



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

Análisis fenotípico *ex vivo* de células dendríticas  
epidérmicas en cultivos de explantes de piel humana.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

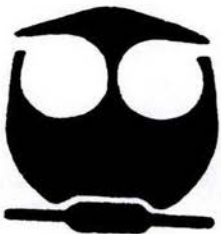
**P R E S E N T A :**

**JAY GEORGINA ESTELA MARTÍN DEL CAMPO DÁVILA**



ASESOR: DR. LEOPOLDO FLORES ROMO  
SUPERVISOR TÉCNICO M. en C. ALBERTO YAIRH LIMÓN FLORES

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D. F.

2004



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.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

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

NOMBRE: Jay Georgina Estela  
Martín del Campo Dávila

FECHA: 01-Julio-04

FIRMA: Jay G.

Jurado Asignado:

Presidente            **MARIA DOLORES LASTRA AZPILICUETA**  
Vocal                **JOSE SULLIVAN LOPÉZ GONZÁLEZ**  
Secretario          **LEOPOLDO FLORES ROMO**  
1er suplente        **ANA ESTHER AGUILAR CÁRDENAS**  
2do suplente        **JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Inmunología Celular, Departamento Patología Experimental,  
CINVESTAV-IPN



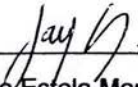
---

**Dr. Leopoldo Flores Romo**  
**ASESOR**



---

**M en C. Alberto Yairh Limón Flores**  
**SUPERVISOR TÉCNICO**



---

**Jay Georgina Estela Martín del Campo Dávila**  
**SUSTENTANTE**

## Agradecimientos:

Al Dr. Leopoldo Flores Romo por permitirme trabajar en su laboratorio, por la confianza brindada, por la transmisión de conocimientos y por darme la oportunidad de conocer un ser humano tan inigualable.

Al M en C Yairh Limón Flores, por sus enseñanzas, y su apoyo en la realización de este trabajo.

A la Q.B.P. Juana Calderón Amador, por su ayuda y asesoría técnica, por enseñarme lo importante de la planeación y el trabajo en equipo, y por ser una gran persona.

A mis compañeros del laboratorio de Inmunología Celular, CINVESTAV: Adriana Brizuela, Adriana Flores, Alex, Gina, Luis, Miguel, Mónica, Óscar, Raquel, René, Yairh, por ese espíritu de compañerismo que se respira dentro del laboratorio, por su ayuda y por su amistad.

Un muy especial agradecimiento al M en C Miguel Becerril y a la M en C Adriana Flores Langarica por la revisión de este texto y sus constructivos comentarios, a la QFB Adriana Brizuela y la Bióloga Selene Meza, por su apoyo moral, su amistad, compañerismo y complicidad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química, pues mi corazón es azul y mi piel dorada y haber sido una universitaria todos estos años ha sido un gran privilegio.

Dedicatorias:

Gracias a Dios por "ponerme" aquí, en este momento, en este lugar, con esta gente.

A mi madre Georgina Martín del Campo Dávila no solo por su apoyo incondicional durante todos estos años, también por ser más que una madre una amiga para mí, por inculcarme y enseñarme muchas de las cualidades que ahora forman parte de mi esencia, por ser un ejemplo de madre y un ejemplo de mujer, por ser la persona que mas admiro en este mundo debido a su inteligencia, fortaleza, decisión, independencia y a su tenacidad. Porque a pesar de todos los obstáculos las cuatro hemos podido salir adelante... simplemente por que te amo Mamá y por que sin ti no hubiera podido llegar hasta donde estoy... Mil Gracias Mami

A los dos más grandes regalos que la vida me ha dado, mis hermanas Ianira (Yuni) y Alejandra (Yayita), pues hemos crecido juntas... sé que nada hubiera sido lo mismo si no hubieran estado aquí, siempre junto a mí.

A mis ángeles que me cuidan: Estela Alatorre Martín del Campo☩ "Bela" por que aunque sé que estas lejos de alguna manera cuidas de mí, por que nunca olvidare tus enseñanzas y siempre estaré orgullosa de decir que tuve una abuela como tú. A mis abuelos Jorge Martín del Campo Sherwood☩ y Humberto Martín del Campo☩, mis bisabuelos Elena Pablos☩ y Jesús Dávila☩. Y a mi padrino Rubén Tatemura☩.

A mi familia Martín del Campo-Dávila-Padilla, especialmente a mi abuela Ma Elena "Yoya" y a mis tíos Jorge, Dalia, Ianira, Sergio, Bernardo, Cris y Octavio. A mi madrina Adriana Lombardo "Gulis".



A la Familia Preciado-Ruíz, especialmente al Dr. Raymundo Preciado pues durante este tiempo ha sido una parte fundamental en mi vida familiar. Ray: te quiero mucho.

A la QFB Rebeca Olmos y al Dr. Alberto Rojas... pues gracias a ellos hice una elección acertada de carrera, por haberme inculcado el gusto por las Ciencias, son más que familia para mí y no tengo manera de agradecerles todo lo que han hecho por mí y mi familia.

A todos los amigos que han pasado por mi vida, todos tienen una parte de mi corazón. A Rosa María y Ginger por todos esos sueños compartidos durante la infancia. A mis compañeros, maestros y amigos durante mis años en el Colegio Inglés Elizabeth Brock.

A mis amigos de la ENP 9 Ely, Loyda, Juan, Yunuén, Óscar. Muy especialmente a Eduardo Uvalle, pues aunque la vida nos ha llevado por caminos muy distintos siempre nos unirá el cariño que nos tenemos.

A mis amigas y amigos de la Facultad de Química: Mariana Huerta, Gabriela Aldape, Lorena Morales, Evelyn Rivera, Paola Lozano, Sandra Márquez, Eréndira García, Alejandra Yllescas, Isabel Izaguirre, Silvia Guzmán, Antonia Escobar, Arturo Mendoza, Manuel Suárez, Chinito Palma, Carlos Catana, Carlos Martínez, Ángel Cortés, Pablo Ramírez, Víctor Guadarrama, pues sin ellos mi vida dentro de la facultad no hubiera sido la misma, por que sé que la vida nos llevará por caminos diferentes y sin embargo siempre habrá un lazo que nos una.

Miguel Palma: simplemente por que sin proponértelo, e incluso quizá sin darte cuenta soy una mujer más feliz desde el momento en que te conocí... gracias por provocarlo, gracias por escucharme y por saber como y cuando hacerme reír... eres una gran persona.

Manuel Suárez: quedará por siempre la duda, si fue el *destino* o si acaso fue una *casualidad* conocerte, no importa, debo decirte que ha sido uno de los acontecimientos más afortunados...

Paola Lozano: por que durante estos años has sido más que mi compañera académica y mi amiga, por que sé que será una amistad por siempre... por cierto, eres una buena persona, y algún día te convencerás.

A la familia Pérez-Mendoza, Gloria, Martín, Isaac, Durlava; especialmente a Adhoksaja Dasa, pues hay cosas que no se pueden negar, y yo les tengo mucho cariño.

A la familia Rosas-López, pues siempre estarán de alguna manera en mi corazón, gracias por los inolvidables momentos compartidos. Yunuén: gracias por motivarme siempre a ser mejor, a seguir adelante y a romper mis propios esquemas.

A Cesar Hernández Balderas, pues me enseñó algo muy importante... a vivir y disfrutar el momento.



Hare Krshna Hare Krshna  
Krshna Krshna Hare Hare  
Hare Rama Hare Rama  
Rama Rama Hare Hare

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	2
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS .....	3
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 LA PIEL, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA.....	5
1.2 SISTEMA INMUNE CUTÁNEO .....	12
1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	15
1.3.1 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	20
1.4 CÉLULAS DE LANGERHANS.....	22
1.5 CAPTURA DE ANTÍGENOS .....	24
1.6 PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS .....	24
1.7 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO A LINFOCITOS T.....	26
1.8 MOLÉCULAS DE ESTUDIO.....	28
1.8.1 HLA-DR .....	28
1.8.2 CD1a .....	29
1.8.3 Langerina.....	29
1.8.4 CD45 .....	30
2. JUSTIFICACIÓN.....	31
3. OBJETIVO GENERAL .....	32
4. OBJETIVOS PARTICULARES.....	32
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
6. RESULTADOS .....	35
7. DISCUSIÓN.....	43
8. CONCLUSIONES .....	48
9. PERSPECTIVAS .....	49
10. APÉNDICE I: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES .....	50
11. APÉNDICE II: Resultados individuales .....	51
12. REFERENCIAS .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BG	Gránulo de Birbeck
BSA	Albúmina sérica bovina
CD	Grupos de diferenciación, del inglés "cluster of differentiation"
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CTLA-4	Antígeno 4 citotóxico de LcT
DC	Célula dendrítica
DDC	Célula dendrítica dérmica
Fc	Fracción cristizable de un anticuerpo
HLA	Antígeno leucocitario humano
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LC	Célula de Langerhans
LcB	Linfocito B
LcT	Linfocito T
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Mn	Monocito
NK	Célula Natural Killer
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR	Receptor de reconocimiento de PAMPs
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RANTES	Quimiocina perteneciente al grupo de quimiocinas CC
SFB	Suero fetal bovino
SIS	Sistema inmune cutáneo
SSI	Solución salina isotónica
TAP	Proteína transportadora de antígenos
TCR	Receptor del Linfocito T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRANCE	Citocina inducida por activación relacionada al TNF

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

### INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1:</b>	Esquema general de la piel.	5
<b>Figura 2:</b>	Los cuatro tipos celulares de la epidermis.	6
<b>Figura 3:</b>	Proceso de queratinización	7
<b>Tabla 1:</b>	Elementos celulares y humorales relacionados con la respuesta inmune presentes en la piel humana normal (sana).	13
<b>Tabla 2:</b>	Aspectos funcionales del sistema inmune cutáneo	14
<b>Tabla 3:</b>	Importancia de las DCs en el control de la inmunidad.	16
<b>Figura 4:</b>	Interacción y ciclo de vida de diferentes poblaciones de DCs.	17
<b>Figura 5:</b>	Algunas características de las DCs.	19
<b>Figura 6:</b>	Características fenotípicas de las DCs inmaduras y maduras.	20
<b>Figura 7:</b>	Origen de las células dendríticas, el linaje mieloide y el linfoide	21
<b>Figura 8:</b>	Procesamiento y presentación de antígenos en contexto de MHC- I (A) y MHC-II (B)	26

### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Tabla 4:</b>	Anticuerpos y diluciones utilizadas.	34
-----------------	--------------------------------------	----

### RESULTADOS

<b>Figura 9:</b>	Control de isotipo (A) cero días de cultivo, (B) tres días de cultivo, (C) seis días de cultivo.	37
<b>Figura 10:</b>	Expresión de HLA-DR en láminas epidérmicas (A) cero días de cultivo, (B) tres días de cultivo, (C) seis días de cultivo.	38
<b>Figura 11:</b>	Expresión de CD1a en láminas epidérmicas (A) cero días de cultivo, (B) tres días de cultivo, (C) seis días de cultivo.	39
<b>Figura 12:</b>	Expresión de Langerina en láminas epidérmicas (A) cero días de cultivo, (B) tres días de cultivo, (C) seis días de cultivo.	40
<b>Figura 13:</b>	Expresión de CD45 en láminas epidérmicas (A) cero días de cultivo, (B) tres días de cultivo, (C) seis días de cultivo.	41
<b>Tabla 5:</b>	Frecuencia (células+/mm <sup>2</sup> ) de DCs epidérmicas en piel humana en cultivo.	42

## RESUMEN

Anatómicamente una de las primeras barreras contra la invasión de microorganismos es la piel, un órgano que por mucho tiempo fue considerado sólo como una barrera física pasiva. Sin embargo; pese a que la descripción de las células dendríticas es relativamente antigua, en las últimas dos décadas este concepto ha cambiado, pues se ha entendido la importancia de las células dendríticas de la epidermis y la dermis, por lo que a la piel se le ha asignado un papel importante en el inicio de respuestas inmunes.

En este estudio se utilizó el modelo *ex vivo* de explantes de piel con el fin de analizar la expresión *in situ* de diversos marcadores de células dendríticas (HLA-DR, CD1a, Langerina y CD45) en condiciones basales, y después de ser cultivada como explante completo, evaluando si las células sufren algún cambio en cuanto a su distribución, morfología y frecuencia. Se obtuvieron láminas epidérmicas de dichos explantes de piel después de tres y seis días de cultivo, y de piel fresca no cultivada como control, y se analizó la expresión de las moléculas mencionadas por inmunohistoquímica.

La frecuencia de células HLA-DR+ disminuyó de manera significativa al tercer día de cultivo, esta diferencia fue más evidente al sexto día de cultivo, también se presentaron cambios morfológicos pues se observaron células con prolongaciones dendríticas más largas al tercer día de cultivo y respecto a la distribución al sexto día de cultivo las células se observan agrupadas. Las células CD1a+ de los explantes de piel en cultivo mostraron el mismo comportamiento en cuanto a frecuencia, morfología y distribución que las células HLA-DR+. Las células Langerina+ solo tuvieron una disminución estadísticamente significativa en frecuencia al sexto día de cultivo, y presentaron cambios morfológicos pues mientras las células en piel sin cultivar se observan redondeadas, después de tres días de cultivo se observaron con prolongaciones dendríticas. Las células CD45+ presentaron disminución estadísticamente significativa en la frecuencia, tanto al tercero como al sexto día de cultivo, también se observó una distribución agrupada de células CD45+.

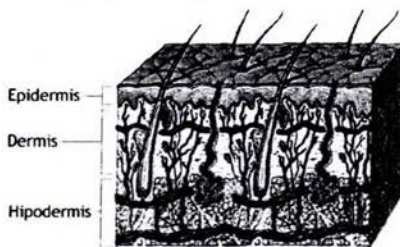
Dados los resultados se propone que los cambios observados durante el estudio se deban principalmente a que las LCs han experimentado migración espontánea o a que estas células estén sufriendo muerte celular.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 LA PIEL, ANATOMÍA E HISTOLOGÍA.

La piel y sus derivados recubren la parte externa de la superficie corporal; la piel es el órgano más grande del cuerpo, representando el 20-15% de la masa corporal total y tiene varias funciones importantes. Conformar una barrera contra la infección por microorganismos y confiere protección contra acciones mecánicas, compuestos químicos, la deshidratación, el calor, el frío y las radiaciones. Es capaz de absorber y de secretar diversas sustancias, y representa un importante eslabón en la defensa inmunológica. Además la piel es un órgano sensorial extenso (Gessner, 1999). Formada por dos capas: la capa externa llamada epidermis, que es un epitelio especializado derivado del ectodermo, y por debajo de la epidermis se encuentra la dermis, formada de tejido conectivo vascular denso originado del mesodermo. Debajo de la dermis se encuentra una capa de tejido conectivo laxo que varía de areolar a adiposo, que en ocasiones llaman hipodermis aunque no es considerada parte de la piel. La dermis está unida a la hipodermis por fibras de tejido conectivo. La hipodermis permite una gran movilidad de la piel sobre la mayor parte de las regiones del cuerpo (Fawcett, 1995)



**Figura 1:** Esquema general de la piel, se muestra la epidermis y la dermis.

Los derivados de la piel incluyen las siguientes estructuras orgánicas y productos tegumentarios: (Ross, 1999).

- Folículos pilosos y pelo
- Glándulas sudoríparas
- Glándulas sebáceas
- Uñas
- Glándulas mamarias



La piel se clasifica como piel gruesa o piel delgada, estos términos se refieren al grosor de la epidermis y no de la piel en conjunto. La piel gruesa se encuentra en las palmas de las manos y las plantas de los pies; en la nuca y los hombros hay piel moderadamente gruesa. La piel delgada cubre el resto del cuerpo, siendo en los párpados y en genitales muy delgada (Fawcett, 1995).

## EPIDERMIS

La epidermis es un epitelio plano estratificado, renovado continuamente que presenta una continua diferenciación (queratinización) formado por cuatro tipos distintos de células: (Fawcett, 1995; Freinkel, 2001).

- Queratinocitos
- Melanocitos
- Células de Langerhans
- Células de Merkel

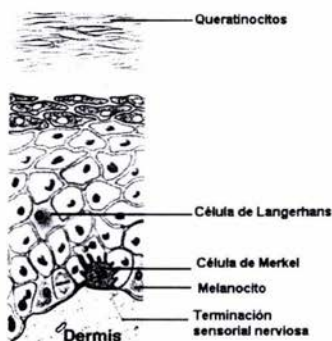


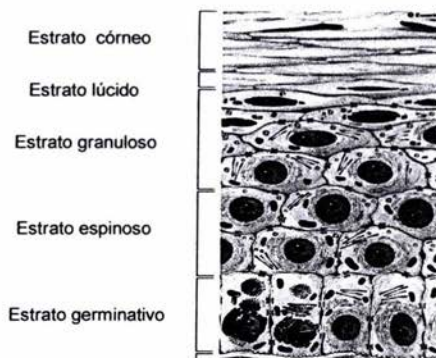
Figura 2: Los cuatro tipos celulares de la epidermis.

El mantenimiento del número de células de la epidermis depende de un fino balance entre la proliferación celular y la diferenciación/apoptosis de los queratinocitos. La interacción de los queratinocitos con las otras células epidérmicas, la adhesión de los queratinocitos con ellos mismos a la lámina basal, y de la interacción con la dermis subyacente son algunos de los factores que están involucrados en la regulación de la homeostasis epidérmica (Freinkel, 2001).

### QUERATINOCITOS: *la célula epidérmica predominante*

Los queratinocitos representan aproximadamente el 90-95 % de las células epidérmicas; estas células epiteliales producen queratina, lo cual da como resultado la formación de las capas superficiales e inertes de la piel. La estructura individual de un queratinocito se correlaciona con su posición dentro de la epidermis y su estado de diferenciación (Freinkel, 2001). La epidermis se organiza estructuralmente en capas, esta organización refleja las etapas de la vida del queratinocito, e incluyen proliferación, crecimiento, desplazamiento hacia el exterior, diferenciación, muerte y descamación de las células.

La queratinización implica: 1) pérdida de la habilidad de proliferar, 2) incremento en el tamaño celular y morfología cada vez más plana, 3) la formación de nuevos organelos junto con una reorganización estructural de los ya existentes y una pérdida eventual de los organelos, 4) síntesis de nuevas proteínas y lípidos, 5) cambios en las propiedades de la membrana plasmática, antígenos de superficie y receptores, 6) deshidratación. El término final de la queratinización es célula diferenciada y muerta (corneocito) la cuál contiene filamentos de queratina y una matriz proteica, y membrana plasmática reforzada con lípidos asociados a la superficie. Aunque el queratinocito de la capa córnea es una célula muerta sin núcleo sigue considerándose una célula funcional, pues todavía conserva sus características de barrera física (Freinkel, 2001).



**Figura 3: Proceso de queratinización**

**Estrato germinativo:** consta de una sola capa de células cilíndricas o cúbicas. Estas células contienen núcleos en forma de muesca limitados por un

delgado anillo de heterocromatina y con uno o dos nucleolos prominentes. Cada célula contiene prolongaciones a manera de dientes que penetran en invaginaciones de la lámina basal y parecen anclar el epitelio a la dermis subyacente. En esta capa se observan muchas células en mitosis que dan origen a nuevas células que son desplazadas hacia la capa superior (Fawcett, 1995). Se sabe que en esta capa existe una población de células precursoras que da origen a los queratinocitos que después colonizan la epidermis y sufren los cambios del proceso de queratinización hasta llegar al estrato córneo (Alonso, 2003).

**Estrato espinoso:** tiene un espesor de varias capas y está formado por células poliédricas irregulares, ligeramente separadas unas de otras. Hacia la superficie tisular las células se aplanan. La superficie de las células está cubierta de "espinas" o proyecciones citoplásmicas cortas, que se unen con proyecciones semejantes a las de las células adyacentes para formar puentes intercelulares. Esto no significa que haya continuidad citoplásmica entre las células ya que los queratinocitos son entidades independientes. El citoplasma de las células es basófilo, lo que indica un alto contenido de RNA, relacionado con la síntesis de proteínas para el crecimiento y división celulares. Al conjunto del estrato germinativo y el estrato espinoso se le denomina comúnmente capa de Malpighi, encargada de la proliferación y proceso del inicio de la queratinización. La capa de Malpighi también contiene melanocitos, productores de melanina, responsable de la pigmentación de la piel; además en esta capa se encuentran las células de Langerhans y de Merkel. En condiciones normales, la frecuencia de mitosis es mayor en el estrato espinoso que en el estrato germinativo (Fawcett, 1995).

**Estrato granuloso:** consta de tres capas de células aplanadas con núcleos vesiculares que carecen de nucleolos (prueba de disminución en la actividad celular), es en esta capa que las células de la epidermis mueren. La digestión de los organelos celulares por las enzimas lisosómicas en los autofagosomas produce la pérdida de la estructura celular. Los queratinocitos de la capa granulosa contienen pequeños gránulos rodeados por membranas o queratinosomas. Estos gránulos se forman en el aparato de Golgi, se desplazan después hacia la periferia celular y liberan su contenido hacia el espacio intercelular. Este material funciona como barrera contra la penetración de diversas sustancias, en particular de agua; ya que



la epidermis es permeable a ella en las capas más profundas y en las más superficiales, pero no en la región central del estrato granuloso (Fawcett, 1995).

**Estrato lúcido:** es una capa clara y translúcida de tres a cinco células de profundidad. Las células no se distinguen con claridad como entidades independientes, se aplanan y agrupan en forma compacta, los núcleos son imprecisos o ausentes y el citoplasma carece de mitocondrias, retículo endoplásmico, ribosomas y aparato de Golgi (Fawcett, 1995).

**Estrato córneo:** es la capa más externa formada por células muertas semejantes a escamas que se aplanan y se fusionan de manera progresiva. Las células no tienen núcleo y el citoplasma es sustituido por queratina que se deriva de las capas más profundas de la epidermis. Las capas más superficiales del estrato córneo son placas córneas aplanadas que sufren una descamación constante. Hay una pérdida constante de células muertas de la superficie de la epidermis, éstas son sustituidas por células nuevas, formadas como resultado de las mitosis en las capas más profundas sobre todo en el estrato germinativo y en el espinoso y que son "empujadas" hacia la superficie por el proceso de queratinización (Fawcett, 1995).

La epidermis del resto del cuerpo es más delgada y simple que la de las palmas de las manos y las plantas de los pies. El espesor de todas sus capas es menor y suele faltar el estrato lúcido. La reducción del grosor de la epidermis en la piel delgada es debida a que la queratinización no es un proceso continuo (Fawcett, 1995).

**MELANOCITOS:** *célula epidérmica productora de pigmento*

El color de la piel depende de tres factores: es amarillo debido a la presencia de caroteno, la sangre le da un tono rojizo, por último la presencia de cantidades variables de melanina explica los tonos de color pardo. La melanina es producida por células especializadas de la epidermis, los melanocitos, que están dispersos entre los queratinocitos del estrato germinativo y espinoso, así como en los folículos pilosos y el tejido conectivo dérmico. Los melanocitos poseen núcleos esféricos pequeños y muchas prolongaciones dendríticas que se extienden entre los queratinocitos adyacentes. La formación de la melanina tiene lugar dentro de los

melanosomas, situados en el citoplasma de los melanocitos. Puede ser que los queratinocitos fagociten las prolongaciones de los melanocitos conteniendo los melanosomas, o que los melanocitos inyecten el pigmento en los queratinocitos vecinos (secreción citocrina). Dentro de los queratinocitos, los melanosomas se acumulan arriba del núcleo (Fawcett, 1995).

**CÉLULAS DE LANGERHANS:** *célula epidérmica presentadora de antígeno profesional*

Las células de Langerhans (LCs) son células dendríticas que residen en la capa suprabasal de la epidermis. Las LCs no son exclusivas de la epidermis, se han encontrado en otros epitelios escamosos incluyendo la cavidad oral, el esófago y la vagina, en los órganos linfoides como en el bazo, timo y ganglios linfáticos y también en la dermis normal. Las LCs constituyen del 1-5 % de la población celular total de la epidermis, están unidas a los queratinocitos a través de la molécula E-cadherina. Las LCs provienen de la médula ósea en etapas tempranas del desarrollo embrionario, y residen en la epidermis por un tiempo durante el cuál capturan y procesan antígenos (Freinkel, 2001).

**CÉLULAS DE MERKEL:** *célula neuroendocrina de la epidermis y dermis*

Constituyen la cuarta población celular en la epidermis, tienen una amplia distribución y por lo general se encuentran en el estrato germinativo o cerca, a menudo con relación a las terminaciones nerviosas intraepiteliales. Tienen núcleos de forma irregular y su citoplasma es menos electrodensito que el de los queratinocitos adyacentes. El citoplasma contiene haces laxos de tonofilamentos y muchos gránulos densos pequeños. Estos gránulos son semejantes a los de todas las células que contienen catecolaminas y se concentran en la región basal de la célula. A diferencia de las células de Langerhans, las células de Merkel están unidas a los queratinocitos vecinos por muchos desmosomas. Se cree que las células de Merkel funcionan como mecanoreceptores. Los gránulos que contienen se localizan en los límites de la epidermis, donde se originan los axones (Fawcett, 1995).

## DERMIS

Es difícil definir los límites exactos de la dermis ya que se fusionan con la hipodermis subyacente, el grosor promedio varía entre 0.5 a 3 mm o más. La dermis determina el modelo de desarrollo de la epidermis suprayacente. La dermis se repara a sí misma por la actividad de los fibroblastos y el depósito de colágena. Está formada por tejido conectivo denso de disposición irregular y se subdivide en dos estratos: 1) la capa papilar en la superficie y 2) la capa reticular, debajo de ella (Fawcett, 1995).

### Elementos celulares de la dermis

Los elementos celulares que predominan en la dermis son los fibroblastos y macrófagos. También puede haber adipocitos. Por lo general la capa papilar contiene más células y fibras de tejido conectivo más pequeñas y delgadas que la capa reticular (Fawcett, 1995).

### Fibras musculares

En la dermis pueden encontrarse fibras musculares lisas, dispuestas en haces pequeños unidos a los folículos pilosos (músculos erectores del pelo) y esparcidas por toda la dermis. En la cara y el cuello las fibras de algunos músculos esqueléticos terminan en las delicadas redes de fibras elásticas de la dermis (Fawcett, 1995).

## HIPODERMIS

La capa subcutánea (aponeurosis superficial) no es parte de la piel, sino que aparece como una extensión profunda de la dermis. La línea de separación con la dermis rara vez es clara. La capa subcutánea forma un enlace entre la piel y la aponeurosis profunda o periostio, y tiene funciones importantes como almacén de grasa y capa aislante, la densidad y distribución de la capa subcutánea determina la movilidad de la piel. La hipodermis contribuye al aislamiento térmico del cuerpo, cuando hay lobulillos continuos de grasa la hipodermis forma una almohadilla de grasa, el panículo adiposo. En el abdomen esta capa puede alcanzar un espesor de 3 cm o más. La zona superficial de la hipodermis contiene parte de los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas (Fawcett, 1995).



## 1.2 SISTEMA INMUNE CUTÁNEO

Un sistema inmune intacto es requerido por los organismos superiores para detectar y destruir microorganismos invasores (virus, bacterias, hongos y parásitos) y para eliminar células que van hacia una transformación maligna (Maurer, 1999). Anatómicamente una de las primeras barreras contra la invasión microbiana es la piel, este órgano por muchos años fue considerado únicamente como una barrera pasiva. En las últimas dos décadas se le ha atribuido un importante papel como parte del sistema inmune en el cuál las células dendríticas de la epidermis (células de Langerhans) y de la dermis (células dendríticas dérmicas) inician respuestas inmunes que protegen la integridad de este tejido y del organismo en general (Maurer, 1999).

La piel es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano y una de sus principales funciones es como una barrera física. Aunque la piel no se considera como parte de los órganos centrales del sistema inmune (órganos linfoides primarios y secundarios), muchas de sus características han hecho necesario el desarrollo de conceptos que tratan de darle un lugar apropiado dentro de la inmunología (Bos, 1997).

En 1986 Bos y Kapsenberg propusieron el término sistema inmune cutáneo SIS (del inglés skin immune system) que describe la complejidad de las células asociadas a una respuesta inmune y los factores humorales presentes en la piel normal (Bos, 1993).

Pese a que la piel comparte algunos de sus elementos constitutivos con otros epitelios, tiene características muy especiales que la hacen extraordinariamente única. Entre estas características están:

- La piel esta casi en continua exposición a la luz y la radiación ultravioleta.
- La piel está continuamente en contacto con una enorme cantidad de antígenos, desde los derivados de microorganismos incluyendo parásitos, hongos, levaduras, bacterias y virus, hasta elementos del medio ambiente, derivados de plantas y compuestos químicos.
- La tercera característica de la piel es la presencia de LCs, estas células son una subpoblación de DCs que pertenecen al grupo de células presentadoras

de antígeno (APCs) profesionales, las células dendríticas tienen la capacidad de iniciar y dirigir una respuesta inmune primaria. (Bos, 1997).

**Tabla 1.** Elementos celulares y humorales relacionados con la respuesta inmune presentes en la piel humana normal (sana).

Componentes celulares	Componentes humorales
Relacionados con la inmunidad innata	
Queratinocitos (fuente de citocinas)	Péptidos antimicrobianos
Células de Langerhans (APCs)	Proteínas de complemento
Macrófagos tisulares	Eicosanoides y prostaglandinas
Monocitos	Neuropéptidos
Granulocitos	Citocinas y quimiocinas
Mastocitos cutáneos	Fibrinolisin
Relacionados con la inmunidad adquirida	
Células endoteliales linfáticas y sanguíneas	Inmunoglobulinas G, y A (incluyendo componente secretor)
Linfocitos T (Linfocitos B y células plasmáticas en mucosas)	Interleucinas Factores estimuladores de colonias Otras citocinas (TGF, TNF)

(Modificado de Bos, 1993)

Citocinas producidas por queratinocitos:

Se demostró que los queratinocitos tienen ciertas funciones dentro del sistema inmune cuando se observó en experimentos de co-cultivo que inducen varios efectos en maduración de LcT. Se ha descubierto que los queratinocitos fagocitan *in vitro*, y que la toma continua de melanosomas producidos por los melanocitos puede ser un equivalente *in vivo*. Se ha demostrado que los queratinocitos expresan moléculas MHC-I, por lo que se ha sugerido que tienen funciones accesorias, tal vez hasta capacidad para presentar antígenos (Bos, 1993).

Los queratinocitos son capaces de producir y secretar varios mediadores de la reacción inflamatoria y de la respuesta inmune tal como eicosanoides y citocinas. Las citocinas producidas por queratinocitos incluyen IL-1, IL-6, IL-7, IL-8 y otras quimiocinas, IL-10, IL-12, GM-CSF, TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral), así como

algunos de los factores que regulan el crecimiento de las células epiteliales, por ejemplo, TGF (factor de crecimiento transformante)  $\alpha$  y  $\beta$ , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico). Debe tenerse en cuenta que con excepción de IL-1, IL-7, y TGF- $\beta$ , (Maurer, 1999) la mayoría de estas moléculas no son producidas constitutivamente por los queratinocitos, son secretadas solo después de una perturbación a la homeostasis epidérmica inducida por una variedad de estímulos no específicos, incluyendo químicos que inducen dermatitis, radiación UV, agentes promotores de tumores, trauma epitelial y otro tipo de factores. Por lo tanto es posible que los queratinocitos estén involucrados en diferentes padecimientos inflamatorios e inmunológicos de la piel, como activadores no específicos respondiendo a una amplia variedad de eventos dañinos. Según Baker et al, los queratinocitos actúan como productores de señales pro-inflamatorias, en respuesta a estímulos externos no específicos con la producción de moléculas de adhesión y factores quimiotácticos (Bos, 1993). Las citocinas no producidas constitutivamente por los queratinocitos junto con IL-1 $\alpha$  inician cambios fenotípicos y funcionales en la población de células de Langerhans (Maurer, 1999).

**Tabla 2.** Aspectos funcionales del sistema inmune cutáneo

Aspectos funcionales del SIS
Exposición continua a agentes ambientales, incluyendo rayos solares biológicamente significativos (fotones), toxinas, antígenos bioquímicamente reactivos, y agentes infecciosos.
Respuesta epitelial pro-inflamatoria a varios estímulos.
Localización epitelial de las LCs
Inducción de respuestas inmunes primarias a ciertos antígenos.
Inducción de tolerancia a ciertos antígenos.
Retos continuos a complejos inmunes endógenos.
Respuesta inmune amplificada por células endoteliales.
Inmunovigilancia activa en relación con el desarrollo y prevención de tumores.

(Modificado de Bos, 1993)



### 1.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs) son células de forma irregular que recibieron este nombre por la morfología distintiva que tienen las prolongaciones membranales a las cuales se llamó dendritas; identificadas en 1973, por Steinman y Conh como una población no adherente en cultivos celulares de bazo de ratón (Steinman, 1980). Las DCs son células derivadas de médula ósea que tienen una importante función como células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales (Cella, 1997), ya que capturan y transfieren información antigénica del mundo externo a las células del sistema inmune adaptativo (Banchereau, 2000).

Después de la identificación de estas células, se iniciaron una serie de experimentos mediante los cuales establecieron a las DCs derivadas de tejidos linfoides como estimuladoras potentes de la respuesta inmune primaria. La observación de células con morfología similar presentes en tejidos no linfoides de ratón y humano, combinada con la evidencia de que juegan un importante papel en el rechazo de trasplantes de corazón y riñón generaron un nuevo interés en el estudio de las DCs. Sin embargo, la escasez de marcadores exclusivos de DCs, la dificultad para distinguirlas de monocitos y macrófagos, y las dificultades para purificarlas han dificultado su estudio. No obstante, muchos laboratorios persisten en sus investigaciones, destacando la actual afirmación de que las DCs representan una población de leucocitos especialistas en presentar antígenos con una extraordinaria capacidad para iniciar respuestas de LcT primarias y secundarias (Hart, 1997).

Han sido descritos cuatro estados de desarrollo, a) progenitores en médula ósea; b) precursores de DCs que "patrullan" a través de la sangre y linfa, así como en los tejidos linfoides, que después de reconocer a algún patógeno liberan citocinas c) DCs inmaduras que residen en tejidos periféricos y en mucosas, las cuales poseen alta capacidad endocítica y fagocítica permitiendo así la captura de Ag; y d) DCs maduras localizadas en los órganos linfoides secundarios y que expresan altos niveles de moléculas de coestimulación permitiendo así la presentación eficiente de antígeno (Banchereau, 2000).

Las propiedades de las DCs incluyen:

1. Capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos.
2. Capacidad de migrar selectivamente a través de tejidos.
3. La capacidad de interactuar, estimular y dirigir respuestas de LcT.

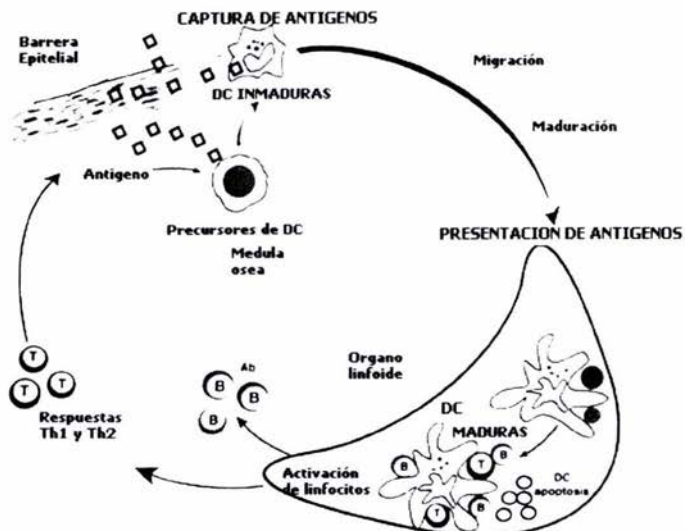
**Tabla 3.** Importancia de las Células Dendríticas en el control de la inmunidad

- Centinelas *in vivo*: distribución *in situ* para optimizar la captura de antígenos; migración hacia los órganos linfoides para optimizar la selección clonal de Lc T CD4+ y CD8+
- Iniciadoras de la respuesta inmune: estimulación de LcT vírgenes y de memoria, y de LcB.
- Inductores de tolerancia: eliminación de timocitos autoreactivos y LcT anérgicos o inmaduros.

(Modificado de Banchereau & Steinman, 1998)

Las DCs son consideradas APCs ideales pues son las únicas células capaces de inducir respuestas inmunes primarias, y como consecuencia, permitir el establecimiento de la memoria inmunológica (Banchereau, 2000).

Estas células cuentan con diversos nombres según su localización en el cuerpo. En la piel y mucosas son llamadas células de Langerhans; en la linfa se llaman células veladas; en órganos como corazón, riñón e intestino, son conocidas como células intersticiales; y a las que se encuentran entre los LcT de los órganos linfoides son llamadas células interdigitantes. Se considera que las DCs representan del 0.5 al 1% de los leucocitos en sangre circulante (Caux, Liu, y Banchereau, 1995; Hart, 1997, Flores-Romo, 2001).



**Figura 4:** Ciclo de vida de las DCs. Los precursores circulan vía sanguínea provenientes de médula ósea y entran a los tejidos (piel intestino, pulmón, etc) como DCs inmaduras, estas células tienen la capacidad de capturar antígenos. Después de la captura antigénica migran hacia los órganos linfoides (DCs maduras) presentando el Ag a los LcT y B vírgenes, los cuales son activados produciendo expansión y diferenciación clonal, Posiblemente en este punto las DCs mueren. (Banchereau, 2000)

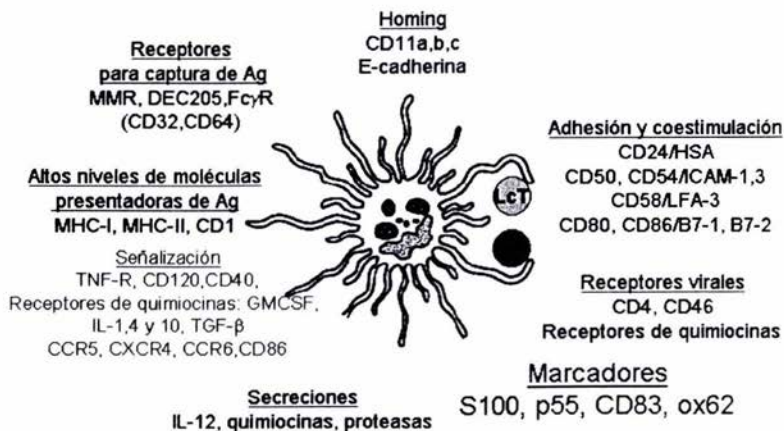
Una importante característica de las DCs es su capacidad de migración que les permite ir de los tejidos periféricos a los órganos linfoides en donde circulan los LcT vírgenes. La migración selectiva de las DCs y su permanencia en un tejido dado, son eventos estrechamente controlados, pero no bien conocidos aún. Los factores quimiotácticos liberados por los tejidos blanco parecen jugar un importante papel en el tráfico de las DCs. Las DCs inmaduras y maduras difieren en el patrón de expresión de receptores de quimiocinas, y por consiguiente en su sensibilidad a distintas quimiocinas. Otras moléculas de superficie están involucradas en la migración de DCs. La expresión del antígeno cutáneo asociado a linfocitos (CLA) puede permitir a las DCs colonizar la piel tras su interacción con células endoteliales activadas mediante E-selectinas. E-cadherina es una molécula implicada en la adhesión de las LCs con los queratinocitos; y las isoformas de la molécula CD44 son importantes en la adherencia de las DCs a las zonas paracorticales de los ganglios linfáticos.



Los estímulos activadores de DCs alteran la expresión de algunas moléculas entre las que se incluyen E-cadherina, CD44,  $\beta 1$  integrinas y receptores de quimiocinas, e inducen rearrreglos del citoesqueleto. Por lo tanto, los factores que promueven la maduración de DCs como APCs son los mismos que llevan a la acumulación de DCs en sitios de inflamación o que inducen migración de las DCs desde tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos.

La maduración de las DCs inicia con señales del microambiente y frecuentemente ocurre en el contexto de una respuesta inflamatoria. Estas señales incluyen productos bacterianos como componentes de la pared celular (LPS o ácido lipoteicoico) y fragmentos de DNA bacteriano, además de citocinas inflamatorias como  $IL-1\beta$  y  $TNF\alpha$ . Las DCs son capaces de responder a la presencia de patógenos e inducir respuestas inmunes primarias, por lo que representan un importante eslabón entre la inmunidad innata y la inmunidad adquirida .

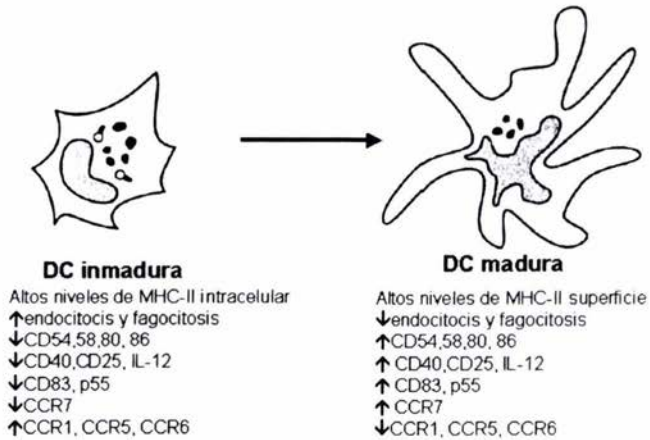
Una vez que las DCs están en contacto con los LcT, se inician una serie de interacciones que llevan a la maduración terminal de las DCs. Particularmente, los LcT liberan citocinas y expresan moléculas de superficie que refuerzan las funciones como APCs de las DCs y prolongan la supervivencia de las DCs. Varios pares receptor-ligando están involucrados en esta relación DCs-LcT, en particular miembros de la familia de TNF como CD40-CD40L, OX40-OX40L y TRANCE-R-TRANCE. Aunque no se ha demostrado formalmente, es muy probable que una vez que las DCs han estimulado a los LcT sufran muerte celular apoptótica. De hecho, las DCs no han sido identificadas en las vías linfáticas eferentes. La repoblación de DCs en los tejidos es debido a un flujo continuo de DCs o precursores de DCs desde la sangre, que tampoco se conoce bien.



**Figura 5:** Algunas características de las DCs. Muchas de las moléculas mostradas no son exclusivas de DCs. (Banchereau y Steinman, 1998)

El fenotipo y función de las DCs cambia considerablemente de acuerdo con su estado de maduración o activación. Las DCs que residen en tejidos periféricos están en un estado inmaduro con una capacidad alta para capturar antígenos y una baja actividad de estimulación de LcT. Las DCs inmaduras son fagocíticas, muestran alta actividad endocítica y expresan altos niveles de receptores de superficie involucrados en la captura de antígeno, incluyendo receptor de manosa, y receptores Fc de inmunoglobulinas, FcγRII, FcεRI y FcεRII. En contraste, el número de moléculas MHC-II es bajo, y esta localizado principalmente intracelularmente, además las moléculas de coestimulación y adhesión son expresadas muy débilmente.

Por el contrario las DCs maduras reducen su capacidad de captura y aumentan considerablemente su capacidad de presentar antígenos. Las DCs maduras incrementan la expresión de moléculas MHC-II considerablemente con un amplio número de moléculas que llevan péptidos de "larga vida" hacia la superficie. Las moléculas de adhesión y coestimulación así como CD40 son reguladas positivamente, es decir la expresión de estas moléculas aumenta en las DCs maduras.



**Figura 6:** Características fenotípicas de las DCs inmaduras y maduras. (Banchereau y Steinman, 1998)

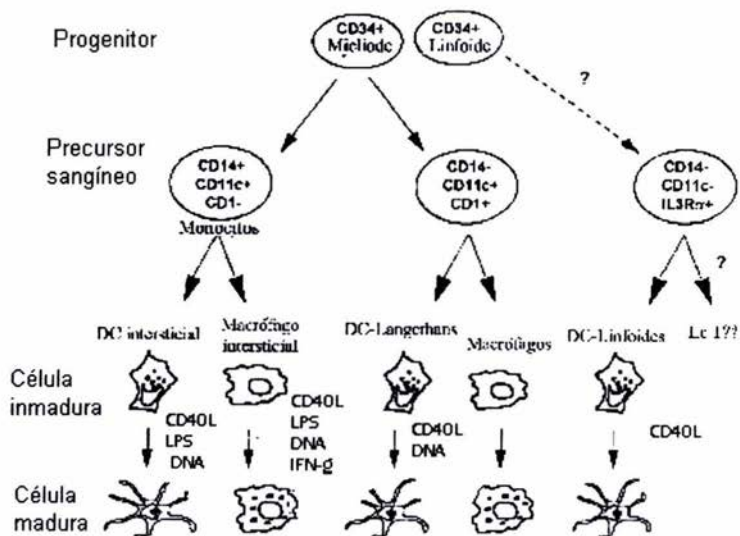
### 1.3.1 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Existe evidencia de que las DCs tienen un progenitor hematopoyético de linaje mieloide, células de médula ósea CD34+ que han sido cultivadas con GM-CSF y TNF $\alpha$  generan diferentes tipos de DCs; después de cinco días de cultivo, dos subtipos de DCs son identificados, las DCs CD1a+ y las CD14+, ambos subtipos maduran a DCs típicas después de doce días de cultivo. Las células CD14+ generan células con gránulos de Birbeck (BGs) y E-cadherina, características de células de las Langerhans epidérmicas. La población CD14- CD1a+ carece de BGs y E-cadherina pero expresan CD2, CD9, CD68 y factor XIIIa, moléculas características de células dendríticas dérmicas (DDC), además las células CD14+ pueden diferenciarse en macrófagos cuando son cultivadas con M-CSF (Cella, 1997).

También se pueden generar DCs a partir de monocitos de sangre periférica CD14+ cultivados con GM-CSF e IL-4. Bajo estas condiciones de cultivo los monocitos desarrollan una población homogénea de DCs con características inmaduras que son capaces de madurar si se les estimula con TNF $\alpha$ , IL-1, LPS o CD40L (Cella, 1997). Así pues, los monocitos representan una fuente abundante de precursores, que se pueden polarizar hacia DCs o a macrófagos dependiendo del estímulo externo.

Existe evidencia de un precursor de DCs de linaje linfóide, una célula capaz de generar tanto linfocitos como DCs ha sido identificada en timo de ratones y de humanos y en la médula ósea del humano. Las DCs linfoides se desarrollan en ausencia de GM-CSF, y en particular, las DCs linfoides murinas expresan CD8 $\alpha$  y otros marcadores linfoides (Banchereau, 2000).

Los dos diferentes linajes de DCs podrían tener funciones diferentes. Se ha demostrado que las DCs linfoides murinas DC8 $\alpha$ + expresan FasL y pueden inducir apoptosis en LcT efectores por lo que pueden ejercer un efecto supresor en LcT. De las DCs generadas de progenitores CD14+ usando GM-CSF y TNF $\alpha$ , solo los monocitos derivados de DCs pueden provocar la proliferación de LcB y su diferenciación a células plasmáticas productoras de IgM.



**Figura 7:** Origen de las células dendríticas, el linaje mielóide y el linfóide (modificado de Banchereau, 2000)



Las citocinas que ayudan a la generación de DCs *in vitro* son GM-CSF, IL-4 y TNF $\alpha$ . Adicionando c-Kit-L o Flt3L al medio de cultivo se incrementa el rendimiento de DCs generadas a partir de precursores de médula ósea o de progenitores obtenidos de sangre periférica. GM-CSF no parece ser un factor de crecimiento primordial para las DCs *in vivo* pues los ratones que expresan altos niveles de esta citocina no tienen un mayor número de DCs. La administración de Flt3L a ratones resulta en un incremento considerable de DCs tanto mieloides como linfoides, sugiriendo que esta citocina puede expandir poblaciones *in vivo* (Cella, 1997).

#### 1.4 CÉLULAS DE LANGERHANS

En 1868, Paul Langerhans impregnando piel humana con sales de oro descubrió una población de células en la región suprabasal de la epidermis. Como las sales de oro tienen afinidad por el tejido nervioso, Langerhans consideró que estas células eran parte del sistema nervioso. En su honor, estas células son llamadas ahora células de Langerhans (LCs). La teoría de que las LCs eran parte del sistema nervioso fue mantenida por varios investigadores hasta los años sesenta. Entre 1950 y 1960 surgió otra teoría en la que se sugería una relación entre las LCs y los melanocitos. De acuerdo a esta teoría, las LCs eran consideradas células hijas de melanocitos en división, como melanocitos disfuncionales o como melanocitos en estado inactivo de desarrollo. Los estudios de microscopía electrónica hechos en 1961 por Birbeck et al. revelaron que las LCs contenían organelos citoplasmáticos únicos. Aun así se seguía pensando que las LCs derivaban de melanocitos (Stingl, 1980).

La teoría ontogénica que relacionaba a las LCs con los melanocitos y la suposición de que eran componentes del sistema nervioso fue refutada por Breathnach et al., en 1968 que trabajó con ratones transplantados con injertos sin componentes de la cresta neural y encontró un desarrollo normal de LCs pero no de melanocitos ni de células de Schwann (Stingl, 1980).

A mediados de los setenta Silberberg et al observó una reducción de LCs cuando aplicó sustancias como cloruro de mercurio y dinitroclorobenceno en piel de

humanos y de cobayos (Stingl, 1980). Fue hasta 1973 que Steinman relaciona a las LCs con el sistema inmune, y en 1979 Katz demuestra que las LCs son de origen hematopoyético pues derivan de la médula ósea (Katz, 1979).

Las LCs se originan en médula ósea (Katz, 1979), se localizan en la capa suprabasal de la epidermis y de otros epitelios. Las LCs epidérmicas forman una extensa red con sus dendritas extendidas casi en contacto con las LCs adyacentes, el número de LCs (aproximadamente  $1000/\text{mm}^2$ ) varía dependiendo del sitio anatómico del cuerpo (Hart, 1997), representando aproximadamente el 1% del total de las células epidérmicas, lo que ha hecho difícil su estudio y purificación.

Las LCs son una población móvil inmadura de DCs, su permanencia en la epidermis es un paso en su ciclo de vida. Los precursores salen de médula ósea a circulación para después poblar la piel. Bajo un estímulo apropiado, pueden dejar la piel y migrar hacia los ganglios linfáticos regionales en donde estimulan LcT (Flores-Romo, 2001; Romani, 2001).

Las LCs expresan varios receptores para la captura de antígenos, incluyendo  $Fc\gamma$  y  $Fc\epsilon$  y la multilectina CD205 (DEC205). No expresan el receptor de manosa de los macrófagos

Ultraestructuralmente las LCs son caracterizadas por un organelo citoplásmico pentalaminar único, el granulo de Birbeck (BG). Los BGs son discos con una apariencia de raqueta de tenis que consiste de dos membranas superpuestas separadas por láminas estriadas con apariencia de zipper. Aunque el BG se identificó en 1961, las señales moleculares que llevan a su formación son desconocidas y el conocimiento de su función es limitado.

Las LCs son las únicas células epidérmicas que expresan moléculas MHC-II, CD1a y Langerina (Dermott, et al, 2002). Esta última es una lectina transmembranal tipo C, involucrada en la internalización y asociada a BGs (Valladeau, 2000). Se han encontrado algunas células CD1a+ que presentan gránulos de Birbeck en dermis, estas pudieran representar células migrando hacia los ganglios regionales. (Hart, 1997).

## 1.5 CAPTURA DE ANTÍGENOS

Las DCs inmaduras tienen varias vías de captura de antígenos, siendo tres las principales:

- Fagocitosis:
- las DCs pueden fagocitar bacterias por activación de pseudopodo, este proceso también se inicia por la fagocitosis promovida por receptores Fc o dependiente de receptores de complemento.
- Macropinocitosis: las DCs pueden formar largas vesículas pinocíticas en las cuales tanto el fluido extracelular como los solutos son ingeridos.
- Endocitosis mediada por receptor: las DCs expresan receptores que median endocitosis absorbente entre los cuales están incluidos PRRs: receptores de lectina tipo C, como el receptor de manosa y CD205; TLRs, receptores Fc $\gamma$  y Fc $\epsilon$  (Banchereau y Steinman, 1998).

## 1.6 PROCESAMIENTO DE ANTÍGENOS

### MHC-II

Una vez que los antígenos han entrado a través de la vía endocítica son degradados por proteasas a péptidos pequeños, que se asocian con moléculas MHC-II. Muchos péptidos se unen a moléculas MHC-II en compartimentos lisosomales separados. Una porción menor de complejos MHC-II-péptido es formada en endosomas en donde los péptidos antigénicos pueden unirse a moléculas MHC-II maduras que son endocitadas desde la membrana celular y que vuelven a reciclarse. Los mecanismos moleculares responsables de la maduración de las moléculas MHC-II después de su biosíntesis han sido ampliamente estudiados, e involucran la participación de varias proteínas accesorias tal como la cadena invariante y moléculas HLA-DM. La cadena invariante dirige el transporte intracelular de moléculas MHC-II hacia la vía endocítica, previniendo la unión de péptidos a moléculas MHC-II antes que el compartimiento esté listo. HLA-DM selecciona los péptidos antigénicos que forman los complejos más estables con moléculas MHC-II así se regula la edición final de complejos péptido- MHC-II para ser presentados a linfocitos CD4+ (Girolomoni, 2001; Sandberg, 2001).



## MHC-I

Las DCs también juegan un papel fundamental en la iniciación de la respuesta celular T citotóxica (mediada por LcT CD8+). Estas células reconocen complejos de moléculas MHC-I y péptidos antigénicos pequeños, la mayoría derivados de proteínas citosólicas endógenas como antígenos virales y tumorales. Las proteínas citosólicas son degradadas en complejos grandes de proteasas (llamados proteosomas), trasladadas por un transportador de péptidos en el retículo endoplásmico, la proteína TAP (transportador asociado con el procesamiento de antígenos), y luego cargadas en moléculas MHC-I. Moléculas accesorias "chaperonas" (calnexina, calreticulina y tapasina) contribuyen a la maduración de las moléculas de MHC-I nuevas. Todas las células expresan MHC-I y pueden ser blanco de respuestas de LcT CD8+, pero solo las DCs son capaces de activar LcT CD8+ vírgenes. Así pues, los antígenos sintetizados por otros tipos celulares pueden ser llevados por DCs en moléculas MHC-I a fin de inducir una respuesta primaria de LcT CD8+.

Distintos mecanismos permiten la carga de antígenos a moléculas MHC-I en las DCs, pero en ningún caso la transferencia es más eficiente para antígenos particulados que para antígenos solubles. Primero, las DCs pueden capturar y digerir antígenos particulados en fagolisosomas, y después producir péptidos que se unen directamente con moléculas MHC-I. El segundo mecanismo, células apoptóticas, restos celulares, solutos y microorganismos que han entrado en la vía endocítica y se han acumulado en fagosomas o micropinosomas y son transferidos al citosol y procesados en la manera clásica TAP-dependiente. Aun no está claro si la entrega es el resultado de una ruptura espontánea de los fagosomas o si existe un mecanismo específico de transferencia. Finalmente, las DCs pueden capturar complejos péptido-chaperona y recobrarlos dentro del retículo endoplásmico (Giolomoni, 2001; Sandberg, 2001).



## Moléculas CD1

Estudios recientes han identificado a la familia CD1 como moléculas presentadoras de antígeno no clásicas, involucradas en la regulación de respuestas de LcT a antígenos como lípidos y glicolípidos microbianos. Pueden ser presentados tanto lípidos exógenos como endógenos, y conocer esta vía puede ayudar no solo a la inmunidad microbiana, sino a las respuestas autoinmunes y antitumorales. Las moléculas CD1 son un distintivo del fenotipo de las DCs, constituyen una familia de glicoproteínas no polimórficas asociadas a  $\beta 2$ -microglobulina que se asocian con un antígeno no procesado en compartimientos endosómicos o lisosómicos y presentan al antígeno de una manera independiente de TAP. En los humanos se han identificado cuatro proteínas CD1 (a-d) que se expresan en DCs mieloides, mientras que en ratón sólo se ha identificado la proteína CD1d (Banchereau, 2000).

### 1.7 PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO A LINFOCITOST

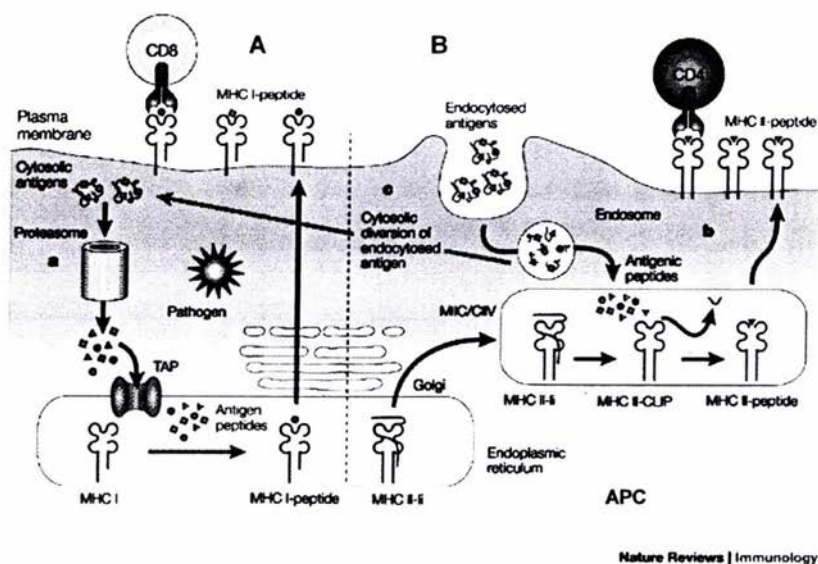


Figura 8: Procesamiento y presentación de antígenos en contexto de MHC- I (A) y MHC-II (B)

Los LcT son activados cuando sus TCRs reconocen ligandos expresados en la superficie de APCs. Los ligandos son complejos de péptidos unidos a moléculas MHC o bien, superantígenos bacterianos. El número de TCRs en un LcT, la fuerza de la interacción TCR-MHC-péptido y la duración de la estimulación del TCR son elementos clave en la sensibilidad del LcT a activarse. La cantidad de ligando y la duración de la interacción TCR-MHC-péptido requerida para activar LcT, varía de acuerdo al estado del linfocito (virgen, de memoria, o efector) y del número de moléculas de adhesión y coestimulación en la APC. Los LcT vírgenes necesitan una estimulación más sostenida de su TCR y una mayor densidad de antígeno, comparados con linfocitos de memoria o efectores, probablemente debido a que los primeros tienen mecanismos de activación con cinéticas lentas. Inversamente, los LcT efectores expresan altos niveles de moléculas de adhesión, y son rápidamente comprometidos, pero muestran una propensión a sufrir apoptosis cuando la unión del TCR y las señales son prolongadas (Girolomoni, 2001; Wang, 2001).

Las señales de coestimulación como aquellas dadas por las moléculas B7, disminuyen el umbral de activación y de esta manera hacen a los LcT más sensibles a la estimulación antigénica. Las moléculas B7 (CD80, CD86) en las APCs interactúan con CD28 que es expresada constitutivamente en LcT; las moléculas CD28 protegen a los LcT efectores de la muerte apoptótica. Las DCs maduras expresan un gran número de moléculas de adhesión y coestimulación que pueden formar racimos con LcT e inducir fácilmente su activación, aún en presencia de pocos complejos péptido-MHC y pocas interacciones de TCRs. Así la maduración de las DCs es un evento crucial para el inicio de la inmunidad. Basado en la habilidad de proveer señales de coestimulación y activar LcT vírgenes, las APCs son divididas en APCs profesionales (DCs, Mn y LcB) y no profesionales, que comprenden todas las demás células que expresan moléculas MHC-I. De manera importante el LcT que ha reconocido el Ag por su TCR en ausencia de señales de coestimulación no solo no se activa, sino que además queda en un estado anérgico para una nueva estimulación antigénica, aún si ésta es completamente apropiada. En contraste los LcT efectores son menos dependientes de señales de coestimulación y pueden interactuar también productivamente con una APC no profesional (Girolomoni, 2001; Wang, 2001).

Durante una respuesta de LcT hay un marcado incremento en el número de LcT antígeno específicos. Esta fase es invariablemente seguida de una fase de regulación negativa la cuál resulta en la eliminación de la mayoría de los LcT efectores. Este proceso requiere la participación activa de una serie de moléculas, especialmente miembros de la familia TNF, como el par Fas-FasL. Aunque se ha reportado que las DCs mieloides expresan Fas-L, su función como inhibidores de respuestas de LcT no ha sido completamente estudiada. Recientemente el homólogo de CD28, antígeno 4 citotóxico de LcT (CTLA4), ha adquirido importancia por jugar un papel en la interrupción del curso de respuestas inmunes, mediante una inhibición de la coestimulación. CTLA4 es transitoriamente expresado en LcT sólo después de la activación y se une a moléculas B7 de las APCs con mayor afinidad que la unión con CD28. Por lo tanto, los ligandos de B7 primero atraen a CD28 y median la activación de LcT y después inhiben la respuesta de estos uniéndose a CTLA4. Además, bajo condiciones de disponibilidad limitada de moléculas B7, las señales mediadas por CTLA4 parecen predominar sobre CD28 y bloquear la expansión de LcT (Girolomoni, 2001; Wang, 2001).

## 1.8 MOLÉCULAS DE ESTUDIO

### 1.8.1 HLA-DR

Las moléculas de MHC-I y MHC-II son glucoproteínas de superficie que, aunque están relacionadas en estructura general y función constan de diferentes subunidades estructurales. Las moléculas MHC-I consisten en dos cadenas polipeptídicas: la cadena  $\alpha$  (codificada por el MHC) y otra cadena más pequeña, la  $\beta_2$ -microglobulina (no codificada por MHC). Las moléculas MHC-II consisten en un complejo no covalente formado por dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  transmembranales. En los seres humanos hay tres pares de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de MHC-II denominados HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ (Janeway, 2000).



### 1.8.2 CD1a

Las moléculas de la familia CD1 son codificadas por cinco genes cercanos localizados en el cromosoma 1 (en humanos) no están ligados a MHC (cromosoma 6), aunque las moléculas CD1 tienen gran homología con proteínas MHC-I y II. Hay varias isoformas de la molécula CD1 y se han dividido en dos grupos (Porcelli, 1999). El grupo uno de isoformas de CD1 (CD1a, CD1b y CD1c en humanos) expresado en APCs es capaz de presentar varias formas de antígenos microbianos y autoantígenos lipídicos a LcT CD4+ y CD8+, mientras que las isoformas del grupo dos (CD1d en humanos y ratones) presentan un glicoesfingolípido, ( $\alpha$ -galactosilceramida), a un tipo especializado de LcT conocido como célula NK T. Estos descubrimientos han cambiado la visión clásica de los LcT que reconocen péptidos sólo en contexto de moléculas MHC clase I y II.

Las LCs expresan moléculas CD1a en niveles muy altos, y niveles no detectables de CD1b o CD1c. Mientras que otros subtipos de DCs (DCs dérmicas y DCs derivadas de monocitos) expresan predominantemente CD1b, y niveles variables de CD1a y CD1c.

Todas las isoformas de CD1 son transportadas a la superficie celular pero subsecuentemente son llevadas por distintos compartimentos endosomales o lisosomales. En particular la isoforma CD1a "trafica" principalmente entre la superficie celular y "vesículas de reciclaje temprano" (Mizumoto, 2004).

### 1.8.3 Langerina

La molécula Langerina es una lectina-C tipo II asociada a membranas, y que es expresada exclusivamente por LCs, que reconoce residuos de manosa por su único dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Localizada intracelularmente asociada a BGs. La transfección de cDNA de Langerina en fibroblastos origina la formación de BGs en estos. Langerina funciona como un receptor endocítico para el transporte de ligandos que contienen manosa a los BGs (Valladeau, 2000; Mizumoto, 2004).



Recientemente se ha encontrado que las moléculas Langerina y CD1a parecen funcionar juntas en la presentación de antígenos no peptídicos a LcT, ahora se especula que los BGs sirven como un sub-compartimiento especializado en organizar la presentación de antígenos lipídicos, mediada por Langerina y dependiente de CD1a (Hunger, et al. 2004; Mizumoto, 2004).

#### 1.8.4 CD45

La molécula CD45 es una proteína con actividad de tirosina-cinasa localizada en todas las células hematopoyéticas excepto eritrocitos y plaquetas. La molécula CD45 es también llamada antígeno leucocitario común. Las proteínas tirosin cinasas constituyen una familia de enzimas citoplásmicas o parecidas a receptores (receptor-like) que catalizan la desfosforilación de residuos fosforilados de tirosina y son caracterizados por dominios catalíticos homólogos. CD45 es una proteína que tiene varias isoformas y las células hematopoyéticas expresan una o varias isoformas. Esta uniformemente distribuida en la membrana plasmática y se localiza en las regiones de contacto de Lc T y Lc B. CD45 regula las Src cinasas requeridas para la transducción de señales de TCR. Esta molécula es un marcador constitutivo de células hematopoyéticas (Trowbridge, 1993).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La piel es uno de los primeros órganos que entran en contacto con los antígenos a los que el cuerpo humano está expuesto. En el caso del humano representa una superficie de contacto de aproximadamente 2 m<sup>2</sup>. Existe una población de DCs en la epidermis, que como su contraparte en epitelio gastrointestinal y respiratorio actúan como centinelas del sistema inmune siendo una importante característica su ubicación y distribución topográfica. Es importante estudiar estas células, ya que por su localización y función están involucradas en procesos inflamatorios, de hipersensibilidad y en diversas enfermedades de la piel. Dentro de la epidermis, las LCs capturan antígenos, los procesan y después migran por los vasos linfáticos para presentarlos a LcT vírgenes en los ganglios linfáticos regionales.

Se han empleado varios modelos para conocer las etapas tempranas de la migración de LCs de la epidermis, entre éstos se encuentran: el modelo de hipersensibilidad por contacto, el modelo de trasplantes epidérmicos y el modelo de cultivo de explantes de piel. Este último tiene ciertas ventajas para estudiar migración de DCs pues utilizando explantes de piel se conservan condiciones estructurales y fisiológicas que las LCs tienen en la piel *in vivo*. En la epidermis las LCs están unidas a los queratinocitos por diversas moléculas, para que las LCs puedan migrar estas deben sufrir ciertas modificaciones las cuales son posibles de estudiar con este modelo. Los cambios fenotípicos no se han estudiado, y se sabe que para que una célula migre y madure debe de regular la expresión de muchas moléculas.

Los reportes de DCs epidérmicas en cultivos de explantes de piel humana estudian la migración espontánea, sin embargo los cambios fenotípicos, así como de frecuencia y distribución de las DCs epidérmicas no han sido lo suficientemente estudiados.

### 3. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Analizar los cambios fenotípicos, morfológicos, de distribución y de frecuencia de las células dendríticas epidérmicas presentes en explantes de piel humana cultivados en ausencia de antígenos exógenos.

### 4. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Analizar la expresión de HLA-DR, CD1a, Langerina y CD45 en láminas epidérmicas de piel humana a los cero, tres y seis días de cultivo.
- ❖ Determinar si las células dendríticas epidérmicas sufren algún cambio respecto a frecuencia, morfología y/o distribución, cuando la piel es cultivada como explante completo, y en ausencia de antígenos exógenos.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras de piel

La piel fue obtenida a partir de cirugía plástica reductiva de abdomen, practicada a mujeres sanas con un rango de edad de los 36 a 53 años.

### Cultivo de explantes de piel

Se trabajó en condiciones de esterilidad, la piel se colocó en SSI estéril, eliminando el tejido graso y cortando con ayuda de un bisturí fragmentos de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>. Los fragmentos de piel fueron lavados con SSI y colocados en cajas petri de 10x35 mm (Becton Dickinson). Los cultivos fueron incubados por cero, tres o seis días a 37° C, con 5% CO<sub>2</sub>, con medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 1% de antibióticos y 20% de suero fetal bovino (SFB, Gibco).

### Obtención de láminas epidérmicas

Después del período de cultivo, la piel fue retirada del medio, y cortada en fragmentos de 0.5 cm<sup>2</sup> aproximadamente. Los fragmentos de piel se colocaron en tubos eppendorf con 1mL de mezcla de enzimas colagenasa (32µg/mL) / dispasa (3.3mg/mL), a 4°C toda la noche, procurando que la incubación no excediera de 18 h. Se separó la epidermis de la dermis por tracción con ayuda de pinzas finas. Las láminas epidérmicas desprendidas fueron lavadas con un exceso de SSI, fijadas en acetona fría por 10 minutos y posteriormente 5 minutos en cloroformo.

### Inmunohistoquímica en láminas epidérmicas

El tejido fijado fue lavado 3 veces (5 min cada lavado) con solución de BSA al 0.2% en PBS (pH=7.4) Las láminas epidérmicas fueron seccionadas en pequeños trozos de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>. Se bloqueó la actividad de la enzima peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6% en solución de PBS y azida de sodio (0.1%) durante 1h.

Después de tres lavados (5 min) con solución de BSA al 0.2% se bloquearon sitios inespecíficos de unión a Fc utilizando suero humano al 3% en BSA 1% durante 1h.



Los anticuerpos primarios fueron preparados a las diluciones óptimas correspondientes, en BSA 1% en PBS (solución para anticuerpos).

**Tabla 4:** Anticuerpos y diluciones utilizadas.

Anticuerpo	Isotipo	Clona	Casa comercial	Dilución
Mo $\alpha$ huHLA-DR	IgG2a	DK22	DAKO, USA	1:100
Mo $\alpha$ hu CD1	IgG2a	NA1/34	DAKO, USA	1:100
Mo $\alpha$ hu Langerina	IgG1	HD24	LIR Lyon Fr.	1:30
Mo $\alpha$ hu CD45 *	IgG1	HI30	Pharmingen, USA	1:40
Mo IgG (control de isotipo)			Jackson Immunoresearch	1:100

\* conjugado a biotina

Los anticuerpos primarios fueron incubados durante 1h a 37 °C o toda la noche a 4°C. Después lavar tres veces con la solución de BSA 0.2%. Se incubó con el anticuerpo secundario  $\alpha$ Mo IgG HRP de chivo, o con SAV-HRP en el caso del anticuerpo  $\alpha$ CD45 acoplado a biotina, ambos 1h a temperatura ambiente. La reacción se reveló con azul gris (SG, Vector) o con aminoetilcarbazol (AEC) observando el desarrollo de color al microscopio. La epidermis fue montada con resina Polymount en portaobjetos limpios. Las láminas ya montadas se analizaron en el microscopio óptico a un aumento de 40X.

#### Frecuencia celular por área de tejido

Se contó el número de células en al menos 10 campos. Para calcular el área ( $\pi r^2$ ) del campo ocular y el número de células por unidad de área se empleó la siguiente fórmula para obtener la densidad celular por  $\text{mm}^2$

Diámetro del campo ocular = cifra de campo ocular / aumento del objetivo (40X)

Los resultados se muestran como el valor promedio (de las cinco muestras de piel) +/- la desviación estándar.

Se realizó un análisis estadístico (t-student) para probar si las diferencias encontradas eran estadísticamente significativas.

## 6. RESULTADOS

En las láminas epidérmicas obtenidas de piel humana que no fue cultivada (figura 10 A) se observaron células HLA-DR+ con morfología dendrítica típica, presentando una distribución homogénea y frecuencia de  $1047 \pm 81$  células /mm<sup>2</sup>. Mientras que en las láminas epidérmicas obtenidas de piel en cultivo durante tres días (figura 10 B) la frecuencia de las células HLA-DR+ disminuyó con respecto al control ( $877 \pm 176$  células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ). Además estas células presentaron morfología más dendrítica, pues fue posible apreciar algunas células con prolongaciones dendríticas más largas. En las láminas epidérmicas obtenidas de piel cultivada durante seis días (figura 10 C) la disminución observada en la frecuencia de células HLA-DR+ fue más evidente ( $602 \pm 150$  células/mm<sup>2</sup>) siendo esta frecuencia estadísticamente significativa menor a la observada en la piel sin cultivar ( $p < 0.01$ ), se observó además un notable cambio morfológico, pues las células parecen reunirse en grupos, aunque se siguen observando células aisladas.

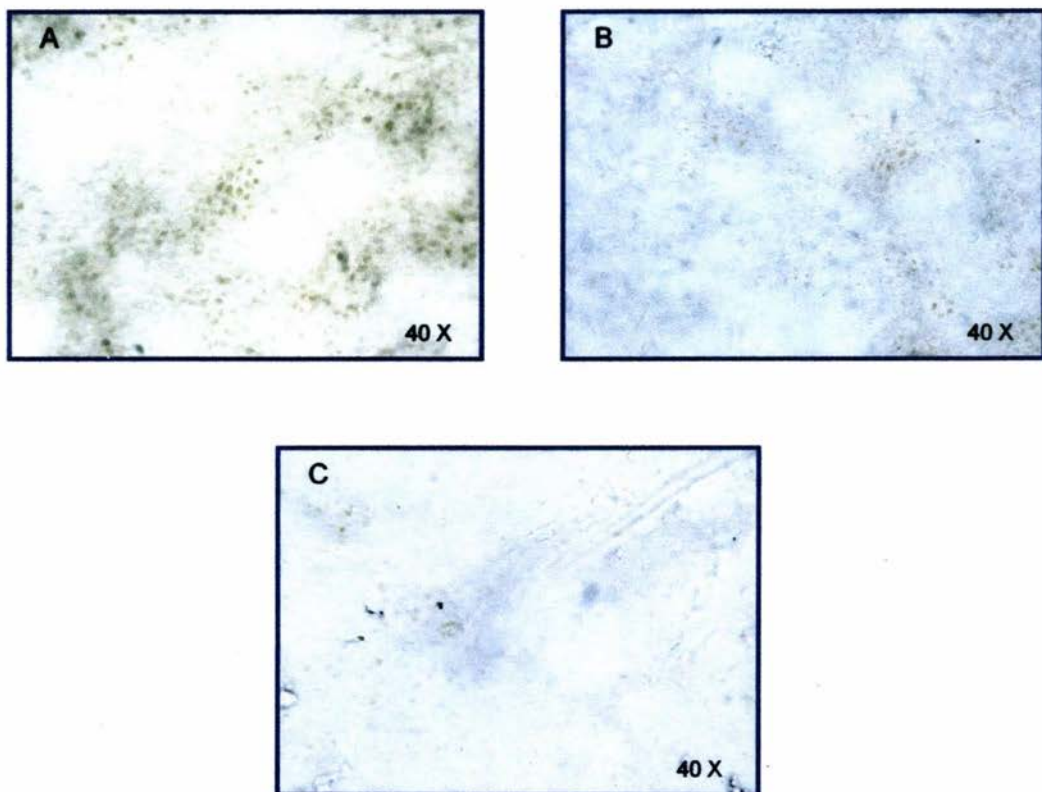
Las células CD1a+ observadas en las láminas epidérmicas obtenidas de piel que no se cultivó (figura 11 A) presentaron morfología típica dendrítica, distribución homogénea a lo largo de toda la lámina epidérmica y frecuencia de  $1216 \pm 118$  células /mm<sup>2</sup>. En las láminas epidérmicas de piel en cultivo durante tres días (figura 11 B) se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de células CD1a+ ( $997 \pm 111$  células/mm<sup>2</sup>), se observó también un evidente cambio morfológico dado que las células presentaron dendritas más prolongadas. Después de seis días de cultivo (figura 11 C) continuó observándose un decremento en el la frecuencia celular ( $789 \pm 70$  células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.01$ ), y también se observaron cambios en la distribución celular pues estas células parecen agruparse.

En las láminas epidérmicas obtenidas de piel no cultivada (figura 12 A) fue posible observar la morfología típica que presentan las LCs cuando son evidenciadas con anticuerpos  $\alpha$ -Langerina, es decir, se observan dendritas tan cortas que prácticamente solo es evidente una parte del soma de la célula, la frecuencia de estas células fue de  $882 \pm 131$  células/mm<sup>2</sup>. Mientras que en las LCs

Langerina+ de láminas epidérmicas de piel en cultivo durante tres días (figura 12 B) la disminución en frecuencia observada no es estadísticamente significativa ( $797 \pm 147$  células/mm<sup>2</sup>), se observa un incremento en tamaño y es evidente la diferencia morfológica que presentan estas células en comparación de las células Langerina+ de la piel no cultivada, ya que se observan claras prolongaciones dendríticas en casi todas las células. Después de seis días de cultivo se observa una disminución estadísticamente significativa ( $658 \pm 117$  células/mm<sup>2</sup>,  $p < 0.05$ ). Este marcador al parecer disminuyó en intensidad lo que puede indicar que hay una menor expresión de la molécula Langerina (figura 12 C).

Cuando la piel no fue cultivada (figura 13 A) es posible observar en la lámina epidérmica obtenida, células CD45+ que presentan morfología típica dendrítica con frecuencia de  $1082 \pm 147$  células/mm<sup>2</sup>, y distribución homogénea. Después de tres días de cultivo (figura 13 B) la frecuencia de las células CD45+ al igual que las células positivas a los otros tres marcadores utilizados (HLA-DR, CD1a y Langerina) mostró una disminución estadísticamente significativa, al parecer las células presentan morfología más dendrítica, aunque esto no es muy evidente. Después de seis días de cultivo (figura 13 C) sigue observándose un decremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de células positivas ( $658 \pm 82$  células/mm<sup>2</sup>); con respecto a la distribución es posible observar el agrupamiento de células como el que fue visto en las láminas epidérmicas de seis días de cultivo en células HLA-DR+ y CD1a+ en algunas zonas de la lámina epidérmica.

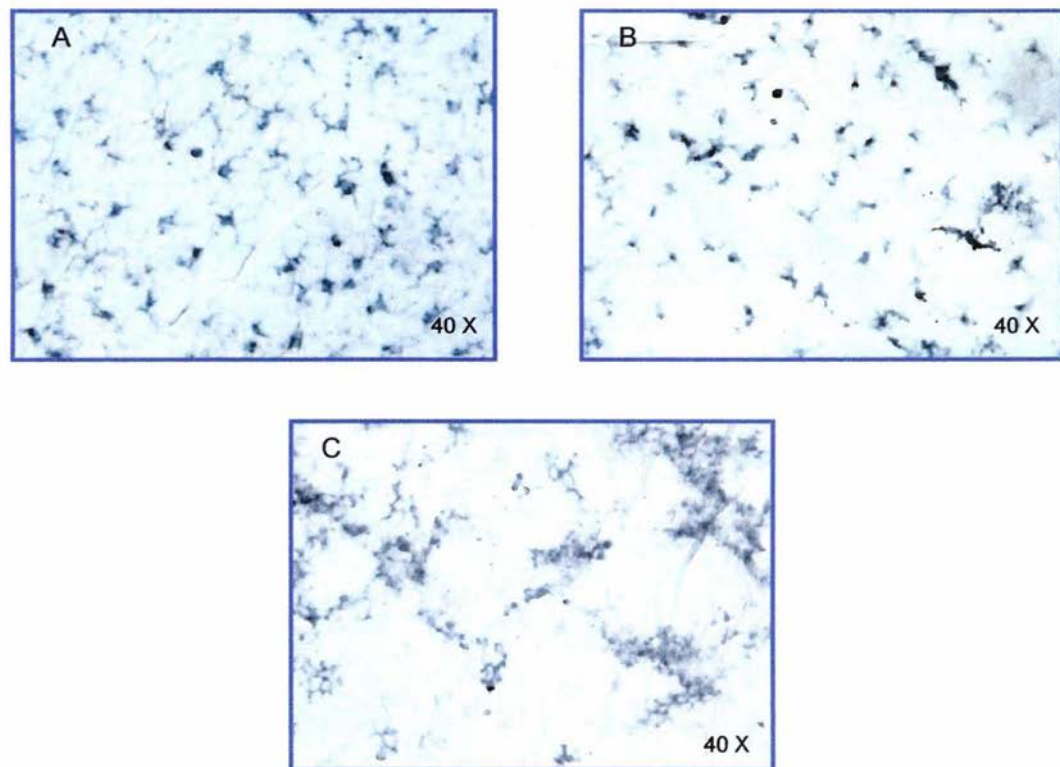
### Control de isotipo



**Figura 9: Control de isotipo en láminas epidérmicas:** se muestran los controles de anticuerpos que se realizaron utilizando IgG de ratón, que es un anticuerpo irrelevante, se usó un anticuerpo secundario  $\alpha$  ratón HRP y la reacción se reveló con SG (Vector). **A:** control cero días de cultivo. **B:** control de tres días de cultivo. **C:** control de seis días de cultivo. Como se observa, no hay marcaje en ninguno de los casos.

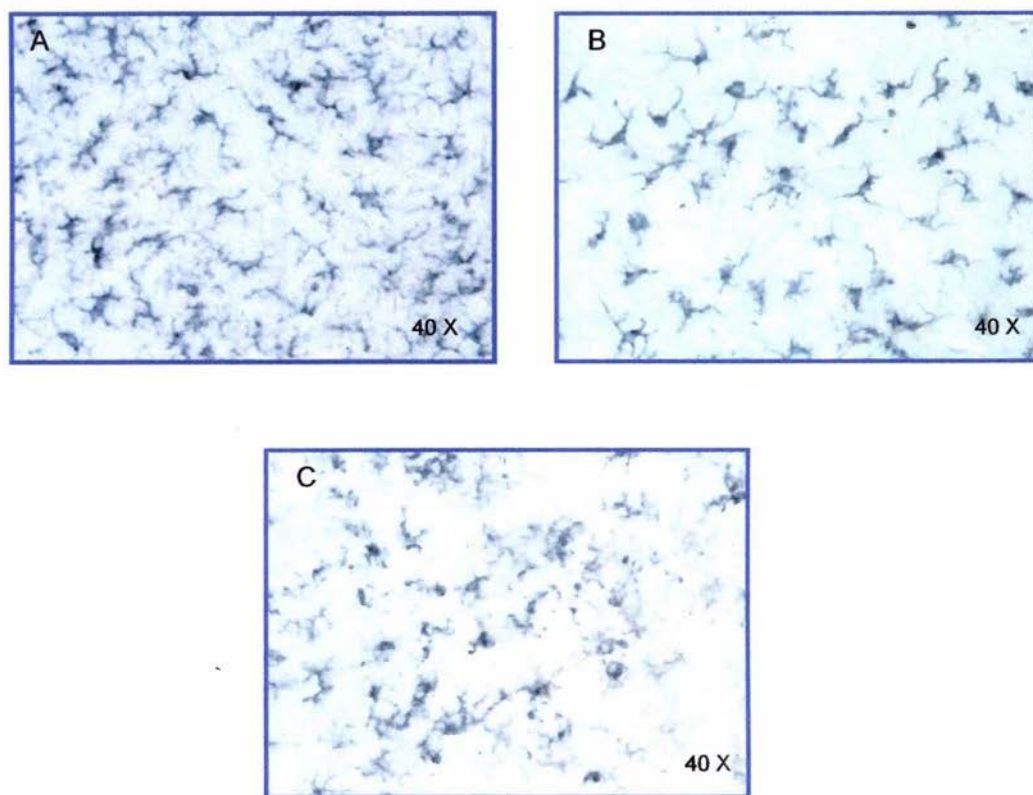


## Expresión de HLA-DR en láminas epidérmicas.



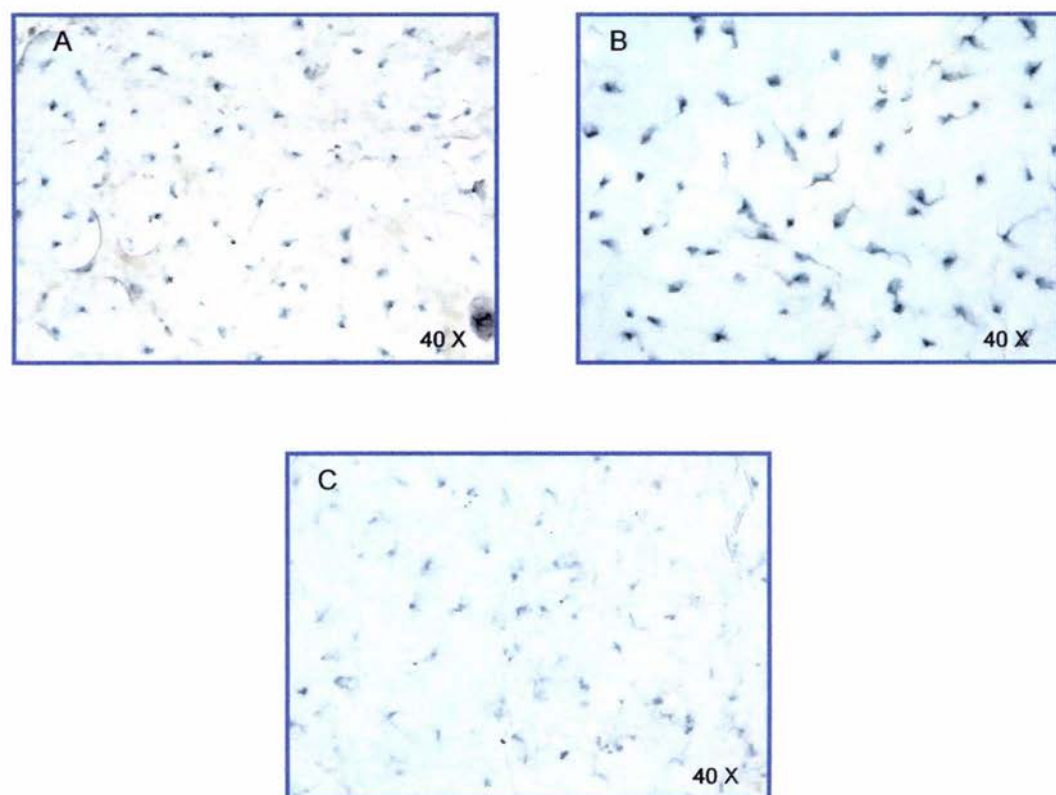
**Figura 10: expresión de HLA-DR en láminas epidérmicas;** A: en la piel no cultivada se pueden observar células con morfología dendrítica típica, B: en el tercer día de cultivo la frecuencia de células dendríticas epidérmicas HLA-DR+ disminuye, las células presentan una morfología un poco más dendrítica, pues se aprecian algunas células con prolongaciones dendríticas más largas. C: después de seis días de cultivo sigue observándose un decremento en el número de células positivas y un notable cambio morfológico, pues algunas veces las células parecen agruparse, aunque se siguen observando algunas células aisladas.

## Expresión de CD1a en láminas epidérmicas.



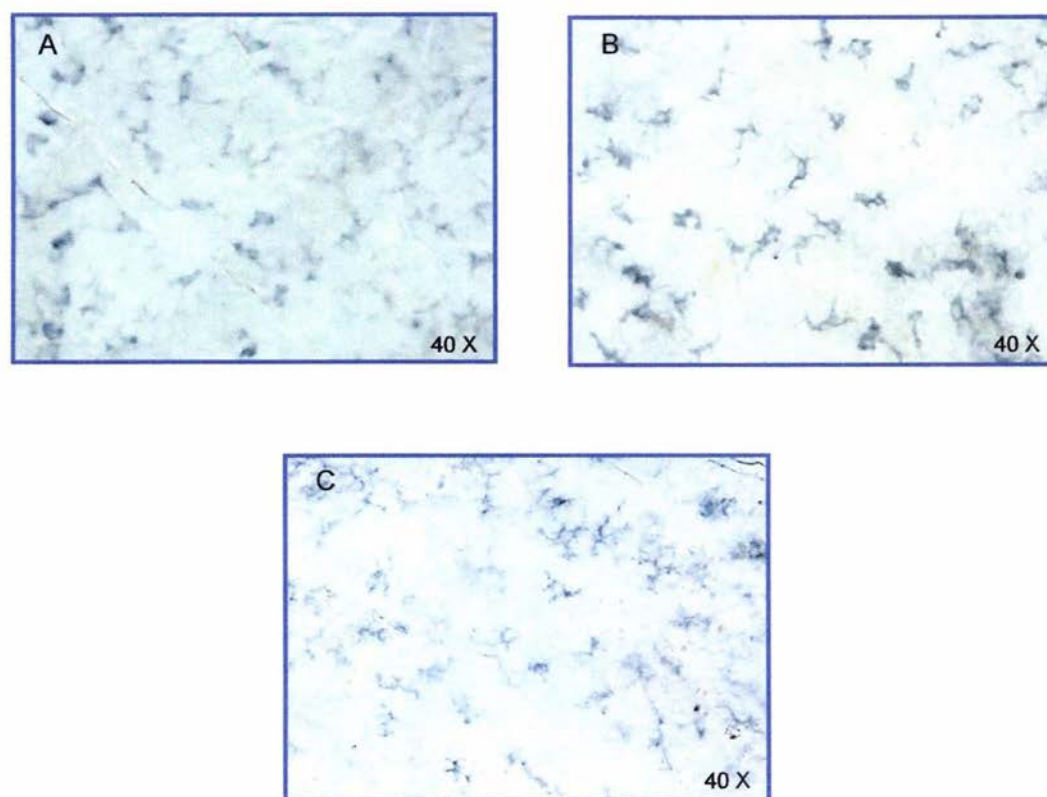
**Figura 11: Expresión de CD1a en láminas epidérmicas.** A: en la piel sin cultivar se pueden observar células CD1a+, con morfología típica dendrítica, B: después de tres días de cultivo se observa además de una notable disminución de células positivas, un incremento en tamaño, y una morfología más dendrítica. C: después de seis días de cultivo sigue observándose un decremento en el número de células positivas: morfológicamente algunas células presentan un aspecto más dendrítico, mientras otras parecen agruparse.

## Expresión de Langerina en láminas epidérmicas.



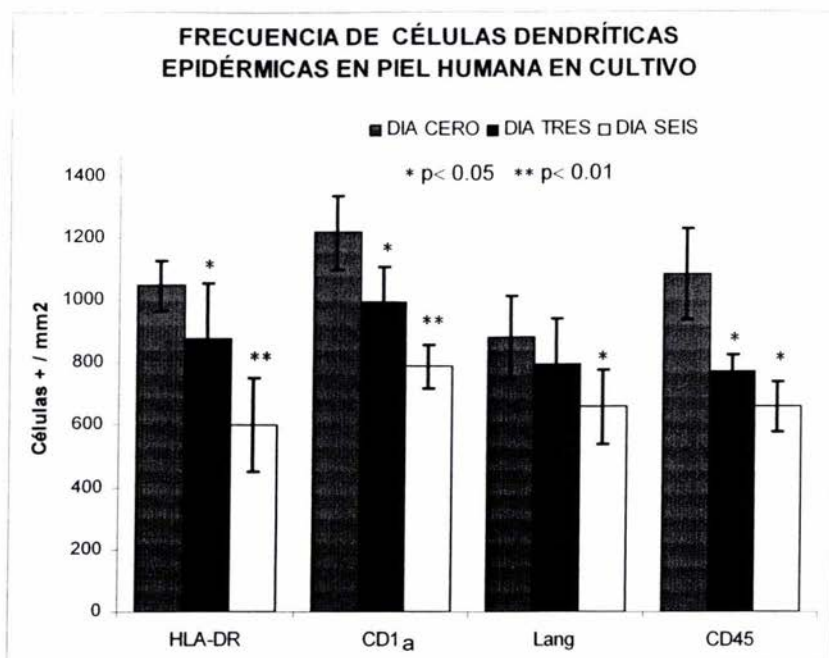
**Figura 12: Expresión de Langerina en láminas epidérmicas.** **A:** en la epidermis de piel sin cultivar se puede observar la morfología típica que presentan las LCs cuando son evidenciadas con este marcador, es decir, observamos dendritas tan cortas que prácticamente solo es evidente una parte del soma de la célula. **B:** células dendríticas epidérmicas Langerina+ a los tres días de cultivo se observa un incremento en tamaño, es evidente la diferencia morfológica que presentan estas células en comparación de las células Langerina+ de la piel no cultivada, ya que se observan claras prolongaciones dendríticas en casi todas las células. **C:** después de seis días de cultivo las células Langerina+ vuelven a observarse poco dendríticas, además al parecer este marcador disminuye en intensidad.

### Expresión de CD45 en láminas epidérmicas



**Figura 13: + Expresión de CD45 en láminas epidérmicas.** A: cuando la piel no ha sido cultivada es posible observar células CD45+ que presentan morfología típica dendrítica, B: después de tres días de cultivo la frecuencia de las células dendríticas epidérmicas CD45+ disminuye, estas tienen al parecer una morfología más dendrítica. C: después de seis días de cultivo sigue observándose un decremento en el número de células positivas y también es posible observar ese agrupamiento de células en algunas zonas.





**Gráfica 1:** Frecuencia de DCs epidérmicas que expresan los marcadores HLA-DR, CD1a, Langerina y CD45 en láminas epidérmicas obtenidas de piel sin cultivar (D0), y de piel cultivada durante tres (D3), y seis días (D6), se pueden observar la disminución en frecuencia de células positivas con el tiempo de cultivo.

Días de cultivo	Células positivas / mm <sup>2</sup>			
	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
Cero (D0)	1047 ± 81	1216 ± 118	882 ± 131	1082 ± 147
Tres (D3)	877 ± 176 D3<D0 p<0.05	997 ± 111 D3<D0 p<0.05	797 ± 147	773 ± 52 D3<D0 p<0.05
Seis (D6)	602 ± 150 D6<D0 p<0.01	789 ± 70 D6<D0 p<0.01	658 ± 117 D6<D0 p<0.05	658 ± 82 D6<D0 p<0.05

**Tabla 5:** Frecuencia de DCs epidérmicas en piel humana en cultivo

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio se utilizaron los explantes de piel en cultivo para poder observar si las LCs sufren cambios en morfología, frecuencia o distribución inducidos únicamente por el proceso de cultivo. Se utilizaron como marcadores las moléculas HLA-DR, CD1a, Langerina y CD45, dichas moléculas son expresadas por las LCs en piel normal.

El presente trabajo se centró en el estudio de tres de los marcadores más utilizados para la caracterización de las DCs en humano. HLA-DR es altamente expresado en la superficie de las LCs (Santambrogio, 1999; Banchereau, 2000), siendo estas las únicas células que expresan esta molécula en epidermis en condiciones normales. La expresión de la molécula CD1a está restringida a pocas células, entre las cuales se encuentran las DCs (Porcelli, 1999) siendo las únicas células que expresan esta molécula en piel. La molécula Langerina se utilizó por ser específica para las LCs, ya que sólo es expresada en células dendríticas epidérmicas (Valladeau, 2000 y 2001). Adicionalmente se utilizó el marcador CD45, pues las DCs epidérmicas expresan esta molécula también llamada antígeno leucocitario común, la cual denota el origen hematopoyético de las DCs.

Al utilizar la lámina epidérmica en lugar de cortes transversales convencionales se pueden apreciar mejor la morfología individual, y la distribución de las células, además, facilita y optimiza su cuantificación por área de tejido, pues las LCs forman una red bidimensional en la epidermis, a diferencia de las DCs dérmicas que forman una red tridimensional.

El cultivo *ex vivo* de explantes de piel tiene la ventaja sobre co-cultivos o monocultivos de varios tipos celulares *in vitro*, ya que la estructura, y las funciones de el tejido son similares a las que se presentan *in vivo* (Rambukkana, 1995), se ha demostrado que al cultivar explantes de piel de ratón se observa migración de LCs, esta migración no se observa cuando se cultiva solo la lámina epidérmica, por lo que se piensa que existe un factor en dermis que es necesario para la migración de las LCs (Heras- Chavarría, 2001).

En animales experimentales, el modelo de hipersensibilidad por contacto es una herramienta útil en el estudio de regulación y migración de LCs y DCs, sin embargo, por razones éticas, este modelo es menos útil y más difícil de aplicar en humanos, así pues, el modelo de cultivos de explantes de piel es considerado una muy buena alternativa, pues además de conservarse parcialmente la estructura original de la piel, es relativamente sencillo obtener muestras de piel humana y los resultados obtenidos son más fácilmente extrapolados a lo ocurrido *in vivo* en el organismo humano que los resultados que podrían obtenerse con animales experimentales.

El modelo de cultivo de explantes de piel ha sido utilizado en algunos estudios a) para observar migración y maduración de LCs en ratón (Larsen, 1990; Romani, 2001) y humano (Lukas, 1996; Romani, 2001), b) como método de obtención de DCs cutáneas murinas (Ortner, 1996; Romani, 2001), c) para observar el efecto de algunas citocinas como  $TNF\alpha$  y GM-CSF en LCs con el fin de elucidar la participación de estas células en algunas enfermedades de la piel (Rambukkana, 1995), d) para observar los efectos de algunos alérgenos por contacto (Rambukkana, 1996) y, e) recientemente, para observar el efecto de algunos microorganismos infecciosos como el virus del dengue (Limón, 2001).

Se ha reportado que en los explantes la estructura de la piel permanece casi intacta durante los primeros tres días de cultivo, después de cuatro a cinco días de cultivo se observa que algunas señales de degradación del tejido como vacuolización empiezan a aparecer y progresan a partir de los cuatro días de cultivo (Rambukkana, 1995) esto es debido a que para que las células permanezcan vivas en un explante en cultivo solo dependen de la perfusión del medio a través del tejido y no de la vascularización.

En el sistema *ex vivo* utilizado en este estudio de cultivos de explantes de piel humana, las DCs epidérmicas sufrieron ciertos cambios con el tiempo de cultivo. Al analizar las láminas epidérmicas procedentes de explantes de piel en cultivo de tres días, se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la frecuencia de células HLA-DR+, CD1a+ y CD45+, en las láminas epidérmicas

obtenidas de piel en cultivo durante tres días, y a los seis días de cultivo se observó una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) de las células positivas para las cuatro moléculas analizadas (HLA-DR, CD1a, Langerina, CD45). También se observaron cambios en la morfología de las células, ya que estas se hicieron más dendríticas (HLA-DR, CD1a, Langerina).

Al mismo tiempo se observaron cambios en la distribución celular, pues fue posible observar células agrupadas (sobre todo de células HLA-DR+ y CD1a+) y algunas regiones de la lámina epidérmica en las que se observó una menor frecuencia celular. Debido a que la molécula CD45 se expresa constitutivamente en las LCs (lo que denota su origen hematopoyético) y tomando en cuenta que se observó una disminución estadísticamente significativa de células CD45+, se puede afirmar así que en las láminas epidérmicas obtenidas de piel en cultivo de tres y seis días, la disminución en frecuencia de LCs observada es debida efectivamente a que hay menos células y no a un cambio de fenotipo o a una disminución en la expresión de los otros marcadores empleados.

Otro punto que debe tomarse en cuenta es que este estudio fue realizado en humanos, y debido a las variaciones biológicas entre los individuos de la especie humana pueden observarse desviaciones estándar aparentemente altas.

Según Rambukkana, et al. en la piel cultivada sin ningún estímulo antigénico después de tres días de cultivo, las DCs epidérmicas muestran un incremento en la expresión de MHC-II y adquieren una apariencia más dendrítica. En el sistema utilizado en este estudio no fue posible evidenciar un incremento en la expresión de HLA-DR, pero si se observaron las células con apariencia más dendrítica, este cambio fue más evidente cuando se analizó el marcador Langerina, que normalmente muestra un patrón de pequeñas marcas y rara vez se logra ver alguna célula con dendritas evidentes debido a que el anticuerpo utilizado para evidenciar esta molécula reconoce un epitopo intracelular, sin embargo, cuando la piel ha estado tres días en cultivo, las moléculas parecen distribuirse también hacia las dendritas celulares, y por tanto las células se ven más dendríticas.



La observación al sexto día de cultivo de agregados de células HLA-DR+ de células CD1a+ y también algunas veces de células CD45+ en láminas epidérmicas, coincide con lo reportado en 1996 por Lukas, et al. en donde observaron células agrupadas que expresaban altas cantidades de MHC-II, y se les compara de alguna forma con los "cordones" de células encontrados en epidermis de ratón por Larsen et al en 1990, Lukas intentó encontrar estos cordones hasta entonces no observados en humanos, y le fué posible observarlos en cortes tangenciales de epidermis (Lukas, 1996).

La disminución observada de las LCs en láminas epidérmicas de explantes de piel humana en cultivo puede deberse a varias causas. Una de las más probables es la migración de células, esto ha sido reportado previamente por Rambukkana, et al. en estudios en cortes transversales. Después de tres días de cultivo las células CD1a+ y HLA-DR+ están presentes en cantidades similares a las encontradas en piel sin cultivar, además su localización dentro de la epidermis también es similar (es decir, las células se encuentran en la capa suprabasal). Después de cinco días de cultivo, la migración de DCs es evidente, pues la mayoría son encontradas en la unión epidermis-dermis. En el día 7, solo unas cuantas células CD1a+, HLA-DR+ son observadas en la epidermis, sin embargo en la dermis superior se observa un aumento de estas células, lo que sugiere que la mayoría de las células CD1a+, HLA-DR+ cruzaron la membrana basal, también se encontraron células HLA-DR+ y algunas CD1a+ en el medio de cultivo, después de 3 días Rambukkana et al., sugieren que las células HLA-DR+, podrían ser DCs dérmicas o células veladas que escaparon de los vasos linfáticos y las células CD1a+ LCs que migran desde la epidermis (Rambukkana, 1995).

En estudios con diversos alérgenos por contacto se ha observado que después de la aplicación de estos, el número de LCs en epidermis disminuye, mientras que las células CD1a+ aumentan en dermis (Rambukkana, 1996).

Es importante conocer cuales son los factores responsables de los cambios fenotípicos y la migración espontánea en la epidermis de las LCs. Se ha sugerido que las funciones de las LCs incluyendo migración, expresión de moléculas de superficie y su supervivencia son reguladas por citocinas generadas dentro de la

epidermis (Rambukkana, 1996) cabe recordar que los queratinocitos son productores de varias citocinas en la epidermis (Bos, 1993, 1997; Maurer, 1999). Hay que remarcar también que las LCs interaccionan íntimamente con los queratinocitos en epidermis, están unidas a estos de manera homotípica por moléculas de E-cadherina, los queratinocitos expresan constitutivamente una variedad de citocinas, entre las que se encuentran IL-1, IL-7, y TGF- $\beta$ , y algunas otras que solo son expresadas cuando la homeostasis epidérmica es perturbada. Las citocinas que no son expresadas constitutivamente por los queratinocitos junto con IL1- $\alpha$  son responsables de iniciar cambios funcionales y fenotípicos en las LCs (Maurer, 1999).

La migración efectiva de LCs fuera de la epidermis requeriría por tanto de una reducción en la expresión de E-cadherina por estas células, lo que les permitiría disociarse de los queratinocitos circundantes, recibir al menos dos señales epidérmicas de citocinas (TNF $\alpha$  e IL1- $\beta$ ), un aumento en la expresión de ICAM-1 y moléculas coestimuladoras, un mantenimiento o un aumento en la expresión de integrinas  $\alpha 6$ , poseer actividad de metaloproteinasa-9 de matriz (una colagenasa que aparentemente permite el paso de LCs a través de la membrana basal hacia la unión dermis-epidermis). Un incremento en la expresión de receptor de quimiocinas CCR7 (importante en el "homing" de LCs) y una disminución en la expresión de los receptores de quimiocinas CCR1 y CCR5 (Cumberbatch, 2000).

Por lo tanto, queda todavía por demostrar si las LCs efectivamente han adquirido cambios fenotípicos en el sistema utilizado en este estudio, y verificar si están migrando hacia el medio de cultivo (analizando las células obtenidas de los sobrenadantes con alguno o varios de los marcadores utilizados) o hacia la dermis (por cortes en piel). Aunque también cabe la posibilidad de que las células estén muriendo *in situ* por apoptosis o necrosis en cuyo caso también debe verificarse, sea *in situ* o en los sobrenadantes.

## 8. CONCLUSIONES

- ❖ Al separar láminas epidérmicas de piel humana que ha sido cultivada como explantes completos por varios días, y cuantificar después las DCs epidérmicas, se encontró una disminución en la frecuencia de células positivas para los cuatro marcadores utilizados: HLA-DR, CD1a, Langerina y CD45. Esta disminución fue más evidente al sexto día de cultivo.
- ❖ En explantes de piel en cultivo, las DCs epidérmicas sufrieron cambios en cuanto a morfología, ya que las células se observaron más dendríticas, particularmente al tercer día de cultivo.
- ❖ También fue posible observar cambios en distribución de las DCs epidérmicas, ya que en los explantes en cultivo de seis días, se pudieron observar algunas veces agrupamiento de células HLA-DR+ y también grupos de células CD1a+.
- ❖ Existe la posibilidad de que los cambios observados sean debidos a que las LCs sufrieron migración espontánea o a que haya muerte celular.

## 9. PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar dobles marcajes en láminas epidérmicas para determinar cambios en subpoblaciones y la inducción o no de moléculas de activación (CD40, CD80 y CD86).
- ❖ Analizar los sobrenadantes para ver si hay migración de células dendríticas al medio de cultivo.
- ❖ Hacer marcajes en cortes congelados de los explantes cultivados, para observar si hay movilización de células dendríticas hacia la dermis.
- ❖ Determinar si ocurre apoptosis o necrosis en las células dendríticas durante el cultivo.



## 10. APÉNDICE I: PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

### a) Solución Salina Isotónica (SSI)

- 0.9 g de NaCl
- Disolver y llevar a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada.

### b) Albúmina Sérica Bovina (BSA) 0.2%

- 1 g de BSA (Sigma, Cat. A9647)
- Disolver y llevar a 500 mL con PBS 1X
- Filtrar
- Almacenar a 4° C por periodos cortos de tiempo

### c) BSA 1% (solución para anticuerpos)

- 0.3 g de BSA
- Disolver y llevar a 30 mL con PBS 1X
- Filtrar
- Almacenar a 4° C por periodos cortos de tiempo

### d) PBS 1X

- NaCl 8 g
- KCl 0.2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15 g
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g

Aforar a 900 mL, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000mL

### e) Colagenasa-Dispasa

Pesar 4mg de Colagenasa (*Clostridium histolyticum*, type I, Sigma) diluir en 1 mL de PBS 1x, pesar 99 mg de Dispasa (*Bacillus polymyxa*, 1.21 U/mg, GIBCO). Adicionar 240µL de colagenasa (4mg/mL) y llevar a 30 mL con PBS 1X. Almacenar a -20° C en alícuotas de 1mL.

## 11. APÉNDICE II: Resultados individuales.

Frecuencia (células+ /mm<sup>2</sup>) de células dendríticas epidérmicas HLA-DR+, CD1a+, Langerina+ y CD45+ en láminas epidérmicas de explantes de piel en cultivo. Todas las muestras fueron tomadas de abdomen de pacientes de sexo femenino.

MUESTRA A (edad 39 años)				
días de cultivo	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
cero	1022 ± 111	1132 ± 179	737 ± 164	886 ± 211
tres	661 ± 154	1170 ± 168	616 ± 91	764 ± 106
seis	604 ± 114	828 ± 119	462 ± 89	770 ± 104

MUESTRA B (edad 53 años)				
días de cultivo	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
cero	965 ± 95	1370 ± 68	992 ± 151	1301 ± 179
tres	888 ± 151	907 ± 107	960 ± 204	779 ± 149
seis	543 ± 89	747 ± 66	753 ± 94	713 ± 96

MUESTRA C (edad 42 años)				
días de cultivo	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
cero	1181 ± 135	1316 ± 136	1046 ± 134	1090 ± 167
tres	1132 ± 104	1046 ± 150	932 ± 168	800 ± 127
seis	435 ± 161	703 ± 94	642 ± 89	787 ± 118

MUESTRA D (edad 37 años)				
días de cultivo	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
cero	1019 ± 150	1158 ± 210	810 ± 86	1072 ± 104
tres	780 ± 118	948 ± 95	709 ± 201	691 ± 96
seis	579 ± 137	783 ± 180	717 ± 185	578 ± 92

MUESTRA E (edad 36 años)				
días de cultivo	HLA-DR	CD1a	Langerina	CD45
cero	1047 ± 134	1107 ± 102	826 ± 85	1060 ± 104
tres	926 ± 90	915 ± 117	770 ± 110	831 ± 112
seis	842 ± 78	884 ± 116	716 ± 96	719 ± 107

## 12. REFERENCIAS

- Alonso, L. and E. Fuchs. "Stem cells of the skin epithelium." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 100 Suppl 1 (2003): 11830-35.
- Banchereau, J. et al. "Immunobiology of dendritic cells." Annu. Rev. Immunol. 18 (2000): 767-811.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman. "Dendritic cells and the control of immunity." Nature 392.6673 (1998): 245-52.
- Becerril-García M.A. "Expresión de receptores de reconocimiento de patrones en células dendríticas epidérmicas murinas durante el periodo neonatal. Tesis de Licenciatura. UNAM, FES Cuautitlán., 2002.
- Bos, J. D. "The skin as an organ of immunity." Clin. Exp. Immunol. 107 Suppl 1 (1997): 3-5.
- Bos, J. D. and M. L. Kapsenberg. "The skin immune system: progress in cutaneous biology." Immunol. Today 14.2 (1993): 75-78.
- Cella, M., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr. Opin. Immunol. 9.1 (1997): 10-16.
- Cumberbatch, M. et al. "Langerhans cell migration." Clin. Exp. Dermatol. 25.5 (2000): 413-18.
- Dermott, R. and et al. "Birbeck granules are subdomains of endosomal recycling compartments in human epidermal langerhans cells, wich form where langerin accumulates." Mol. Biol. Cell 13 (2002): 317-35.
- Fawcett, D. Histología. 12 ed. McGraw-Hill, 1995.
- Flores-Romo, L. "In vivo maturation and migration of dendritic cells." Immunology 102.3 (2001): 255-62.

- Freinkel, R. and D. Woodley. The Biology of the Skin. The Parthenon Publishing Group, 2001.
- Gessner, F. Histología. 3 ed. México: Editorial Médica Panamericana, 1999.
- Girolomoni, G. and S. Corinti. "Dendritic Cells (T-Lymphocyte Stimulating)." Encyclopedia of Life Sciences, Nature, 2001.
- Hart, D. N. "Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response." Blood 90.9 (1997): 3245-87.
- Heras-Chavarria, M. B. "Estudio fenotípico y funcional de las células dendríticas en la epidermis del ratón en el periodo perinatal." Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, 2001.
- Hunger, R. E. et al. "Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells." J. Clin. Invest. 113.5 (2004): 701-08.
- Janeway, C., P. Travers, and M. Walport. Inmunobiología. España: Masson, 2000.
- Katz, S. I., K. Tamaki, and D. H. Sachs. "Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow." Nature 282.5736 (1979): 324-26.
- Larsen, C. P. et al. "Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants." J. Exp. Med. 172.5 (1990): 1483-93.
- Limón-Flores, A. Interacción Inicial del virus del Dengue con células cutáneas Tesis de Maestría. CINVESTAV, IPN, 2001.
- Lukas, M. et al. "Human cutaneous dendritic cells migrate through dermal lymphatic vessels in a skin organ culture model." J. Invest. Dermatol. 106.6 (1996): 1293-99.
- Maurer, D. and G. Stingl. "Dendritic Cells in the Context of Skin Immunity." Academic Press, 1999. 111-19.
- Mellman, I., S. J. Turley, and R. M. Steinman. "Antigen processing for amateurs and professionals." Trends Cell. Biol. 8.6 (1998): 231-37.



- Mizumoto, N. and A. Takashima. "CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers." J. Clin. Invest. 113.5 (2004): 658-60.
- Ortner, U. et al. "An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells." J. Immunol. Methods 193.1 (1996): 71-79.
- Porcelli, S. A. and R. L. Modlin. "The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids." Annu. Rev. Immunol. 17 (1999): 297-329.
- Rambukkana, A. et al. "In situ behavior of human Langerhans cells in skin organ culture." Lab. Invest. 73.4 (1995): 521-31.
- Rambukkana, A. et al. "Effects of contact allergens on human Langerhans cells in skin organ culture: migration, modulation of cell surface molecules, and early expression of interleukin-1 beta protein." Lab. Invest. 74.2 (1996): 422-36.
- Romani, N. et al. "Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance." Int. Rev. Cytol. 207 (2001): 237-70.
- Ross and et al. Histología, Texto y Atlas. 3ra ed. México: Editorial Médica Panamericana, 1999.
- Sandberg, J. and R. Glas. "Antigen Processing." Encyclopedia of Life Sciences Nature, 2001.
- Santambrogio, L. "Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96.26 (1999): 15050-55.
- Stagg, A. and S. Knight. "Antigen-Presenting Cells." Encyclopedia of Life Sciences Nature, 2001.
- Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig. "Dendritic cells: features and functions." Immunol. Rev. 53 (1980): 127-47.
- Stingl, G., K. Tamaki, and S. I. Katz. "Origin and function of epidermal Langerhans cells." Immunol. Rev. 53 (1980): 149-74.

- Trowbridge IS and Thomas ML. CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. Annu. Rev. Immunol. 12 (1993):85
- Valladeau, J. et al. "Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues." J. Immunol. 168.2 (2002): 782-92.
- Valladeau, J. et al. "Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules." Immunity. 12.1 (2000): 71-81.
- Vandenabeele, S. and L. Wu. "Dendritic cell origins: puzzles and paradoxes." Immunol.Cell. Biol. 77.5 (1999): 411-19.
- Wang, J. and T. Watanabe. "Antigen Presentation to Lymphocytes." Encyclopedia of Life Sciences Nature, 2001.
- Zierhut, M. et al. "Immunology of the skin and the eye." Immunol.Today 17.10 (1996): 448-50.

Si te rezagas, resiste la tentación de rendirte  
---Dave Weinbaum---