotípica y funcional de estas células aún no es completa.

En el caso de las PP, por medio de inmunohistoquímica en cortes histológicos, se han descrito DC CD205⁺ en el área interfolicular en rata (Soesatyo *et al.*, 1990). En el ratón, las DC se describen en dos sitios; en el área de linfocitos T existen CD205⁺/CD11c⁺ y en el área subepitelial CD205⁺/CD11c⁺ (MacPherson and Liu, 1993). Recientemente se describió la presencia de tres subpoblaciones de DC en las placas de Peyer murinas, estas son CD11b⁺/CD8 α ⁻ (consideradas mieloides) en el domo subepitelial, CD11b⁺/CD8 α ⁻ (linfoides) en las regiones interfoliculares; y células doble negativas, CD11b⁺/CD8 α ⁻ en

ambos sitios. Estas células pueden estar involucradas en la inducción de diferenciación de linfocitos T vírgenes CD4⁺ (Iwasaki and Kelsal, 2001).

Por su parte las DC en lamina propia se han caracterizado morfológicamente en cortes histológicos de intestino y con el uso de marcadores (para la molécula MHC de clase II y CD205) como lo muestra el estudio realizado en la década de los 80's en el que se sugiere que las DC se encuentran presentes en la lámina propia, ya que existe una población celular que exhibe una morfología irregular (dendrítica), que expresa moléculas del MHC clase II y carece de los marcadores presentes en macrófagos (por inmunohistoquímica, Mayrhofer *et al.*, 1983). Estudios posteriores han descrito DC a lo largo del tracto gastrointestinal en los cuales se describen células CD205⁺ localizadas en la lámina propia del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) (Soesatyo *et al.*, 1990).

Por otro lado Maric y colaboradores en 1996, empleando una fijación en etanol previa a la inclusión, describen DC MHC-CII⁺ en la lámina propia, además una subpoblación distribuida entre los enterocitos. En relación con este trabajo, estudios recientes (Rescigno *et al.*, 2001) reportan DC en el epitelio, a las que se les confiere la función de captación de antígenos directamente del lumen intestinal, a través de los enterocitos, sin perturbar la integridad de la barrera epitelial. Estas observaciones resultan de importancia, ya que sugieren una vía de entrada antigénica no descrita anteriormente, especialmente para antígenos alimenticios, microorganismos no invasores y/o comensales.

La presencia de DC en el GALT incluye los ganglios linfáticos, lugar en el cual se lleva a cabo la respuesta inmune. Las DC se encuentran principalmente en las áreas de células T; se han descrito DC CD205⁺, CD80⁺, CD40⁺, CD68⁺, en las áreas de células T. Existen otros marcadores que no se restringen a estas áreas como CD11c, descrito cerca del seno subcapsular, en las regiones paracorticales al igual que en las áreas de células T y MHC CII⁺ descrito tanto en áreas de células T como en áreas de células B. Este fenotipo se ha descrito utilizando anticuerpos dirigidos contra estas moléculas en cortes histológicos de ganglios linfáticos (Steinman *et al.*, 1997). Sin embargo estos datos representan de forma general las DC en ganglios linfáticos, debido a que no existen descripciones detalladas de DC en los MLN.

La interacción entre las DC intestinales y diversos antígenos como protozoarios y bacterias se han descrito utilizando en su mayoría modelos *in vitro*; o en trabajos que complementen tanto experimentos *in vivo* como *in vitro*, tal es el caso de un estudio llevado a cabo administrando antígenos intrainestinalmente, mostrando que las DC intestinales pueden adquirir antígenos y activar linfocitos T vírgenes. Este trabajo se

realizó en ratas a las que se les inyectó antígeno intrainestinal y posteriormente se canularon por el conducto torácico para coleccionar DC y observar la capacidad de estas células para activar linfocitos T CD4⁺ *in vitro* (Liu and MacPherson, 1993).

Los resultados mostrados por Ingalls y Golenbock en 1995 demuestran que las células que expresan el fenotipo CD11c/CD18 en cultivos *in vitro* pueden responder al lipopolisacárido de bacterias gram negativas como *Salmonella minnesota*, puesto que el heterodímero CD11c/CD18 es una proteína integral de membrana que funciona como receptor bacteriano (Ingalls and Golenbock, 1995). Otro trabajo efectuado *in vitro* demuestra que la bacteria *Salmonella* puede entrar eficientemente y sobrevivir dentro de DC CD11c⁺ purificadas de órganos linfoides. Las poblaciones de DC expuestas a este patógeno intracelular responden incrementando la producción de IL-1, IL-6 e IL-12, lo que sugiere que estas células pueden ser una fuente importante de estas citocinas durante la respuesta contra la infección por *Salmonella* (Marriott *et al.*, 1999).

Asimismo Chirido y colaboradores en el 2002 reportan que purificando DC CD11c⁺ de lámina propia de ratón, estas células pueden tomar antígenos (como ovoalbumina) administrados oralmente e inducir una expansión clonal de linfocitos T específica para el antígeno administrado (Chirido *et al.*, memorias del Simposio Internacional de DC e Inmunoterapia, Buenos Aires, 2002).

Recientemente, utilizando *Salmonella* (bacteria enteropatógena) como antígeno administrado oralmente se observó que esta bacteria puede generar respuestas tipo Th1 en las placas de Peyer y en los MLN, y puede regular la actividad de los linfocitos T en tejido linfoide intestinal, lo que sugiere que las DC están involucradas en estas respuestas (Hughes and Galán, 2002).

Estos trabajos también subrayan la importancia de utilizar la ruta natural de infección en el estudio de la respuesta inmune *in vivo* a patógenos intestinales (Hughes and Galán, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Las DC son las APC con mayor capacidad para iniciar una respuesta inmune, debido a su habilidad para capturar antígenos (inmaduras) en los órganos periféricos no linfoides, posteriormente migran y los presentan a los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios (Mellman *et al.*, 1998; Banchereau *et al.*, 2000), lo cual implica la activación (maduración) así como la migración de estas células (Cella *et al.*, 1997; Banchereau and Steinman, 1998).

La mucosa intestinal es una de las superficies de mayor contacto antigénico. A pesar de que las Placas de Peyer son la vía clásica de entrada antigénica, se sabe que la lámina propia también juega un papel importante, gracias a estudios recientes en los que se demuestra que las DC que se encuentran en la lámina propia pueden captar antígenos del lumen intestinal (Rescigno *et al.*, 2001). Por otro lado, existen reportes de modelos animales carentes de PP, capaces de inducir respuestas inmunes eficientes, demostrando que los MLN son el principal sitio en el que se lleva a cabo la respuesta inmune adaptativa (Yamamoto *et al.*, 2000).

De acuerdo a lo anterior y considerando que las DC son las APC más eficientes descritas hasta el momento y que en el GALT se han descrito diversas subpoblaciones de ellas, resulta de interés estudiar la dinámica de estas poblaciones ante la presencia de un antígeno microbiano administrado oralmente como ETEC. ETEC es un organismo de importancia en salud pública ya que es el agente causal de un número considerable de muertes infantiles por diarrea en países como México (Souza *et al.*, 2002) y es considerada una de las causas más comunes de diarrea, siendo el agente causal de la llamada diarrea del viajero (Wenneras *et al.*, 1999). Cabe resaltar que ETEC es administrada oralmente puesto que es la ruta natural del infección del patógeno (Nataro and Kaper, 1998; Hughes and Galán, 2002).

Gran parte del conocimiento de lo que ocurre en las respuestas inmunes se basa en análisis *in vitro* de poblaciones celulares estimuladas con diversos antígenos. Sin embargo para comprender las respuestas protectoras y patológicas, es necesario definir en dónde se inducen y el fenotipo de las DC que participan en dichas respuestas *in vivo* en los organismos.

OBJETIVO GENERAL

- ♣ Analizar DC *in situ* en ratones BALB/c, utilizando los marcadores CD11c y CD205 en LP y MLN, cuando se administra antígeno bacteriano (EPEC) inoculado oralmente.

Objetivos Particulares

- ♣ Analizar por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de DC como CD11c y CD205 en LP, tanto en condiciones basales como en presencia de bacterias vivas inoculadas oralmente.
- ♣ Analizar por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de DC como CD11c y CD205 en MLN, tanto en condiciones basales como en presencia de bacterias vivas inoculadas oralmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones BALB/c libres de parásitos, suministrados por el bioterio del CINVESTAV.

Inoculación de Ratones con ETEC

Se empleó una cepa de *Escherichia coli* enterotoxigénica amablemente proporcionada por la Dra. Teresa Estrada García del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV. Se usó una dosis de 3×10^7 bacterias por ratón y solución salina (SS) como control, las cuales se administraron oralmente utilizando una sonda, 15 min. después de amortiguar el pH estomacal con bicarbonato de sodio (CO_3Na) 0.35 M. Posteriormente, los ratones permanecieron 24 hrs. con agua y alimento *ad libitum*.

Obtención de intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos

24 hrs. después de la inoculación, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se disectaron a lo largo del abdomen dejando descubierto el tracto digestivo (Fig. 12); un primer corte se realizó a la altura del esfínter pilórico y cerca del recto el segundo, enseguida se separó el mesenterio y el intestino se colocó en solución salina 0.85% para su manipulación.

Se separó por completo el mesenterio del intestino hasta obtener el ganglio linfático mesentérico, este se incluyó completo en "tissue teck" y congeló en nitrógeno líquido. Posteriormente el intestino se extendió y se cortaron secciones de aproximadamente 2 cm, las cuales se lavaron con SS 0.85% para retirar los restos de contenido intestinal y se incluyeron en "tissue teck" para su congelación en nitrógeno líquido. Los bloques congelados se usaron para obtener cortes de 6μ en microtomo por congelación (criostato), los cuales se colocaron en portaobjetos tratados previamente con xilano al 2% (Fig. 12).

Los cortes, se fijaron en acetona fría (Productos Químicos Monterrey), enseguida se trataron con cloroformo, ambos procesos durante 20 min. a 4°C . Posteriormente se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena del tejido saturando la enzima con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 6% durante 30 min. a

temperatura ambiente. Por último, para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a utilizar, se bloquearon los receptores Fc con suero de chivo al 1% durante 20 min. a temperatura ambiente (Fig. 12).

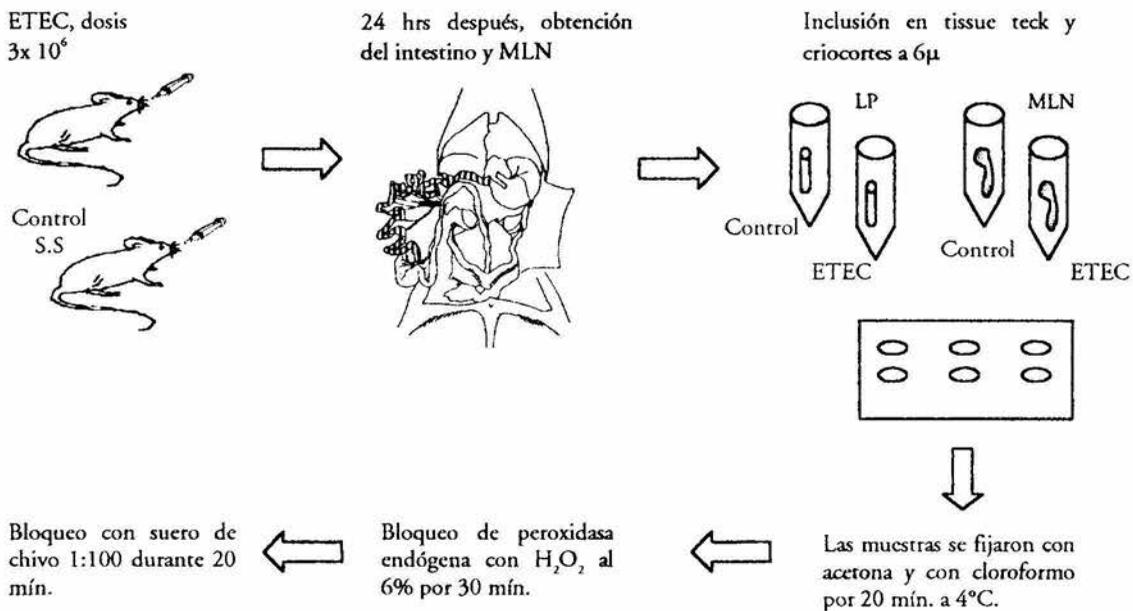


Fig 12. Diagrama de flujo de la metodología empleada para obtener cortes de intestino delgado y MLN para inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica

Los anticuerpos primarios y secundarios que se emplearon para la caracterización celular fueron los siguientes:

Anticuerpo monoclonal hamster anti-ratón CD11c biotinado. Pharmingen No. de catálogo 09702D, Isotipo IgG, λ . CD11c es una integrina expresada sobre células dendríticas en sitios como las áreas de células T de los ganglios linfáticos. Dilución usada: 1:250.

Anticuerpo monoclonal rata anti-ratón CD205. Hibridoma amablemente donado por el Dr. Ralph Steinman (Rockefeller University, N.Y. USA.), Isotipo IgG2a, CD205 es una glicoproteína de membrana expresada por células dendríticas de ratón en órganos periféricos no linfoides como la piel y en las áreas de linfocitos T de los órganos linfoides secundarios. Dilución usada: 1:250.

Anticuerpo monoclonal conejo anti-rata, biotinado. Vector Laboratories. No de catalogo BA4001. Se usó como anticuerpo secundario para detectar anticuerpos de rata no marcados en una dilución de 1:200.

IgG de rata, purificado de suero de animales no inmunizados. Jackson Immuno Resaerch Laboratories. No. catálogo 012-000-003. Se utilizó como control de isotipo. Dilución: 1:200.

Estreptavidina conjugada con Peroxidasa (SAVPOX). SBA. No de catalogo 7100-05. proteína tetramérica purificada de *Streptomyces avidinii*, compuesta por cuatro subunidades idénticas cada una con un sitio de alta afinidad para biotina, acopladas a peroxidasa. Se usó a una dilución de 1:1000.

Los anticuerpos primarios (CD11c y CD205) así como el isotipo, se incubaron durante 12 hrs a 4°C, posteriormente se realizaron tres lavados con albúmina sérica de bovino (BSA, del inglés Bovine seric albumin) 0.1% en solución salina por 8 min. cada uno, después se incubó el anticuerpo secundario anti-rata biotinado para el caso de CD205 e Isotipo, durante 45 mín. a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de incubación se hicieron tres lavados de 8 min. con BSA 0.1%, posteriormente se incubó con SAVPOX durante 30 min a temperatura ambiente. La reacción se revelo con diaminobencidina (DAB) líquida (DAKO No. Catalogo K3466), al microscopio hasta observar un color marrón característico, para detener la reacción se lavó abundantemente con agua destilada (H₂Od). Por último se realizó una contratinción con azul de metileno 30%, lavando con H₂Od (Fig. 13). Las muestras previamente deshidratadas se montaron permanentemente con resina Poli-mount (Polysciences, No de Catalogo 08381) (Fig. 13). Las laminillas se dejaron secar, para su análisis posterior al microscopio óptico. Esta estrategia experimental se aplicó de la misma manera para las muestras de los ratones control y los inoculados con ETEC.

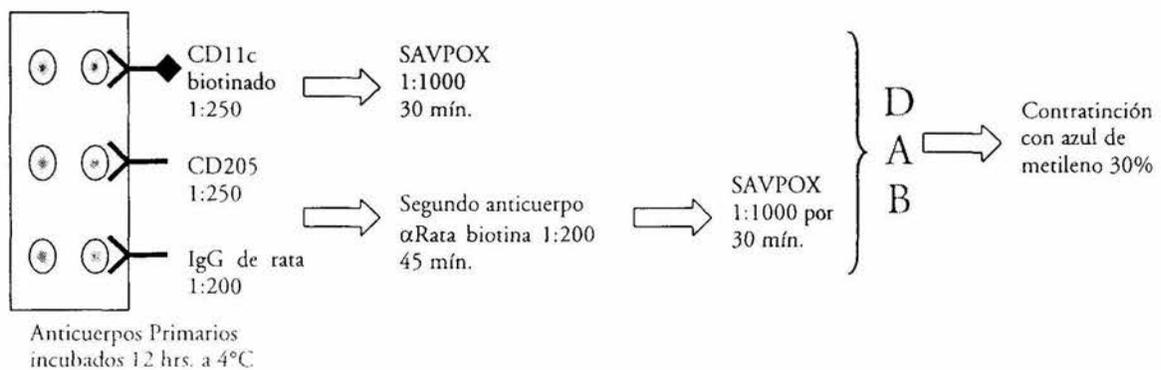


Fig. 13. Diagrama de flujo que ilustra la técnica inmunohistoquímica que se empleó, utilizando los anticuerpos CD11c, CD205, para las muestras de los ratones control y los inoculados con ETEC.

Cuantificación celular

Para cada experimento se realizaron un mínimo de 2 repeticiones, utilizando 2 ratones para cada variable o condición (inoculados con ETEC y solución salina como control). En cada muestra se contó el número de células positivas por lo menos en 10 campos en el caso de MNL y por corte para LP, a un aumento final de 40x.

Con el número de células positivas obtenidas por campo en el caso de los MNL, se calculó la densidad celular por área de acuerdo a la siguiente relación; considerando la cifra de campo visual y el aumento al cual se observaron las muestras se calculó el diámetro del campo, que para el microscopio (American Optical) que se utilizó, según la siguiente fórmula:

ϕ de Campo = Cifra de campo Visual/Aumento del Objetivo (Rincón Sánchez y Reyes Ortiz, 1992).

ϕ de Campo = 18mm/40x

ϕ de Campo = 0.45mm = 450 μ

Calculando así el diámetro, se obtuvo el área por campo según la siguiente formula:

Área de Campo = πr^2

Área de Campo = (3.1416) (225 μ)²

Área de Campo = 159043.5 μ^2

Considerando el área en la cual se contaron las células, se calculó el número de células positivas por milímetro cuadrado.

Para la LP el número de células por vellosidad se calculó haciendo un promedio del número de vellosidades por cada corte obteniendo así un aproximado de 47 vellosidades por corte.

Análisis Estadístico

Para determinar si existe diferencia significativa entre los valores registrados para los ratones control y los inoculados con ETEC se aplicó una prueba de t.

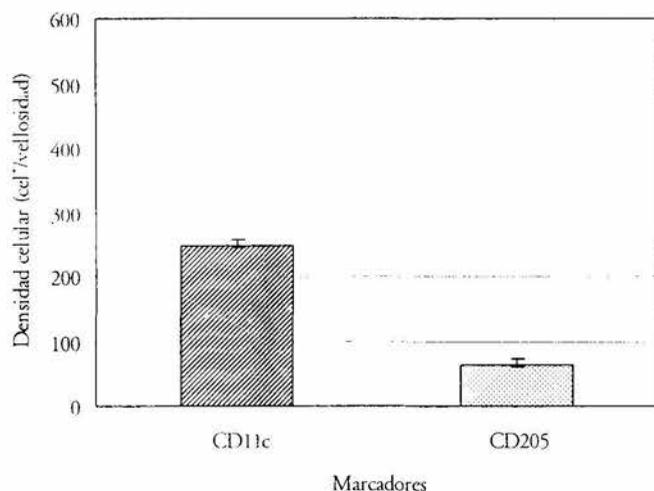
RESULTADOS

Caracterización inmunohistoquímica de criocortes de intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos de ratones BALB/c.

∞ Células CD11c' y CD205' en LP de ratones normales.

En cortes transversales de intestino delgado se identificaron DC CD11c' localizadas en la lámina propia (Fig. 14) y muy escasamente en la porción de la submucosa y hacia la lámina muscular, registrándose una densidad promedio de 247 ± 10.7 células positivas por vellosidad.

Asimismo se observaron DC CD205' distribuidas a lo largo de la lámina propia (Fig. 14) desde la mucosa hasta la lámina muscular con una densidad promedio de 63 ± 3.8 células positivas por vellosidad (Tabla 1). Existe una mayor densidad de células CD11c' que de CD205' en lámina propia (Gráfica 1).

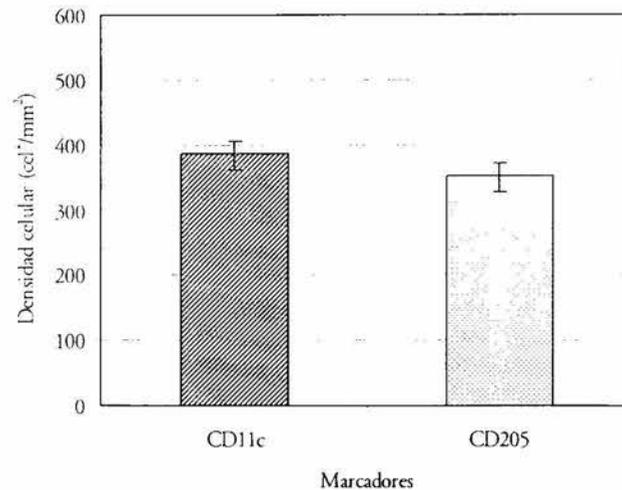


Gráfica 1. Densidad de células CD11c' y CD205' en LP de ratones normales.

∞ Células CD11c' y CD205' en MLN de ratones normales.

En cortes transversales de MLN se identificaron DC CD11c' localizadas en el área cercana a la corteza (seno subcapsular y región cortical), la región paracortical, medular e interfolicular; pero escasas en la región de los folículos linfoides (Fig. 15). Con una densidad celular promedio de 385 ± 19.0 células positivas por mm^2 .

Las células CD205⁺ se encuentran distribuidas de manera homogénea en todo el ganglio (Fig. 15) incluyendo los folículos linfoides (Fig. 16). La densidad celular cuantificada fue de 351 ± 24.0 células positivas por mm^2 . Las células CD11c⁺ presentan una mayor densidad que las células CD205⁺ presentes en el ganglio (Gráfica 2).

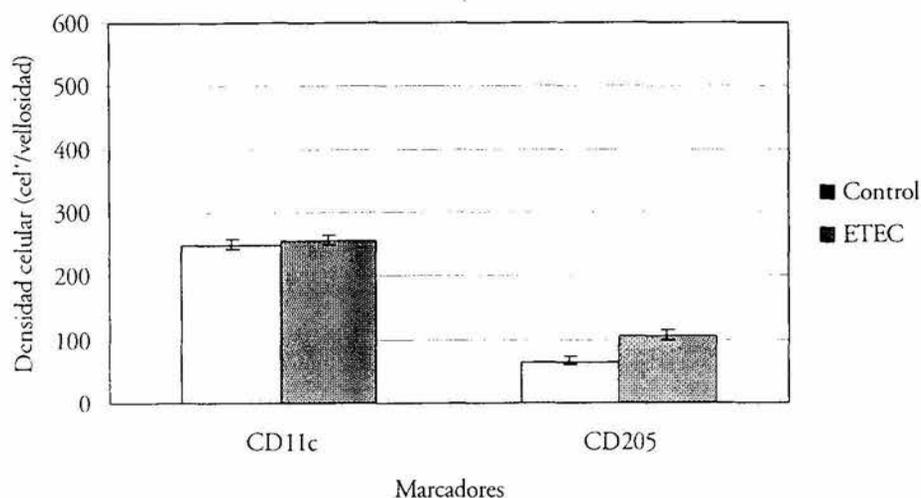


Gráfica 2. Densidad de células CD11c⁺ y CD205⁺ en ganglio linfático mesentérico de ratones normales.

☞ Células CD11c⁺ y CD205⁺ en LP de ratones inoculados con ETEC.

Después de la inoculación con ETEC se observaron células CD11c⁺ distribuidas densamente a lo largo de la lámina propia (Fig. 12). Comparando los datos obtenidos en LP de ratones normales, se observó una variación significativa ($t= 16.20$ $p<0.005$) en el número de células positivas por vellosidad cuando los ratones son inoculados oralmente con la bacteria (Gráfica 3), esta variación corresponde al 3.1% (Tabla 3).

Para CD205 se encontraron células positivas localizadas preferentemente hacia la región de la submucosa (Fig. 14). En comparación con los ratones control, las células CD205⁺ se observa un incremento significativo ($t=394.83$ $p<0.005$) que corresponde al 68.5% (Tabla 3) después de la inoculación con ETEC (Gráfica 3).



Grafica 3. Densidad de células CD11c⁺ y CD205⁺ en lámina propia de ratones control y ratones inoculados con ETEC.

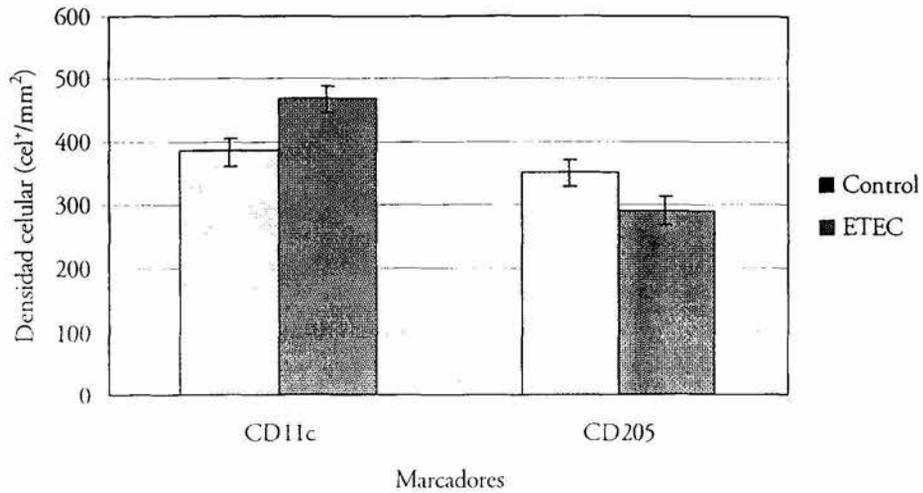
| | Control Densidad (cel'/vellosidad) | ETEC Densidad (cel'/vellosidad) |
|--------------------|--|---|
| CD11c ⁺ | 247 ± 10.0 | 255 ± 8.9 |
| CD205 ⁺ | 63 ± 3.8 | 106 ± 7.8 |

Tabla 1. Número de células positivas por vellosidad para dos marcadores en ratones control y ratones inoculados con ETEC.

☞ Células CD11c⁺ y CD205⁺ en MLN de ratones inoculados con ETEC.

Se observaron células CD11c⁺ en las áreas interfoliculares, en la corteza, en la médula y dentro de los folículos linfoides (Fig. 15). Comparando este resultado con el control observamos que existe un incremento significativo ($t=28.55$ $p<0.005$) en la densidad celular después de la inoculación (Fig. 16) (Gráfica 4), la cual representa el 21.9% (Tabla 3).

En el caso de CD205 se observaron células positivas distribuidas homogéneamente en todo el ganglio linfático (corteza, médula y folículos linfoides) (Fig. 13), sin embargo se observó una disminución significativa ($t=16.05$ $p<0.005$) en el número de células positivas en los ratones inoculados con ETEC (Gráfica 4), que corresponde a un 17.06% (Tabla 3).



Gráfica 4. Densidad de células CD11c⁺ y CD205⁺ en ganglio linfático mesentérico de ratones control e inoculados con ETEC.

| | Control (densidad cel'/mm ²) | ETEC (densidad cel'/mm ²) |
|--------------------|---|--|
| CD11c ⁺ | 385 ± 19.0 | 469 ± 20.0 |
| CD205 ⁺ | 351 ± 24.0 | 291 ± 21.7 |

Tabla 2. Número de células positivas en ganglio linfático mesentérico para dos marcadores en ratones control y ratones inoculados con ETEC.

| | Lámina Propia | Ganglio Linfático Mesentérico |
|--------------------|---------------|-------------------------------|
| CD11c ⁺ | 3.1% ↑ | 21.9% ↑ |
| CD205 ⁺ | 68.5% ↑ | 17.06% ↓ |

Tabla 3. Incremento (↑) y disminución (↓) en la densidad celular en LP y MLN 24 hrs. después de la inoculación con ETEC.

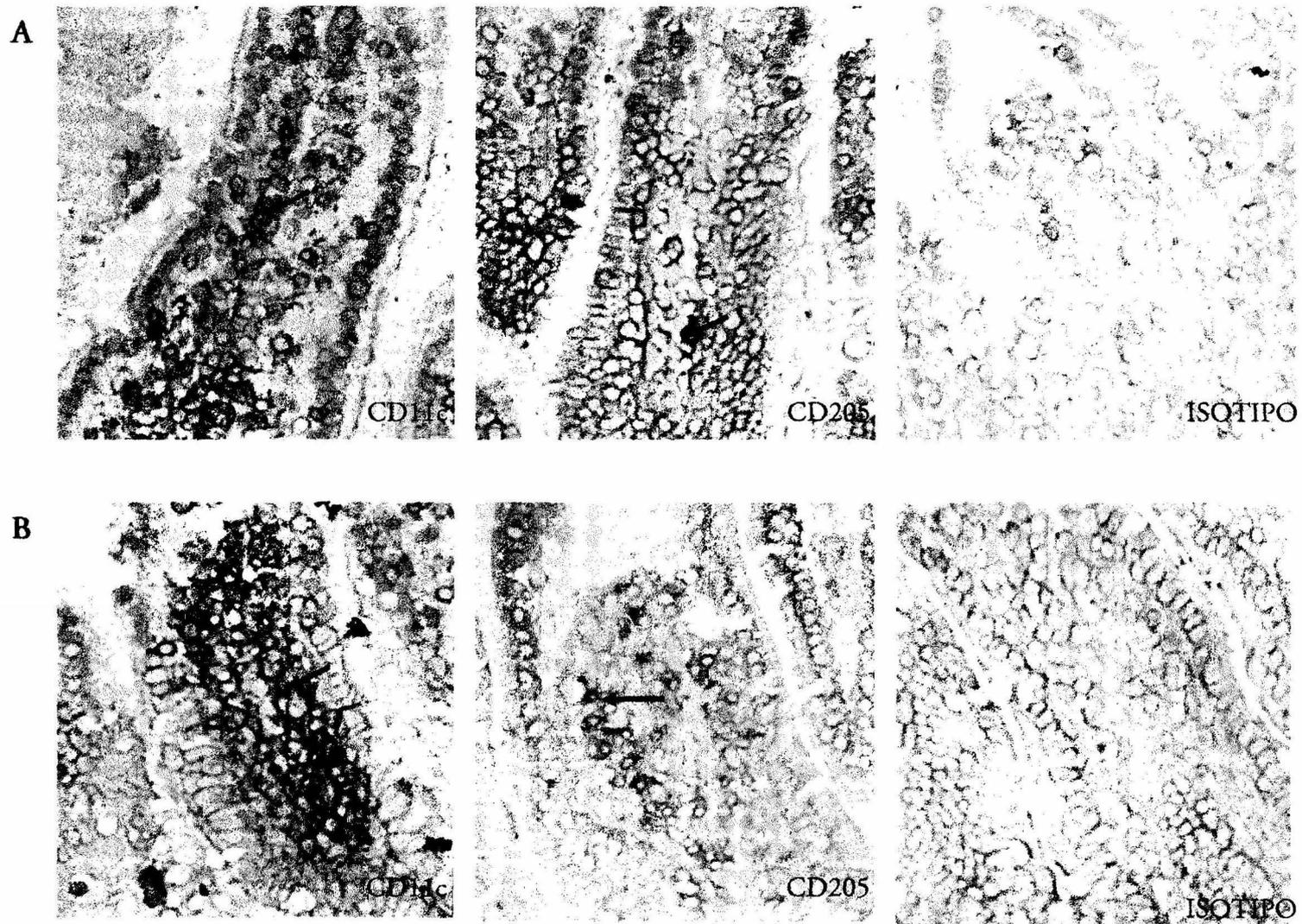


Fig. 14. Inmunohistoquímica de cortes transversales de intestino de ratones control (A) e inoculados con ETEC (B), en los que se observa la lámina propia y la distribución de células CD11c' y CD205', 40x.

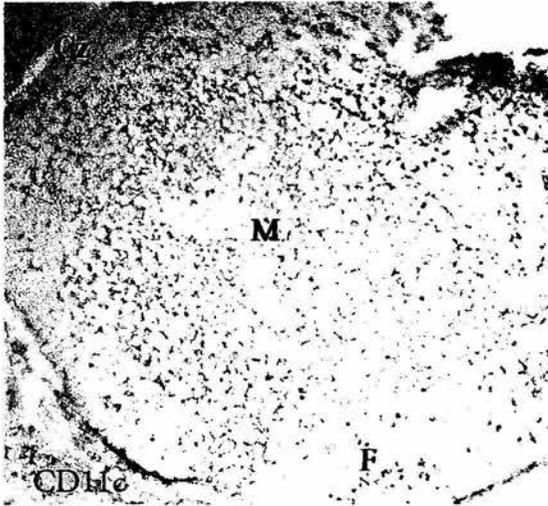
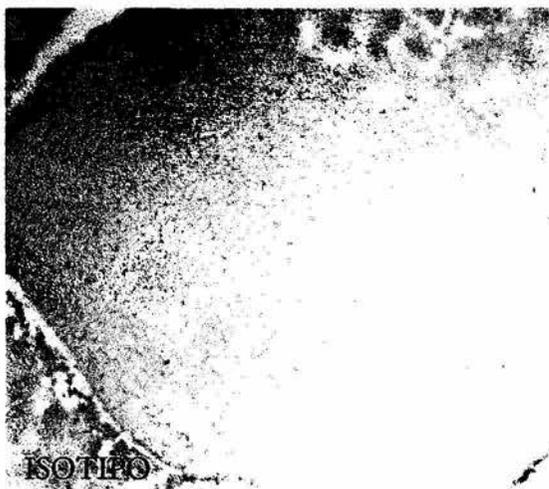
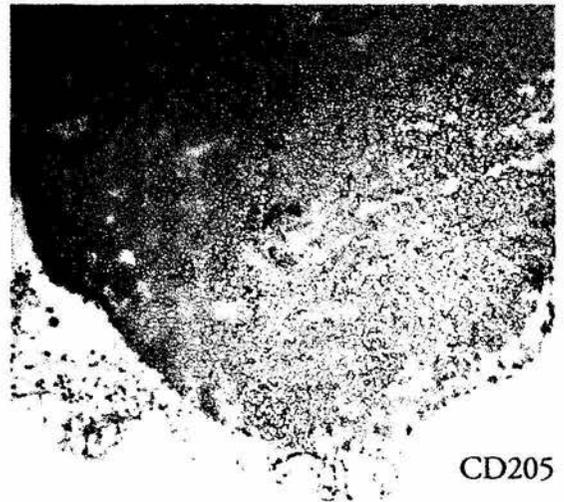
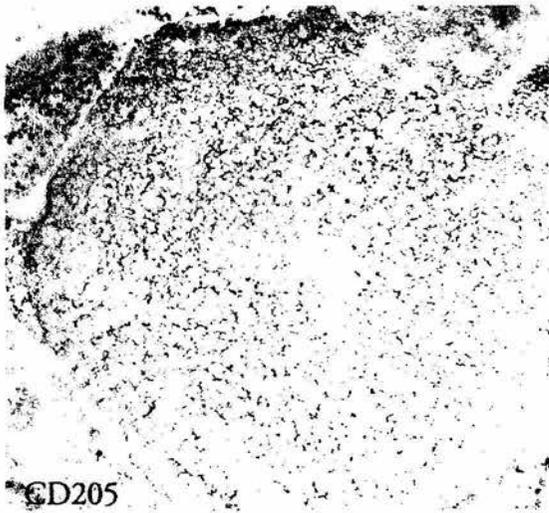
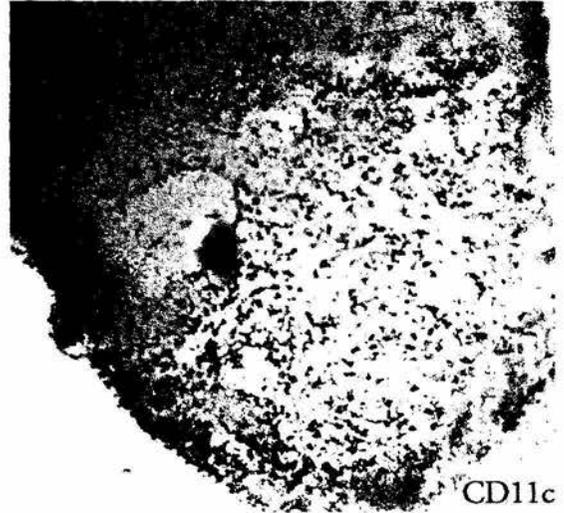
A**B**

Fig. 15. Inmunohistoquímica de cortes transversales de MLN para los marcadores CD11c y CD205 en ratones control (A) y en ratones inoculados con ETEC (B), en los que se puede observar la organización del ganglio linfático y la ubicación de las células 10x (Cz) Región de la corteza, (M) porción medular y (F) muestra áreas folículos linfoides.

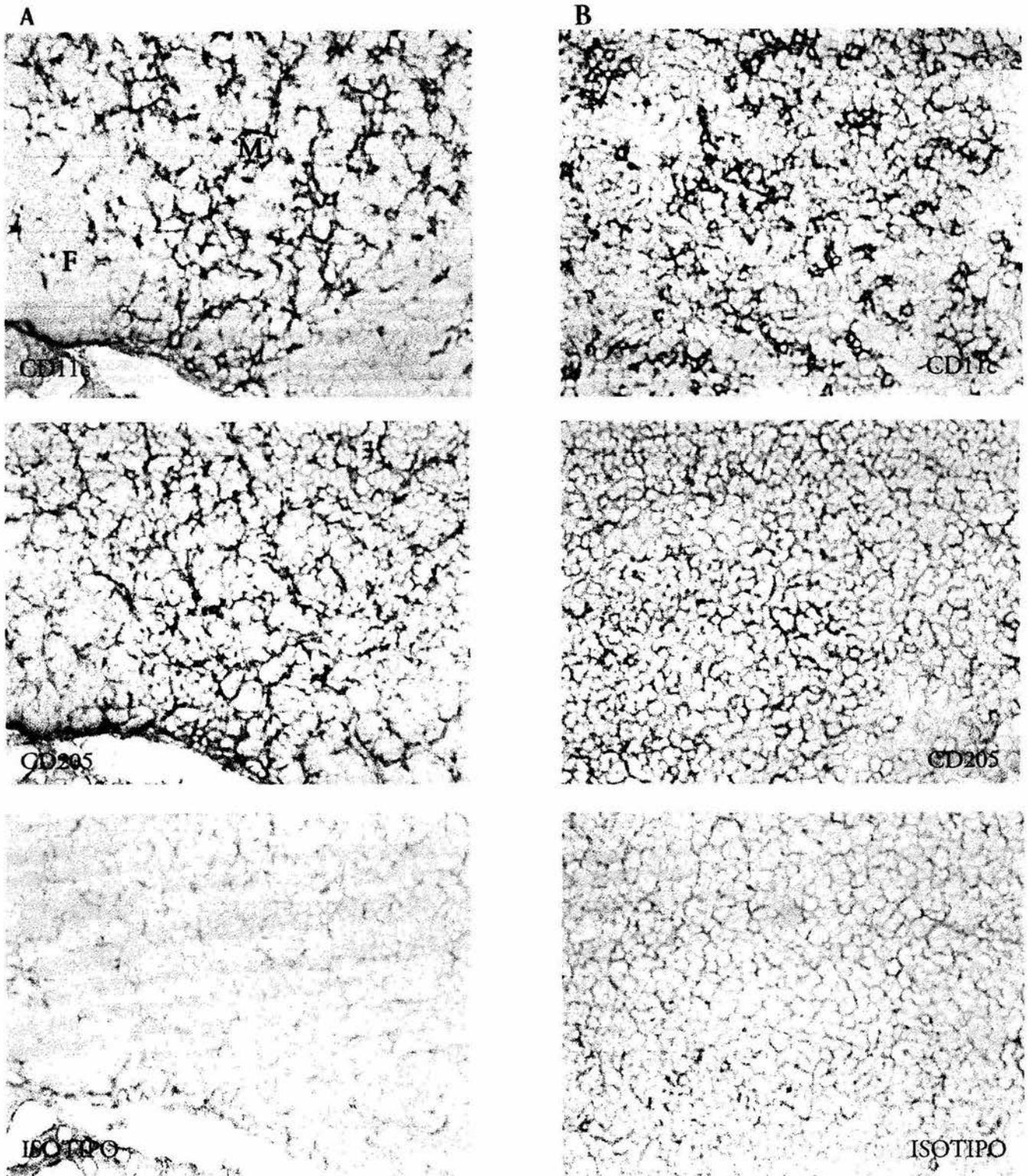


Fig. 16. Inmunohistoquímica de cortes transversales de MLN de ratones control (A) e inoculados con ETEC (B) en los cuales se observa la distribución de las células CD11c' y CD205', 40x (M) porción medular y (F) área del fólculo linfoide.

DISCUSIÓN

Las células dendríticas son APC que actúan como centinelas del sistema inmune, capturando y procesando antígenos en los tejidos periféricos no linfoides, posteriormente migran a los órganos linfoides más cercanos y presentan dichos antígenos en el contexto de moléculas del MHC-CI y CII a los linfocitos T vírgenes, activándolos (Banchereau and Steinman, 1998).

El estudio de las DC intestinales se ha realizado principalmente *in vitro*, en diversos trabajos se han descrito DC MHC-CII', CD11c' y CD205' en placa de Peyer, lámina propia y ganglio linfático mesentérico (Rescigno *et al.*, 2001; Yamamoto *et al.*, 2000; Iwasaki and Kelsall, 2001; Steinman *et al.*, 1997; MacPherson and Liu, 1993; Soesatyo *et al.*, 1990; Mayrhofer *et al.*, 1983), sin embargo pocos son los trabajos en los que se estudia la dinámica de las DC bajo estimulación antigénica (Ingalls and Golenbock, 1995; Marriott *et al.*, 1999; Chirido *et al.*, 2002; Hughes and Galán, 2002). Por otro lado, no hay reportes *in vivo* en los que se administren antígenos oralmente y ninguno en el que se emplee un organismo vivo como una bacteria enteropatógena.

En el intestino, la vía de entrada antigénica más estudiada corresponde a las PP, donde las células M juegan un papel primordial (MacPherson and Liu, 1999; Nagler-Anderson, 2001), sin embargo es importante destacar que no es la única vía de entrada antigénica. Reportes recientes realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que bacterias ubicadas en el lumen son capturadas por DC de LP. Estas células cruzan la barrera epitelial, abriendo las uniones estrechas de los enterocitos y extienden sus dendritas hasta el lumen, capturando el antígeno y manteniendo la integridad de la barrera epitelial (Rescigno *et al.*, 2001). Este fenómeno evidencia que las DC localizadas en la LP pueden capturar antígenos aunque estos no sean invasivos y plantea una nueva vía de entrada antigénica.

En el presente trabajo se demostró la presencia y variación en el número de DC CD11c' y CD205' en la lamina propia y en los ganglios linfáticos mesentéricos. Las diferencias significativas encontradas en la densidad celular presente en los dos sitios anatómicos estudiados (LP y MLN) cuando los ratones han sido inoculados con ETEC podría deberse a las funciones que desarrollan las DC en la captura antigénica puesto que los marcadores utilizados, están relacionados con el reconocimiento y fagocitosis de antígenos respectivamente (Figdor *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 1995; Shelley *et al.*, 2002; Ingalls and Golenbock, 1995).

CD11c es un miembro de la familia de las β_2 integrinas, las cuales son moléculas de adhesión, que junto con CD18 forma un receptor heterodimérico (Shelley *et al.*, 2002) conformado por una subunidad α de 150 KD (codificada por el gen CD11c) y una subunidad β de 95 kD (codificada por el gen CD18), originalmente descritas en leucocitos de humano y ratón (Hynes, 1987; Arnaout, 1990). Esta glicoproteína de membrana se expresa preferentemente en DC (Ingalls and Golenbock, 1995) y participa en numerosas interacciones ya sea célula-célula o célula-matriz extracelular (Arnaout, 1990).

La molécula de CD11c, como otras integrinas esta involucrada en la adhesión de células al endotelio y puede interactuar con un amplio repertorio de ligandos como fibrinógeno, partículas opsonizadas por la molécula C3b del complemento y LPS, también es capaz de unir bacterias no opsonizadas (Ingalls and Golenbock, 1995). Se ha demostrado su participación en la fagocitosis de antígenos bacterianos como *Salmonella*, en estudios *in vitro* donde utilizan DC CD11c⁺ internalizan eficientemente la bacteria, por lo que se sugiere que esta subpoblación celular puede ser un blanco de entrada en LP y PP para bacterias intracelulares *in vivo* (Marriott *et al.*, 1999; MacPherson and Liu, 1999; Rescigno *et al.*, 2001).

En el ratón, las DC en órganos linfoides expresan altos niveles de CD11c, sin embargo la expresión de esta molécula es muy baja o nula en macrófagos por lo que se considera como un marcador específico de DC (Steinman *et al.*, 1997).

IZT.

Con respecto a las células CD11c⁺ en la lámina propia de ratones control, se localizaron distribuidas a lo largo de la vellosidad y podrían representar células que se encuentran vigilando la barrera epitelial de manera normal, manteniendo la homeostasis de la respuesta inmune ante bacterias, ya sea patógenas o comensales (Granucci and Ricciardi-Castagnoli, 2003; Rescigno *et al.*, 2000). Se demostró que existe un aumento significativo en la densidad celular cuando los ratones fueron inoculados con ETEC, probablemente dicha variación se deba a que la presencia de un antígeno bacteriano induce el reclutamiento de DC a la zona afectada y a la participación de este marcador en la fagocitosis de bacterias enteropatógenas o gram negativas (Ingalls and Golenbock, 1995; Marriott *et al.*, 1999). En un estudio previo en el que utiliza el modelo de asa ligada en intestino delgado de ratones, se describió un incremento en el número de DC CD11c⁺ cuando las asas se infectan con bacterias patógenas como *Salmonella* (Rescigno *et al.*, 2001). En el epitelio del tracto respiratorio, que también representa otra mucosa de alto contacto antigénico, se ha reportado que la administración un antígeno inhalado ocasiona un incremento en la densidad de DC, sugiriendo que las DC de vías aéreas constituyen una población que participa en respuesta a la inflamación local (Schon-Hegrad *et al.*, 1991)

Se observaron también células CD11c⁺ distribuidas en el MLN, pero escasamente en los folículos linfoides de los ratones control, lo que coincide con un estudio previo en el cual describen DC CD11c⁺ de ganglios linfáticos de ratón incluyendo los MLN (Steinman *et al.*, 1997). Probablemente estas células migran y presentan antígenos a los linfocitos T, puesto que existe una gran cantidad de antígenos de bacterias (comensales) y nutrientes que no ocasionan daño, de esta forma las DC estarían involucradas en la tolerancia por la vía intestinal. Este hecho se pone de manifiesto en un estudio realizado utilizando una población de DC intestinales colectadas de vasos linfáticos que llevan cuerpos apoptóticos de células epiteliales de intestino, lo que demuestra que existe un flujo constante de DC de lámina propia al MLN en ausencia de antígenos o procesos inflamatorios, demostrando su participación potencial en la tolerancia periférica (Huang *et al.*, 2000). En presencia de ETEC se observó un incremento significativo de las células CD11c⁺ en el MLN, estas células se encuentran tanto en la región cercana al seno subcapsular como a las áreas interfoliculares, es probable que estas células estén migrando de la lámina propia, después de la captura antigénica y pueden presentar los antígenos a los linfocitos T, gracias a la presencia de vías aferentes (Rothkötter *et al.*, 1999). La posible movilización *in vivo* de DC intestinales hacia los MLN en presencia de una bacteria enteropatógena (ETEC), hasta donde sabemos no se ha descrito anteriormente.

Por otro lado CD205 es una lectina tipo C-I homóloga al receptor de manosa presente en macrófagos y se ha considerado como un marcador específico de DC (Figdor *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 1995). Estructuralmente, CD205 contiene 10 dominios tipo lectina C y un tallo citoplásmico con motivos de tirosina que regulan la señalización intracelular (Kronin *et al.*, 2000; Figdor *et al.*, 2002). Es un receptor involucrado en la captura y procesamiento de antígenos, sin embargo aún se desconoce cual es su ligando. En contraste con otros receptores se ha demostrado anteriormente que endocita a los antígenos y los libera en los endosomas tardíos o lisosomas, donde los antígenos son degradados y presentados en el contexto de moléculas del MHC-CII (Mankhe *et al.*, 2000); y por otra parte utilizando un anticuerpo anti CD205 acoplado a OVA administrada subcutáneamente se demostró la presentación de OVA en el contexto de MHC-CI por parte de DC CD11c⁺ a linfocitos T CD8⁺ en ganglios linfáticos, provocando después de 14 días deleción en la división celular de linfocitos T, sugiriendo en un modelo *in vivo* su participación en la tolerancia periférica (Bonifaz *et al.*, 2002).

En los ratones control se encontraron DC CD205⁺ en LP, que se encuentran de manera normal capturando antígenos intestinales. Bajo la presencia de ETEC se incrementan significativamente y se localizan en todo lo largo de la LP distribuyéndose preferentemente hacia la lámina muscular, lo cual no ha sido reportado previamente. Esto nos hace suponer que debido al cambio de ubicación de estas células se

esta llevando a cabo el reconocimiento y captura del antígeno situado en la luz intestinal (ETEC), para después migrar al ganglio linfático mesentérico por las vías aferentes que provienen de la mucosa y la lámina muscular (Rothkötter *et al.*, 1999; Fawcett, 1995).

En el caso de MLN se observó una disminución significativa de las DC CD205⁺ después de la inoculación con ETEC. Es posible que se esté llevando a cabo la migración de DC de la lámina propia a este sitio, pero al parecer 24 hrs. no son suficientes para observar un incremento o disminución en la densidad de DC CD205⁺. Sin embargo un estudio previo describe una disminución en la expresión de DC CD205⁺ 48 hrs. después de la administración de LPS lo que sugiere una regulación en la modulación de este marcador (De Smedt *et al.*, 1996); debida a que las DC pierden la capacidad de expresar marcadores involucrados en la captura y procesamiento antigénico para expresar marcadores que participan en la activación de linfocitos T, probablemente esté ocurriendo un proceso similar en nuestro modelo con ETEC.

Ambos marcadores (CD11c y CD205) pueden expresarse en la misma DC. Se ha demostrado que DC aisladas de ganglios linfáticos son MHC-CII⁺, CD11c⁺, CD205⁺, CD40⁺ y CD86⁺ (Steinman *et al.*, 1997), sin embargo no se discriminó si se trataba de diferentes poblaciones de DC o una sola. Otro estudio realizado con DC de humano se demostró que expresan conjuntamente receptores tipo Toll, involucrados en el reconocimiento de diversos patógenos (Kadowaki *et al.*, 2001). Asimismo, se sabe que DC inmaduras expresan tanto el receptor de manosa como CD209 (DC-SIGN), moléculas de la familia de lectinas tipo C similares a CD205 (Figdor *et al.*, 2002). De esta manera podemos decir que las DC expresan simultáneamente varios marcadores, dependiendo del estado de activación en el que se encuentran, puesto que existe regulación en la expresión de algunos de estos receptores que ocurre de manera importante después de la interacción con un antígeno. Debido a que se observaron DC CD11c⁺ y CD205⁺ en LP y MLN y una variación significativa después de la inoculación con ETEC, resultaría importante analizar si se trata de la misma población celular (células dobles positivas) y, de acuerdo al sitio anatómico en que se localicen, determinar su estado de activación mediante la presencia de marcadores de coestimulación.

CONCLUSIONES

- ♣ Usando un modelo murino de colonización con ETEC, 24 hrs. después de la inoculación oral, se observó un incremento significativo en la densidad celular de DC CD11c' y CD205' en LP.
- ♣ En los MLN se demostró que existe un incremento significativo en la densidad celular de DC CD11c' y una disminución significativa en el caso de las células CD205' después de la administración oral con ETEC.
- ♣ En este modelo *in vivo*, se observó variación significativa en el número de DC 24 hrs. después de la inoculación oral con una bacteria no invasiva (ETEC).

PERSPECTIVAS

- ♣ Analizar por inmunohistoquímica la expresión de CD11c y CD205 en PP, tanto en condiciones basales como en presencia de ETEC.
- ♣ Analizar por inmunohistoquímica la expresión de marcadores de coestimulación como CD86 y CD40 en LP, PP y MLN, en condiciones basales y en presencia de ETEC.
- ♣ Realizar dobles marcajes CD11c/CD205 en LP, PP y MLN, en presencia de ETEC y en condiciones normales.
- ♣ Analizar la posible colocalización de ETEC y DC en LP, PP y MLN.

APÉNDICE

Azul de metileno solución stock

- 30 mg. Azul de metileno
- Borato de sodio 1%
- Disolver y aforar a 100 ml de H₂O destilada
- Se almacena a temperatura ambiente por periodos prolongados de tiempo

Azul de metileno 30%

- 300 µl de azul de metileno solución stock
- 700 µl de H₂O destilada
- Se almacena a temperatura ambiente por periodos prolongados de tiempo

Azida de sodio 0.1%

- 50 mg. de azida de sodio
- disolver y aforar a 50ml de H₂O destilada
- Se almacena a 4°C por periodos prolongados de tiempo

BSA 0.1 %

- 0.5 g de albúmina sérica bovina
- disolver y aforar a 500ml solución salina fisiológica
- Se almacena a 4°C por periodos prolongados de tiempo

BSA 1%

- 0.5 g de albúmina sérica bovina
- disolver y aforar a 50ml de PBS
- filtrar con una membrana de 0.22µ
- Se almacena a 4°C por periodos cortos de tiempo

DAB

- 1 mg. de Diaminobencidina
- 2 ml de Tris 0.2 M pH 7.4
- 10 µl H₂O, 30 %
- Se desecha después de usarse

H₂O₂ 6%

- 60 µl de H₂O₂ al 30% agregar a 1000 µl de azida de sodio 0.1%
- Se desecha después de usarse

PBS

- 8.0 g de NaCl
- 0.2 g de KCl
- 1.15 g de Na₂HPO₄
- 0.2 g de K₂HPO₄
- Aforar a 1000 ml de H₂O destilada
- Se almacena a temperatura ambiente o 4°C por periodos prolongados de tiempo

Preparación de portaobjetos con xilano 2%

- Colocar los portaobjetos con xilano 2 % por 30 mín. a temperatura ambiente
- Dejar secar en 37°C durante 24 hrs.

Solución salina fisiológica

- 0.85 g de NaCl
- disolver y aforar a 100ml de H₂O destilada
- Se almacena a 4°C por periodos prolongados de tiempo

Xilano 2%

- 10 ml de Xilano
- aforar a 500 ml con acetona

REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober I.S. (2000). *Inmunología Celular y Molecular*. 3ed. McGraw-Hill. España. pp 17-30.
- Acosta A.G., Cruz L.M. (1992). *Inmunología de Mucosas*. Atelier. México. pp 91-106.
- Arnaout M.A. (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 75(5):1037-1050.
- Ayabe T., Satchell D.P., Wilson C.L., Parks W.C., Selsted M.E., Ouellette A.J. (2000). Secretion of microbicidal α -defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nature Immunology*. 1(2):113-118.
- Balderas-Carrillo O.E. (2002). Caracterización fenotípica de células dendríticas, en despegamiento epitelial de cérvix humano. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala, UNAM. Tlalnepantla Edo. México.
- Banchereau J., Briere F, Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y-J., Paulendran B. and Palucka K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18:767-811.
- Banchereau J. and Steiman R. M. (1998). Dendritic cell and the control of immunity. *Nature*. 392:245-252.
- Banchereau J., Bazan F., Blanchard D., Briere F., Galizzi J.P., van Kooten C., Liu Y.J, Rousset F. and Saeland S. (1994). The CD40 ligand antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology*. 12:881-922.
- Bell D., Young J.W., Banchereau J. (1999). Dendritic cells. *Advances in Immunology*. Academic Press. pp 255-317.
- Berber E.A. (1992). Manejo y presentación de antígenos en el sistema inmunitario, en *Inmunología de Mucosas*. Atelier. México. pp 100-106.
- Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on Major Histocompatibility Complex Class I products and peripheral CD8' T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine*. 196(12):1627-1638.
- Cella M, Sallusto F. and Lanzavecchia A. (1997). Origin maturation and antigen presenting function of dendritic cell. *Current Opinion in Immunology*. 9:10-16.
- Chirido F.G., Millington O.R., Beacock-Sharp H., Mowat A.M. (2002). Dendritic cells from murine small intestine: isolation and functional characterization. *International Symposium on Dendritic Cells and Immunotherapy*. Buenos Aires, Argentina.

Cook M.J. (1983). The anatomy of laboratory mouse, en *The Mouse in Biomedical Research*. Academic Press. 3:102-118.

Croituru K. and Bienenstock J. (1994). Characteristics and functions of mucosa-associated lymphoid tissue, en *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Strober W., Mestecky J., McGhee J. R., Lamim M. E, Bienenstock J. Academic Press. pp 141-149.

Cutler C.W., Jotwani R., Pulendran B. (2001). Dendritic cells: immune saviors or Achilles heel?. *Infection and Immunity*. 69(8):4703-4708.

De Smedt T., Pajak B., Muraille E., Lespagnard L., Heinen E., De Baetselier P., Urbain J., Leo O., Moser M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 184:1413-1424.

Dieu M.C., Vanbervliet V., Vicari A., Bridon J.M., Oldman E., Aït-Yahia S., Briere F., Ziotnik A., Lebecque S., Caux C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cell by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*. 188(2):373-386.

Dombrowski K.E., Ke Y., Brewer K.A., Kapp J.A. (1998). Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. *Immunological Reviews*. 161:111-118.

Fagarasan S., Honjo T. (2003). Intestinal IgA sintesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology*. 3:63-72

Fawcett, W. (1995). *Tratado de Histología*. 12ed. McGraw-Hill. México. pp 675-712

Figdor C.G., van Kooyk I., Adema G.J. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nature Reviews Immunology*. 2:77-84.

Flores-Langarica, A. (2001). Identificación y distribución de células MHC-CII⁺ dendríticas en el intestino de ratones BALB/c, C57BL/6, CD40L^{-/-}. Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias. UNAM. D.F. México.

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

Foster H.L., Small J.D., Fox J.G. (1983). *The mouse in biomedical research*. Academic Press. U.K. pp 339-342.

Gartner L.P., Hiatt J.L. (1997). *Histología*. McGraw-Hill. México. pp 331-357, 242-263.

Geneser. (1997). *Histología*. Panamericana. Argentina. pp 415-428.

Gordon J, Pound J.D. (2000). Fortifying B cells with CD154: an engaging tale of many hues. *Immunology*. 100:269-280.

Grabbe S., Kämpgen E., Schuler G. (2000). Dendritic cell: multi-lineal and multi-functional. *Trends in Immunology*. 21(9):431-433.

Granucci F., Ricciardi-Castagnoli P. (2003). Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Current Opinion in Microbiology*. 6:72-76.

Grouard G., Risson M-C., Filgueira L., Durand I., Banchereau J., Liu Y-J. (1997). The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with IL-3 and CD40 Ligand. *Journal of Experimental Medicine*. 185(6):1101-1111.

Harper H.M., Cochrane L., Williams N.A. (1996). The role of small intestinal antigen-presenting cells in the induction of T-cell reactivity to soluble protein antigens: association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance. *Immunology*. 89:449-456.

Hooper L.V., Bry L., Falk J.L., MacPherson G. (1998). Host-microbial symbiosis in the mammalian intestine: exploring an internal ecosystem. *BioEssays*. 20:336-343.

Huang F.P., Platt N., Wykes M., Major J.R., Powel T.J., Jenkins C.D., MacPherson G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*. 191:435-443.

Hughes E.A., Galán J.E. (2002). Immune response to *Salmonella*: location, location, location?. *Immunity*. 16:325-328.

Hussain N, Jaitley V. and Florence A.T. (2001). Recent advances in the understanding of uptake of microparticules across the gastrointestinal lymphatics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 50:107-142.

Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-554.

Ingalls R.R., Golenbock D.T. (1995). CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*. 181.1473-1479.

Janossy G., Tidman N., Selby W.S., Thomas J.A., Granger S., Kung P.C., Goldstein G. (1980). Human T lymphocytes of induce and suppressor type occupy different microenvironments. *Nature*. 288,81-84.

Jiang W., Swiggard W.J., Heufler C., Peng M., Mirza A., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*. 375:151-155.

Junqueira L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (1998). *Basic Histology*. 9ed. Appleton and Lange. USA. pp 248-271.

Kadowaki N., Ho S., Antonenko S., de Waal M., Kastelein R.A., Bazan F., Liu Y-J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 19(6):863-869.

Kanamori Y., Ishimaru K., Nanno M., Maki K., Ikuta K., Nariuchi H., Ishikawa H. (1996). Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *Journal of Experimental Medicine*. 184:1449-1459.

Kato T. and Owen R. L. (1994). Structure and function of intestinal mucosal epithelium, en *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Strober W., Mestecky J., McGhee J. R., Lamim M. E., Bienenstock J. Academic Press. pp 11-26.

Kelsall B.L. and Strober W. (1996). Distinct populations of dendritic cell are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *Journal of Experimental Medicine*. 183:237-247.

Kelsall B.L. and Strober W. (1998). Peyer's patch dendritic cell and the induction of mucosal immune responses. *Research Immunology*. 148(8-9):490-8.

Konecny P., Stagg A.J., Jebbari H., English N., Davidson R.N., Knight S.C. (1999). Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation *in vitro*. *European Journal of Immunology*. 29:1803-1811.

Kronin V., Wu L., Gong S, Nussenzweig M.C. and Shortman K. (2000). DEC-205 as a marker of dendritic cell with regulatory effects on CD8 T cell responses. *International Immunology*. 12 (5):731-735.

Leeson T.S., Leeson C.R. and Paparo A.A. (1990). *Texto/Atlas de Histología*. McGraw-Hill. México. pp 741.

Levine M.M., Kaper J.B., Black R.E., Clements M.L. (1983). New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiology Reviews*. 47:510-550.

Levine M.M., Ristaino P., Marley G., Smyth C., Knutton S., Boedeker E., Black., Young C., Clements M.L., Cheney C., Patraik R. (1984). Coli surface antigens 1 and 3 of colonization antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification and immune responses in humans. *Infection and Immunity*. 44:409-420.

Levine M.M. and Nataro J.P. (1994). Intestinal infections, en *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Strober W., Mestecky J., McGhee J R., Lamim M E., Bienenstock J. Academic Press. pp 505-512.

Liu Y-J., Kanzler H., Soumelis V., Gilliet M. (2001). Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology*. 2(7):585-589.

Liu L., Zhang M, Jenkins C. and MacPherson G.G. (1998). Dendritic cell heterogeneity *in vivo*: two functionally different dendritic cell population in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *Journal of Immunology*. 161:1146-1155.

Liu Y-J., MacPherson G. (1993). Antigen acquisition by dendritic cells: intestinal dendritic cells acquire antigen administered orally and can prime naïve T cells *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 177:1299-1307.

MacDonald T.T. and Spencer J. (1994). Gut-associated lymphoid tissue, en *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Strober W., Mestecky J., McGhee J R., Lamim M E., Bienenstock J. Academic Press. pp 415-424.

MacPherson G.G. and Liu L. (1999). Intestinal dendritic cells, en *Dendritic Cell: Biology and Clinical Applications*. Academic Press. pp 141-151.

MacPherson G.G, Jenkins C, Stein M.J. and Edwards C. (1995). Endotoxin-Mediated dendritic cell release from the intestine. *Journal of Immunology*. 154:1317-1322.

Mahnke H., Guo M., Lee S., Sepulveda H., Swain S.L., Nussenzweig M. and Steinman R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, Dec-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *Journal of Cell Biology*. 151:673-683.

Maric I., Holt P.G., Perdue M.H. and Bienenstock J. (1996). Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *Journal of Immunology*. 156:1408-1414.

Marriott I., Hammond T. G., Thomas E.K. and Bost K.L. (1999). *Salmonella* efficiently enter and survive within cultured CD11c⁺ dendritic cell initiating cytokine expression. *European Journal of Immunology*. 29:1107-1115.

Mayrhofer G., Pugh C.W., Barclay A.N. (1983). The distribution, ontogeny and origin in the rat Ia-positive cells with dendritic morphology and Ia antigen in epithelia, with special reference to the intestine. *European Journal of Immunology*. 13:112-122.

Mellman I., Turley S.J. and Steinman R.M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends in Cell Biology*. 8:231-237.

Murray P.R., Kobayashi G.S., Pfaller M.A., Rosenthal K.S. (2002). *Microbiología Médica*. 2ed. Harcourt. España. pp 227-240

Nagler-Anderson, C. (2001). Man the Barrier! Strategic defenses in the intestinal mucosa. *Nature Reviews Immunology*. 1:59-67.

Nataro, J.P., Kaper J.B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(1):142-201.

Neutra M.R. and Kraehenbul J.P. (1994). Cellular and molecular basis for antigen transport in the intestinal epithelium, en *Handbook of Mucosal Immunology*. Ogra P.L., Strober W., Mestecky J., McGhee J R., Lamim M E., Bienenstock J. Academic Press. pp 27-39.

Ossevoort, M., Kleijmeer M.J., Nijman H.W., Geuze H.J., Kast M., Melief C.J.M. (1995). Functional and ultrastructural aspects of antigen processing by dendritic cell. *Advances in Experimental Medicine Biology*.378:227-231.

Pavli P., Woodhams C.E., Doe W.F. and Hume D.A. (1990). Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cell from the mouse intestinal lamina propria. *Immunology*. 70:40-47.

Pulendran B.J.L., Smith G., Caspary K., Brasel D., Pettit E., Maraskovsky C.R., Maliszewski. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response *in vivo*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 96:1036-1041.

Rescigno M., Granucci F., Ricciardi-Castagnoli P. (2000). Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cell. *Journal of Clinical Immunology*. 20(3):161-166.

Rojas-Espinosa O. (2001). *Inmunología (de memoria)*. 2ed. Panamericana. México. pp 374.

Romani N., Gruner S., Brang D., Kampgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P.O., Steinman R.M., Schuler G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*. 180:83-93.

Rothkötter H.J, Pabst R. and Bailey M. (1999). Lymphocyte migration in the intestinal mucosa: entry, transit and emigration of lymphoid cells and the influence of antigen. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 72:157-165.

Schon-Hegrad M.A., Oliver J., McMenamin P.G, Holt P.G. (1991). Studies on the density, distribution, and surface phenotype of intraepithelial class II major histocompatibility complex antigen (Ia)-bearing dendritic cell (DC) in the conducting airways. *Journal Experimental of Medicine*. 173:1345-1356.

Shelley C.S., Teodoridis J.M., Park H., Faronkhzand O.C., Böttinger E.P., Arnout M.A. (2002). During differentiation of the monocytic cell line U937, Pur α mediates induction of the CD11c β_2 integrin gene promoter. *Journal of Immunology*. 68:3887-3893.

Shortman K., Liu Y-J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*. 2:151-161.

Shortman K., Caux C. (1997). Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells*. 15(6):409.

Simecka, J.W. (1998). Mucosal immunity of the gastrointestinal tract and oral tolerance. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 34:235-259.

Soesatyo M., Biewenga J., Kraal G. and Sminia T. (1990). The localization of macrophage subsets and dendritic cell in the gastrointestinal tract of the mouse with special reference to the presence of high endothelial venules. *Cell Tissue Research*. 259:587-593.

- Souza V., Castillo A., Eguiarte L.E. (2002). The evolutionary ecology of *Escherichia coli*. *American Scientist*. 20:332-341.
- Stingl G., Tamaki K., Katz S.I. (1980). Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunological Reviews*. 53:149-174.
- Steinman R.M. (1999). Dendritic cells, en *Fundamental Immunology*. Paul W.E. 4ed. Lippicott-Reven. pp 547-572.
- Steinman R.M, Pack M, Inaba K, (1997). Dendritic cell in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunological Reviews*. 156:25-37.
- Steinman R.M., Swanson J. (1995). The endocytic activity of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 182:283-288.
- Steinman R.M., Gutchinov B., Witmer M.D., Nussenzweig M.C. (1983). Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 157:613-627.
- Steinman R. and Cohn A.Z. (1973). Identification of novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *Journal of Experimental Medicine*. 137:1142-1162.
- Stephens R.J. and Thomson A.W. (1999). Dendritic cells in the liver, kidney, heart and pancreas, en *Dendritic Cells Biology and Clinical Applications*. Lotze M.T. and Thomson A.W. Academic Press. USA. pp 153-178.
- Vandenabeele S., Wu L. (1999). Dendritic cell origins: Puzzles and paradoxes. *Immunology and Cell Biology*. 77:411-419.
- Ventura J.J., Campos R.R. (1992). Estudio morfológico del tejido linfóide asociado al intestino, en *Inmunología de Mucosas*. Atelier. México. pp 91-98.
- Vremec D., Shortman K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of Immunology*. 159:565-573.
- Weiner, H.L. (2000). Oral tolerance, an active immunological process mediated by multiple mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*. 106(6):935-937.
- Weiss L., Greep R.O. (1997). *Histology*. 4ed. McGraw-Hill. USA. pp 523-544.
- Wenneras C.Q F., Bardhan, P.K., Sack R.B. and Svennerholm A. (1999). Intestinal immune responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccines. *Infection and Immunity*. 67(12):6234-6241.

Winzler C., Rovere P., Rescigno M., Granucci F., Penna G., Adorini L., Zimmermann V.S., Davoust J., Ricciardi-Castagnoli P. (1997). Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *Journal of Experimental Medicine*. 183:317-328.

Yamaguchi Y. and Ogawa M. (1999). Dendritic cell and cells of the monocyte/macrophage lineage, en *Dendritic Cell: Biology and Clinical Applications*. Academic Press. pp 281-293.

Yamamoto M., Rennert P., McGhee R., Kweon M-N., Yamamoto S., Dohi T., Otake S., Bluethmann H., Fujihashi K., Kiyono H. (2000). Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patch are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *Journal of Immunology*. 164:5184-5191.