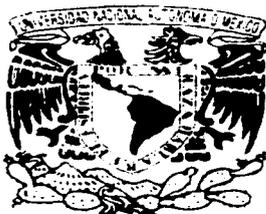


00524
192



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXPRESIÓN DE RECEPTORES ENDOCÍTICOS
EN LAS CÉLULAS DE LANGERHANS DURANTE
EL PERIODO NEONATAL EN RATONES C57BL/6**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARCELA VILLARREAL SILVA



MÉXICO, D. F.

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003

11



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

https://doi.org/10.1016/j.procs.2019.05.005

PAGINACION

DISCONTINUA

Jurado asignado:

Presidente

Prof. Saturnino de León Chapa

Vocal

Profa. Sonia Mayra Pérez Tapia

Secretario

Prof. Leopoldo Flores Romo

1er. Suplente

Prof. Marco Velasco Velázquez

2do. Suplente

Profa. Mónica Berenice Heras Chavarría

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Marcela Villarreal Silva

FECHA: 8 - octubre 2023

FIRMA: _____

Este trabajo fue desarrollado en el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México D. F.

Sustentante:
Marcela Villarreal Silva



Asesor:
Dr. Leopoldo Flores Romo



Supervisor técnico:
M. en C. Mónica Berenice Heras Chavarría



Dedicatorias:

A toda mi familia como muestra de agradecimiento por su amor, apoyo y comprensión. A mi papá, a mis hermanas y en especial a mi mamá, que ha estado conmigo en todo momento.

A Jonathan, por supuesto, porque su amor y compañía en estos años me han inspirado y me dan la fuerza para cumplir metas como ésta.

A mi amigo Gabriel, el buscador de estrellas, quien está conmigo aún cuando esté muy lejos de aquí.

A mis amigos, Liliana, Juan Pablo, Yolanda, Isaac, Carlos, Uctor, Paty, Alejandro W, Jerson, Jorge U y en especial a Ana Elena y Elisa porque agradezco la manera en que han hecho mis momentos difíciles menores y me han acompañado, desde hace algunos años, en mis momentos más felices.

Al Doctor Leopoldo Flores en agradecimiento a la oportunidad que me brindó en su laboratorio, donde conocí lo que es el trabajo en equipo. A Mónica, Juanita, Miguel y Raquel porque sin su apoyo y sus enseñanzas, este trabajo simplemente no hubiera sido posible.

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpos
Ag	Antígenos
APC	Células presentadoras de antígenos (inglés <i>Antigen presenting cells</i>)
BPIIP	Proteína bactericida incrementadora de permeabilidad (inglés <i>Bactericidal permeability-increasing protein</i>)
C	Sistema complemento
CB	Sangre de cordón umbilical
CC	Quimiocina CC (dos cisteínas consecutivas en su secuencia)
CCR	Receptor para quimiocinas CC
CHO	Carbohidratos
CLA	Antígeno leucocitario cutáneo
CSF	Factores estimulantes de colonias
CXC	Quimiocina CXC (cisteína-aminoácido-cisteína)
CXCR	Receptor para quimiocinas CXC
DC	Células dendríticas
DDC	Células dendríticas dérmicas
DETC	Células T dendríticas epidérmicas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FasL	Ligando de Fas
Fc γ R	Receptor para la fracción cristalizable gamma
Fc ϵ R	Receptor para la fracción cristalizable epsilon
FDC	Células dendríticas foliculares
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fLC	Células de Langerhans recién aisladas
FLT3-L	Ing. <i>FMS-Like Tyrosine Kinase 3-ligand</i> (CD135)
GB	Gránulos de Birbeck
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HLA	Antígeno leucocitario humano
ICAM	Molécula de adhesión intercelular 1
IDC	Células dendríticas interdigitantes
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucinas
IFN	Interferones
IP	Proteína inducida por IFN- γ
L	Ligando, (ej. CD40L -Ligando de CD40)
LBP	Proteína de unión a lipopolisacárido
LC	Células de Langerhans
LDL	Lipoproteínas de baja densidad

LFA	Antígeno linfocitario funcional
LPS	Lipopolisacárido
MARCO	Receptor scavenger con estructura colagenosa expresado en macrófagos
MCP	Proteína quimioatrayente de macrófagos (quimiocina cc)
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDC	Quimiocina derivada de macrófago (quimiocina CC)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIP	Proteína inflamatoria del macrófago
MLR	Cultivo mixto de linfocitos
MMP	Metaloproteasas de matriz
MMR	Receptor de manosa del macrófago
MoDC	Células dendríticas originadas de monocitos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	Células <i>Natural killer</i>
PAF	Factor activador de plaquetas
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones (Receptores de PAMP)
PTC	Células plasmacitoides
RANTES	Quimiocina regulada por activación, expresada y secretada por células T normales, perteneciente al grupo CC
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SALT	Tejido linfoide asociado a la piel (inglés <i>Skin associated lymphoid tissues</i>)
SCF	Factor de células estaminales
SIS	Sistema inmune de la piel (inglés <i>Skin immune system</i>)
SR	Receptor <i>Scavenger</i>
TAP	Proteína transportadora de antígenos
TARC	Quimiocina de activación regulada por el timo
Tc	Linfocito T citotóxico (CD8 ⁺)
TCR	Receptores de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	Linfocito T cooperador (CD4 ⁺)
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRANCE	Citocina inducida por activación relacionada al factor de necrosis tumoral
TT	Toxide tetánico
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

Aún cuando las células dendríticas (DC) en piel humana fueron descritas en 1868, su presencia en diferentes tejidos ha sido establecida en los últimos treinta años. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios en torno al importante papel que tienen dichas células en el inicio de respuestas inmunes. A pesar de esto, su origen y vías de diferenciación siguen siendo motivo de controversia. Actualmente se sabe que las células de Langerhans (LC) comprenden una población de DC localizadas en distintos epitelios y mucosas, por ejemplo intestino, pulmón y epidermis, se originan en médula ósea y se caracterizan por la presencia de gránulos de Birbeck (GB), la expresión de E-cadherina y la molécula langerina recientemente descrita¹. El origen hematopoyético de las LC es denotado por la presencia del marcador leucocitario CD45, que también expresan las células T dendríticas, presentes además en la capa suprabasal de la epidermis murina (DETC) y que forman parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales. Aunque ambas poblaciones presentan una morfología dendrítica característica, sus fenotipos y funciones son distintos. Además de la expresión de CD45, las LC de la epidermis del ratón adulto se caracterizan por la presencia de MHC-II y CD-205, sin embargo, las LC de animales neonatos carecen de CD205 y muy pocas son MHC-II⁺, esto podría indicar la inmadurez de estas células. En el presente trabajo se analizó la expresión de algunos receptores endocíticos en las DC epidérmicas de ratones C57BL/6 adultos y neonatos. Se incluyeron: CD205, CD14 y el receptor *scavenger* (SR). Las LC de los animales adultos expresan CD205, sin embargo, no poseen CD14 ni SR (CD204). Por otro lado, las DC epidérmicas de los animales neonatos expresan CD14 y CD204 pero no el marcador clásico CD205. Las DC poseen características que las hacen células presentadoras de antígeno (APC) profesionales. Poseen numerosos receptores endocíticos que facilitan el reconocimiento y captura de estructuras antigénicas diversas provenientes de microorganismos; además, son capaces de migrar hacia los órganos que concentran las células efectoras (linfocitos), donde presentan y estimulan eficientemente respuestas antígeno-específicas. Estos eventos pueden explicarse por la alta expresión de moléculas MHC-II y de moléculas accesorias. Sin embargo, en distintos reportes se ha visto que distintas capacidades están disminuidas en las DC de animales neonatos. Por ejemplo, las DC obtenidas de sangre humana de cordón umbilical (CB) son menos efectivas que las DC de adulto en cuanto a reconocimiento, captura y presentación antigénica². Aunque los mecanismos de estas deficiencias no son claros, se sabe que la reducida expresión de receptores endocíticos, moléculas MHC; de coestimulación y de adhesión; limita las DC de CB en su capacidad de captura y presentación antigénica, así como en su respuesta a algunas citocinas. Esto puede representar una deficiencia propia de las DC en proceso de maduración, cuyas implicaciones serían importantes para la respuesta inmune de niños pequeños y recién nacidos contra infecciones y en la vacunación.

TABLAS Y FIGURAS

Título	Página
Tabla 1. Miembros proteicos importantes que forman PRR.	6
Figura 1. Maduración de las DC.	8
Figura 2. Origen hematopoyético de las células del sistema inmune.	10
Figura 3. Tres subtipos de DC humanas y macrófagos relacionados.	11
Figura 4. Las DC en migración se acumulan y viajan a través de los vasos linfáticos	15
Figura 5. Moléculas que interactúan con el linfocito T.	16
Figura 6. Moléculas clave en las funciones tempranas y tardías de las DC.	17
Figura 7. LC en una lámina epidérmica humana marcadas por inmunofluorescencia.	18
Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de una parte del citoplasma de una LC.	19
Figura 9. Micrografía electrónica de una LC migrando.	21
Tabla 2. Diferencias fenotípicas y funcionales entre DC y macrófagos.	23
Figura 10. Algunos de los PRR sobre DC.	24
Figura 11. Procesamiento y presentación de Ag en el contexto de MHC-I.	29
Figura 12. Procesamiento y presentación de Ag en el contexto de MHC-II.	30
Figura 13. Procesamiento y presentación de Ag de las DC.	31
Figura 14 Estratos de la piel gruesa de la planta del pie	34
Figura 15. Ratón adulto de la cepa C57BL/6.	41
Tabla 3. Ab monoclonales usados en el análisis fenotípico de las DC epidérmicas murinas.	42
Tabla 4. Número de células positivas por campo y densidad celular (cels./mm ²) de CD45, MHC-II, CD204, CD14 y CD205 en la epidermis del ratón C57BL/6 neonato	43
Tabla 5. Expresión de CD45, MHC-II, CD204, CD14 y CD205 en las células epidérmicas del ratón C57BL/6 neonato y adulto.	44
Tabla 6. Promedio de la densidad celular de CD45, MHC-II, CD204, CD14 y CD205 en ratón C57BL/6 neonato y adulto \pm la desviación estándar.	45
Figura 16. Gráfica de la expresión diferencial de marcadores clásicos y receptores endocíticos en las LC de ratones C57BL/6 adultos y neonatos.	45
Figura 17. Comparación de la expresión de los marcadores clásicos de LC: MHC-II y CD205 en ratones C57BL/6 adultos y neonatos.	46
Figura 18. Expresión de receptores endocíticos en las LC epidérmicas de ratones C57BL/6 adultos y neonatos.	47

ÍNDICE

ABREVIATURAS.	IV
RESUMEN.	VI
TABLAS Y FIGURAS.	VII
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. INMUNIDAD INNATA.	3
1.1.1. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos.	4
1.2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.	7
1.2.1. Poblaciones de células dendríticas.	12
1.2.2. Moléculas que regulan las funciones de las DC	13
1.3. LAS CÉLULAS DE LANGERHANS.	17
1.3.1. Reconocimiento y captura de antígenos.	22
1.3.1.1. Marcadores de las células de Langerhans.	25
1.3.2. Procesamiento y presentación de antígenos.	27
1.4. PIEL.	32
1.4.1. Epidermis.	32
1.4.2. Dermis.	34
1.4.3. Sistema inmune cutáneo.	35
1.5. INMUNIDAD EN EDAD TEMPRANA.	37
2. JUSTIFICACIÓN.	39
3. OBJETIVO GENERAL.	40
4. OBJETIVOS PARTICULARES.	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS.	41
5.1. Animales.	41
5.2. Inmunohistoquímica.	41
5.3. Cálculo de la densidad celular.	42
5.4. Análisis estadístico.	42
6. RESULTADOS.	43
7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.	48
8. CONCLUSIONES.	54
9. PERSPECTIVAS.	55
APÉNDICE.	IX
REFERENCIAS.	X

1. INTRODUCCIÓN

El humano vive en constante exposición a una gran variedad de agentes infecciosos, tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos pluricelulares. Estos son capaces de provocar enfermedades y si se multiplican sin control, pueden conducir a la muerte del organismo hospedero. Además de éstos, existen numerosas sustancias químicas que en condiciones o concentraciones específicas, pueden también tomarse nocivas. La mayoría de las infecciones que contraen los individuos sanos son de corta duración y apenas dejan secuelas, esto se debe a la acción de las células y moléculas que conforman el Sistema Inmune. Dicho sistema tiene la función principal de eliminar estos agentes infecciosos reduciendo al mínimo los daños causados por los mismos. Para lograrlo se realizan acciones muy diversas cuya eficacia depende de la dosis y la patogenicidad del microorganismo implicado, así como de la respuesta inmune iniciada.

La primera fase de cualquier respuesta inmune consiste en el reconocimiento del patógeno o material extraño, lo que desencadena reacciones destinadas a eliminarlo. A grandes rasgos, el Sistema Inmune emplea respuestas de dos categorías: la innata y la adaptativa. La diferencia más importante entre ambas respuestas es que la adaptativa presenta una especificidad superior y se intensifica con el número de exposiciones al mismo patógeno, lo que habla de su capacidad de "memoria". Las respuestas innatas utilizan mecanismos primitivos que no se modifican tras la exposición repetida a un determinado agente infeccioso, sin embargo, la captura del microorganismo es relativamente específica, tal que permite el reconocimiento de microorganismos identificando una amplia variedad de productos microbianos de estructuras muy particulares³.

Las células que participan principalmente en las respuestas inmunes son los leucocitos, un grupo importante son las células mediadoras de las respuestas innatas tales como: las células citocidas naturales o natural killer (NK), células fagocíticas como monocitos, macrófagos, leucocitos polimorfonucleares (PMN) y DC; estas últimas, con los macrófagos y los linfocitos B componen el grupo de células presentadoras de antígeno profesionales (APC). Junto con las barreras físicas y químicas como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial y ciertas proteínas sanguíneas, entre las que se incluyen miembros del sistema complemento (C), estas células se consideran la primera línea de defensa frente a la infección⁴.

La descripción de las DC en piel por Langerhans en 1868, fue seguida de una larga especulación acerca de sus funciones. Steinman y Cohn identificaron DC en bazo de ratón en 1973 e iniciaron una serie de experimentos que establecieron a las DC derivadas de tejido

linfoides como potentes estimuladores de las respuestas inmunes primarias. La observación de que células similares estaban presentes en tejidos no linfoides de ratones y humanos, combinada con la evidencia del importante papel que jugaban en el rechazo a trasplantes de corazón e hígado, generó un gran interés. Sin embargo, distintas razones han llevado a que el estudio de las DC progrese lentamente, entre ellas está el que los marcadores específicos que se conocen son escasos y el número de DC que se obtienen de su purificación es muy bajo, haciendo que la generación de estas células *in vitro* sea un gran logro de la investigación científica.

Las DC funcionan como centinelas del Sistema Inmune, ya que inician respuestas inmunes eficientes. Estas células son parte medular en el vínculo entre la respuesta inmune innata y adaptativa porque cuentan con receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR), representantes del Sistema Inmune innato, con los que reconocen y capturan antígenos (Ag), migrando luego hacia los órganos linfoides secundarios para presentar los epítopes derivados de estos Ag a linfocitos T Ag-específicos, iniciando la respuesta adaptativa y promoviendo la activación y expansión linfocitaria.

Los nuevos descubrimientos en el estudio de las DC proveen oportunidades en la intervención terapéutica, por ejemplo en el trasplante de médula ósea y de órganos como el corazón o el hígado, así como en enfermedades autoinmunes. Recientemente se han diseñado protocolos de inmunoterapia clínica para ciertas enfermedades infecciosas y malignidades, basados en el uso de las DC como "adyuvantes naturales"⁵.

Muchos estudios han sugerido que las LC se originan de precursores mieloides de la médula ósea (como también los monocitos y los neutrófilos pero no los linfocitos) y comprenden una población de DC localizadas en epitelios como: intestino, pulmón y epidermis, donde se caracterizan por la presencia de GB y la expresión de E-cadherina. Su estudio ha ayudado al conocimiento de las DC en general, debido a que comparten las características principales de la mayoría de las DC. Después de captar el Ag mediante sus PRR, las LC inician un proceso de maduración y migran transformándose a células veladas durante la circulación linfática, localizándose más tarde en el ganglio linfático regional, donde se conocen como IDC, aquí la alta expresión de moléculas accesorias les ayuda a establecer el contacto efectivo al presentar Ag mediante moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) a los linfocitos T, lo que puede llevar al desarrollo de una respuesta efectora particular mediante la liberación de citocinas y quimiocinas. El que en diversos estudios no se han encontrado DC en linfa eferente puede indicar que una vez que han llegado a los órganos linfoides, las DC mueren por apoptosis⁶.

El inicio de una respuesta inmune adaptativa con los rearrreglos clonales de receptores sobre los linfocitos, es dependiente de las señales provistas por las DC del sistema inmune innato, sin embargo, dichas señales se han visto disminuidas en DC de animales neonatos. En varios estudios se demuestra que las DC de CB son menos efectivas que las DC del adulto en cuanto a reconocimiento, captura y presentación antigénica. Aunque los mecanismos de estas deficiencias no son claros, se sabe que la expresión reducida de moléculas accesorias de adhesión y de MHC, limita las DC de CB en sus distintas funciones⁷. Esto puede representar una deficiencia de las DC en proceso de maduración en etapas tempranas del desarrollo con implicaciones en el Sistema Inmune de niños pequeños y neonatos, por lo que el presente trabajo se enfoca a caracterizar algunos receptores endocíticos y PRR en LC epidérmicas de ratones neonatos y adultos de la cepa C57BL/6, con la finalidad de conocer más sobre la ontogenia de las DC.

1.1. INMUNIDAD INNATA

El sistema inmune innato representa la primera línea de defensa interna contra los agentes extraños, particularmente microorganismos. Este sistema es necesario para desarrollar efectores inmediatos que controlen la invasión del patógeno. El funcionamiento del Sistema Inmune está basado en dos sistemas distintos de reconocimiento: el innato y el adaptativo⁸. La inducción de la función efectora apropiada de células clonales es mediada por el sistema inmune innato, mientras que ambos sistemas controlan la discriminación entre lo propio y lo extraño. El sistema no clonal o innato controla el inicio de la respuesta inmune adaptativa al regular la actividad coestimuladora sobre las APC, lo que conduce al desarrollo de respuestas efectoras particulares mediante la liberación de citocinas y quimiocinas. Se considera que las respuestas innata y adaptativa integran en el hospedero vertebrado un solo sistema inmune donde, por muchos aspectos, se cree que la primera precede y es necesaria a la segunda⁹. Primero, las defensas innatas del hospedero son encontradas en todos los organismos multicelulares, la inmunidad adaptativa, que tiene habilidad para adaptarse a un agente infeccioso y confiere la capacidad de transferencia transplacentaria de anticuerpos (Ab) de la madre al feto, es encontrada sólo en los organismos vertebrados, donde la "memoria" está confinada a un solo individuo y debe ser moderada para no iniciar un proceso de autoinmunidad. Segundo, el reconocimiento innato distingue lo propio de lo no propio perfectamente, condición no conocida en la respuesta adaptativa desafortunadamente¹⁰. Tercero, el sistema inmune innato utiliza receptores que trascienden a través del tiempo, la inmunidad adaptativa parece utilizar los mismos mecanismos efectoras guiados por Ab clonalmente específicos y TCR

codificados en rearrreglos de genes de la superfamilia Ig¹¹. De hecho, es posible decir que la respuesta en contra de proteínas extrañas, o no propias al organismo, es controlada por estos rearrreglos genéticos, sin embargo, la forma en que se inician y ejecutan las respuestas a patógenos la mayoría de las veces está determinada por el tipo de inmunidad innata a dicho organismo¹², además de que los defectos en los mecanismos de la inmunidad innata que afortunadamente son raros, son casi siempre letales¹⁰.

1.1.1. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR).

El Sistema Inmune ha evolucionado enormemente en respuesta a la variabilidad y heterogeneidad molecular de los patógenos, a lo que se añade la habilidad de los microorganismos para mutar. Las estructuras moleculares reconocidas por el Sistema Inmune deben estar compartidas entre varios grupos de patógenos, lo que representa patrones moleculares y no sólo estructuras particulares. Esto implica que estos patrones deben ser productos conservados del metabolismo microbiano, útiles para su viabilidad o patogenicidad, por lo que no están sujetos a variabilidad antigénica. El efecto principal del reconocimiento inmune (la destrucción del microorganismo) requiere que las estructuras reconocidas sean distinguidas absolutamente de los Ag propios, lo cual es una habilidad del sistema inmune innato, con lo que además de montar una respuesta efectiva, previene respuestas autoinmunes o de hipersensibilidad.

Las estructuras invariantes en los patógenos con las características antes citadas representan los blancos principales del reconocimiento inmune innato y en conjunto se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Ejemplos de éstos son: la estructura general de los lipopolisacáridos (LPS) y ácidos lipoteicoicos que comparten todas las bacterias Gram negativas y Gram positivas respectivamente; el motivo CpG no metilado característico del DNA bacteriano, la doble cadena de RNA de algunos virus y las mananas componentes de la pared celular de las levaduras⁹.

Los organismos han desarrollado una gama de receptores no clonales mediante los que reconocen dichos PAMP con amplia especificidad, denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR). La diferencia entre dichos receptores y los TCR e inmunoglobulinas es que solamente los primeros están presentes en vertebrados e invertebrados y sus especificidades son codificadas en un DNA de línea germinal (*germline*), o dirigidas por patógenos, es decir, seleccionadas por patógenos a nivel poblacional. Los PRR se expresan estratégicamente sobre las células de primer contacto con patógenos, dicha interacción causa la activación en sólo minutos u horas a partir de la primera exposición. Su localización en la superficie epitelial y en

todos los tipos de células del sistema inmune innato, incluyendo las APC, es importante para la regulación de los mecanismos de defensa. El reconocimiento de PAMP por PRR resulta en la inducción de funciones efectoras⁹. Ejemplos de PRR son el receptor de manosa del macrófago (MMR), CD205, CD204 (SR), CD14, receptores Fc y los receptores tipo *Toll* o *Toll-like* como TLR2, TLR4 y TLR5 que reconocen peptidoglucano y glicolípidos micobacterianos, LPS y flagelina bacteriana respectivamente. Estos se presentan en células epiteliales de las superficies basolaterales¹³, macrófagos y otras células de defensa especializadas, que generalmente se encuentran debajo de la superficie epitelial.

Las señales inducidas por la interacción del PAMP con su respectivo PRR pueden ser de tres categorías:

- Promueven señales que median la respuesta inflamatoria: Inducción de la síntesis de citocinas que incluyen la interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6, interferón (IFN) tipo I y varias quimiocinas.

- Inducción de coestimulación: Aumento en la síntesis de moléculas coestimuladoras de las células T; en las que con certeza se incluyen CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), éstas se unen al receptor CD28 perteneciente a la superfamilia inmunoglobulina (Ig).

- Señales que controlan la inducción de funciones efectoras: Aumento en la síntesis de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, factor de crecimiento transformante (TGF)- β e IFN- γ .

Los representantes de la inmunidad adaptativa son linfocitos T y B que expresan receptores de Ag clonalmente distribuidos. Las especificidades de dichos receptores son generadas mediante mecanismos somáticos, por lo que no son productos de selección natural dirigida por patógenos. Un linfocito maduro puede tener un receptor con una especificidad única, sin embargo, una señal recibida a través de este receptor no es suficiente para la activación de linfocitos *naive* (vírgenes), ahora se sabe que una segunda señal es requerida para que la activación se lleve a cabo, esta señal es conocida como coestimulación¹⁴.

Cuando los vertebrados evolucionaron como un *sub-phyllum* separado, las respuestas primitivas como la producción de péptidos antibacterianos mantuvieron su función original, pero con el tiempo adquirieron nuevas funciones. Una de éstas fue la inducción de la expresión de moléculas de coestimulación en la superficie de las APC, otra fue el facilitar la captura y procesamiento del Ag. Debido a que la activación de los linfocitos es apropiada sólo cuando ellos son específicos para los Ag derivados del patógeno, Medzhitov y su grupo consideran la actividad coestimuladora como una señal de la presencia del patógeno, proporcionada por el sistema de reconocimiento innato a través de la unión de los PAMP a los PRR, lo que induce la síntesis y expresión de moléculas de coestimulación y el reconocimiento de los Ag específicos derivados del microorganismo por el linfocito, en el evento conocido como presentación de

péptidos específicos realizada por la APC⁹. Este mecanismo completo asegura que una célula T reciba las señales necesarias para la activación cuando el péptido reconocido por el TCR deriva del patógeno que inició la actividad coestimuladora¹⁶. Las DC son realmente efectivas en cuanto a coestimulación, ya que poseen numerosas moléculas accesorias, glicoproteínas de membrana que facilitan el enlace del TCR aún cuando el número de TCR sobre la membrana del linfocito es tan pequeño como de 100 a 1000. Debido a que los Ag propios carecen de PAMP, estos no inducen actividad coestimuladora, de ahí que las células T específicas de Ag propios normalmente no sean activadas. Así, el sistema inmune innato logra controlar la discriminación entre lo propio y lo extraño.

Contrario a los receptores de la inmunidad adaptativa, el reconocimiento inmune innato no es mediado por miembros de una sola familia proteica, sino de varias que han sido adaptadas para funcionar como PRR con un papel muy importante en el reconocimiento de Ag extraños, coestimulación, procesos de fagocitosis y opsonización, activación de vías de señalización proinflamatoria e inducción de apoptosis, activación de C y cascadas de coagulación. Según Medzhitov y Janeway⁹, nosotros podemos ahora distinguir siete familias importantes:

Familia proteica	Sitio de expresión	Ejemplo	Ligandos	Funciones conocidas
Lectinas tipo C	Proteínas del plasma	Colectinas (MBL)	Carbohidratos bacterianos y virales	Opsonización, activación del sist. complemento
-Humoral			Receptor GalNAc	Induce actividad tumoricida
-Celular	Macrófagos, células dendríticas	Lectina tipo C del macrófago	Manosa terminal	Fagocitosis
	Macrófagos, células dendríticas	Receptor de manosa del macrófago (MMR)	Manosa terminal	Fagocitosis
	Macrófagos, células dendríticas	CD205/Dec-205	CHO no conocido	Choletis, Secrec. IFN- γ
	Células NK	NKR-P1	MHC-I, CHO?	Inhibe activación.
	Células NK	Ly49	LPS	Señales celulares
Proteínas ricas en leucina	Macrófagos, células epiteliales	CD14	LPS	Señales NFkB
	Monocitos y otras	Homologo "Toll"	Ligando no conocido	No conocido
	Células B	RP105	No conocido	Mitogenesis de cels. B
Receptores Scavenger	Macrófagos	SR de macrófagos (MSR)	Pared celular bacteriana	Fagocitosis (p.ej. de LPS)
	Macrófagos	MARCO	Media fagocitosis	Una pared bact. y LPS
	Células yST	WC1		No conocida
Pentraxinas	Proteína del plasma	Proteína C-reactiva, CRP	Fosfatidilcolina	Opsoniza, activa C
	Proteína del plasma	Prot. Amiloide sérica	Pared celular bacteriana	Opsoniza, activa C
Transferasas lipídicas	Proteína del plasma	LBP	LPS, otro LS	Transfiere LPS a CD14
	Proteína del plasma	BPIP	LPS, otro LS	Bactericida
Integrinas	Macrófagos, células NK, T y dendríticas	CD11b, c; CD18	LPS	Señalización celular, fagocitosis.

Tabla 1. Miembros proteicos importantes que forman PRR. Las proteínas con regiones ricas en leucina median muchas de las interacciones proteína-proteína, las pentraxinas, componentes de una reacción de fase aguda, son sintetizadas en el hígado y liberadas en el plasma en respuesta a patógenos. Tomada de Medzhitov 97 y Janeway 2002⁹.

Las células integrantes del sistema inmune innato son aquellas encontradas en las superficies del organismo como la piel, intestino y tracto respiratorio. Ellas incluyen células de vigilancia –macrófagos, DC y las células efectoras no específicas, como las natural killer (NK) de

fenotipo CD16⁺, CD56⁺, CD57⁺, los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los granulocitos de la respuesta inflamatoria (CD15⁺) y bajo ciertas condiciones, como inflamación, incluso células como los queratinocitos. Los linfocitos T (CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD7⁺, CD8⁺) y B (CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, CD24⁺), son entonces el arsenal celular de la respuesta inmune adaptativa. Las células NK, algunos subtipos de células $\gamma\delta$ y posiblemente células T autorreactivas NK1 $\alpha\beta$ CD-1 específicas se conocen como células linfoides innatas, las cuales responden inmediatamente a un reto inmunológico sin la necesidad de una fase previa de expansión, porque expresan receptores estereotipados que reconocen un patrón molecular microbiano. Al igual que las DC, las células NK poseen receptores que median su activación, tales como NKR-P1 y un receptor lectina tipo-C y se ha detectado su secreción de IFN- γ . Sin embargo, se han encontrado también receptores con dominios ITIM (*immunotyrosine inhibitory motifs*) que mediante la fosforilación de sus residuos tirosina en sus regiones citoplásmicas, transducen señales de inhibición sobre ambas células¹⁶.

Los macrófagos son células centinela que responden al estímulo innato mediante fagocitosis de cuerpos extraños, sin embargo, ellos no son capaces de montar una respuesta inmune primaria, lo cual es la función principal de las células especializadas en la presentación de Ag conocidas como DC⁶. El primer indicio de que las DC juegan un papel importante en el inicio de la respuesta inmune surgió con los estudios de MLR en ratón, donde las células T proliferan cuando se cultivan con poblaciones alogénicas de DC de bazo, pero no responden a poblaciones ricas en macrófagos. Estudios subsecuentes que comparan la habilidad de las DC y los macrófagos para estimular otras respuestas en cultivo han llegado a la misma conclusión, tanto en ratón como en humano. Por ejemplo, las DC son potentes estimuladoras de la proliferación del linfocito T_c, la producción de Ab por el linfocito B y algunas respuestas policlonales (mitogénicas) como la mitogénesis oxidativa, proceso inducido por la unión de compuestos oxidantes, generados química o enzimáticamente, a la membrana de algunos leucocitos¹⁷. En contraste, los macrófagos son pobres o inactivos en estos sistemas, resultando incluso a veces supresores¹⁸.

1.2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DC representan una población celular traza, fenotípica y funcionalmente heterogénea. Su morfología característica se debe a las largas proyecciones citoplásmicas que extienden en muchas direcciones desde su cuerpo celular. *In vivo*, dichas proyecciones se observan como vellosidades bastante móviles¹⁹. Las DC inmaduras residen en tejidos periféricos donde colectan Ag de su entorno por endocitosis o macropinocitosis.

Cada etapa funcional de las DC está regulada por distintos mecanismos, como ya se vio, el que ocupa el primer lugar es el reconocimiento de una señal de "alerta" o "peligro". Entre los mediadores de una señal de peligro están muchos productos bacterianos o virales, como proteínas o DNA, factores de coagulación, complemento y un gran número de proteínas circulantes o provenientes de tejido. Las proteínas de choque térmico, constituyentes de la pared celular (LPS, fragmento de toxoide tetánico TT, enterotoxina A de *S. aureus* y otras), son usadas *in vitro* para activar DC directamente, antes o después de la captura de un Ag. En respuesta a estas señales, las DC producen diferentes IL, expresan marcadores de coestimulación y aumentan las moléculas MHC-II en su superficie.

In vivo, el encuentro con Ag y la migración de las DC de la periferia a los órganos linfoides secundarios conducen la maduración de estas células. Esto involucra un cambio fenotípico y funcional reflejado en la disminución de la capacidad de captura y procesamiento antigénico y el aumento de sus funciones accesorias con la expresión de un gran número de moléculas coestimuladoras y MHC-II en su superficie²⁰, por lo que al entrar a los ganglios linfáticos proporcionan la combinación de señales necesarias para llevar a cabo la principal función de las DC: la presentación de Ag derivados de patógenos a linfocitos T y B y la iniciación de la respuesta inmune adaptativa²¹.

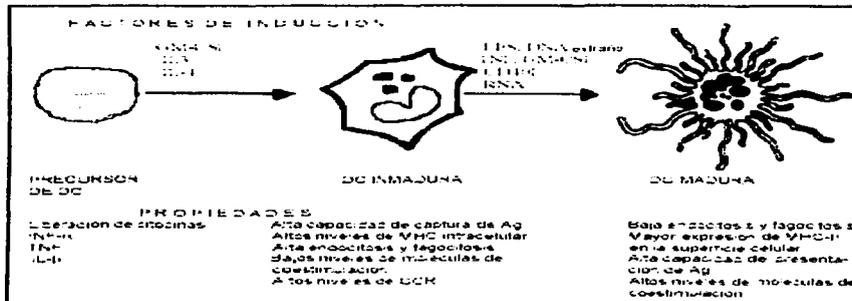


Figura 1. Maduración de las DC. Factores de inducción (citocinas, patógenos, células T, migración) y propiedades de cada estadio (liberación de citocinas, captura y presentación antigénica). Tomado de *Banchereau et al. 2000*²².

La maduración de LC que ocurre *in vitro* es paralela a los eventos que ocurren *in vivo* durante la migración de LC de la piel a los ganglios linfáticos regionales⁵. Las LC son DC inmaduras que pueden capturar proteínas nativas con gran eficacia y después de madurar, presentar los péptidos procesados a las células T. Contrariamente, las LC cultivadas, así como las IDC de órganos linfoides, son relativamente ineficientes en captura antigénica pero son muy

potentes en cuanto a activación de linfocitos T *naive*²³. A este respecto, las LC epidérmicas comparadas con LC o IDC cultivadas, expresan relativamente pocas moléculas MHC-II y accesorias como CD80 y CD86, considerándoseles DC inmaduras²⁴.

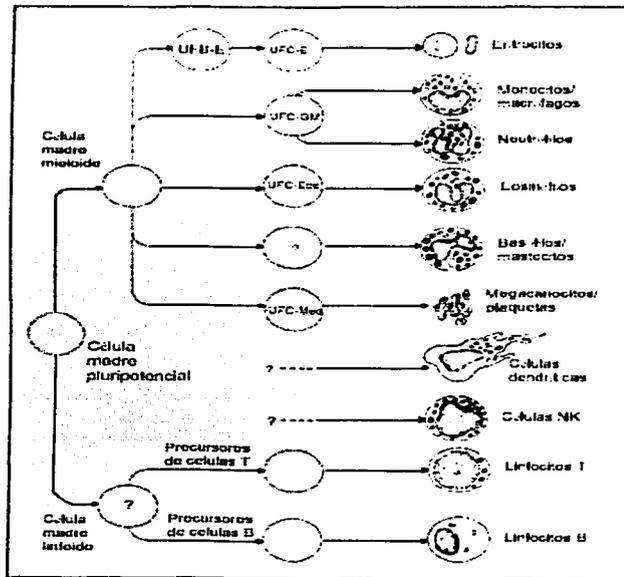
La superficie celular de las DC relacionadas con el linaje mielóide presenta moléculas CD45 y MHC-II pero no marcadores de otros linajes celulares como: CD3, CD19, CD14, CD15 y CD18. El hecho de que expresen el marcador CD45 señala su origen hematopoyético, lo cual se ha hecho evidente en experimentos de radiación de médula ósea y reconstitución por trasplante. También se ha comprobado que DC de bazo de ratón²⁵, epidermis de ratón²⁶, linfa de rata²⁷ y epidermis humana²⁸ son derivadas de progenitores de la médula ósea, ya que en trasplantes de médula las DC de estos órganos expresan moléculas MHC del donador. Debido a que las LC presentan marcadores mieloides, como CD13, CD33 y CD11 (expresados en macrófagos y granulocitos), y a que están presentes en ratones *lkaros*, carentes de todas las células linfoides²⁹, se cree que el precursor de las LC es de origen mielóide, sin embargo, el modelo creado para explicar el origen de las DC del timo a partir de lo estudiado en LC resulta inapropiado. Estas células no tienen como función el iniciar las respuestas contra Ag extraños sino inducir, mediante la presentación de Ag colectados localmente, la muerte de los linfocitos T auto-reactivos a través de mecanismos de apoptosis mediados por Fas, ya que dichas DC expresan el FasL generando la tolerancia periférica.

Al igual que las DC del timo, se han encontrado DC en ganglios linfáticos y bazo de ratón que se relacionan más con células de origen linfóide, debido, entre otras cosas, a que presentan el marcador CD8a; el fenotipo CD8a⁻ representa las DC derivadas del linaje mielóide. También recientemente se ha descubierto que las DC de origen linfóide expresan altos niveles de complejos MHC-II/péptido propio en las áreas de T de los ganglios linfáticos⁵.

Otras células que al parecer son de origen linfóide son las recién estudiadas, DC plasmacitoides (PTC) del humano, que expresan CD4, CD1a, CD11c y CD3, y pocos marcadores mieloides, aunque sus funciones aún no son claras, se cree que promueven respuestas de tipo Th2, responden sólo a ciertas citocinas y producen cantidades abundantes de IFN- α ³⁰.

Aún cuando las DC fueron reconocidas hace casi 35 años, sólo recientemente se han ampliado los conocimientos de los mecanismos que dirigen su crecimiento y diferenciación. El GM-CSF para el cual tienen numerosos receptores, parece jugar un papel importante en el desarrollo de DC mieloides, tanto murinas como humanas¹⁹. Inaba y su grupo han encontrado que los cultivos de células precursoras MHC-II⁻ de ratón proliferan y son capaces de originar granulocitos, monocitos y DC en respuesta a GM-CSF y no a otros CSF³¹. También se ha descrito que los monocitos de sangre periférica humana (CD14⁺) por tratamiento con GM-CSF y

IL-4 o solamente con GM-CSF, pueden adquirir apariencia dendrítica y el marcador CD1a⁶. Estas DC derivadas de monocitos presentan un fenotipo típico de DC inmadura, marcadores monocíticos (CD11b, CD36, CD68, CD115) y son eficientes para la captura de Ag. Después de inducir su maduración con LPS, TNF- α e IL-1 (que inducen migración) o con moléculas como CD40L importantes en la interacción con los linfocitos T³², obtienen su morfología dendrítica y cambian su fenotipo, aumentando la expresión de moléculas accesorias y la traslocación de MHC-II a la superficie de la célula, adquiriendo concomitantemente la capacidad para activar células T *naive*, sin embargo, no poseen marcadores monocíticos ni la capacidad de capturar antígenos.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 2. Origen hematopoyético de las células del Sistema Inmune. UFC-E precursor de UFC-E, es decir, de la unidad formadora de colonias eritroides; UFC-GM, unidad formadora de colonias de granulocitos-macrófagos; UFC-Eos, unidad formadora de colonias de eosinófilos; UFC-Meg, unidad formadora de colonias de megacariocitos y plaquetas, aún cuando Galy et al. Mostraron algunas evidencias de que las DC, linfocitos T, B y NK provienen de un progenitor común, esto aún se encuentra en controversia⁶⁷. Tomada de WILLIAMS, Hematology 2002³³.

Además de la propagación de DC mieloides a partir de precursores MHC-II⁺ y de monocitos, estas células han sido generadas partiendo de células progenitoras CD34⁺ humanas en presencia de GM-CSF (o de IL-3) y TNF- α . Estas DC muestran características típicas de LC, que expresan el marcador linfocítico cutáneo (CLA) y CD1a, MHC-II, CD4, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86, CD83, presencia de GB y alta capacidad de estimular células T, carentes de CD64 (Fc γ RI) y CD35 (CR). Las células CD1a⁺ son células CD45RO⁺ (inmaduras) y expresan los

marcadores CD13 y CD33⁵. Bajo la influencia de TGF- β también se polariza la diferenciación hacia DC con características de LC³⁴.

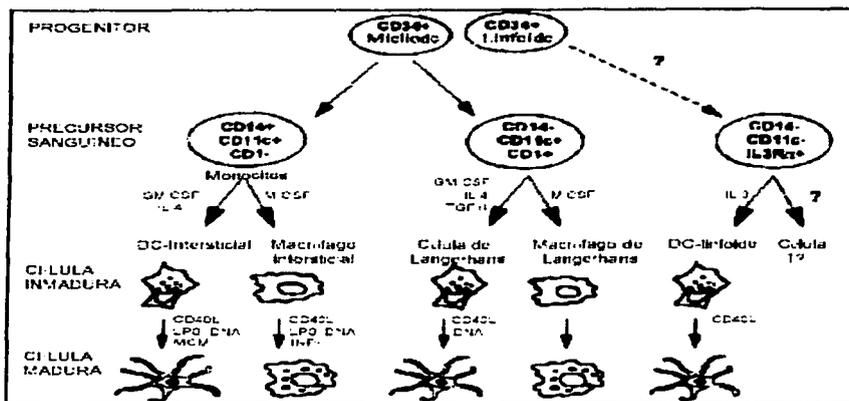


Figura 3. Tres subtipos de DC humanas y macrófagos relacionados. Según las condiciones, el progenitor mielóide da lugar a dos precursores, uno genera DC y macrófagos intersticiales y el otro, macrófagos y células de Langerhans. Aún no está claro si el precursor CD11c⁺ que genera DC-linfoide es generado a partir del progenitor linfóide y si da lugar a linfocitos T. Tomado de *Banchereau et al. 2000*²².

Además del GM-CSF, otras citocinas son importantes para el óptimo desarrollo de las DC, entre éstas se encuentran: el factor de células estaminales (SCF), cKitL y el receptor para factores de crecimiento FLT3-L; IL-4 para la diferenciación a partir de monocitos; TNF- α , para su maduración y TGF- β componente del suero bovino implicado en el desarrollo de las LC. A éstos se anexa la estimulación de CD40 por CD40L (gp39), que es expresado en células T activadas y promueve la función accesoria de las DC porque las induce a madurar, con lo que expresan moléculas de coestimulación y secretan citocinas y quimiocinas, esto también aumenta su viabilidad que típicamente es corta *in vitro* (de uno a cinco días). Dicha maduración vía CD40 se demuestra por la expresión de CD25 y la disminución de CD1a, la traslocación de MHC-II a la superficie y la secreción de IL-12. La molécula CD40 es de crítica importancia en el desarrollo de las células B dependiente de células T, su diferenciación y el cambio de isotipo. Existen también varias moléculas implicadas en la regulación de estas células, tales como IL-10 que impide la diferenciación de monocitos a DC, M-CSF que promueve la diferenciación de macrófagos a partir de los monocitos, al igual que IL-6 y al parecer, VEGF. La IL-10 también puede inducir la apoptosis de las DC y disminuir su capacidad para estimular linfocitos T y la producción de IL-12. También se ha visto que los glucocorticoides disminuyen la viabilidad de

las DC y su expresión de moléculas de coestimulación, un ejemplo es la prostaglandina E2, que disminuye la producción de IL-12 y aumenta la de IL-10, lo que genera respuestas tipo Th2³⁶.

1.2.1. Poblaciones de las células dendríticas

Aún cuando no está claro si las diferencias entre las poblaciones de DC se deben a que corresponden a diferentes linajes celulares o a diferentes estados de diferenciación, las DC comprenden todo un sistema celular conformado por: 1) DC en tejidos no linfoides como las LC del epitelio (piel, mucosas y pulmón) y las células intersticiales de corazón y riñón así como de otros órganos, 2) las células veladas de la linfa aferente y las DC de sangre periférica; 3) las IDC de las áreas de T dentro de los órganos linfoides secundarios; 4) las de la médula tímica y 5) las células FDC de los folículos de B de los órganos linfoides secundarios⁵.

Las DC de vigilancia o centinelas incluyen las poblaciones encontradas en tejidos no linfoides o periféricos y pueden ser divididas en dos poblaciones basándose en fenotipo y localización, aquellas encontradas en el epitelio superficial (LC y DC en intestino, tracto urogenital y el tracto respiratorio), y las encontradas en tejido no epitelial (DC de corazón, de riñón y de la dermis). Las primeras expresan en humano el fenotipo CD1a⁺, del cual las segundas carecen y pueden migrar al tejido linfoide local.

Las DC de la sangre o linfa ("veladas"), constituyen de un 0.1% a un 1.0% de la población leucocitaria de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en el humano³⁶. Estas expresan moléculas MHC, pero pocos o nulos marcadores de diferenciación-activación (CD83, CMRF-44) y moléculas de coestimulación. La mayoría son inmaduras, en el sentido de que algunas de éstas ya presentan suficientes moléculas para captar Ag cuando es requerido. A éstas se anexan primordialmente precursores de DC derivadas de médula ósea y tal vez DC derivadas de tejidos.

Las IDC están presentes en la médula del timo y en las áreas de T del tejido linfoide secundario, donde más de un tipo ha sido identificado. Entre éstas se encuentran células residentes y células activadas que han reconocido y capturado un Ag, por lo que expresan MHC-II y moléculas de coestimulación, cuya función es presentar Ag a linfocitos T *naive* principalmente, ya que son poblaciones capaces de secretar quimiocinas que atraen linfocitos T *naive*³⁷. Las IDC son células altamente móviles y de baja densidad, con morfología característica. Aunque son capaces de estimular a los linfocitos T, las IDC de tejidos linfoides parecen ser requeridas para la estimulación de células T en reposo, ya que liberan muchas citocinas (IL-2, IL-3, GM-CSF e IFN- α) implicadas en la proliferación linfocitaria. A diferencia de las células mieloides IDC, las DC de origen linfoide (CD8 α ⁺) de estos órganos se han

relacionado a funciones de tolerancia periférica regulando la apoptosis de células T que tienen capacidad de reconocer Ag propios, mediante mecanismos que involucran Fas.

Las DC localizadas dentro de los ganglios linfáticos pueden subdividirse en cinco grupos basándose en su fenotipo, entre los que se incluyen las IDC (CD4⁺, CD11c⁺, CD33⁻), las PTC (CD4⁺, CD11c⁻, CD33⁺) y las FDC (CD4⁺, CD11c⁺, CD33⁺). Los grupos restantes son IDC de aumentada o disminuida afinidad del Ab anti-CMRF-44, molécula que se ha relacionado a células derivadas de precursores CD34⁺ ³⁶.

Las FDC se localizan exclusivamente en los folículos de los linfocitos B del bazo y ganglios linfáticos y expresan receptores para el Fc de inmunoglobulinas y fragmentos del complemento. Su función es presentar Ag en forma de complejos inmunes a los linfocitos B. Estas células se han relacionado más con células estromales, es decir, con aquellas que conforman el tejido de sostén de estos órganos parenquimatosos³⁶, ya que no expresan ni el marcador leucocitario CD45 ni las integrinas $\beta 2$ (tales como CD11/CD18) de los leucocitos¹⁹, implicadas en la migración, activación de células T, señalización y adhesión celular⁴⁰.

No está claro que todas las poblaciones de DC tengan el mismo progenitor mieloide y su relación con células del linaje monocito-macrófago es incierto. Aunque tanto macrófagos como DC son capaces de presentar Ag, estas últimas exceden por mucho la capacidad de los macrófagos².

1.2.2. Moléculas que regulan las funciones de las DC

Las DC de la periferia, como las LC, capturan Ag y migran como células veladas a través de la linfa o vasos sanguíneos y residen en órganos linfoides secundarios en las áreas de T como IDC⁴¹, allí presentan los Ag procesados a los linfocitos T *naive* generando una respuesta primaria Ag-específica por la célula T⁴², esta presentación a células T es entonces seguida por la respuesta primaria extrafolicular de células B⁴³.

Estudios en los que LC son administradas intravenosamente han sugerido que estas células dejan el epitelio a través de la linfa aferente, migran a través del hígado y llegan a los ganglios linfáticos regionales, pero pocas, si acaso, entran directamente de la sangre a los ganglios linfáticos⁵. La producción local de TNF- α se sugiere como uno de los mecanismos reguladores de la migración de las LC epidérmicas a los ganglios⁴⁴. También se ha encontrado que pocas DC migran del bazo a la sangre circulante⁴⁵, al igual que de los ganglios linfáticos a través de la linfa eferente, probablemente porque mueren después de su presentación de Ag *in situ*⁵.

Dos aspectos indican que muchas DC tienen capacidad de migrar, en primer lugar porque diferentes poblaciones han sido caracterizadas por su localización y estado de diferenciación y

activación, sugiriendo que algunas células migran conforme maduran; en segundo lugar, por la disminución en el número de DC presentes en el tejido no linfóide a partir de la administración de LPS, IL-1 o TNF⁴⁶. Las DC cruciales para la fase efectora de la respuesta innata son aquellas capaces de capturar Ag de bacterias, virus u otros patógenos y de estimular las células efectoras tempranas, posiblemente por la producción de citocinas como IL-12 e IFN- α con las que estimulan la proliferación de las células T (o su expansión clonal) y la producción de citocinas, que a su vez promueven la producción de Ab por las células B y estimulan la maduración de los precursores de las LC. Actualmente está claro que las células T CD4⁺ presentan dos perfiles distintos de producción de citocinas (Th1 y Th2) y que estos perfiles determinan el tipo de respuesta básica mediada por este tipo celular. Entre las citocinas típicas de Th1 destacan IFN- γ , TNF- β e IL-12; este tipo celular está implicado en las reacciones inflamatorias mediadas por células. Varias citocinas tipo Th1 activan reacciones citotóxicas, inflamatorias y de hipersensibilidad retardada. Por el contrario, las células tipo Th2 producen IL-4 e IL-5 de forma característica, produciendo además con frecuencia IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 y estimulan la producción de Ab, con isotipo IgE. Las citocinas de Th2 se asocian con la regulación de las respuestas alérgicas y de Ab de gran magnitud. Las citocinas de Th1 inhiben las acciones de Th2 y viceversa³.

Además de la producción de IL-12, se ha señalado que las DC de ganglios linfáticos de ratón son la mejor fuente de IL-6, la cual también producen las LC. Se cree que esta citocina ayuda a inducir la actividad citotóxica alogénica de los linfocitos T. IL-7 es producida por algunas DC (CD83⁺), activando también la MLR alogénica. Las DC también producen IL-15 e IL-10. No se ha podido aclarar aún si las DC producen IL-1 (IL-1 α e IL-1 β), TGF- β , TNF- α y TNF- β ; sin embargo, las DC expresan los receptores para estas citocinas: IL-1R, TNFR, TGFR (donde se encuentra la Endoglina), además de IL-2R (a donde pertenece el CD25 de algunas DC) y GM-CSFR, ya que no cuentan con receptores para otros CSF³⁵.

Junto con los receptores de las citocinas antes mencionadas, las DC generadas *in vitro* expresan los receptores de quimiocinas: C5aR, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 y CXCR4, por lo que migran en respuesta a las quimiocinas CC: Proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP)-3, MCP-4, RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α , MIP-1 β y MIP-5 y a la quimiocina CXC: SDF-1. Sin embargo, no responden a la quimiocina CC eotaxina o a las quimiocinas CXC IL-8, IP10 y Gro β , ni a la quimiocina C linfotactina. Las DC además de responder a C5a también responden a formil-péptidos, al factor activador de plaquetas (PAF) y a la quimiocina CC que producen las DC y los macrófagos llamada MDC. Recientemente se descubrió que el receptor CCR6 que une MIP-3 α está presente en DC derivadas de un precursor CD34⁺ y no en DC derivadas de monocitos. Los receptores CCR5 y CXCR4 están

implicados en la infección por HIV. La migración de las LC también está regulada por moléculas de adhesión, tales como E-cadherina, CLA y las isoformas de CD44. Para cruzar barreras como la membrana basal y el endotelio, las DC cuentan con metaloproteasas de matriz (MMP), involucradas en la degradación de componentes de la pared celular tales como la colagenasa intersticial (MMP-12) y algunos miembros de la familia de MT-MMP⁵. Las DC inmaduras en la sangre pueden entrar a los órganos linfáticos atravesando el endotelio vía la integrina β de CD49d.

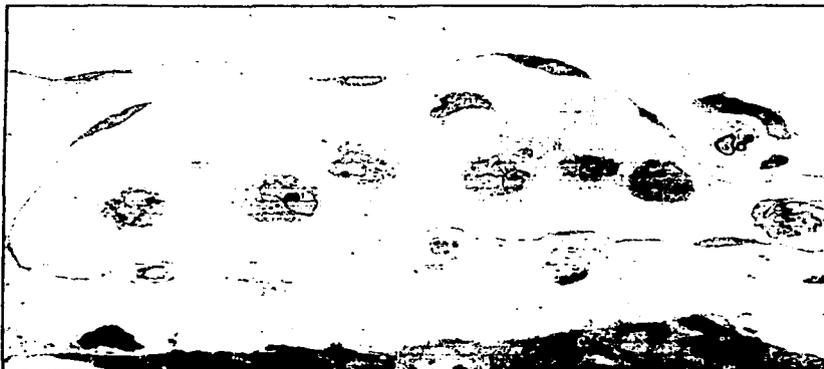


Figura 4. Las DC en migración se acumulan y viajan a través de los vasos linfáticos. Esta micrografía electrónica fue tomada de un explante de piel cultivado por dos días. Este amplio vaso bajo la epidermis está cubierto por una delgada capa endotelial por donde migran las células veledas con sus largas y delgadas extensiones de citoplasma, características de DC maduras. Algunas de estas células contienen pequeños gránulos de Birbeck indicando que son LC. 1.230x; bar = 15 μ m. Tomado de Romani *et al.* 2001⁵.

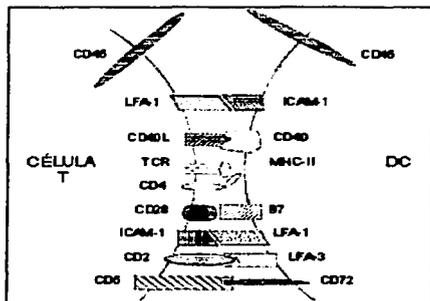
Recientemente se ha detectado la producción de nuevas quimiocinas como son: MDC (producida por macrófagos y DC), TARC (esencialmente por DC), DC-CK-1 (producida en altos niveles por DC), TECA (por IDC del ratón). Muchas de estas quimiocinas específicas de DC inducen la migración de las células T, pero están principalmente involucradas en la atracción de las DC al área paracortical de los órganos linfáticos durante la iniciación de las respuestas inmunes primarias⁵.

Como ya se ha visto, el crecimiento, diferenciación y migración de las DC están influenciados por un gran número de moléculas, de igual manera, muchas de éstas participan en las funciones de las DC tales como la captura, el procesamiento y la presentación antigénica. Tal vez en esta última etapa es donde llevan a cabo sus funciones más importantes, debido a que consuman el vínculo primordial entre la respuesta innata y la adaptativa. Dichas moléculas incluyen aquellas involucradas en estimular las funciones de los linfocitos, tales como su

proliferación, migración y producción de Ab, participando desde las citocinas y quimiocinas, hasta las moléculas de adhesión y coestimulación.

La interacción DC-linfocito se ve favorecida por moléculas de adhesión tales como ICAM-3 (CD50) que se expresa constitutivamente sobre las DC en altas concentraciones y provee la adhesión inicial predominante con el LFA-1 (CD11a) de los linfocitos. La ICAM-2 de las DC no parece contribuir en gran medida con esta interacción en particular. ICAM-1 (CD54) es expresada en menores cantidades sobre DC en reposo, pero es inducida rápidamente sobre DC como resultado de una señal del linfocito T. CD58 puede también incrementar la estabilidad en la unión del CD2 de los linfocitos T. LFA-1 participa en interacciones recíprocas.

Las DC activadas incrementan la expresión de las moléculas de coestimulación, que junto con las moléculas de adhesión permiten la activación de las células T. En ausencia de coestimulación no ocurre activación del linfocito T y por el contrario, se genera la tolerancia anérgica.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5. Gran cantidad de moléculas sobre la superficie de las DC tienen la habilidad de interactuar con el linfocito Th, éstas incluyen las estructuras de presentación y reconocimiento antigénico (MHC-II y TCR junto con CD4), moléculas que participan en la activación del linfocito T (B7 y CD28) y en la activación de DC (CD40 y CD40L) y moléculas de adhesión. Se ha propuesto que CD45 participa en la interacción con otras células o con moléculas de la misma superficie celular.

CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) son miembros de la familia de la Ig que se unen a diferentes sitios de la molécula CD28 de los linfocitos (presente en 28% de los linfocitos T humanos). En presencia de la señal proporcionada por CD28, la célula T se activa y se induce la secreción de citocinas en una superficie celular blanco; con esto se da, por ejemplo, la estimulación de las señales por ciclosporina A, así como la expresión de moléculas de superficie como TNF- α y TNF- β , FasL (ligando de Fas), CD40L, CD30L y CD27L (ver posteriormente)⁹. CTLA-4 que es un segundo ligando, es expresado sobre los linfocitos T activados y promueve una señal negativa alternativa. Las respuestas del linfocito T hacia Th1 son atribuidas a CD80 y hacia Th2 a CD86⁴⁷. La expresión de CD80 y CD86 es estimulada en presencia de GM-CSF o IL-4, sin embargo, el IFN- γ sólo induce CD86. Estudios recientes señalan que CD50 (ICAM-3) actúa junto

Las LC son las DC no linfoides mejor caracterizadas, se localizan en la capa basal y suprabasal de la epidermis. Son el único tipo celular que expresa moléculas MHC-II en piel sana. En piel humana se encuentran de 460-1000 LC/mm² y en piel murina de 800-1200 LC/mm², dependiendo de la cepa⁵. Birbeck en 1961 señaló que las LC además de caracterizarse por poseer gran cantidad de gránulos (que llamó posteriormente gránulos de Birbeck —GB), tienen un núcleo multilobulado, el cual puede visualizarse en preparados comunes, por ejemplo, en cortes finos de muestras de piel fijadas en paraformaldehído y glutaraldehído embebidas en Epon (mezcla de resinas epóxicas para microscopía electrónica de transmisión), donde muestran su citoplasma muy claro, carente de tonofilamentos y con tendencia a encoger. Actualmente se sabe que estas células no presentan melanosomas ni desmosomas hacia las células vecinas y que las LC humanas también se caracterizan por la expresión de CD1a y el receptor CCR6 de quimiocinas^{52,53}.

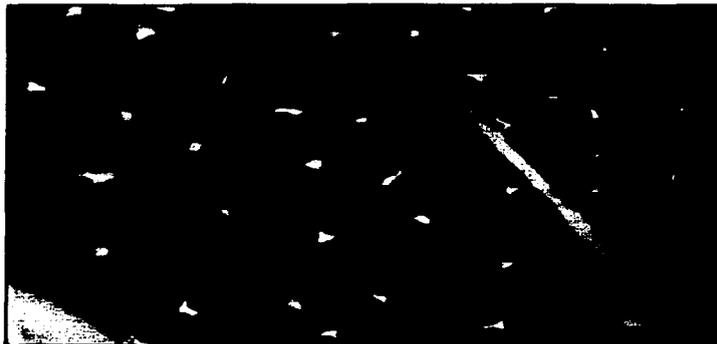


Figura 7. LC en epidermis de piel humana visualizadas en una lámina epidérmica por inmunofluorescencia con Ab monoclonales anti-MHC-II. Cortesía de Steinman R. en Austyn, *Principles of cellular and molecular immunology*, 1993¹⁸.

Las LC son metabólicamente activas ya que presentan un buen número de mitocondrias, centriolos y lisosomas, además de su retículo endoplásmico y su aparato de Golgi bien desarrollados⁵⁴. En los preparados teñidos mediante tinciones especiales *in vivo*, por ejemplo, en inmunohistoquímica para el receptor de superficie CD1, se distingue la forma dendrítica característica de estas células por las numerosas prolongaciones que se extienden desde su cuerpo celular hacia los espacios intermedios entre los queratinocitos adyacentes. Aparte de CD1a, las LC humanas expresan otros miembros de la familia CD1 como CD1c en cantidades variables y porcentajes mayores de CD1b, también presente en DC dérmicas⁵⁵. Su rasgo ultraestructural más característico es la presencia de GB, organelos pentalaminares en forma de

bastón que constan de membranas superpuestas separadas por láminas, con un estriado transversal regular que les da una apariencia dentada y en algunos casos, con un ensanchamiento en un extremo, por lo que su estructura, mejor descrita por Klaus Wolf en 1967, semeja una raqueta de tenis limitada por una membrana. El GB se ha relacionado con algunas moléculas cuya participación en el proceso endocítico apenas está siendo definida, como el receptor tipo lectina llamado Langerina, que fue el primero en ser descrito¹. Valladeau y su equipo han señalado que un epítipo de esta molécula es reconocido por el Ab monoclonal anti-LAG (gránulo asociado a LC) descrito por Kashihara en 1986⁵⁶.



Figura 8. Micrografía electrónica de transmisión de una parte del citoplasma de una LC, ilustrando GB citoplásmicos completos (→) e incompletos (>). Cortesía de Romani N. en Austyn, *Principles of cellular and molecular immunology*, 1993¹².

En algunos estudios se ha mostrado que las LC posiblemente derivan de precursores de la médula ósea, llegan a la piel (posiblemente a través del torrente sanguíneo) y migran en forma inmadura hacia la epidermis, donde terminan su diferenciación a LC con GB y donde forman una red de DC epiteliales localizadas periféricamente como células centinela que capturan Ag para procesarlos y presentarlos posteriormente a los linfocitos T. El precursor que llega a la epidermis no ha sido caracterizado, pero estudios en cultivo han mostrado que se trata de células CD34⁺ con presencia CLA asociado a residencia cutánea, que lleva al desarrollo de LC en presencia de TNF- α y GM-CSF, ya que alrededor del 20% de la progenie contiene GB⁵. Estos precursores de LC parecen ser guiados específicamente por la quimiocina MIP-3 α /CCL19 producida por macrófagos y por los queratinocitos de la epidermis, ya que cuentan con el receptor apropiado, CCR6. La citocina TGF-1 β también tiene un papel importante. La inmigración de DC puede

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

observarse por una video-técnica, donde precursores candidatos a LC CD117/CD1a*, fluorescentes, inyectados intravenosamente, se extravasan a la epidermis, dependiendo de los niveles de selectinas de la sangre expresados en la dermis¹⁸.

Las LC normalmente están en continuo movimiento, pero permanecen en su lugar en la epidermis sin subir ni descamarse como los queratinocitos y otras células en el estrato córneo. Allí las LC se ubican como centinelas del Sistema Inmune ya que capturan Ag que ingresan por la epidermis para procesarlos y presentarlos a los linfocitos con la consecuente inducción de la respuesta inmune específica, por lo que deben migrar a los ganglios linfáticos regionales donde se localizan en las áreas de células T⁶⁷.

Varios modelos han permitido estudiar algunos de los mecanismos y cambios que permiten a las LC salir de la piel y llegar al ganglio linfático correspondiente, entre los más conocidos están la inducción de la hipersensibilidad por contacto por la aplicación tópica de haptenos sensibilizadores, el cultivo de explantes de piel y los alo- e iso-transplantes cutáneos⁴¹. Estos estudios señalan, por ejemplo, que en respuesta a la aplicación de sensibilizantes o inductores de la migración, como las citocinas inflamatorias IL-1 β y TNF α , disminuye la densidad de las LC epidérmicas y aumenta el número de DC en el ganglio linfático regional. La IL-1 β provoca un aumento dramático en la expresión de MHC-II en la superficie y cambios en la morfología, pues las células se aprecian más grandes y más dendríticas; dichas características son signos de activación y coinciden con el aumento observado en la capacidad accesoria de las DC. La acción que tiene el TNF- α en la migración de las LC al ganglio linfático regional está mediada por el TNF-RI, ya que el ratón *knock-out* de TNF-RI, no presenta ninguna alteración en la respuesta inducida en hipersensibilidad por contacto. También se ha demostrado que la principal fuente de la IL- β son las mismas LC, que pueden estimularse autócrinamente o actuar paracrinamente con los queratinocitos u otras células cutáneas para inducir la síntesis de otras citocinas como TNF- α , que se produce en la epidermis por los queratinocitos⁶⁸.

La emigración de las LC de la epidermis involucra la disminución de los enlaces homotípicos de la E-cadherina a los queratinocitos. El primer obstáculo para las LC migratorias es atravesar la membrana basal. Hay evidencia de que las enzimas MMP están implicadas en la penetración de las membranas basales por las LC; algunas MMP son por ejemplo, MMP-9 y MMP-2, que poseen un sustrato específico para colágeno tipo IV. El sistema MMP-9 es activado también por las mismas citocinas que median la regulación de la E-cadherina. Algunos experimentos han sugerido que la cascada enzimática del activador de plasminógeno/enzima urocinasa también participa en la penetración de la membrana y las DC expresan el receptor de urocinasa CD87²⁰.

En diversos estudios se ha señalado que mediante el bloqueo de las integrinas por inyección intradérmica de Ab anti-integrina $\alpha 6$ y aplicación de TNF- α , las LC atraviesan el siguiente

obstáculo, el tejido conectivo dérmico, ya que retraen sus dendritas y pierden su unión a los queratinocitos. Finalmente, las LC entran a los vasos linfáticos de la dermis. Aún cuando no está confirmado, las DC entran en el seno subcapsular de los ganglios linfáticos y desde ahí migran a las áreas de T. Nuevamente interacciones de adhesión (selectinas, integrinas, etcétera), como las utilizadas al penetrar los vasos linfáticos, son importantes para que éstas lleguen al área paracortical, donde la LC finaliza como una IDC que se encuentra con células T Ag-específicas. Esto puede ser visto en experimentos de hipersensibilidad por contacto con el alérgeno isotiocianato de fluoresceína (FITC), donde las DC que migraron al captar este alérgeno fluorescente, aparecen dentro del ganglio⁴¹. También se han notado desde hace tiempo, GB en células del ganglio, sin embargo, éstos pueden formarse en las DC derivadas de células progenitoras de CD34⁺ en ausencia de un ambiente epidérmico. La E-cadherina, que se ha mostrado como un marcador específico de LC es de gran utilidad en estos casos, ya que el porcentaje de células que lo expresa disminuye como consecuencia de la aplicación de un Ag sensibilizante de contacto²⁰.

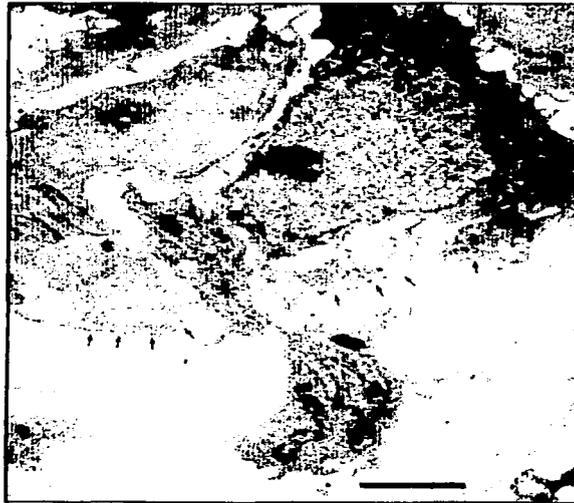


Figura 9. Micrografía electrónica de una LC (*) abriéndose paso a través de la membrana basal (—) hacia la dermis. Obtenida de un explante de piel que fue cultivado por dos días. 6,800x; bar = 3µm. Tomado de Romani *et al.* 2001²⁰.

La dirección de la migración de las LC se sustenta en la acción de las quimiocinas, tales como MIP-3 α y la quimiocina de tejido linfoide secundario (SLC), (llamadas recientemente CCL19 y CCL21, respectivamente), que se unen al CCR7 que expresan las DC maduras y las LC. De esta manera se da la migración, ya sea a los vasos linfáticos, donde las células endoteliales producen CCL19; o al área de T de los ganglios linfáticos donde se localiza la quimiocina CCL21.

Otro grupo de quimiocinas recientemente encontradas en las LC son las que se unen al receptor CCR2 como las MCP y que las atraen a los vasos dérmicos o a los ganglios. CCR5 y su ligando MIP-1 α tienen efectos menos pronunciados. Romani *et al* han evidenciado que la IL-16 promueve la salida de las LC de la epidermis. In vivo, esta citocina puede ser provista por células T que se encuentran en la dermis^{2v}.

Durante su migración desde la piel hasta el ganglio linfático, las LC sufren transformación, primero a células veladas de las vías linfáticas y después a IDC en el ganglio linfático, donde se presenta el Ag a los linfocitos T. Las LC representan una población celular muy dinámica que permanece en la epidermis por aproximadamente tres semanas, su ciclo no se conoce con exactitud pero se cree que su residencia en ella es la última etapa de su vida, ya que una vez que han llegado a los órganos linfoides secundarios mueren por apoptosis. Este hecho se puede suponer porque los cambios debidos a la maduración son irreversibles y sólo se han encontrado pocas células pertenecientes al linaje dendrítico en la linfa eferente. Aparentemente este recambio es lento, pero en condiciones basales también hay una salida constante de cierto número de LC hacia la dermis, lo cual aumenta con diversos estímulos²³.

1.3.1. Reconocimiento y captura de antígenos

Las LC han desarrollado más de un mecanismo para identificar y capturar Ag, aunque se ha encontrado que sus capacidades fagocíticas son menores a las de los macrófagos, este hecho claramente depende de su estado de diferenciación⁴⁷. A diferencia de los linfocitos T y B, las LC no expresan receptores específicos de Ag, sino receptores que reconocen epítopes comunes a muchos patógenos bacterianos o virales (PRR); receptores tipo lectina como CD204, receptores de C o de Ig^D.

Las LC comparten algunas características con los macrófagos, tales como la expresión de receptores Fc, marcadores citoquímicos (enzimas lisosomales) y algunos marcadores de macrófagos como F4/80 en el ratón, los cuales se pierden una vez que las LC maduran a DC capaces de migrar y presentar Ag. Sin embargo, la diferencia fenotípica más importante es que

las DC expresan MHCII en grandes cantidades en forma constitutiva, mientras que los macrófagos necesitan diversos estímulos para expresar MHC-II¹⁶.

Las LC se han caracterizado por su gran capacidad de captura antigénica mediante diversos mecanismos, algunos de éstos son la endocitosis mediada por receptor y la fagocitosis de partículas relativamente grandes como partículas de látex, cuerpos apoptóticos, virus y parásitos intracelulares⁵⁵. La pinocitosis o captura de un Ag en fase fluida es una manera efectiva por la que las DC captan Ag para presentarlos a linfocitos e inducir una respuesta inmune. A este proceso se han relacionado los GB y la molécula langerina¹. La macropinocitosis es dependiente del citoesqueleto y está mediada por la formación de grandes vesículas con membrana celular (1-3 µm) que permiten la captura de una gran cantidad de líquido por hora (la mitad del tamaño celular en el caso de las DC), concentrando los solutos extracelulares en vacuolas para procesarlos⁵⁵. Se sabe que las DC generadas a partir de precursores monocíticos así como las LC recién aisladas (fLC), son capaces de llevar a cabo este proceso de captura antigénica¹⁶.

Características	Macrófagos	fLC	LC en cultivo	DC linfoides
GB	-	+	-	-
Esterasa no específica	+	+	-	-
ATPasa en membrana	+	+	-	-
Marcador F4/80	+	+	-	-
FcγRII (CDw32)	+	+	-	-
Receptor CR3 (CD11b/18)	+	+	+	+
LCA (CD45)	+	+	+	+
MHC-I	+	+	+	+
MHC-II	+/-	+	+	+
Marcador 33D1	-	-	-	+/-
Inmunoestimulación	-	-	+	+
Procesamiento de Ag	+	+	-	-
Endocitosis	Alta	Alta	Baja	Baja

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 2. Características y funciones de fLC y LC de cultivo comparadas con las de los macrófagos y DC linfoides en el ratón¹⁶.

A pesar de ser capaces de montar todos estos mecanismos de captura antigénica mediante sus diversos PRR, se ha encontrado que las LC inmaduras no son APC potentes², no así los estadios maduros de estas células encontrados en la linfa aferente y en los ganglios linfáticos (como algunas células veladas e IDC que presentan características de LC como GB, E-cadherina e inclusiones que señalan que en alguna etapa fueron endocíticas), los cuales son altamente capaces de estimular linfocitos T *naive* al presentar sus Ag procesados en contexto

de MHC-II sobre su superficie. También ha sido señalado que este tipo de IDC es capaz de fagocitar bajo ciertas condiciones *in vivo*⁵.

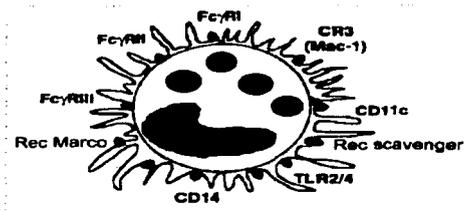


Figura 10. Algunos de los receptores de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos en las DC. Tomado de Resigno 99⁴⁹.

Clark (2000), ha clasificado a los receptores de superficie para la captura de Ag dependiendo si su unión con el Ag es directa o indirecta:

-Enlace directo del Ag:

- Receptores de reconocimiento de patrones/receptores tipo lectina: Estos reconocen estructuras moleculares en muchos microorganismos ausentes en vertebrados. Los epítopes reconocidos por PRR comúnmente son carbohidratos complejos con alguna especificidad en los residuos CHO terminales. En estos se incluye el receptor CD205 y MMR.
- Receptores de lectinas: Estos son moléculas de superficie que se han identificado por su afinidad a lectinas comunes tales como el gluten de trigo o la aglutinina del cacahuate, lo que permite identificar diferentes poblaciones de DC.
- Receptores para lipoglicanos: Entre éstos se encuentra CD14, que es una glicoproteína expresada en células de linaje mielomonocítico, no común en DC, también es encontrado en forma soluble, es el receptor del complejo LPS y la proteína de enlace de LPS, LBP.
- Receptores para virus
- Receptores de DNA

-Enlace indirecto del Ag:

- Receptores Fc (FcR): FcγR, FcεR y FcαR permiten la captura de Ag unido a un Ab, es decir, cuando ya se ha llevado a cabo la participación de la respuesta inmune adaptativa, por lo que la respuesta montada es muy específica. Para que estos receptores tengan una función en la respuesta innata, los Ab deben tener muy baja afinidad natural en el suero.
- Receptores de complemento
- Receptores de cuerpos apoptóticos y necróticos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.3.1.1. Marcadores de las células de Langerhans epidérmicas. CD45, CD205, CD14 y CD204.

Janeway y Medzhitov han definido algunas de las funciones de los componentes de la respuesta inmune innata, entre éstas, han propuesto que la inducción de las funciones efectoras es el resultado del reconocimiento de una amplia gama de patrones moleculares conservados en los agentes patógenos microbianos (PAMP) por los PRR de las células especializadas en captura antigénica tales como las LC⁹. Los receptores CD205, CD14 y CD204 estudiados en este trabajo, son sólo ejemplos de receptores endocíticos pertenecientes a la familia de los PRR, sin embargo, cada vez es mayor el número de estudios enfocados en la elucidación de sus funciones y su localización en otras células.

CD45 (B220)⁵⁰ es una proteína que tiene actividad de fosfatasa de fosfotirosina, es la más importante del Sistema Inmune con esta función, siendo expresada por todas las células de origen hematopoyético. El papel más conocido de esta fosfatasa es de regulador positivo de señales de transducción que se desencadenan por los receptores del Ag de los linfocitos T y B, así como señalización involucrada en la diferenciación intratímica de algunas poblaciones de células T (T γ/δ , por ejemplo)⁶⁰, sin embargo, recientemente se ha encontrado su posible participación en la adhesión, migración transendotelial y en procesos inflamatorios⁴⁰.

Se sabe por diversos estudios que el marcador CD45, junto con la ectonucleotidasa ATPasa, se encuentra entre las moléculas que se expresan más tempranamente durante la ontogenia de las LC, encontrándose células ATPasa⁺, CD45⁺, aparentes precursores de LC en la piel, desde el día 17 de gestación⁶¹.

El receptor DEC205 (dendritic and epithelial cells) fue identificado como una molécula reconocida por el Ab monoclonal NLDC-145, comprobándose su expresión en diferentes poblaciones de DC como IDC, células veladas, LC y en células del epitelio tímico e intestinal. Se demostró también que su peso molecular era de 205 KDa, de los cuales 7 KDa corresponden a CHO. Actualmente esta molécula tiene ya la designación de CD205. En el humano, CD205 se expresa tanto en DC mieloides como en PTC⁶².

El DNAC del CD205 codifica para 1722 aminoácidos, la proteína exhibe similitudes estructurales con los miembros de la familia del MMR, que además incluye el receptor de fosfolipasa A2 y Endo 180. Estas lectinas de superficie constan de un dominio rico de cisteína, un dominio de fibronectina tipo II, varios dominios de reconocimiento de CHO o CRD (10 para CD205) dependientes de calcio, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, y funcionan manteniendo la homeostasis y defensa inmune del hospedero^{63,64}). El CD205 de humano es 77% idéntico al murino, conservando 61 cisteínas y 14 sitios potenciales de N-

glicosilación. La similitud estructural entre el MMR, receptor de Ag mannosilados expresado por MoDC (macrófagos y células hepáticas endoteliales) y el CD205, ha sugerido que éste último es un receptor también involucrado en la captura de esta clase de Ag.

Al CD14 también se le ha llamado receptor de LPS o LPS-R y es una proteína de membrana compuesta de 356 aminoácidos, con cuatro sitios de glicosilación de unión a N. Una secuencia de 19 aminoácidos adicionales, implicada en la señalización, es removida durante el procesamiento. El CD14 está anclado a la membrana mediante enlaces al glucosilfosfatidilinositol. El gen de CD14 contiene un intrón de 88 pares de bases inmediatamente seguido del codón de iniciación. La expresión principal de CD14 se da en la superficie de monocitos y débilmente en granulocitos, también es expresado por macrófagos tisulares. Aunque se ha encontrado que algunas LC y DDC pueden expresar marcadores mielo-monocíticos como el marcador CD14, no se ha encontrado que las DC de sitios diferentes a la dermis sean positivas a éstos⁶⁵, sólo en ratones estimulados con LPS, la expresión de CD14 es detectada también en células no mieloides como hepatocitos y algunas células epiteliales. También se ha descrito la presencia de este marcador en forma soluble, tanto en suero (3 µg/mL) como en el sobrenadante del cultivo de células transfectadas con CD14⁶⁶.

La familia de los receptores *scavenger* fue identificada como un grupo de moléculas de membrana expresadas en macrófagos, células de Kúpffer y algunas células del endotelio, con alta especificidad por ligandos polianiónicos⁶³. No se ha encontrado expresión de CD204 o SR en monocitos, sin embargo, una vez que se han diferenciado a macrófagos, éstos presentan formas diferentes de este receptor (por ejemplo SR tipo A o B)⁶⁷. De hecho, el CD204 recientemente se ha considerado un marcador de diferenciación de macrófagos, ya que es uno de los receptores más numerosos de estas células con un papel importante en la deposición patológica del colesterol durante la aterogénesis⁶⁴. Los análisis por inmunohistoquímica muestran el reconocimiento de CD204 en diversas colonias de macrófagos tales como alveolares, de pulpa roja del bazo, de ganglios linfáticos, intersticiales, perivasculares del cerebro, de placas ateroscleróticas y en células de Kúpffer del hígado⁶⁴. El marcaje de CD204 bovino mediante el Ab IgG-D2 muestra su expresión en sitios particulares de las células, como el retículo endoplásmico, membrana nuclear y aparato de Golgi; diversos estudios señalan que el CD204 se transporta a la superficie en endosomas de membrana mediante mecanismos especiales, una vez que se ha disociado del Ag en los compartimientos endosomales de pH ácido⁶⁷.

El CD204 es un trimero glicoproteico de membrana con un peso molecular aproximado de 220 kDa. La comparación de los aminoácidos de las moléculas del CD204 de diferentes organismos muestra un alto grado de conservación, esta similitud ha impedido la inducción de

fuerzas respuestas inmunes en animales de laboratorio con el fin de generar Ab dirigidos hacia este marcador⁶⁴.

Los tres tipos de SR clase A, SR-A (I, II y III), son generados a partir del mismo gen. Los tipos I y II (SR-AI y SR-AII) difieren en el dominio rico en cisteína del extremo C terminal, pero son funcionalmente indistintos, ya que poseen un dominio de colágeno responsable de la unión al ligando⁶⁴.

Estudios recientes de Harshyne y su equipo sugieren que las DC son las únicas células con la capacidad de capturar Ag de células vivas mediante el contacto con éstas y la endocitosis de fragmentos proteicos y lipídicos de su membrana en compartimientos endosomales y señalan al CD204 como uno de los receptores que participan en este proceso, además, han mostrado que la maduración de la DC, mediante CD40L por ejemplo, induce el cambio a la isoforma SR-AI a partir de SR-AII. El tipo SR III es una variante no funcional que se queda atrapada en el RER y no se expresa en la superficie⁶⁴.

1.3.2. Procesamiento y presentación de antígenos

Aún no está completamente claro cómo las DC inician respuestas primarias estimulando a los linfocitos T *naive*. La incapacidad de las DC maduras de fagocitar partículas y la carencia de lisosomas parece dificultar los esquemas de procesamiento de Ag. La distribución de compartimientos ácidos en LC ha sido estudiada mediante microscopía electrónica empleando la técnica de DAMP (derivado de una base débil acoplado a DNP). Este compuesto se difunde rápidamente en la célula, se concentra en compartimientos de manera inversamente proporcional al pH, se une a las proteínas covalentemente y es visualizado usando una combinación apropiada de Ab anti-DNP conjugados con oro, con los que los endosomas, fagolisosomas y lisosomas se ponen de manifiesto. Estas estructuras están relacionadas con el procesamiento de los Ag endocitados, la separación de la cadena invariante de las moléculas clase II y su unión al péptido inmunogénico.

Las DC convierten los Ag de las células extrañas y microorganismos infecciosos en péptidos cortos que son enlazados a proteínas de membrana del MHC. La asociación péptido/MHC se lleva a cabo en organelos intracelulares específicos y la interacción de los péptidos con las moléculas de clase I y II se produce en diferentes zonas de la célula.

La fuente mayoritaria de péptidos que se unen a moléculas MHC-I son las proteínas presentes en el citosol de las APC, incluyendo las proteínas virales y bacterianas intracelulares, dicha unión se lleva a cabo después de que éstas son degradadas por proteasas y peptidasas intracelulares y liberadas nuevamente al citosol, para que ser presentadas en forma de péptidos

cortos (9 aminoácidos). Los Ag exógenos, por ejemplo, organismos intactos, Ag particulados o Ag solubles capturados por fagocitosis o endocitosis, son también sometidos a degradación y proteólisis, pero éstos no son liberados al citosol sino a los compartimientos MIIC, por lo que su presentación se lleva a cabo mediante moléculas MHC-II.

El reconocimiento de los Ag por parte de los linfocitos T es esencial para la iniciación y regulación de una respuesta inmune eficaz. Es notable que los Tc y Th reconocen péptidos unidos a moléculas MHC-I y MHC-II respectivamente, aunque ésta no es una ruta absoluta. La mayoría de los Tc son CD8⁺ y desempeñan su función citotóxica cuando reconocen los Ag extraños presentados por MHC-I, la cual constituye un mecanismo de defensa fundamental frente a patógenos intracelulares, incluidos los virus, algunas bacterias y parásitos. Debido a que cualquier célula del cuerpo puede ser infectada de esta manera, todas las células nucleadas expresan moléculas MHC-I. Además de moléculas MHC-II, las DC expresan moléculas MHC-I, también reguladas por la diferenciación y activación celular, las cuales son responsables de la presentación cruzada o *cross-priming*, mecanismo que utilizan las DC para estimular la generación de linfocitos Tc CD8⁺ específicos a Ag intracelulares que han sido internalizados y presentados por células vecinas antes que las DC, ya que estas capturan cuerpos apoptóticos (no necróticos) de células anteriormente infectadas o malignizadas, tales como macrófagos para re-presentar sus péptidos a los linfocitos T. El *cross-priming* se considera significativo en la respuesta inmune por ser usado en el rechazo de tumores y transplantes así como en la presentación de Ag derivados de otras células en el contexto de MHC-I, desencadenando una respuesta citotóxica o la tolerancia periférica hacia Ag propios. Otras células, como los macrófagos, carecen de ésta capacidad⁵⁵.

Por otro lado, los Th parecen estar involucrados en el reconocimiento de células que pueden diferenciarse a células efectoras en respuesta a las citocinas que éstos secretan. Las DC son ejemplos de dichas células efectoras y su extraordinaria capacidad para captar Ag es paralela a la alta expresión de moléculas MHC-II en su superficie (>10⁵ por célula) que se da con su diferenciación, lo que se refleja en la expresión de una gran cantidad de vesículas no lisosomales de clase II. Se ha sugerido que en estados tempranos de la maduración, la capacidad de captura antigénica de las DC podría permitir la eficiente presentación de Ag, sin embargo, en estudios de LC en cultivo, se ha encontrado que la síntesis de moléculas del MHC-II es virtualmente indetectable durante el primer o segundo día de cultivo, sugiriendo que la expresión de dichas moléculas sobre la superficie celular o la de sus complejos con el péptido antigénico, inicia hasta que la DC comienza su maduración a DC inmunoestimuladora¹⁸.

Además de la presentación vía MHC clase I o II, se ha señalado recientemente que las moléculas CD1, miembros de la familia no clásica del MHC, que expresan algunas poblaciones

de DC también participan en la presentación de Ag no proteicos al TCR. De los cinco diferentes tipos de CD1 (CD1a, CD1b, CD1c, CD1d y CD1e), las LC y las DC monocíticas (MoDC) expresan CD1a, mientras CD1d es expresada por MoDC, lo que los hace capaces de presentar glicolípidos al TCR⁶⁹.

Como se vio anteriormente, el ensayo más comúnmente usado para demostrar las capacidades funcionales de las DC es la MLR alógena, que demuestra que las DC son aproximadamente 100 veces más eficientes en iniciar respuestas inmunes primarias que cualquier otra APC incluyendo células B y monocitos⁵.

Los péptidos citosólicos, provenientes en su mayor parte de la síntesis proteica de los polirribosomas celulares, y los Ag de patógenos intracelulares, son degradados por proteasas y peptidasas intracelulares y liberados dentro del citosol, por lo que su presentación se lleva a cabo mediante moléculas MHC-I por la vía clásica dependiente de TAP y proteosomas.

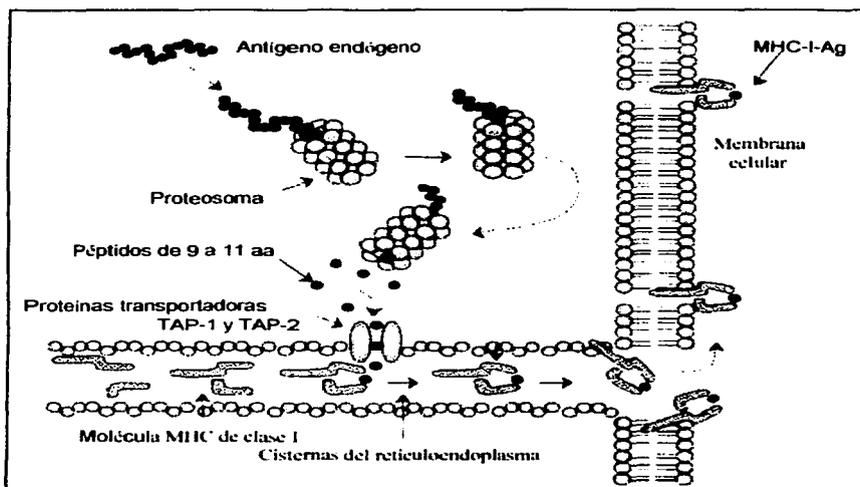


Figura 11. Procesamiento y presentación de Ag en el contexto de MHC-I. Tomado de Rojas-Espinoza 2001⁷⁰.

Aunque el ensamblaje de las moléculas de clase I se produce en el retículo endoplásmico rugoso (RER) de la célula, los péptidos se generan a partir de proteínas citosólicas. En el proteosoma se lleva a cabo la actividad proteolítica más importante a nivel citosólico debido a que presenta la actividad de endopeptidasas, degradando proteínas desnaturalizadas o ligadas

a ubiquitinas hasta liberar péptidos de 5-15 aminoácidos, el IFN- γ aumenta la expresión de los genes que codifican las moléculas componentes del proteosoma. Los péptidos se enlazan a los productos de dos genes, TAP1 y TAP2 (o HAM 1 y HAM2 en ratones), los cuales pertenecen a la familia de los transportadores ABC, forman heterodímeros que se localizan en el RER y el *cis*-Golgi y median el transporte activo hasta liberar dichos péptidos en los compartimientos de las moléculas del MHC-I donde son incorporados al péptido clase I recién sintetizado que será acarreado hasta la superficie celular. Esto no ocurre en presencia de inhibidores del proteosoma o del aparato de Golgi, definiendo que se requiere de la vía clásica donde ambos participan. En el RER, los péptidos antigénicos se asocian con las cadenas pesadas de clase I (cadena α) y con la β 2-microglobulina, esta unión es complicada y en ella están implicados los chaperones, como la calnexina, los cuales facilitan y dirigen la formación del complejo estable, que se transporta después a la superficie celular. Los complejos de clase I sin péptido son inestables, lo que permite asegurar que sólo los complejos útiles a nivel funcional puedan interactuar con los TCR³.

Los Ag exógenos, por ejemplo, organismos intactos, Ag particulados o Ag solubles capturados por fagocitosis o endocitosis deben primero ser sometidos a degradación y proteólisis antes de liberarse a los compartimientos de MHC-II, donde ocurre su unión a los péptidos clase II. Recientemente se ha identificado un compartimiento vesicular en el que se produce la carga de péptidos en las moléculas de clase II denominado MIIC, que comparte características de endosoma y lisosoma y presenta múltiples estructuras de membrana.

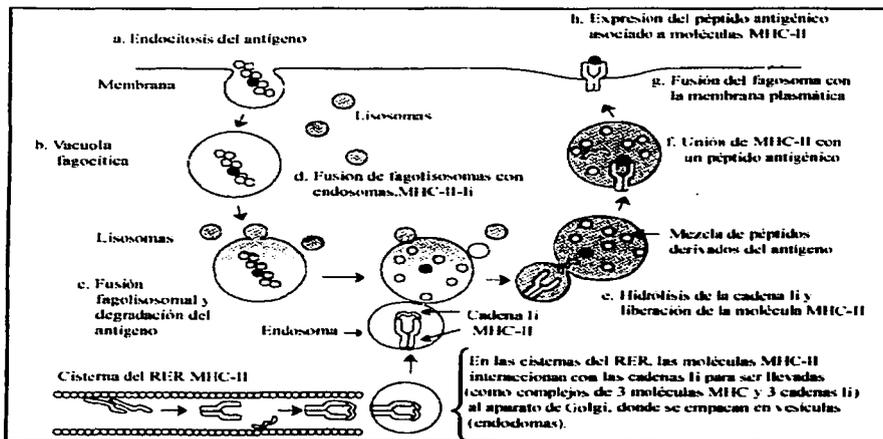


Figura 12. Procesamiento y presentación de Ag en el contexto de MHC-II. Tomado de Rojas- Espinoza 2001⁷⁰.

Las cadenas α y β de las moléculas clase II son sintetizadas a partir de los genes A y B de la región MHC-II. En el RER las cadenas α y β de clase II se encuentran unidas a un polipéptido denominado cadena invariante (Ii), que impide la unión al péptido y contiene secuencias que permiten a la molécula de clase II abandonar el RER. Ii está codificada por un gen ajeno al MHC. El complejo $\alpha\beta$ -Ii es transportado por el aparato de Golgi hasta un compartimiento endosómico o lisosómico de naturaleza ácida, en donde se disocia Ii. La maduración posterior de estas vesículas ocurre después de la fusión con la vía endocítica lisosomal (evidenciado por el marcaje de CD68 y fosfatasa ácida), esto disminuye el pH y permite la disociación de Ii del complejo $\alpha\beta$, facilitando la unión del péptido correcto a la molécula del MHC-II. El complejo $\alpha\beta$ permanece en este compartimiento durante 1-3 horas, antes de alcanzar la superficie celular¹⁸.

Una vez sintetizadas en el RER, tanto las moléculas de clase I como las de clase II son transportadas a través del aparato de Golgi, las primeras unidas a un péptido antigénico y las segundas a una cadena invariable. Las moléculas de clase II se separan de las de clase I en el retículo de la cara *trans* del aparato de Golgi. Las moléculas de clase I se dirigen directamente a la superficie celular. Las moléculas de clase II se unen al compartimiento endosómico-lisosómico, mientras éste se desplaza hacia la membrana plasmática.

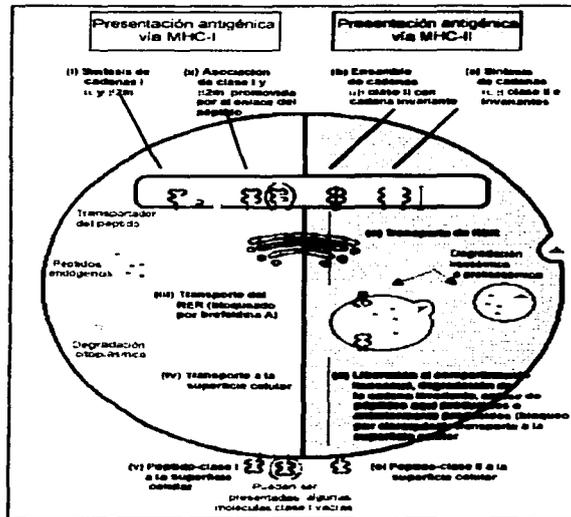


Figura 13. Procesamiento y presentación de Ag de las DC¹⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Recientemente ha sido mostrado que las DC liberan paquetes de membrana celular, llamados exosomas, los cuales contienen moléculas de MHC asociadas al procesamiento de péptidos y moléculas coestimuladoras, con las que también son capaces de estimular linfocitos T, pero parecen más efectivas al ser re-presentadas por una segunda DC⁵.

Nuevamente, muchas moléculas regulan la presentación antigénica por moléculas del MHC. Bajas dosis de GM-CSF disminuyen la producción de moléculas MHC-I en macrófagos de ratón, IL-4 aumenta la producción de MHC-II de la misma manera que el IFN- γ ⁵.

Aunque la activación primaria de células B, dependiente de células T requiere DC y ocurre en el área extrafolicular de los órganos linfáticos secundarios, se sabe poco de la interacción directa entre las DC y las células B. Las células T promueven a través de los marcadores CD40 y CD70 la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células B, haciéndolas capaces de aumentar su producción de IgG, IgA e IgM. En presencia de IL-12 e IL-10, se polariza esta producción de Ab por las células B de memoria ya sea a IgM o IgA respectivamente⁵.

1.4. PIEL

La piel, recubre toda la superficie externa del organismo, se encuentra unida a las mucosas por estrechas zonas de transición, (zonas mucocutáneas) y lleva a cabo importantes funciones. Además de ser un extenso órgano sensorial capaz de absorber y secretar, conforma una barrera contra la invasión de microorganismos y confiere protección contra acciones mecánicas, compuestos químicos, calor, frío y radiaciones. También tiene gran importancia en la regulación del calor y el mantenimiento del equilibrio hídrico. Representa un importante eslabón en la defensa inmunológica.

Por su estructura, la piel se compone de dos capas: La capa externa o epidermis y la subyacente o dermis (también denominada corion). Las dos capas forman una masa compacta que descansa sobre una capa subyacente de tejido conectivo, más laxo, el tejido celular subcutáneo, que a menudo es más rico en lípidos. Se asocian a la piel distintas estructuras de origen epidérmico, como pelo, uñas, glándulas sebáceas y sudoríparas.

1.4.1. Epidermis

La epidermis está compuesta por un tejido epitelial plano estratificado, cuya función principal es proteger contra acciones lesivas del medio y contra la pérdida de líquidos. Para ello la epidermis cuenta con el *estrato córneo*, una membrana externa protectora compuesta por células aplanadas muertas que contienen el complejo proteico de la queratina, cementado

mediante lípidos intercelulares. En condiciones normales, el estrato córneo se elimina con velocidad constante y se forma al mismo ritmo por proliferación y diferenciación de las células de la porción más profunda del epitelio. En cortes diagonales a la superficie se observan diferentes capas de la epidermis a partir del límite dérmico⁷¹:

El *estrato basal*, compuesto de una capa de células cilíndricas o cúbicas, relacionadas entre sí mediante desmosomas y ancladas a la membrana basal subyacente mediante hemidesmosomas, de núcleo oval en muesca limitado por un anillo de heterocromatina, con uno o dos nucleolos y citoplasma basófilo con tonofibrillas. En este estrato se observa mucha actividad mitótica, una parte menor de las células basales hijas actúa como células madre, pero la mayoría abandonan la capa basal y comienzan la diferenciación, que tiene lugar durante la migración a través de la epidermis, la modificación morfológica y bioquímica y la finalización por eliminación de células muertas queratinizadas en la capa superior; por todo esto a esta capa también se le da el nombre de estrato germinativo.

El *estrato espinoso*, donde las células adoptan forma poligonal, con ligero aplanamiento horizontal en la parte superior de la capa, separadas entre sí por una angosta hendidura con puentes intercelulares que semejan espinas, tienen núcleos redondos de ubicación central y citoplasma de moderada basofilia con mayor contenido de tonofibrillas, éste y el estrato germinativo son considerados en conjunto la capa de Malpighi, sitio donde se encuentran los melanocitos, las LC y de Merkel⁷².

El *estrato gránuloso*, compuesto de células aplanadas que han dejado de producir queratina e involucrina (del plasmalema de células espinosas), con un citoplasma que posee gránulos muy basófilos de queratohialina y profilagrina rica en azufre y cuyos núcleos, mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas y aparato de Golgi comienzan a degenerar en las células externas por liberación enzimática lisosómica que los degrada, desapareciendo en el siguiente estrato, el *estrato lúcido*, compuesto de células aplanadas, densamente empaquetadas, que sólo muestran el contorno del núcleo al estar aisladas, este estrato no se visualiza en la piel fina.

El *estrato córneo*, compuesto de numerosas células planas totalmente queratinizadas enucleadas, por lo que se distingue como una capa gruesa eosinofílica de láminas ondeadas en la que no se diferencian células. En la superficie tiene lugar una continua descamación de las células córneas, separadas entre sí, las cuales conforman el *estrato disyunto*.

Los considerados no queratinocitos o células de la epidermis que no sufren queratinización y simultáneo desplazamiento hacia arriba o diferenciación son:

- o Melanocitos, células redondas acumuladas mayormente en zonas más pigmentadas como la cara y los órganos genitales, con prolongaciones ramificadas y gránulos pardo-amarillos por la melanina que producen.

- Células de Merkel, aún cuando se han sugerido en relación estrecha con los queratinocitos, son consideradas de tipo independiente, con función de mecanorreceptores.
- Las LC, son APC y representan uno de los principales componentes de la defensa cutánea. Pueden aparecer en todas las capas de la epidermis pero como ya se explicó, en el estrato espinoso se ven con mayor frecuencia⁷¹.

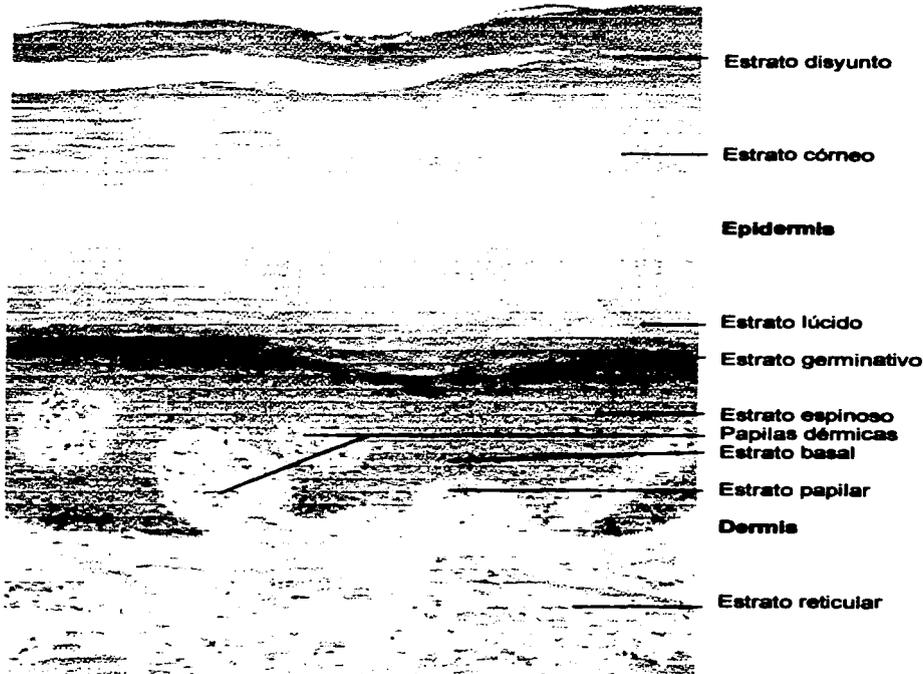


Figura 14. Piel gruesa de la planta del pie. Se observan las diferentes capas de la epidermis, así como las capas papilar y reticular de la dermis. El término piel gruesa hace referencia únicamente al grosor de la epidermis. H & F. x 220. Tomado de *Geneser, Histología, 2001*⁷¹.

1.4.2. Dermis

La dermis es la gruesa capa de tejido conectivo a la que se fija la epidermis y continúa en profundidad con el tejido subcutáneo rico en lípidos. En el tejido dérmico se insertan los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas y sebáceas.

La dermis se compone de dos capas no muy diferenciadas, hacia arriba por el estrato papilar, más delgado, compuesto de tejido conectivo bastante laxo con delgadas fibras de colágeno; por debajo el estrato reticular, más grueso, con gruesas fibras de colágeno dispuestas en grandes haces y abundantes fibras elásticas.

Las células que se encuentran con mayor frecuencia son fibroblastos y macrófagos, pero también hay gran cantidad de mastocitos y DC dérmicas (intersticiales).

Por la observación de cortes de piel para la observación en microscopio óptico, se distingue la transición entre la epidermis y la dermis como una línea limitante ondulada irregular, debido a las crestas y procesos papilares que la epidermis emite hacia la dermis subyacente, ésta última se prolonga hacia arriba entre las papilas y las crestas con invaginaciones vascularizadas de tejido conectivo, llamadas papilas, que reciben asas capilares nutridas del torrente sanguíneo de las arterias conectadas a la red cutánea, paralela a la superficie de la piel⁵².

1.4.3. Sistema inmune cutáneo

Claramente, los epitelios no son sólo barreras físicas, son además activos participantes en la defensa del organismo con sensores, circuitos de señalamiento y moléculas efectoras que coordinan y ejecutan reacciones graduales contra los microbios, siendo la piel el mejor representante⁵⁷. El epitelio como barrera de defensa que previene la penetración microbiana debe su importancia a sus funciones siempre coexistentes de barrera mecánica, de absorción y de arrastre físico por la secreción. Una vez que el epitelio es dañado por una herida o infección, las células inician una respuesta inflamatoria emitiendo señales de quimiotaxis que atraen otras células de la sangre.

En un principio, la habilidad de secretar sustancias antimicrobianas en saliva, lágrimas y secreciones respiratorias fue sólo atribuida a las glándulas secretoras (que generan una compleja mezcla de lisozima con lactoferrina, lactoperoxidasa, inhibidor de leucoproteasa secretora, fosfolipasa A2 y defensinas), sin embargo, actualmente se sabe que el epitelio con funciones de barrera y absorción produce también sustancias como la β -defensinas y catelicidinas⁷³.

Actualmente se considera que el órgano de mayor tamaño con la función de barrera es la piel, la cual además tiene la función de defensa inmunológica⁵⁷. En los últimos años se ha demostrado que la piel representa una parte muy amplia e importante de las defensas del organismo, lo cual se debe interpretar desde el punto de vista de su constante exposición a Ag provenientes de parásitos, hongos, levaduras, bacterias, virus y otros derivados del ambiente como plantas y compuestos químicos. Varios modelos se han propuesto para otorgar un lugar

especial a la piel dentro del Sistema Inmune. El primero propone un sistema denominado tejido linfoide asociado a la piel (SALT), compuesto de LC epidérmicas, queratinocitos, células dérmicas endoteliales y los ganglios linfáticos regionales. También se encuentra el conocido desde 1986 sistema inmune de la piel (SIS), que incluye la complejidad de la respuesta inmune asociada a elementos tanto humorales como celulares, por lo que abarca entre otros al modelo SALT⁷⁴.

Una característica principal de SIS es la presencia de LC, una población de DC con características de APC profesionales que activan excepcionalmente a los linfocitos, células efectoras del Sistema Inmune. Se considera que la cantidad total de LC en la epidermis ronda los mil millones en humano, conformando sólo el 1% de células, con un recambio diario de unos 45 millones⁵ y, si bien los linfocitos parecen ser escasos, la cantidad total en la epidermis es equivalente a la que se encuentra en la sangre circulante ($1.3-2.5 \times 10^4 / \text{cm}^2$)⁵⁷. Es aún más sorprendente la demostración de que también los queratinocitos, las células más numerosas en la epidermis, intervienen en la defensa ya que además de sintetizar citocinas, éstos pueden presentar Ag en el contexto de MHC-I y MHC-II, cuya expresión se induce por IFN- γ producido por células NK o por linfocitos Th1 activados. Sometidos a ciertas condiciones, por ejemplo de inflamación, los queratinocitos son capaces de fagocitar Ag, secretar IL-1, IFN, factores crecimiento, TNF- α y otras sustancias que estimulan la maduración de linfocitos Th⁷⁴.

También dentro del SIS están las DC dérmicas (DDC), estudiadas hasta ahora principalmente en piel humana. Las DDC expresan factor XIIIa, altos niveles de HLA-DR y HLA-DQ, CD1c, CD32, distintas moléculas de adhesión y de coestimulación como CD80, CD86 y CD83. Aproximadamente el 80% expresa los marcadores mieloides CD13 y CD33. De manera interesante, se ha distinguido 10-15% de la población total por la expresión de CD14 o de CD1a, sugiriendo que estas subpoblaciones podrían representar precursores de las LC epidérmicas. En la dermis murina también existen dos poblaciones de DDC, que se distinguen por la expresión diferencial de C11b, ambos grupos expresan CD45 y moléculas del MHC-II, sólo algunas expresan CD205 y su localización se limita a las regiones perivasculares, como componentes de la unidad microvascular de la dermis. Funcionalmente las DDC son tan potentes como las LC para estimular la reacción leucocitaria mixta (MLR) alogénica y se ha demostrado que están implicadas en las reacciones de hipersensibilidad por contacto.

Canny *et al.* demostraron que también algunas líneas celulares epiteliales apropiadamente estimuladas expresan sobre su membrana la proteína bactericida incrementadora de permeabilidad (BPIP). Esta proteína puede unirse al LPS constituyente de la membrana de las bacterias Gram negativas, por lo que es conocida como un antimicrobiano de leucocitos polimorfonucleares que permite además mantener en balance las reacciones de inflamación por

LPS, ya que compite por éste con la proteína LBP del plasma, que libera al LPS a receptores específicos como CD14/TLR4 de macrófagos y otras células de defensa del hospedero que desencadenan respuestas inflamatorias de alta sensibilidad⁷⁵.

Además de las LC en la epidermis del ratón adulto, las células T dendríticas epidérmicas (DETC) también expresan el marcador leucocitario común CD45, que denota su origen hematopoyético, estas últimas forman parte de los linfocitos T $\gamma\delta$ intraepiteliales. Aunque las LC y las DETC presentan una morfología dendrítica característica en el ratón, sus fenotipos son altamente distintivos y el papel que desempeñan en este epitelio es también diferente. A pesar de que las DETC se encuentran en estrecho contacto con las LC *in situ*, no se sabe si se comunican y afectan entre sí⁵⁴. Sólo el equipo de Takashima, utilizando líneas celulares de LC y DETC, encontró que los linfocitos T $\gamma\delta$ producen GM-CSF y CSF-1, citocinas importantes para las LC, y que el cocultivo de las dos líneas aumenta la capacidad de las DETC para responder a ciertos factores de crecimiento. A diferencia de las LC, las DETC son MHC-II⁺, pero expresan los marcadores Thy-1, asGM-1, CD3 y receptor de T $\gamma\delta$. Por el análisis estructural se ha observado que no poseen BG aunque es evidente la presencia de gránulos con gran actividad de arilsulfatasa. Al igual que las LC, se localizan en la capa suprabasal de la epidermis, en una densidad que varía mucho entre las distintas cepas de ratones⁵⁶.

1.5. INMUNIDAD A TEMPRANA EDAD

Distintos componentes del Sistema Inmune parecen ser menos eficientes en niños recién nacidos. Los patrones que siguen las infecciones virales en ellos, sugieren respuestas disparas de las células T que no permiten la adecuada defensa, además, factores como las reservas disminuidas de la médula ósea, la reducida adherencia/quimiotaxis y la baja actividad enzimática y señalización de los neutrófilos neonatales, contribuyen al riesgo de la rápida diseminación de cualquier infección en el recién nacido. Otras limitaciones ocurren a nivel de monocitos y macrófagos, el sistema complemento y la citotoxicidad del Tc activado, la cual se mantiene debajo de los niveles del adulto aún después de la inducción con IL-12/IL-15 exógena.

Se ha demostrado *in vitro*, que la mayoría de las células T CD4⁺/CD8⁺ de CB presentan el fenotipo CD45RA⁺⁷⁶, cuando en PBMC del adulto en condiciones normales, dicho fenotipo se presenta en igual número al fenotipo de células maduras CD45RO⁺. El CD40L, que es un marcador de activación, también se ha encontrado reducido en la célula T del neonato⁷⁷. Las respuestas normales a aloantígenos y la proliferación y producción de citocinas por la estimulación de CD28 en el linfocito T, indican que las células T neonatales tienen capacidades normales pero alteradas, como se aprecia por ejemplo, a nivel de transcripción de M-CSF y GM-

CSF, IL-12 e IL-15 en células T, donde la vida media del mRNA es más corta⁷⁸. Por otro lado, si su diferenciación se lleva a cabo vía Th2 o Th1 no ha sido definido todavía, sobretodo por que no se conoce con exactitud la capacidad de producir y responder a las citocinas en la etapa neonatal⁷⁹.

Además de la inmadurez fenotípica y funcional de los linfocitos T en CB, se ha encontrado que las DC de CB parecen ser menos efectivas en inducir la proliferación de linfocitos T en respuesta al estímulo antigénico, comparadas con las DC de PBMC del adulto. Esto se asocia a la reducida expresión de moléculas HLA, de coestimulación/adhesión y de marcadores de activación. Otro factor que podría representar una deficiencia de las DC inmaduras es su capacidad de responder a algunas citocinas, lo cual tiene importantes implicaciones en la respuesta inmune de niños pequeños y recién nacidos, en el caso de infecciones o inmunizaciones. Estas características hacen a la CB una mejor fuente de trasplante alogénico, al tener disminuida su capacidad de originar la enfermedad de injerto contra huésped en personas que requieren trasplante de médula ósea².

Se sabe que los niños no responden a ciertos polisacáridos capsulares bacterianos antes de tener dos años de edad, lo cual crea una ventana de susceptibilidad a infecciones cuando los Ab maternos protectores desaparecen. En adultos, el componente del complemento C3d puede asociarse con polisacáridos de pneumococos y unirse al receptor de complemento CR2 sobre las células B. En recién nacidos, los niveles reducidos de CD21 y la actividad de complemento baja resultan en la falta de sinergismo CD21/BCR, contribuyendo además con la activación defectuosa de células B⁸⁰.

El inmunizar mujeres embarazadas con el fin de transferir Ab protectores trasplacentarios a los niños puede tener varias ventajas: las respuestas de la madre son normales, algunas vacunas inactivadas (toxide tetánico, p. ej) son seguras para ella y la transferencia de IgG (mediada por un receptor Fc del intestino del niño o en placenta) es eficiente. Sin embargo, la inmunización materna puede también inhibir las respuestas del niño debido a una gran cantidad de factores, como los niveles de Ab de la madre, especificidad de los epítopes utilizados en la vacuna, su dosis, su vía de administración y el tipo de Ag. La inmunogenicidad de las vacunas en recién nacidos y niños pequeños surge como un importante factor para la protección a temprana edad⁸⁰.

2. JUSTIFICACIÓN

La supervivencia de un individuo en un ambiente diverso depende de que el Sistema Inmune decida acertadamente cuándo responder y cuándo no actuar (activación contra tolerancia). Además, si se inicia una respuesta inmune, ésta debe ser la adecuada, es decir, la activación de los mecanismos efectores precisos estará meticulosamente regulada.

Durante la última década se ha generado evidencia acerca de la incapacidad de los linfocitos T y B para realizar estas decisiones. Sin embargo, también se ha comprobado que células representantes del sistema inmune innato pueden discriminar entre los diversos retos antigénicos y dirigir la respuesta inmune adaptativa posterior.

Las DC son APC profesionales únicas por su morfología y movilidad, que en su estado inmaduro poseen una gran capacidad de captura antigénica. Se localizan en sitios frontera con el medio ambiente (piel, otros epitelios y mucosas), siendo sus principales representantes: las LC. Las LC poseen PRR que al interactuar con sus ligandos dirigen distintas señales que conducen a coestimulación y síntesis de citocinas entre otros, promoviendo la migración y maduración de la DC y posiblemente el inicio de una respuesta Ag-específica.

El periodo neonatal se ha asociado con una pobre respuesta a algunos Ag, lo que pudiera relacionarse a la inmadurez de distintos componentes del Sistema Inmune. Aunque se han analizado las respuestas de linfocitos T y B en la etapa neonatal, existen pocos reportes acerca de la ontogenia y funcionalidad de las LC en neonatos.

Se ha observado que las DC de CB estimulan débilmente la MLR y la proliferación clonal de los linfocitos T. También se ha visto que la capacidad endocítica de las DC obtenidas a partir de monocitos de CB está disminuida, esto concuerda con la baja expresión de MMR, MHC-II y CD1a en comparación con los niveles del adulto. Esto puede representar una deficiencia propia de las DC en proceso de maduración, pero tiene implicaciones importantes en el Sistema Inmune de niños pequeños y recién nacidos. Es por esto que el presente trabajo se enfoca a caracterizar algunos receptores endocíticos y PRR en LC de piel de ratón C57BL/8 neonato y adulto con la finalidad de conocer más sobre su expresión durante la ontogenia de las DC en las fases tempranas de la vida extrauterina del ratón.

3. OBJETIVO GENERAL

- **Estudiar la expresión de receptores endocíticos y de reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PRR) en las LC de ratones C57BL/6.**

4. OBJETIVOS PARTICULARES

- **Estudiar la expresión de receptores endocíticos y PRR como CD14 y CD204 en las células dendríticas epidérmicas, de ratones neonatos y adultos.**
- **Comparar la expresión de los marcadores clásicos de las LC (MHC-II, CD45 y CD205) en el periodo neonatal y en la vida adulta.**

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. ANIMALES

Se emplearon ratones singénicos de la cepa C57BL/6 de 0 y 90 días de edad. Se trabajaron al menos seis ratones por condición experimental, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándares en el bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Los ratones neonatos se sacrificaron utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal y los adultos por dislocación cervical. Se rasuró la zona abdominal, se obtuvo la piel, se quitó mecánicamente la grasa subcutánea para facilitar el procedimiento y la muestra se cortó en cuadros de aproximadamente 1 cm². Con la dermis orientada hacia abajo, se incubó la piel por dos horas a 37° C en ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M con pH 7.4 que facilita la separación de las uniones dependientes de calcio entre dermis y epidermis. Finalmente se separó la epidermis por tracción con ayuda de la parte posterior de una navaja de bisturí. Cada lámina epidérmica se lavó con solución salina isotónica (SSI, 0.9% NaCl /agua) y se fijó con acetona fría 20 minutos para realizar posteriormente el inmunomarcaje.

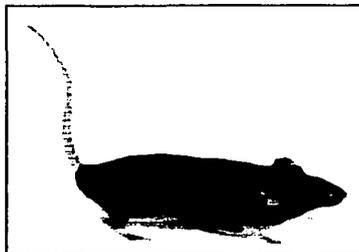


Figura 15. Ratón adulto de la cepa C57BL/6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2. INMUNOHISTOQUÍMICA

La epidermis extraída fue cortada en secciones de aproximadamente 5 mm², en estas se realizó el bloqueo de peroxidases endógenas con H₂O₂ al 6% en una mezcla de azida de sodio al 0.1% en PBS, incubando por dos horas a temperatura ambiente para evitar la interferencia de éstas en la reacción de revelado. Se realizó un segundo bloqueo pero esta vez de uniones inespecíficas, incubando por una hora a temperatura ambiente en suero de chivo al 1% en

albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS. Se incubaron los Ab primarios a 4° C por 12-14 horas, a la dilución apropiada en BSA 1%. Se utilizaron IgG de rata 1 µg/mL e IgG de rata biotinada 1 µg/mL como controles de isotipo. El exceso de Ab primario se eliminó lavando tres veces con BSA 0.2% en SSI. Se utilizaron sistemas de amplificación biotina-avidina, por lo que se requirió un segundo periodo de incubación de una hora a temperatura ambiente con Ab biotinados anti-IgG de rata a la dilución adecuada en BSA 1% (excepto para el Ab anti-CD45 biotinado). Se lavó con la solución de BSA 0.2% tres veces y finalmente se incubó por 45 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina peroxidada diluida en BSA 1%. Después de tres lavados con BSA 0.2% se procedió al revelado con diaminobencidina (Gibco)/H₂O₂. Generalmente la reacción se evidenciaba en 10 minutos, deteniéndose con agua destilada. Las preparaciones se montaron con resina Polymount (Polysciences) y finalmente se analizaron al microscopio.

Ab α-ratón	Conjugado con	Clona	Isotipo	Casa comercial
CD45	Biotina	30F11	RatIgG _{2b}	PharMingen
MHC-II	-	NIMR4CII	RatIgG _{1k}	Donación [†]
SR	-	2F8	RatIgG _{2b}	SEROTEC
CD14	-	mC5-3	RatIgG _{1k}	PharMingen
CD205	-	NLDC-145	RatIgG _{2b}	Donación [†]

[‡] Leopoldo Santos, CINVESTAV-IPN
[†] Ralph M Steinman, Rockefeller Univ.

Tabla 3. Ab monoclonales primarios utilizados en el análisis fenotípico de las DC epidérmicas murinas.

5.3. CÁLCULO DE LA DENSIDAD CELULAR

Se contó el número de células en al menos 10 campos por muestra, con el número obtenido se aplicó la siguiente fórmula para obtener la densidad celular por mm² (D. C.):

$$D. C. = \frac{1 \times 10^6 \times \text{Número de células positivas}}{A}$$

1x 10⁶ es un factor de conversión y A es el área del campo ocular, la cual se obtiene de las siguientes formulas:

$$A = \pi r^2 = \pi [D/2]^2$$

$$D = \frac{\text{Cifra del campo ocular}}{\text{Aumento utilizado}}$$

Donde r es el radio del campo ocular y D es el diámetro (dados en µ), los aumentos utilizados en la cuantificación fueron 20x ó 40x y la cifra del campo ocular utilizado, constante para el microscopio utilizado, es de 18 mm.

5.4. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los valores están expresados como la media +/- la desviación estándar de los resultados.

6. RESULTADOS

En este trabajo experimental se llevó a cabo el marcaje de DC de epidermis de ratón C57BL/6 neonato y adulto con 5 Ab distintos, dirigidos a las moléculas MHC-II, CD45, CD14, CD204 y CD205. Se realizaron al menos tres experimentos, integrado cada uno de al menos tres ratones.

Los resultados obtenidos de la cuantificación de las células positivas para estos marcadores en el neonato, así como la densidad celular obtenida para cada uno de estos se enlistan a continuación:

CD45 (40x)		CII (20x)		CD14 (20x)		SR (20x)	
Cel/ campo	D. C. (Cel/mm ²)						
148	931	39	61	87	137	72	113
138	868	27	42	63	99	75	118
145	912	26	41	79	124	68	104
166	1044	39	61	83	130	64	101
143	899	56	88	82	129	76	119
147	924	56	88	78	123	73	115
182	1144	40	63	88	138	88	138
167	1050	22	35	92	145	83	130
172	1081	37	58	76	119	54	85
136	855	46	72	86	135	70	110
94	591	118	185	85	134	76	119
104	654	58	91	73	115	53	83
113	710	73	115	95	149	58	91
106	666	49	77	75	118	82	129
110	692	53	83	89	140	78	123
129	811	50	79	78	123	66	104
116	729	69	108	68	107	53	83
132	830	59	93	72	113	72	113
140	880	44	69	84	132	88	138
110	692	100	157	110	173	68	107

Tabla 4. Resultados de la cuantificación de células que expresaron CD45, MHC-II, CD204, CD14 y CD205 en la epidermis del ratón C57BL/6 neonato. Número de células positivas por campo y densidad celular (cels./mm²)

Como es bien sabido, las LC epidérmicas de los ratones adultos sanos, expresan MHC-II, CD205 y CD45. Sin embargo, al buscar células positivas para estos marcadores en la epidermis de ratones neonatos, se encontró que la densidad de células que expresan MHC-II es muy baja y no se encontraron células CD205⁺. Al realizar el inmunomarcaje utilizando el Ab anti-CD45 se observó un gran número de células de morfología dendrítica que expresaban este marcador, su densidad es prácticamente la misma que en los animales adultos. Esto sugiere que la epidermis de ratones de 0 días de edad, es decir, recién nacidos, ya está colonizada por células dendríticas que representan probablemente precursores de LC o LC de fenotipo inmaduro, ya que expresan CD45⁺ pero no CD205 y sólo un 10% de células son MHC-II⁺.

Al estudiar la expresión de CD14 y CD204, receptores que participan en endocitosis, se encontró que en el neonato hay una población de DC que expresan estos marcadores, a diferencia del adulto, en que ambos receptores están totalmente ausentes.

MARCADORES	NEONATOS (0 DÍAS)	ADULTOS (90 DÍAS)
CD45	+	+
MHC-II	escasas	+
CD204	+	-
CD14	+	-
CD205	-	+

Tabla 5. Expresión de CD45, MHC-II, SR, CD14 y CD205 en ratón C57BL/6 neonato y adulto.

La siguiente tabla muestra los resultados del promedio de tres experimentos diferentes como la densidad celular promedio \pm la desviación estándar:

Marcador estudiado (cels./mm ²)	EDAD (días)	
	0	90
CD45	848 \pm 156	972 \pm 210
MHC-II	83 \pm 37	837 \pm 155
CD205	0 \pm 0	698 \pm 89
CD14	129 \pm 16	0 \pm 0
CD204	111 \pm 17	0 \pm 0

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 6. Promedio de la densidad celular de CD45, MHC-II, CD204, CD14 y CD205 en ratón C57BL/6 neonato y adulto \pm la desviación estándar.

A continuación se presentan los mismos resultados de manera gráfica, donde se puede apreciar la expresión diferencial de estos receptores en los animales adultos y neonatos:

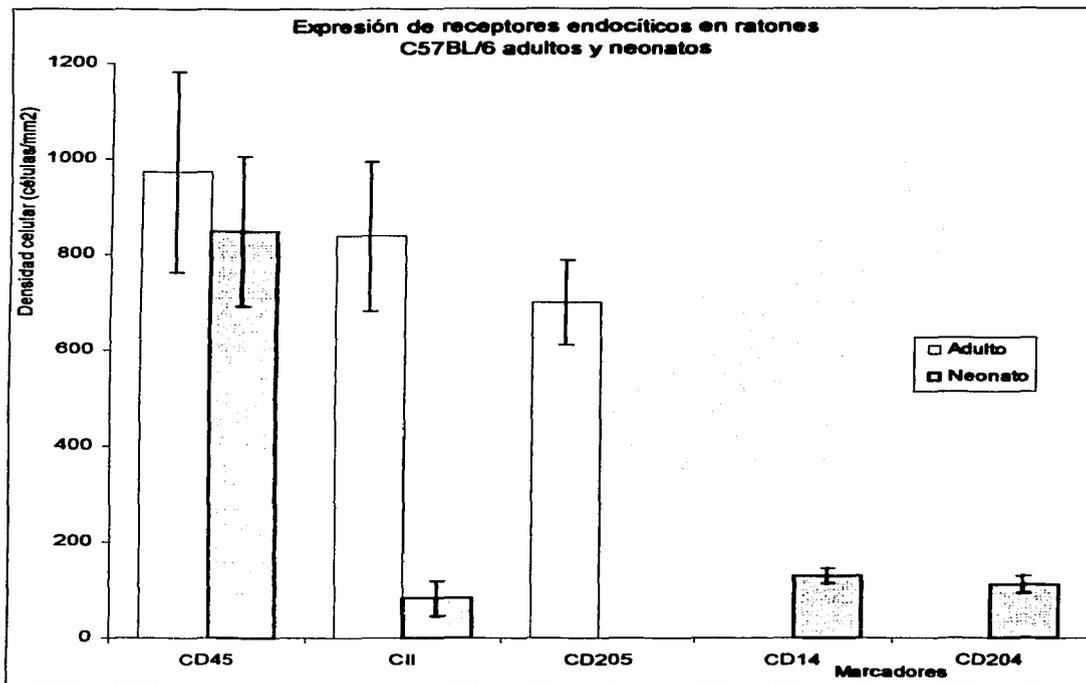


Figura 16. Expresión diferencial de marcadores clásicos y receptores endocíticos en las LC de ratones C57BL/6 adultos y neonatos. Los resultados se muestran como el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



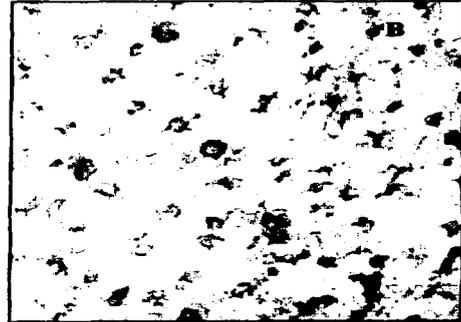
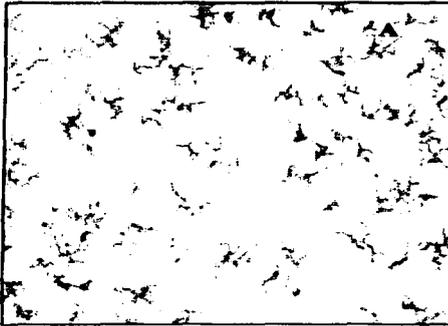
Fig 17. Comparación de la expresión de los marcadores clásicos de LC: MHC-II (A y B) y CD205 (C y D) en ratones C57BL/6 adultos y neonatos. Las LC en la epidermis del ratón adulto expresan MHC-II y CD205, mientras que en la epidermis del neonato pudieron observarse escasas células MHC-II fuertemente teñidas, pero CD205 estuvo totalmente ausente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

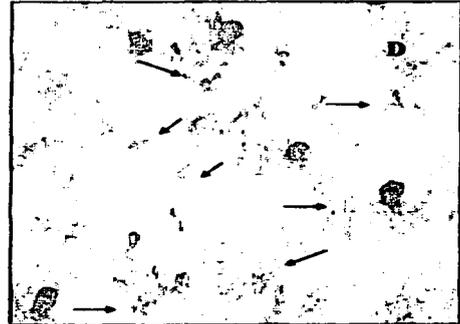
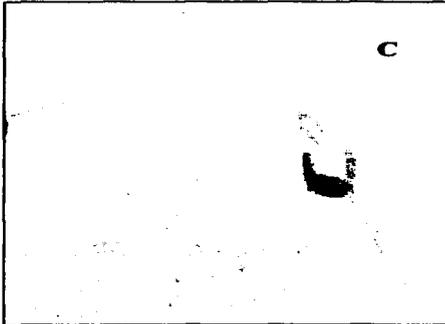
ADULTO

NEONATO

CD45



SR



CD14

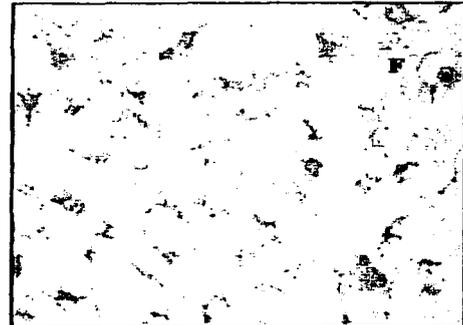
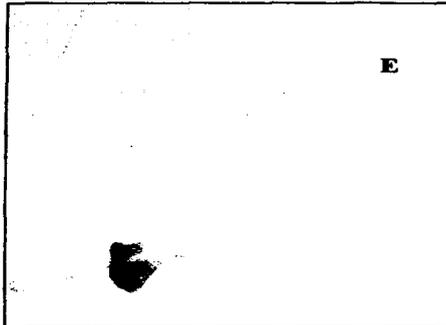


Fig 18. Expresión de receptores endocíticos en las LC epidérmicas de ratones C57BL/6 adultos y neonatos. La epidermis de los animales neonatos cuenta ya con DC CD45⁺ en densidad muy similar a los ratones adultos. Sin embargo, a diferencia de las LC clásicas del adulto, ellas expresan CD14 y SR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

La epidermis del ratón adulto contiene dos poblaciones de células con morfología dendrítica y derivadas de médula ósea: las LC (ATPasa⁺, Thy-1⁻, CD3⁻), representantes de las DC clásicas, y las DETC (ATPasa⁻, Thy-1⁺, CD3⁺), integrantes de los linfocitos Ty5 intraepiteliales, ambas comparten el marcador CD45, que denota su origen hematopoyético⁶¹. Las LC son un subgrupo de DC no linfoides localizadas en la epidermis, que presentan la molécula E-cadherina y los GB asociados recientemente a la molécula Langerina⁵⁶. En piel sana son el único tipo celular que expresa moléculas MHC-II y CD205.

Las LC son una población de DC localizadas en la capa basal y suprabasal de la epidermis, especializadas en el reconocimiento y la captura antigénica con la capacidad de migrar, madurar y presentar Ag a los linfocitos T, estimulando así a la respuesta inmune adaptativa. De ahí que sean reconocidas como los principales centinelas del Sistema Inmune. Estas células derivan de médula ósea, sin embargo, no se conoce cuándo ni bajo qué señales las LC o sus precursores llegan por primera vez a la epidermis.

En análisis previos se ha demostrado que al día 17 de gestación, la etapa más temprana en que pueden separarse láminas epidérmicas, la epidermis está ya colonizada por células CD45⁺. En esta etapa tan temprana pueden también distinguirse ya dos poblaciones distintas: una que expresa la enzima ADPasa y otra que es Thy1⁺, sin embargo, otros de los marcadores no se expresan aún⁶¹.

En el presente trabajo se analizó la expresión de algunos receptores endocíticos pertenecientes a la familia de los PRR (SR, CD14 y CD205), en LC de la epidermis de ratones C57BL/6 neonatos y adultos. Además se estudió la expresión de marcadores clásicos de las LC (MHC-II, CD205, CD45) en el neonato para su comparación con el adulto. De manera general, los datos presentados se toman relevantes porque sugieren distintos mecanismos de diferenciación de las LC.

En concordancia con lo previamente observado, el marcador que se encontró más tempranamente en este trabajo fue CD45^{61, 61}. La densidad celular encontrada en el neonato fue de 848 ± 156 células/mm², que es muy similar a los niveles del adulto (972 ± 210 células/mm²).

Se sabe que CD45 se expresa en todas las células de origen hematopoyético, por lo que el resultado de su expresión no es inesperado, sin embargo, debido a que esta molécula no ha sido completamente definida, su función en las diferentes células aún no ha sido aclarada completamente. Se sabe que dicha proteína tiene actividad de fosfatasa de fosfotirosina, con la importante función de regular muchas señales de transducción que dirigen las funciones de las células del Sistema Inmune. En los linfocitos, CD45 regula positivamente la señal

desencadenada de la presentación antigénica en los receptores de los linfocitos T y B. También participa en la señalización involucrada en la diferenciación intratímica de algunas poblaciones de células T⁶⁰. Otra función conocida de la proteína CD45 es la regulación negativa mediante la defosforilación de residuos de tirosina de las proteínas pertenecientes a la familia *src* de las tirosin-cinases. Es por ello que controla la adhesión mediada por integrinas (por ejemplo CD11 y CD18) involucradas en la migración transendotelial y en la permanencia de ciertas células en los sitios de inflamación por la interacción con algunos componentes de la matriz extracelular⁶⁰.

En el contexto de las LC se desconoce en qué interviene CD45, sin embargo, se ha visto que las LC aisladas expresan los epítopes comunes de CD45, pero son RA'RB'RC' y que las LC obtenidas de piel de pacientes con dermatitis atópica expresan constitutivamente CD45RB. Al parecer, la expresión de las diferentes isoformas de CD45 está regulada por señales locales de inflamación, sin embargo, hacen falta datos para comprender la función que tiene CD45 en las LC. Cuando se estudió la expresión de MHC-II y CD205 en las LC del ratón C57BL/6 neonato, se encontraron escasas células MHC-II⁺ y el receptor CD205 fue totalmente negativo. Esto indica que aunque la epidermis del ratón neonato posee ya LC o sus precursores, éstas portan un repertorio molecular distinto al de las LC del adulto. La repercusión de estos hallazgos en el entendimiento del sistema inmune neonatal es trascendente, tomando en cuenta que las LC son las mejores APC conocidas hoy en día. Estos datos concuerdan con lo encontrado anteriormente en ratones BALB/c⁶¹.

Las moléculas MHC-II son necesarias para la presentación de péptidos derivados de antígenos exógenos a linfocitos T CD4. Sería importante conocer si la expresión limitada de estas moléculas en el neonato obstaculiza la tarea final de las LC que es precisamente la de presentar Ag.

Por otro lado, CD205, es un receptor que ha sido involucrado en la endocitosis de Ag de naturaleza sacárida, perteneciente a la familia de lectinas tipo C, al igual que el MMR⁶². Aunque posee diez dominios de reconocimiento de CHO, sus ligandos se desconocen. Su función se ha estudiado utilizando Ab de conejo específicos para CD205. En estos experimentos se observó que tras la incubación por 20 minutos a 37°C, los Ab marcados con oro coloidal se localizaban en compartimientos multivesiculares con alto contenido de MHC-II⁶³.

En este sistema experimental, estos anticuerpos de conejo anti-CD205 fueron presentados a hibridomas de linfocitos T específicos para Ig de conejo⁶³, 100 veces mejor que los controles de isotipo. Actualmente también se sabe que el dominio citoplásmico de CD205 posee 3 aminoácidos ácidos, que dirige a los ligandos a compartimientos especializados de procesamiento, mejorando por mucho la presentación antigénica. Por lo anterior, la carencia de

CD205 en las LC neonatales, podría imposibilitarlas para realizar algunas de sus funciones cruciales en cuanto a procesamiento antigénico.

En la periferia (epidermis), las LC se encuentran en un estado referido como inmunológicamente inmaduro, debido a su débil capacidad para estimular linfocitos T naive, comparadas con LC maduras. En esta etapa, las LC son altamente eficientes para capturar antígenos, encontrándose que endocitan efectivamente zimosán, manosa unida a BSA y manana-FITC, pinocitan HRP muy eficientemente, e incluso se ha demostrado que las fLC, son capaces de fagocitar además de levaduras y partículas de látex, bacterias intactas como *S. aureus* y *C. parvum*⁵⁵.

Las APC, incluyendo las LC, expresan moléculas en su superficie destinadas a reconocer ligandos microbianos muy conservados. Dichos receptores son los denominados PRR, que ahora se sabe, reconocen ligandos endógenos y exógenos, que los relaciona con homeostasis y también con las primeras líneas de defensa del organismo.

Cuando se analizó CD14 en la epidermis de ratones neonatos, se observó que hay una población de DC que lo expresan. Se sabe que CD14 se expresa sobretodo en la superficie de monocitos y débilmente en granulocitos, pero también se ha encontrado en macrófagos tisulares, células de hígado y células epiteliales CD14⁺ estimulados con LPS⁵⁴. La actividad del CD14 es la captura de endotoxina (LPS), algunos estudios sugieren que las formas solubles pueden actuar como una molécula de transferencia de lípidos en conjunto con la LBP. Cuando el LPS se une al CD14 de monocitos o neutrófilos, las células se activan y liberan citocinas como TNF y/o aumentan la expresión de moléculas accesorias (de adhesión y coestimulación)^{56, 54}.

La relación entre las DC y las células del linaje monocítico es todavía tema de debate. Aunque se ha encontrado que algunas LC y DDC pueden expresar marcadores mielomonocíticos como CD14, no se ha encontrado que las DC de sitios diferentes a la dermis sean positivas a éstos⁵⁵. Mohamadzadeh *et al.* han observado que cultivos de monocitos (>98% CD14⁺) con GM-CSF e IL-15, generan células que pierden el marcador CD14, con características típicas de LC (CCR6, Langerina, E-cadherina, CD1a) y poseen la capacidad de madurar en respuesta a estímulos inductores (LPS o CD40L). Por el contrario, utilizando Ab anti IL-15 han descrito que dicha diferenciación se ve bloqueada significativamente. Basados en otros estudios que indican que los queratinocitos son capaces de producir las citocinas que parecen estimular la diferenciación de monocitos a DC, este grupo señala que la diferenciación de las LC a partir de monocitos posiblemente se lleve a cabo en la misma epidermis⁵². Además de las DDC (CD14⁺ CD1a⁻), Nestlé *et al.* han encontrado en la dermis humana otros dos fenotipos de células de morfología dendrítica que los hacen suponer que se trata de células en proceso de maduración a LC migrando hacia la capa suprabasal de la epidermis: las células

CD1a⁺ CD14⁻, con baja capacidad de adhesión, pero capaces de madurar a células inmunoestimuladoras con características de LC y las células CD1a⁻ CD14⁺, con fuerte capacidad de adhesión y baja actividad inmunoestimuladora⁶⁵.

Estos resultados pueden sugerir que las LC neonatales que expresan CD14 representan células en proceso de maduración, ya que las LC de la etapa adulta no presentan este marcador. Sin embargo, son pocas las evidencias que apoyan que la expresión de CD14 se deba a la presencia de precursores monocíticos en proceso de maduración o diferenciación a LC en la misma epidermis.

La familia de los receptores *scavenger* (SR) incluye un amplio rango de moléculas endocíticas importantes en la deposición patológica del colesterol a través de la captura de lipoproteínas de baja densidad (LDL) mediada por receptor, y en el reconocimiento y eliminación de microorganismos patógenos⁶⁴. El CD204 o SR recientemente se ha considerado un marcador de diferenciación de macrófagos porque presentan SR clase A tipo I (SRA-I) y SRA-II, miembros clásicos de la familia SR con un dominio de colágeno de unión a ligando⁶⁶ que les da la capacidad de reconocer diversas moléculas, como las formas acetiladas y oxidadas de LDL, polirribonucleótidos (poli G y poli I), productos terminales de glicosilación y lípidos superficiales como LPS y ácido lipoteicoico. A CD204 (SRA-I) se le atribuyen funciones adhesión y de endocitosis y fagocitosis de componentes modificados del hospedero y de ligandos exógenos, sin embargo, la vía de señalización que induce ha sido poco definida⁶³.

Muy recientemente, SRA se ha asociado con la capacidad única de las DC para capturar Ag de células vivas (proceso denominado *nibbling*) y presentarlo en el contexto de MHC-I (*cross-presentation* o *cross-priming*). Este nuevo mecanismo de captura y presentación antigénica es de gran importancia en la generación de inmunidad y en el mantenimiento de tolerancia periférica *in vivo*⁶⁸.

Diversos estudios señalan que una vez que se ha disociado del Ag en los compartimientos endosomales de pH ácido, el CD204 se transporta a la superficie en endosomas mediante mecanismos especiales⁶⁷.

Al igual que el receptor CD14, en el presente trabajo se observó que las LC de los ratones C57BL/6 neonatos presentan el marcador CD204, contrario a las de adultos, donde no se observa su expresión. La presencia de CD14 y CD204 en el neonato podría señalar un mecanismo de defensa inmune parcial, sin embargo, esto plantearía nuevas interrogantes sobre las razones que podrían llevar a la pérdida de dichos marcadores y con esto, la pérdida en pocos días de las importantes funciones de estos receptores. Probablemente éstas células representan precursores de las LC que después de cierto tiempo cambien su repertorio molecular y se conviertan en las LC clásicas (MHC-II⁺, CD205⁺, CD204⁻, CD14⁻). Nuevamente,

estudios más extensos que incluyan la realización de dobles marcajes, de irradiación y transferencia, ayudarían en gran medida a obtener nuevas referencias sobre la ontogenia temprana de las LC.

El hecho de que sólo los ratones neonatos C57BL/6 muestren la expresión de CD14 y CD204 resulta muy interesante debido a que el estudio realizado anteriormente con ratones BALB/c muestra el mismo patrón de expresión: las LC de neonato son CD14⁺ y CD204⁺, en contraste con las LC de adulto que no presentan ninguno de estos dos marcadores pero sí MHCII y CD205⁹¹. Aunque no se hicieron dobles marcajes (CD14 y CD204) para afirmar que estas células representan una sola población, la densidad de células positivas para cada uno de estos marcadores es prácticamente la misma. Sin embargo, la densidad de células CD14⁺ y CD204⁺ en el ratón C57BL/6 neonato (129, 111 células/mm² respectivamente), es menor a la encontrada en la cepa BALB/C (524, 513 células/mm²). Otra diferencia notable entre ambas cepas, es que la intensidad de la marca de estos mismos marcadores en la epidermis del ratón neonato de la cepa C57BL/6, parece ser mucho menor, ya que se observa tenue, a diferencia del marcaje en las LC del ratón neonato de la cepa BALB/C donde la marca se distribuye uniformemente sobre el cuerpo celular (resultados no mostrados). A pesar de estas diferencias, los resultados encontrados para ambas cepas señalan que el fenotipo CD14⁺, CD204⁺, CD45⁺, CD205⁺, pudiera representar un fenotipo inmaduro de las LC neonatales en comparación con las LC del ratón adulto. Sería importante conocer si esta población corresponde a los precursores de las LC maduras MHCII⁺, CD205⁺ y determinar su capacidad funcional. Los resultados de este trabajo señalan la posibilidad de que en diferentes etapas de la ontogenia, los precursores de LC adquieran diversos determinantes de superficie, de una manera muy regulada en el tiempo.

Actualmente existen reportes que evidencian algunas de las diferencias entre las distintas cepas de ratones, proporcionando una herramienta básica para el estudio de respuestas efectivas en el desarrollo de distintas patologías. De manera general, se ha encontrado que los ratones C57BL/6 son resistentes a ciertas infecciones, por ejemplo, la causada por *Leishmania major*, mientras que la cepa BALB/c es susceptible. Esto correlaciona con la inducción de respuestas específicas Th1 o Th2, respectivamente. Los mecanismos exactos involucrados en la polarización de la respuesta se desconocen, sin embargo, se ha visto que las citocinas sintetizadas en etapas tempranas de la infección son cruciales en el desarrollo de respuestas protectoras, el mismo patrón de susceptibilidad se observó con *L. monocitogenes*.

Liu y sus colaboradores observaron que las DC esplénicas CD11b^{low} y CD11c⁺ obtenidas del ratón C57BL/6, después de 3 y 6 horas de la infección con *Listeria monocitogenes*, expresan mayores niveles de RNAm para la proteína 40 (p40) de IL-12 que las del ratón BALB/C. El IFN- γ es producido en mayor cantidad por las células T esplénicas de C57BL/6 que por las de BALB/C

en respuesta al Ab monoclonal anti-TCR- $\alpha\beta$, mientras las células T esplénicas de BALB/C producen una mayor cantidad de IL-4 bajo estimulación del TCR $\alpha\beta$ que C57BL/6. También detectaron una mayor cantidad de RNAm para IL-15 y proteína intracelular IL-15 en las DC del ratón C57BL/6 que en BALB/C, 3 días después de la infección. Las células de bazo CD3⁺, IL2R β ⁺ están incrementadas en ratones C57BL/6 pero no en los ratones BALB/C en etapas tempranas de la infección. Además, la expresión del gen que codifica para IL12R β es mayor en las células T de C57BL/6 pero no en BALB/C. Estos resultados sugieren que la diferencia en la producción de IL-15 e IL-12 por las DC puede, al menos en parte, marcar la diferencia en la susceptibilidad a la infección por *Listeria monocitogenes* entre las cepas C57BL/6 y BALB/c⁸⁵.

Este mismo grupo estudió las diferencias en la expresión de TLR en bazo para ambas cepas de ratones, encontrando que las DC esplénicas del ratón C57BL/6 expresan preferentemente RNAm para TLR9, y que el ratón BALB/C expresa altos niveles de RNAm para TLR-2, -4, -5 y -6. Además, encontraron que C57BL/6 produce IL12 en respuesta a los ligandos de TLR4 (LPS), TLR2 (lipoproteínas) y TLR9 (CpG), mientras que BALB/C sólo responde a estos ligandos produciendo MCP-1. Las DC de C57BL/6 expresan también altos niveles de CD40 y Stat4, lo cual no se observa en BALB/C. Apoyados por estos resultados, Liu y su grupo sugieren que el ratón C57BL/6 *naive* contiene niveles mayores de poblaciones maduras de DC que BALB/C *naive* en las mismas condiciones⁸⁶. Los estudios aquí expuestos señalan la posibilidad de que las células del ratón BALB/c presenten capacidades distintas a las del ratón C57BL/6, que podrían estar relacionadas con un distinto nivel de maduración. Esto podría explicar de alguna manera las diferencias en la expresión de los marcadores CD14 y CD204 en ratones neonatos entre ambas cepas. El que ambos receptores se expresen en una población menor y con una marca más tenue en ratones C57BL/6, podría apoyar la idea de que las células CD14⁺ o CD204⁺ comienzan ya sea a migrar o a "madurar" fenotípicamente, proceso que parece ser más temprano en ratones C57BL/6 que en BALB/C.

Hacen falta muchos estudios para precisar la diversidad funcional de las LC en diferentes etapas ontogénicas y ayudar a entender el papel que tienen estas células en la epidermis así como los mecanismos que gobiernan su diferenciación.

8. CONCLUSIONES

- Las LC de la epidermis de ratones adultos C57BL/6 expresan CD45, MHC-II y CD205, fenotipo clásico de las LC.
- Aunque la epidermis de los animales neonatos posee ya el número de DC CD45⁺ equiparable al adulto, éstas no poseen CD205 y sólo algunas son MHC-II⁺.
- Existe una población de DC epidérmicas en el ratón neonato, que expresa CD14 y CD204 a diferencia del adulto, en el cual, ambos marcadores están ausentes.
- La densidad de células CD14 y CD204 en el neonato C57BL/6 (129, 111 células/mm² respectivamente), es mucho menor que la observada en el neonato BALB/C, contribuyendo con otra diferencia entre las dos cepas de ratones.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar dobles marcajes que permitan conocer si las LC que expresan CD14 y las CD204⁺ representan una sola población.
- Realizar ensayos que permitan conocer si los receptores CD14 y SR en las DC neonatales son funcionales.

https://doi.org/10.1016/j.procs.2017.05.005

PAGINACION

DISCONTINUA

APÉNDICE

- a) Solución salina fisiológica (SSI): Disolver 0.85 g de NaCl en agua destilada y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C por periodos prolongados.
- b) Albúmina sérica bovina (BSA), 0.2%: Disolver 1.0 g de BSA en 500 mL de SSI y filtrar por una membrana de 0.22 μ . Almacenar a 4°C por periodos cortos.
- c) BSA 1%: Disolver 0.5 g de BSA en PBS 1X y aforar a 50 ml, filtrar con una membrana de 0.22 μ , almacenar a 4°C por periodos cortos.
- d) PBS 1x: Pesar 1.74 g de KH₂PO₄, 4.25 g de Na₂HPO₄ y 5.97 g de NaCl, disolverlos en agua destilada y ajustar el pH entre 7.2 y 7.4, aforar a 1000 mL. Almacenar a temperatura ambiente o a 4°C por periodos prolongados.
- e) EDTA 0.5M: Pesar 46.52 g de EDTA sódico y disolverlo a una mezcla de 50 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH 0.5M, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 250 mL con agua destilada.
- f) Acetona: Usarla fría manteniéndose en el congelador.
- g) Azida de sodio 0.1%: Disolver 0.05 g de azida de sodio en agua destilada y aforar a 50 ml, almacenar a 4°C por periodos prolongados.
- h) Diaminobencidina (DAB): Pesar 0.001 g de DAB, mezclar con 2 ml de Tris 0.2 M pH 7.4 y 10 μ l H₂O₂ 30 %. Desechar después de usarse.
DAB (DAKO): diluir 10 μ L del reactivo de color en 1000 μ L de sustrato.
- i) H₂O₂ 6%: Mezclar 400 μ L de H₂O₂ al 30% con 1600 μ L de azida de sodio al 0.1%. Desechar después de usarse.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- ¹ Valladeau J, Duvert-Frances V, Pin J, Dezutter-Dambuyant C, Vincent C, Massacrier C, Vincent J, Koned K, Banchereau J, Caux C, Davoust J, Saeland S. The monoclonal antibody DCGM4 recognizes Langerin, a protein specific of LC's, and is rapidly internalized from the cell surface. *Eur J Immunol* 1999;29:2695-704.
- ² Petty RE, Hunt DWC. Neonatal dendritic cells. *Vaccine* 1998;16:1378-82.
- ³ Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunología*. 5ª ed. Madrid, España: Harcourt, 2000;1-10.
- ⁴ Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular*. 3ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana, 1999;4-5,132.
- ⁵ Caux C, Lebecque S, Liu Y-J, Banchereau J. Cap 5: Developmental pathways of human myeloid dendritic cells. En: *Dendritic cells biology and clinical applications*. Academic Press, 1999:63-92.
- ⁶ Banchereau J, Steiman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(19):245-52.
- ⁷ Hunt D, Huppertz H-I, Jiang H-J, Petty RE. Studies of human cord blood dendritic cells: Evidence for functional immaturity. *Blood* 1994;84(12):4333-43
- ⁸ Clark GJ, Angel N, Kato A, MacDonald K, Vuckovic S, Hart DNJ. The role of dendritic cells in the innate immune system. *Microbes and infection* 2000;2:257-272.
- ⁹ Medzhitov R, Janeway Ch Jr. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9:4-9
- ¹⁰ Janeway Ch Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
- ¹¹ Janeway Ch A Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13: 11-16
- ¹² Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996;272:50-54.
- ¹³ Gevitz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ & Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001;167:1882-5.
- ¹⁴ June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15:321-31.
- ¹⁵ Liu Y, Janeway, Ch A Jr. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3845-9.
- ¹⁶ Bendelac A, Fearon D. Innate immunity. Innate pathways that control acquired immunity. *Curr Opin Immunol* 1997;9:1-3
- ¹⁷ Roffman E, Wilchek M. The extent of oxidative mitogenesis does not correlate with the degree of aldehyde formation of the T lymphocyte membrane. *J Immunol* 1986; 137(1):40-4.
- ¹⁸ Austyn JM, Wood KJ. *Principles of cellular and molecular immunology*. Oxford New York: Oxford University Press, 1993:145-176.
- ¹⁹ Young JW, Steinman RM. The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem cells* 1996;14:376-87.
- ²⁰ Romani N, Ratzinger G, Pfaller K, Salvenmoser W, Stössel H, Koch F, Stoitzner P. Migration of dendritic cells into Lymphatics-The Langerhans cell example: Routes, Regulation and relevance. *Intl Rev Cyt*. 2001;207:237-70.
- ²¹ Banchereau J, Steiman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392(19):245-52.
- ²² Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y-J, Pulezran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811
- ²³ Steinman RM, Pack M, Inaba K. Dendritic cell in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immun rev* 1997;156: 25-37.
- ²⁴ Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hatchcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994;180:1849-60.
- ²⁵ Steinman RM, Lustig DS, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs in mice. *J Exp Med* 1974;139:1431-44.
- ²⁶ Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originated in bone marrow. *Nature* 1979;282:324-6.
- ²⁷ Pugh CW, MacPherson GG, Steer HW. Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* 1983;157:1758-79.
- ²⁸ Pelletier M, Perreaut C, Landry D, David M, Montplaisir S. Ontogeny of human epidermal Langerhans cells. *Transplantation* 1984;38 :544-6.
- ²⁹ Georgopoulos K, Bigby M, Wang JH, Molnar A, Wu P, Winandy S, Sharpe A. The *ikaros* gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* 1994;79:143-56.
- ³⁰ Beutler E, Coller B, Litchman MA, Kips T, Seligsohn U. *Williams Hematology*. 6ª ed. New York, USA: McGraw-Hill, 2001:132.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ³¹ Ito T, Amakawa R, Inaba M, Ikehara S, Inaba K, Fukuhara S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by INFs. *J Immunol* 2001;166(5):2961-9
- ³² Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, Wolpe S, Schuler G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 1992b;175:1157-67.
- ³³ Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
- ³⁴ Vandenabeele S, Wu L. Dendritic cell origins: Puzzles and paradoxes. *Immunol Cell Biol* 1999;29(9):2695-704
- ³⁵ Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997;9:10-6
- ³⁶ Fearnley DB, Whyte LF, Carnoutsos SA, Cook AH, Hart DNJ. Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 1998;93:728-36.
- ³⁷ Steinman RM. DC-Sign: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000;100:491-4.
- ³⁸ Monji T, Petersons J, Sauna NK, Vuckovic S, Hart DN, Auditore-Hargreaves K, Risdon G. Competent dendritic cells derived from CD34+ progenitors express CMCRF-44 antigen early in the differentiation pathway. *Immunol Cell Biol* 2002;80(3):216-25.
- ³⁹ Ham A, Cormack D. *Tratado de histología*. 8ª ed. México, D F: Nueva Editorial Interamericana, 1984.
- ⁴⁰ Axelsson L, Hellberg C, Melander F, Smith D, Zheng L, Andersson T. Clustering of $\beta 2$ -integrins on human neutrophils activates dual signaling pathways to ptdlns 3-kinase. *Exp Cell Res* 2000;256:257-63.
- ⁴¹ Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J Exp Med* 1987;166:1654-67.
- ⁴² Inaba K, Metlay JP, Crowley MT, Steinman RM. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 1990;172:631-40.
- ⁴³ Inaba K, Steinman RM. Protein specific helper T lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science* 1985;229:475-9.
- ⁴⁴ Cumberbatch M, Kimber I. Tumor necrosis factor- α is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunol* 1995;84:31-5.
- ⁴⁵ Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T-cell dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. *J Exp Med* 1988;167:646-51.
- ⁴⁶ Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM. Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolisaccharide tumor necrosis factor and interleukin 1. *J exp Med* 1995;181:2237-47.
- ⁴⁷ Hart DNJ. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997;90(9):3245-87
- ⁴⁸ Steinman R M. DC-Sign: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000 Mar 3; 100:491-4.
- ⁴⁹ Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol*. 1999 77: 404-10
- ⁵⁰ Lucas A, MacPherson G. Langerhans cells: immigrants or residents? *Nat Immunol* 2002;3(12):1125-6.
- ⁵¹ Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W, Charo I, Weissman IL, Cyster JG, Engleman EG. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2003;4(1):92.
- ⁵² Mohamadzadeh M, Bererd F, Essert G, Chalouni C, Puledran B, Davoust J, Bridges G, Palucka AK, Banchereau J. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J Exp Med* 2001;194:1013-9.
- ⁵³ Mommas M, Mulder A, Vermeer B, Koning F. Functional human epidermal Langerhans cells that lack Birbeck granules. *J Invest Dermatol* 1994;103:807-10.
- ⁵⁴ Stingl G, Tamaki K, Katz SI. Origin and function of epidermal Langerhans cells. *Immunol Rev* 1980;53:149-174.
- ⁵⁵ Bell D, Young JW, Banchereau J. Dendritic cells. En: *Advances in Immunology*. USA:Academic Press, 1999;72:255-324.
- ⁵⁶ Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, Duvert-Frances V, Davoust J, Caux C, Lebecque S, Sæland S. Langerin, a novel C-Type Lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000; 12 :71-81.
- ⁵⁷ Bos JD. The skin as an organ of immunity. *Clin Exp Immunol* 1997;107(Suppl. 1):3-5.
- ⁵⁸ Heras MB. Estudio fenotípico y funcional de las células dendríticas en la epidermis del ratón durante el periodo perinatal (Tesis de maestría). D. F. México: IPN, ENCB, Depto de Inmunología, 2001.
- ⁵⁹ Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cells subtypes. *Nature* 2002; 2:151-61.
- ⁶⁰ Kawai K, Kishihara K, Molina TJ, Wallace VA, Ma TW, Ohashi PS. Impaired development of V gamma 3 dendritic epidermal T cells in p56lck protein tyrosine kinase deficient and CD45 protein tyrosine phosphatase deficient mice. *J Exp Med* 1995;181(1):345-9.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ⁶¹ Elbe A, Tschachler E, Steiner G, Binder A, Wolff K, Stingl G. Maturation steps of bone marrow derived dendritic murine epidermal cells. *J Immunol* 1989;145(8):2431-8.
- ⁶² Kato M, McDonald K, Munster D, Clark G, Hart DNJ. White Cell Differentiation Antigens. En *Leucocyte Typing VII*. Oxford New York USA: Oxford University Press, 2002:298-303.
- ⁶³ Gordon S. Pattern recognition receptors:doubling up for the innate immune response. *Cell* 2002;111(7):927-30.
- ⁶⁴ Takeya M, Tomokiyo R-I, Jinnouchi K, Honda M, Wada Y, Suzuki H, Kodama T, Takahashi K; en *Leucocyte Typing VII*. White Cell Differentiation Antigens. Oxford New York USA, 2002.378-80 pp.
- ⁶⁵ Nestlé FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol* 1993;151(11):6535-45.
- ⁶⁶ Goyert S, Wright S; en *Leucocyte Typing VII*. White Cell Differentiation Antigens. Oxford University Press. Oxford New York USA, 2002.761-2 pp.
- ⁶⁷ Naito M, Kodama T, Matsumoto A, Doi T, Takahashi K. Tissue distribution, intracellular localization and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors. *Am J Pathol* 1991;139(6):1411-23.
- ⁶⁸ Harshyne LA, Zimmer MO, Watkins SC, Barrat-Boyes SM. A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* 2003;170(5):2302-9.
- ⁶⁹ Steinman R. Dendritic cells. En *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven: Philadelphia, USA, 1999.
- ⁷⁰ Rojas-Espinoza O. *Inmunología (de memoria)*. 2° edición. Editorial Médica Panamericana. México, D. F. 2001.
- ⁷¹ Geneser F. *Histología*. 3° ed. México D F: Editorial Médica Panamericana, 2001:445-64.
- ⁷² Fawcett DW. *Histología*. 12° ed. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana, 1995:577-612.
- ⁷³ Ganz T. Epithelia : Not just physical barriers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(6):3357-8.
- ⁷⁴ Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunology today* 1993;14(2):75-8.
- ⁷⁵ Canny G, Levy O, Furuta GT, Narravula-Alipati S, Sisson RB, Serhan CN & Colgan SP. Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3902-7.
- ⁷⁶ Inaba K, Steinman RM. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* 1984;169: 1717.
- ⁷⁷ Harris DT, Shumacher MJ, Locascio J, Besencon FJ, Olson GB, DeLuca D, Shenker L, Bard J, Boyse EA. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. *Immunology* 1992;89:10006-10.
- ⁷⁸ Buzby JS, Lee SM, Van Winkle P, et al. *Blood* 1996;88:2889-97.
- ⁷⁹ Ohshima Y and Delespesse G. T cell derived IL-4 and dendritic cell derived IL-12 regulate the lymphokine producing phenotype of alloantigen primed naive human CD4 T cells. *J Immunol* 1997;158,629-36.
- ⁸⁰ Kovarik J, Siegrist C-A. *Immunity in early life*. Elsevier Science Ltd 1998;19(4):150-2.
- ⁸¹ Becerril MA. Expresión de receptores de reconocimiento de patrones en las células dendríticas epidérmicas murinas durante el período neonatal (Tesis de licenciatura). D. F. México: FES Cuautitlán, UNAM, 2002.
- ⁸² Stahl P D. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* 1992;47:442-50.
- ⁸³ Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995;375:151-4.
- ⁸⁴ Luft T, Pang KC, Thomas E, Hertzog P, Hart DN, Trapani J, Cebon J. Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* 1998;161(4):1947-53.
- ⁸⁵ Liu T, Nishimura H, Matsugushi T, Yoshikai Y. Differences in interleukin-12 and -15 production by dendritic cells at the early stage of *Listeria monocytogenes* infection between BALB/C and C57BL/6 mice. *Cell Immunol* 2000;202:31-40.
- ⁸⁶ Liu T, Matsugushi T, Tsuboi N, Yajima T, Yoshikai Y. Differences in expression of Toll-like receptors and their reactivities in Dendritic cells in BALB/C and C57BL/6 mice. *Infect Immun* 2002;70(12):6638-45.
- ⁸⁷ Galy A, Travis M, Cen D, Chen B. Human T, B, Natural Killer and Dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 1995; 3:459-73.

