



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**MIGRACIÓN DE CÉLULAS LINAJE NEGATIVAS DE SANGRE
PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS SANOS EN RESPUESTA A
ESTÍMULOS QUIMIOTÁCTICOS PRESENTES EN PIEL INFLAMADA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ISAAC TORRES FIERRO



MÉXICO, D.F.

2012



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
VOCAL: PROFEROR: LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO
SECRETARIO: PROFESOR: MONICA BERENICE HERAS CHAVARRIA
1^{er} SUPLENTE: PROFESOR: SONIA MAYRA PÉREZ TAPIA
2^{do} SUPLENTE: PROFESOR: ARACELI MENDIETA RERGIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES,
CENTRO MÉDICO NACIONAL S. XXI, IMSS.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS

SUSTENTANTE:

ISAAC TORRES FIERRO

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Bonifaz por todo el apoyo, paciencia y confianza brindada para la realización de este trabajo.

A Gibrán por sus valiosos aportes en la supervisión de cada parte de este proyecto y por estar siempre dispuesto a ayudar.

A Aniela por su valiosa asesoría en las técnicas experimentales.

A todos mis compañeros de la UIMEA: Marcela, Tania, Paty Rojo, Iliana, Octavio, Alberto, David y Rosaurora, por hacer de este laboratorio un lugar muy agradable para trabajar.

DEDICATORIAS

Primero que nada, gracias a Dios por todas las bendiciones que tengo en esta vida.

A mis Padres, no hay palabras para agradecer todo lo que son para mí.

Padre, gracias por todo tu esfuerzo y apoyo en todos estos años, gracias por estar allí para mí.

Madre mía, gracias por todo lo que haces para mí, eres la mejor mamá que he podido tener.

A mis hermanas Doraly y Yanelly por todo su amor.

A todos mis amigos de la facultad que me brindaron tantos momentos agradables: Oscar Pérez, Polett, Jose Juan, Dulce, Alejandra, Kikin, Salvador, Sujhey, Angie, Narda, Arely, Servando, Oscar (Portero), Geovanni, Kano, Rosaurora, Zabdi, Cecilia y Gina.

INDICE:

Índice de figuras y tablas.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumen.....	iii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
• Origen de las células dendríticas.....	2
• Clasificación de las células dendríticas.....	4
• Poblaciones de DCs en sangre periférica.....	4
– cDCs.....	5
– pDCs.....	6
– cDCs M-DC8 ⁺	6
• Poblaciones de DCs en piel.....	8
– Células de Langerhans.....	8
– Células dendríticas mieloides dermales.....	8
– pDCs residentes en dermis.....	8
– DCs inflamatorias dermales.....	8
• DCs y quimiotaxis.....	9
• DCs e inflamación.....	12
• DCs en enfermedades autoinmunes.....	13
– Psoriasis.....	13
– Lupus eritematoso discoide.....	14
3. Antecedentes directos al trabajo.....	15
4. Justificación.....	17
5. Hipótesis.....	18
6. Objetivos.....	18
7. Metodología.....	19
8. Resultados.....	23
9. Discusión de resultados.....	34
10. Conclusiones.....	39
Referencias.....	40

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1.....	3
Figura 2.....	9
Figura 3.....	16
Figura 4.....	22
Figura 5.....	24
Figura 6.....	25
Figura 7.....	26
Figura 8.....	27
Figura 9.....	28
Figura 10.....	29
Figura 11.....	30
Figura 12.....	31
Figura 13.....	31
Figura 14.....	33
Tabla 1.....	11

ABREVIATURAS

APC. Célula presentadora de antígeno profesional.
DA. Dermatitis atópica.
BDCA. Blood dendritic cell antigen.
cDCs. Células dendríticas convencionales.
CLA. Antígeno linfocitario cutáneo.
CLP. Precursor linfoide común.
CMP. Precursor mielóide común.
CDP. Precursor común de las células dendríticas.
DCs. Células dendríticas.
GM-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
GMP. Progenitores de granulocitos/macrófagos.
GPCRs. Receptores acoplados a proteínas G.
HSC. Células troncales hematopoyéticas.
ICAM-1. Intercellular adhesion molecule-1.
IFN. Interferón.
LCs. Células de Langerhans.
LEC. Lupus eritematoso cutáneo.
LECC. Lupus eritematoso cutáneo crónico.
LED. Lupus eritematoso discoide.
LEG. Lupus eritematoso generalizado.
MCP-1. Monocyte chemotactic protein-1.
mDCs. Células dendríticas mieloides.
MHC. Complejo principal de histocompatibilidad.
MDP. Progenitor de células dendríticas y macrófagos.
PAMPs. Patrones moleculares asociados a patógenos.
PASI. Índice de severidad y área de psoriasis.
PBMCs. Células mononucleares de sangre periférica.
pDCs. Células dendríticas plasmacitoides.
Pre-DCs. Precursor de células dendríticas convencionales.
PRRs. Receptores de reconocimiento de patrones.
PSGL-1. Ligando 1 de la P-selectina.
RNAm. RNA mensajero.
SDF-1. Stromal cell-derived factor.
SFB. Suero fetal bovino.
SN LED. Sobrenadante de cultivos de células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED.
SN SANO. Sobrenadante de cultivos de células de dermis de individuos sanos.
TLRs. Receptores tipo toll.
UIMEA. Unidad de investigación médica en enfermedades autoinmunes.
VCAM-1. Vascular cell adhesion molecule-1.

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno profesionales (APCs) cuyas funciones principales son la orquestación de la respuesta inmune y el mantenimiento de la tolerancia inmunológica¹. En sangre periférica se pueden identificar dos poblaciones de DCs, las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) y las células dendríticas convencionales (cDCs). Dentro de las cDCs se identifica además una población de DCs inflamatorias que se caracteriza por la expresión del marcador M-DC8². Por otro lado, en la piel de individuos sanos se han identificado tres poblaciones de DCs: Las células de Langerhans, las DCs residentes de dermis y bajos números de pDCs³. Diferentes subpoblaciones de DCs han sido implicadas en la patogénesis de enfermedades autoinmunes con manifestaciones cutáneas. En las lesiones de pacientes con psoriasis se ha encontrado que las pDCs se encuentran activadas crónicamente produciendo IFN α/β ⁴, además de que existen cDCs inflamatorias produciendo TNF e iNOS⁵. En el caso del Lupus Eritematoso Discoide (LED), en biopsias de lesiones se han encontrado pDCs expresando la proteína inducible por IFN α/β MxA⁷ y en un estudio realizado en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) se advirtió la presencia de cDCs con características inflamatorias⁶. La presencia de estas poblaciones de DCs inflamatorias en la piel, ausentes en condiciones normales, ha dado pie a la propuesta de que precursores en la sangre periférica pueden redistribuirse hacia la piel en condiciones de inflamación. En el presente trabajo, se evaluó la capacidad migratoria de poblaciones de células Lin⁻ de sangre periférica de individuos sanos en respuesta a dos quimiocinas inflamatorias (IL-8 y SDF-1). Se evaluó además la movilización inducida por estímulos quimiotácticos producidos por las células de la dermis de individuos sanos (SN SANO) y de pacientes con LED (SN LED). Las poblaciones estudiadas fueron las cDCs, pDCs, cDCs M-DC8⁺ y una población de células Lin⁻ que está siendo caracterizada en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Autoinmunes (UIMEA) y que se denominó "nDC". Se encontró que, las nDC son una población con alta movilidad, mientras que las pDCs y cDCs exhiben muy poca movilidad a los estímulos evaluados. La población nDC mostró quimiotaxis en respuesta a IL-8 y a SDF-1. También se observó que en el SN LED existen agentes quimiotácticos que atraen a las poblaciones en estudio. Los resultados sugieren que las nDCs pueden ser un posible precursor de sangre periférica que posee alta capacidad de movilizarse tanto a piel sana como a piel inflamada para su potencial participación en procesos inflamatorios crónicos.

1. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno profesionales derivadas de médula ósea. Juegan un papel central en la iniciación y orquestación de la respuesta inmune y se encuentran distribuidas en tejidos periféricos, órganos linfoides y sangre periférica.

Las DCs participan tanto en la respuesta inmune a distintos patógenos como en la inducción de tolerancia inmunológica a antígenos inocuos y/o propios¹. Ambas funciones requieren de interacciones específicas con las células T en tejidos linfoides secundarios. El resultado de estas interacciones depende de la modulación e integración de varias señales: Adhesión, formación de complejos MHC-péptido-TCR, la expresión de moléculas coestimuladoras y la liberación de mediadores solubles⁸.

En condiciones de reposo, las DCs residen en tejidos periféricos y órganos linfoides en estado de inmadurez caracterizado por una baja expresión en superficie de moléculas de clase II (MHCII), moléculas coestimuladoras y moléculas de adhesión⁹. Las DCs inmaduras capturan y presentan continuamente autoantígenos, circulando entre los tejidos periféricos y los órganos linfoides, manteniendo tolerancia inmunológica al inducir la eliminación o anergia de células T autorreactivas o inducir el desarrollo de células T reguladoras^{10,11}. Por otro lado, las señales asociadas con inflamación, por infecciones o daño tisular, inducen la maduración de las DCs, proceso que involucra el paso de la célula dendrítica de un estado de captación de antígenos a una célula presentadora de antígenos capaz de iniciar la respuesta inmune adaptativa.

Las DCs interactúan a través de receptores especializados llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) con patógenos los cuales expresan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PRRs más estudiados son los receptores tipo toll (TLRs), familia de proteínas que se expresan ya sea en la superficie celular o en endosomas y que son capaces de reconocer moléculas típicas de los patógenos como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano, flagelina, RNA viral de una o dos cadenas, DNA viral o DNA bacteriano, etc^{12,13}.

El proceso de maduración de una célula dendrítica involucra varios factores: 1) Cambios en la morfología celular que incluyen la pérdida de estructuras de adhesión, reorganización del citoesqueleto y la adquisición de mayor motilidad celular; 2) Disminución de la expresión de receptores endocíticos/fagocíticos; 3) Secreción de diferentes citocinas/quimiocinas para activar y reclutar distintas estirpes celulares; 4) Aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40; 5) Translocación de compartimentos de moléculas de MHC clase II hacia la superficie celular y 6) Secreción de citocinas y quimiocinas capaces de diferenciar y polarizar células efectoras¹⁴.

Una vez maduras, las DCs cargadas con antígeno dirigen la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, lo cual lleva a la proliferación y diferenciación de células T en células cooperadoras o efectoras. Las DCs también son importantes en el montaje de la respuesta inmune humoral debido a su capacidad para interactuar directamente con células B y como presentadoras de antígenos sin procesar.

De esta manera, las células dendríticas tienen un papel central regulando la activación y progresión de la respuesta inmune, los mecanismos generales de mantenimiento de la tolerancia deben actuar correctamente para mantener este equilibrio, ya que la pérdida de este equilibrio puede derivar en desórdenes autoinmunes.

2. ANTECEDENTES

Origen de las células dendríticas.

En cuanto a su origen, las DCs provienen de las células troncales hematopoyéticas (HSC) las cuales generan los precursores mieloides comunes (CMP) y los progenitores linfoides comunes (CLP). Con el estudio de la expresión de Flt3 en las DCs progenitoras se demostró que las DCs pueden ser originadas a partir de CMP y de CLP¹⁵. Con respecto a su origen mieloides, el CMP da lugar al progenitor de células dendríticas y macrófagos (MDP). El MDP da lugar a monocitos y al precursor común de DCs (CDP), que a su vez da origen a las pDCs y al precursor de las cDCs (pre-DCs). Las pre-DCs se encuentran en médula ósea, sangre y bazo. Cuando las pre-DCs entran a los nódulos linfáticos desde la sangre a través de las venas del endotelio alto y se integran a la red de DCs, adquieren el fenotipo y morfología de las células dendríticas convencionales (cDCs)¹⁶. Por otro lado, los monocitos pueden migrar

a los tejidos bajo condiciones inflamatorias y dar lugar a macrófagos y a algunas poblaciones de DCs denominadas como inflamatorias¹⁷.

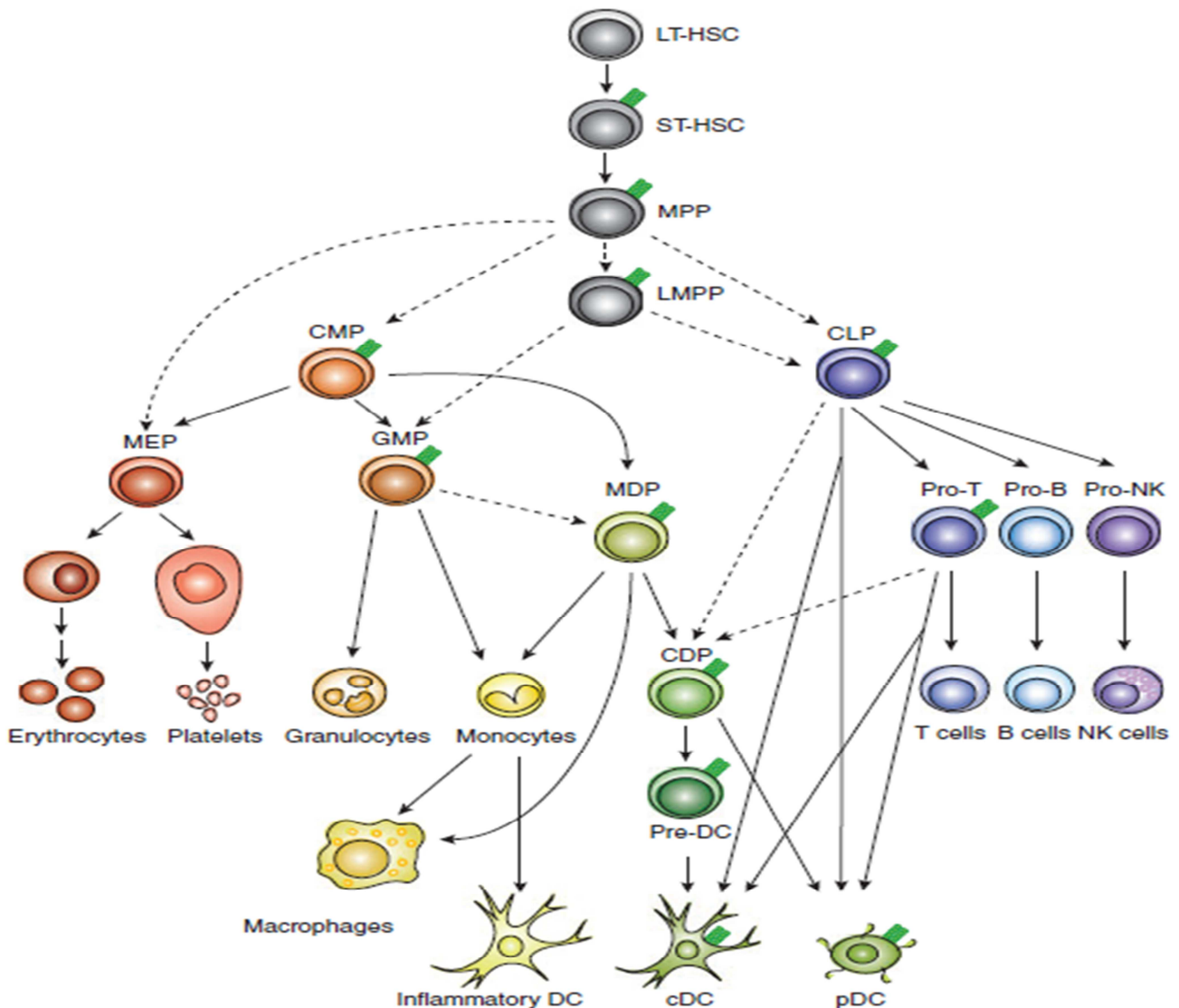


Figura 1. Desarrollo hematopoyético de células dendríticas¹⁸. En la figura es posible observar en orden jerárquico el proceso de diferenciación de las distintas estirpes celulares presentes en sangre periférica a partir de las células troncales hematopoyéticas (HSC). Se puede observar que, como se había descrito anteriormente, el progenitor mieloide común (CMP) da origen al progenitor de macrófagos y DCs (MDP). También se observa como el progenitor de DCs (CDP) puede tener un origen tanto mieloide como linfocítico. Por otra parte, los monocitos que pueden provenir tanto de GMP (Progenitores de granulocitos/macrófagos) como de MDP pueden dar origen a las DCs inflamatorias. Finalmente CDP da origen tanto a Pre-DCs como a pDCs, pudiendo estas últimas originarse también a partir de CLP directamente.

CLASIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Históricamente, las DCs han sido clasificadas en base a diferentes criterios como morfología, ubicación, origen, estado de activación, etc. De esta manera, tenemos poblaciones de células dendríticas de tejidos, de sangre periférica y de piel.

POBLACIONES DE DCs EN SANGRE PERIFÉRICA

En sangre periférica se han identificado dos poblaciones principales de DCs, las DCs convencionales (cDCs, también llamadas mDCs o DC1) y las DCs plasmacitoides (pDCs, también llamadas DC2).

Fenotípicamente, las DCs son caracterizadas por la ausencia de marcadores específicos de otros linajes como: CD3, (Linfocitos T); CD14, (Macrófagos); CD19, (Linfocitos B) y CD56, (células NK) y por la expresión de HLA-DR. En base a la expresión diferencial de CD11c y CD123 (la cadena α del receptor de IL-3, IL-3R α) en sangre periférica de individuos sanos, las DCs se pueden identificar como: cDCs (CD11c⁺ CD123^{int-baja}) y pDCs (CD11c⁻ CD123^{alta}), estas poblaciones de DCs tienen papeles distintos y complementarios en la inducción de la respuesta inmune¹⁴. En investigaciones adicionales se ha propuesto que las cDCs comprenden tres distintas subpoblaciones, que difieren en su expresión de CD16, CD1b/c y BDCA-3¹⁹. Por otro lado, se ha propuesto que la subpoblación de cDCs CD16⁺, puede además ser subdividida en cDCs M-DC8⁺ y cDCs M-DC8⁻²⁰.

Las pDCs poseen alta expresión de la cadena α del receptor de IL-3 (CD123), esta subunidad acoplada con la subunidad β completa el receptor para la IL-3, la cual es muy importante en el desarrollo de las pDCs y en la supervivencia y proliferación de células hematopoyéticas. La subunidad α del receptor de IL-3 es específica para esta citocina; mientras que, la subunidad β es común además para el receptor de IL-5 y el receptor de GM-CSF²¹ (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos).

Las pDCs, después de ser activadas, son parecidas morfológica y fenotípicamente a las cDCs. Originalmente se creía que provenían de precursores distintos, pero datos recientes han demostrado que ambas poblaciones pueden ser derivadas tanto de precursores linfoides como mieloides¹⁵. Las pDCs y las cDCs comparten algunas propiedades funcionales tales como reconocimiento de patógenos mediado por TLRs, receptores tipo lectina C²² y

receptores tipo NOD²³, entre otros; además de la secreción de citocinas, y que al encontrarse con inmunógenos ambas poblaciones maduran y expresan CD80, CD83, CD86, CD40 y HLA-DR. Se ha descrito que las pDCs, al igual que las cDCs pueden también internalizar, procesar y presentar antígeno a células T CD4⁺ y además, a través de un proceso llamado *presentación cruzada*, presentar antígeno *in vitro* a células T CD8⁺ a través de moléculas MHC Clase I²⁴. Estos descubrimientos sugieren que las pDCs pueden funcionar como células presentadoras de antígeno profesionales (APCs); sin embargo, si las pDCs pueden de hecho funcionar como APCs *in vivo* durante respuestas inmunes y si esto promueve inmunidad mediada por células T y/o generar tolerancia, se mantienen como temas sin resolver.

A pesar de estas similitudes, las pDCs presentan diferencias importantes comparadas con las cDCs; en primer lugar, las pDCs poseen varias características de linfocitos, como el hecho de que en el estado de reposo las pDCs carecen de la morfología dendrítica, presentando una morfología de célula plasmática y que sus patrones de localización y recirculación o *homing* son más similares a los de los linfocitos¹⁷. Las pDCs tienen una vida media relativamente larga, mientras que el recambio de las cDCs es más breve²⁵. Se ha propuesto además que, las pDCs están más especializadas en el reconocimiento de virus y patógenos a través de la expresión de receptores tipo Toll intracelulares como TLR 7 y TLR 9²⁶.

A continuación se hace una descripción breve de las principales características de las poblaciones de DCs en sangre periférica.

cDCs.

Las cDCs son células presentadoras de antígeno profesionales con alta capacidad fagocítica como células inmaduras y alta capacidad productora de citocinas como células maduras. Son células que se encuentran presentes en la circulación y en los tejidos y que por su alta capacidad migratoria pueden migrar hasta las zonas de células B y células T en los órganos linfoides secundarios. Las cDCs regulan las respuestas de las células T, tanto en ausencia como en presencia de infecciones. Son células con un tiempo de vida media generalmente corto, expresan los TLRs 2, 3, 4, 5, 6 y 8 y tienen la capacidad de producir grandes cantidades de IL-12 en respuestas antibacterianas y antivirales²⁷.

Recientemente se propuso que las cDCs pueden dividirse en dos poblaciones; cDC1 (CD1c⁺CD141⁻ DCs) y cDC2 (CD1c⁻CD141⁺ DCs)¹. Las cDC2 no expresan CD1a ni sintetizan IL-12, además que producen altos niveles de IL-10. Sin embargo, ambas poblaciones poseen la misma capacidad presentadora de antígeno²⁸.

pDCs.

Las pDCs son consideradas como la línea frontal en la inmunidad antiviral debido a su capacidad para producir altas cantidades de interferón (IFN) tipo I cuando son expuestas a virus²⁹. La notable capacidad de las pDCs para producir IFN se debe a: i) retención endosomal prolongada de ligandos de TLR; ii) expresión basal alta del factor de transcripción IRF7, regulador maestro de la respuesta de IFN; iii) morfología secretoria plasmacitoide parecida a la morfología de las células plasmáticas secretoras de anticuerpos; iv) expresión de receptores de superficie específicos que modulan la secreción de IFN, como ILT7, BDCA-2 (Blood dendritic cell antigen) y, en el caso del ratón, el Siglec-H¹⁷.

Las pDCs se activan al ser expuestas a CpGs y expresan ICOS-L al madurar, esto les permite generar células T reguladoras productoras de IL-10³⁰, además que expresan los TLRs 7 y 9 en endosomas para detectar ácidos nucleicos³¹. Las pDCs se localizan en órganos linfoides primarios, secundarios y terciarios (agregados y folículos), el hígado y la sangre. Durante condiciones patológicas, las pDCs migran de la médula ósea o de la circulación hacia tejidos dañados a través de las venas del endotelio alto. Además, se ha propuesto que sensan daño de tejido y promueven la reparación de tejido dañado en la piel³.

cDCs M-DC8⁺

En algunos trabajos se ha descrito una tercera población de DCs de sangre periférica contenida dentro de las cDCs, caracterizadas por la expresión del marcador M-DC8 (6-sulfo LacNAc)², el cual es una modificación del ligando 1 de la P-selectina (PSGL-1), esta subpoblación, también llamada SlanDC, carece de la expresión del antígeno linfocitario cutáneo (CLA) y no une ni P- ni E-selectina. Fenotípicamente, las cDCs M-DC8⁺ se han definido como CD1c⁻, CD11c⁺, CD16⁺, CD14⁻, C5aR⁺, CD45RA⁺³². Las cDCs M-DC8⁺ expresan los receptores para las anafilotoxinas C5a y C3a (C5aR y C3aR), el receptor de baja afinidad para IgG (FcγIII) que recluta células a sitios de inflamación y los receptores

CX3CR1 y CXCR4, por lo cual migra en respuesta a CX3CL1 (Fractalcina) y CXCL12 (SDF-1)⁵.

Se ha propuesto que esta población posee importantes propiedades proinflamatorias debido a que produce altas cantidades de TNF- α en respuesta a LPS, más que los monocitos o las otras poblaciones de DCs². Datos funcionales revelan que las cDCs M-DC8⁺ son potentes inductoras de células T antígeno-específicas y que en las células NK promueven la proliferación, producción de IFN- γ y el potencial tumoricida³³.

Debido a sus importantes propiedades proinflamatorias, las cDCs M-DC8⁺ han sido relacionadas con enfermedades caracterizadas por una respuesta inflamatoria tipo Th1 tales como Psoriasis y Artritis Reumatoide³². Se ha propuesto que las cDCs M-DC8⁺ son importantes en la patogénesis de la Psoriasis debido a que pueden ser estimuladas con complejos formados por RNA propio y el péptido antimicrobiano LL37 y producir altos niveles de citocinas proinflamatorias⁵. Además, en muestras de piel con Psoriasis se han encontrado cDCs M-DC8⁺ expresando IL-23, TNF- α e iNOS lo que indica que estas células posiblemente corresponden a la población previamente descrita como Tip-DCs en esta patología. Las Tip-DCs han sido definidas como DCs inflamatorias dermales que expresan TNF- α e iNOS y que se acumulan en piel con Psoriasis, se cree que estas células son la principal población inflamatoria efectora de DCs en Psoriasis³⁴. Con respecto a su fenotipo, las Tip-DCs han sido descritas como DCs CD11c⁺CD1c⁻ con alta expresión de HLA-DR y de las moléculas coestimuladoras (CD40 y CD86); sin embargo, aún no se ha identificado el origen de estas células.

La expresión del marcador M-DC8 en las cDCs es excluyente para la expresión de CLA. CLA es un carbohidrato de membrana miembro de la familia de las selectinas que confiere a las células que lo expresan un tropismo cutáneo y la capacidad de infiltrar la piel, esta molécula se encuentra en aproximadamente 10 al 25% de células T CD3⁺ CD45RO⁺, así como en neutrófilos, monocitos y células dendríticas. La expresión de CLA se induce durante la activación del linfocito en el ganglio linfático. CLA ha sido reconocida como una de las moléculas más importantes para el *homing* a piel y su expresión en linfocitos activados favorece el infiltrado inflamatorio. Consecuentemente, CLA ha sido asociado con la patogénesis o severidad de muchas enfermedades inflamatorias, tales como Dermatitis Atópica, Psoriasis y Lepra³⁵.

POBLACIONES DE DCs EN PIEL.

La piel, como la primera línea de defensa del organismo, provee protección en contra de agentes físicos, químicos y patógenos. En la piel se han identificado tres poblaciones de DCs en individuos sanos: Las células de Langerhans, las DCs mieloides residentes de dermis y las pDCs, mientras que en la piel inflamada se encuentra presente una cuarta población, las DCs inflamatorias dermales³.

Células de Langerhans. Las células de Langerhans (LCs) son la población predominante de DCs en la epidermis y por lo tanto, forman parte de la primera línea de defensa en contra de los antígenos que penetran la piel³⁶, estas células expresan la proteína Langerina, la cual está asociada a los gránulos de Birbeck. Se ha descrito que las LCs expresan los TLRs 1, 2, 3, 5, 6 y 10³⁷ y responden a ligandos de TLR 2 y TLR 3 con la producción de IL-6, IL-8 y TNF- α . La función principal de las LCs es captar, procesar antígenos y presentarlos a las células T en los nódulos linfáticos que infiltran la piel.

Células dendríticas mieloides dermales. La población de DCs que reside en la dermis de la piel es conocida como DCs mieloides dermales³⁸. Fenotípicamente esta población es CD1c⁺ CD11c⁺ HLA-DR⁺ CD45⁺ CD14⁻; además, expresa CCR7 y puede migrar en respuesta a CCL19. Expresa los PRRs TLR 2, TLR 4, CD206 y DC-SIGN³⁹. Esta población capta antígenos, madura y migra a los nódulos linfáticos locales y presenta antígenos a células T⁴⁰.

pDCs residentes de dermis. En piel sana las pDCs son muy escasas⁴¹, esta población se ha relacionado con la patogénesis de la Psoriasis en donde se argumenta que una temprana activación de estas células seguida por la activación de las DCs mieloides residentes de piel provoca el inicio de dicha patología⁴².

DCs inflamatorias dermales. En la piel inflamada se ha encontrado presente una cuarta población de DCs, las DCs inflamatorias dermales caracterizadas porque, a diferencia de las DCs mieloides residentes de dermis que son CD1c⁺, esta población es CD1c⁻⁴³, en Psoriasis se han encontrado produciendo TNF e iNOS, por lo cual se les ha llamado Tip-DCs. En Dermatitis Atópica (DA) también se ha encontrado esta población, sin embargo, no produce TNF ni iNOS⁴⁴, esto indica que el microambiente inflamatorio es determinante en la diferenciación de las DCs inflamatorias. El origen de esta población de DCs aún no es claro

aunque hay varias propuestas, entre ellas está la hipótesis de que las DCs inflamatorias pueden originarse a partir de las DCs mieloides dermales. También se piensa que pueden provenir de monocitos o de precursores presentes en la sangre periférica. Por otra parte, se ha propuesto que las cDCs M-DC8⁺ de sangre periférica pueden, en condiciones de inflamación, movilizarse a la piel para participar en la patogénesis de distintas enfermedades inflamatorias crónicas^{5, 6, 32}.

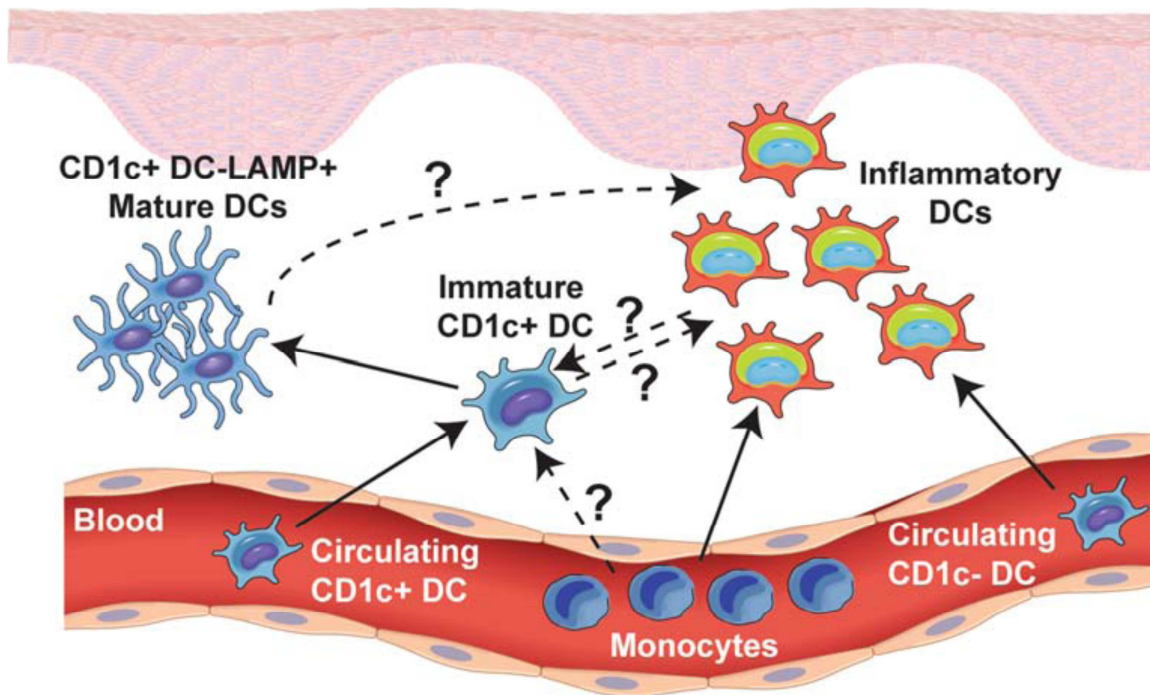


Figura 2. Precursores probables de las DCs inflamatorias dermales⁴⁵. Aun no es claro cuál es el precursor de las DCs inflamatorias dermales. Es posible que los monocitos circulantes den origen a esta población al migrar a piel en condiciones inflamatorias, o quizás puedan diferenciarse a partir de las DCs CD1c⁺ residentes de dermis. En la sangre periférica existen al menos tres poblaciones de cDCs que son posibles precursores de las DCs inflamatorias dermales, CD1c⁺, CD16⁺ y BDCA-3, las últimas dos son CD1c⁻.

DCs Y QUIMIOTAXIS.

Las quimiocinas (citocinas que inducen quimiotaxis) son importantes mediadores de la respuesta inmune debido a que regulan el reclutamiento de los leucocitos hacia tejidos tanto en ausencia de inflamación como en condiciones inflamatorias⁴⁶. De acuerdo a su expresión, existen dos tipos de quimiocinas; quimiocinas inflamatorias, las cuales reclutan leucocitos en respuesta a stress fisiológico y quimiocinas homeostáticas, las cuales participan en el tráfico basal de leucocitos y en la arquitectura de los órganos linfoides secundarios⁴⁷.

La quimiotaxis es un fenómeno en el cual la dirección del movimiento celular es determinada por el gradiente extracelular de una sustancia química. Las quimiocinas se unen a receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Las proteínas G asociadas con receptores de quimiocinas contienen tres subunidades: $G_{\alpha i}$, β y γ . La activación de las proteínas G es inducida por la unión de GTP a $G_{\alpha i}$ y la liberación de $\beta\gamma$. Esto inicia la cascada de señalización, con las subunidades $\beta\gamma$ activando efectores “rio abajo” de la vía de señalización, como la fosfoinositol 3-cinasa, que controla los cambios del citoesqueleto necesarios para la quimiotaxis. Además, las subunidades $\beta\gamma$ liberadas son capaces de activar las fosfolipasas (PLC) B2 y B3, enzimas responsables de la producción de inositol trifosfato (IP3) y la liberación del calcio intracelular. Los inhibidores de G_i , tales como la toxina pertussis (TxP) bloquean todos los eventos de señalización intracelulares y por lo tanto inhiben la migración de las poblaciones de leucocitos mediada por agentes quimiotácticos⁴⁸. En particular, la toxina pertussis adiciona covalentemente una ADP-ribosa al sitio de unión de GTP de la subunidad $G_{\alpha i}$ del receptor bloqueando esta vía de señalización.

La expresión diferencial de receptores, por parte de las diferentes estirpes celulares del sistema inmune, influye en su sensibilidad única a ciertas quimiocinas. La siguiente tabla resume la expresión de los receptores de quimiocinas descritos en las células dendríticas inmaduras y maduras, además del resultado funcional de la ligación de cada receptor.

Chemokine receptors expressed by DC and the functional outcome of receptor ligation

DC status	Chemokine Receptor	Ligand	Function
Immature DC	CCR1	CCL3 (MIP1 α) CCL5 (RANTES) CCL7 (MCP-3) CCL8 (MCP-2) CCL9 (MRP-2) CCL14 (HCC1) CCL16 (HCC4)	Recruitment of DC/DC precursors to sites of Inflammation
	CCR2	CCL2 (MCP-1) CCL7 (MCP-3) CCL12 (MCP-5) CCL8 (MCP-2) CCL16 (HCC4)	Recruitment of DC/DC precursors to sites of inflammation
	CCR4	CCL17 (TARC) CCL19 (MIP-3 β , ELC)	DC/DC precursor recruitment for skin homing
	CCR5	CCL3 (MIP1 α) CCL4 (MIP1 β) CCL5 (RANTES) CCL8 (MCP-2) CCL11 (eotaxin) CCL14 (HCC1) CCL16 (HCC4)	Recruitment of DC/DC precursors to sites of inflammation
	CCR6	CCL20 (MIP-3 α)	Langerhans cell migration; DC migration into gut; DC localization in Peyer's patches
	CCR8	CCL1 (TCA3)	Monocyte-derived DC recruitment from skin to DLN
	CCR9	CCL25 (TECK)	pDC recruitment to inflamed gut
	CXCR3	CXCL9 (Mig) CXCL10 (IP10) CXCL11 (ITAC)	Murine pDC recruitment to LN; human pDC to sites of inflammation
	CX3CR	CX3C11 (fractalkine)	DC sentinel function
Immature and Mature DC	CXCR4	CCL12 (SDF-1)	Enhances human pDC migration in response to CXCR3 ligands; DC recruitment
Mature DC*	CCR7	CCL19 (MIP-3 β , ELC) CCL21 (6CKine, SLC)	DC recruitment from periphery to T cell areas of secondary lymphoid tissue; Enhances DC endocytic ability

* During the process of maturation/in response to inflammatory stimuli, DC downregulate their cell surface expression of the chemokine receptors they expressed in their immature state and upregulate their cell surface expression of CCR7.

** Some immature DC express CXCR4, but do not respond chemotactically to its ligand; upon exposure to maturation stimuli, some DC acquire the ability to migrate to CCL12.

HCC - ; hemofiltrate CC chemokine; ELC – Epstein Bar Virus Ligand 1 chemokine; IP10 – interferon inducible protein-10; ITAC - interferon γ T cella chemoattractant; MIP – macrophage inflammatory protein; MCP – monocyte chemoattractant protein; MRP – MIP-related; Mig – monokine induced by interferon γ ; RANTES – regulated on activation normal T cell expressed and secreted; SDF – stromal cell-derived factor ; SLC – secondary lymphoid chemokine ; TARC – thymus and activation regulated chemokine ; TECK – thymus expressed chemokine

Tabla 1. Receptores de quimiocina expresados por DCs y resultado funcional de la ligación de cada receptor⁴⁹.

Como se puede observar en la **tabla 1**, las DCs expresan una amplia gama de receptores, característica que les confiere una gran capacidad quimiotáctica para cumplir sus importantes funciones en el inicio de la respuesta inmune.

Además de su papel en la quimiotaxis, las quimiocinas y sus receptores desempeñan otros papeles importantes. Por ejemplo, algunos receptores como CCR5, son también los principales correceptores para algunas cepas de VIH. Algunas quimiocinas están involucradas en el proceso de angiogénesis debido a su efecto quimiotáctico en células endoteliales, mientras otras ejercen efectos antiangiogénicos⁵⁰. Además, algunas quimiocinas juegan un importante papel en la hematopoyesis, el crecimiento de tumores y el desarrollo de metástasis⁵¹. Por ejemplo, se ha demostrado que SDF-1 (del inglés, stromal

cell-derived factor, también llamada CXCL12) junto con su receptor CXCR4 desempeñan un papel importante en el *homing* de las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea⁵² y también dirigen la diseminación metastática de cáncer de mama a este sitio⁵³. El receptor CXCR4 se encuentra expresado en pDCs⁵⁴, cDCs⁵⁵ y en la población descrita previamente cDCs M-DC8+⁵.

DCs E INFLAMACIÓN.

La inflamación se define como una compleja serie de reacciones ejecutadas por el organismo cuyo fin es activar procesos de reparación y mecanismos de defensa en contra de agentes patógenos. La producción de citocinas por células locales es uno de los eventos iniciales que permiten el reclutamiento de otras células hacia el sitio de inflamación para la realización de funciones efectoras.

La diapédesis es el proceso por el cual los leucocitos circulantes migran hacia los tejidos. La presencia de estímulos inflamatorios (productos microbianos, citocinas, componentes del complemento, etc.) provoca la expresión de moléculas capaces de unir leucocitos, un proceso llamado activación del endotelio⁵⁶. Las células del endotelio activado expresan altos niveles de moléculas de adhesión de la familia de las selectinas, ICAM-1 (intracelular adhesion molecule-1) y VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule). Las selectinas son glicoproteínas presentes en leucocitos (L-selectina), endotelio (E-selectina y P-selectina) y plaquetas (P-selectina) que unen moléculas glicosiladas en la superficie de otras células y median adhesión de baja afinidad entre los leucocitos y el endotelio⁵⁷. La migración de estas células es mediada por el incremento de productos quimiotácticos.

La extravasación y migración de los leucocitos es dependiente de varias quimiocinas entre ellas IL-8 y MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1), que son producidas en sitios de infección. La IL-8, liberada por macrófagos activados, atrae neutrófilos que son estimulados a penetrar el tejido inflamado, mientras que MCP-1 recluta monocitos, células T, células NK y células dendríticas⁵⁸. Otras quimiocinas relacionadas con el reclutamiento de células a los sitios de inflamación son; CCL5 (RANTES), que recluta células T, DCs, eosinófilos, células NK, mastocitos y basófilos⁵⁹; IP-10, que recluta células T CD4⁺ y MIG, que atrae células T activadas.

Sin embargo, las moléculas involucradas en la adhesión leucocitaria y el reclutamiento de las células efectoras hacia la piel pueden influenciar potencialmente la magnitud de los procesos inmunopatológicos en respuesta a una infección, de igual manera una activación crónica de las células del sistema inmune puede generar un ambiente pro-inflamatorio continuo y generar un excesivo reclutamiento de estas células, derivando en daño de tejido y enfermedades inflamatorias crónicas.

DCs EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La alteración de la homeostasis de las DCs ha sido directamente implicada en varias enfermedades autoinmunes, dentro de este grupo podemos nombrar a dos enfermedades autoinmunes con manifestaciones cutáneas, la Psoriasis y el Lupus Eritematoso Discoide (LED).

Psoriasis

Psoriasis vulgaris, el tipo más común de Psoriasis, es una enfermedad inflamatoria crónica cutánea que se caracteriza por la presencia de parches escamosos rojizos. Estas lesiones pueden estar confinadas a áreas específicas tales como codos, rodillas y cuero cabelludo o pueden estar diseminadas en todo el cuerpo. Esta enfermedad presenta rasgos histopatológicos muy característicos; como el engrosamiento de la piel (acantosis) debido a un incremento en la proliferación de los queratinocitos en la base de la epidermis y la presencia de infiltrado inflamatorio importante compuesto por DCs y células T CD4⁺ y CD8⁺.

Esta enfermedad es resultado de un desorden autoinmune caracterizado por la expansión y activación de células Th1, Th17 y Th22, con una producción asociada de IFN- γ , TNF- α , IL-17 e IL-22 en la piel⁶⁰. La naturaleza proinflamatoria del TNF- α induce la expresión ICAM-1 en los queratinocitos, lo cual facilita la adhesión de los leucocitos circulantes⁶¹. Además, el TNF- α estimula a los queratinocitos para que produzcan IL-8, un potente quimioatrayente de neutrófilos, además de otras citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-1, que juegan un papel fundamental en la generación y mantenimiento de las células TH17⁶².

En cuanto al papel de las DCs en esta enfermedad, se encontró que las pDCs que infiltran la piel psoriática están activadas crónicamente para producir IFN γ , lo que provoca la activación y expansión de células T autorreactivas, desencadenando una hiperproliferación epidermal

que lleva a la formación de la placa psoriática⁴. Se piensa que una de las causas de esta patología es la activación aberrante de las pDCs por ácidos nucleicos propios⁶³. Por otro lado, las cDCs M-DC8⁺ también han sido implicadas en la patogénesis de este padecimiento debido a que en lesiones de pacientes con Psoriasis se ha encontrado esta población produciendo TNF e iNOS⁵.

Lupus Eritematoso Discoide

El Lupus Eritematoso Discoide (LED) es una variedad del Lupus Eritematoso Cutáneo Crónico⁶⁴ (LECC) que se asocia al Lupus Eritematoso Generalizado (LEG) sólo en un 10% de los casos. A diferencia del LEG, que presenta daño multiorgánico y es caracterizado por un componente humoral, el LED presenta diversas manifestaciones cutáneas y se desencadena por fármacos, infecciones o luz UV. Si bien la etiología del LED y LEG aún no es clara, se ha sugerido que una producción incrementada de IFN α/β puede ser el factor patogénico clave, ya que en la sangre de pacientes con LEG, especialmente aquellos que presentan la forma activa, se han encontrado altos niveles de IFN- α , RANTES, IL-8, MCP-1, IP-10 y MIG^{65, 66, 67}. Además, en el suero de pacientes con Lupus Eritematoso Cutáneo (LEC) subagudo se han encontrado niveles más altos de citocinas proinflamatorias que los encontrados en individuos sanos⁶⁸.

Debido a que, como se mencionó anteriormente, sólo un 10% de los casos de LED evoluciona a la forma generalizada, se ha propuesto que ambos padecimientos pueden tener orígenes diferentes y hasta ser enfermedades diferentes. En lesiones de pacientes con LEC se ha identificado un ambiente pro-inflamatorio caracterizado por la expresión incrementada de interferones y TNF- α ⁶⁴ sugiriendo la posibilidad de que, al igual que en la Psoriasis y la Dermatitis Atópica, precursores presentes en sangre periférica pudieran estar migrando a piel y participando en la patogénesis de dicha enfermedad. Sin embargo, hasta el momento no se ha publicado algún estudio donde se identifiquen DCs mieloides inflamatorias presentes en biopsias de paciente con LED. Por otro lado, en una estudio previo realizado en la UIMEA se identificó la presencia de cDCs con características inflamatorias⁶ en biopsias de pacientes con LED, además en otro estudio publicado se encontró una correlación positiva del número de pDCs presentes en biopsias de LED con la cantidad de células expresando la proteína inducible por IFN α/β MxA, sugiriendo que las pDCs son las responsables de la producción local de IFN α/β ⁷.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS AL TRABAJO

En un trabajo previo realizado en la UIMEA con un grupo de 30 pacientes con Psoriasis se identificó una población de sangre periférica de fenotipo $\text{Lin}^- \text{CD123}^+ \text{HLA-DR}^{\text{baja}}$, que pudiera estar relacionada con las células dendríticas y que posteriormente se denominó como “nDC” (Figura 3).

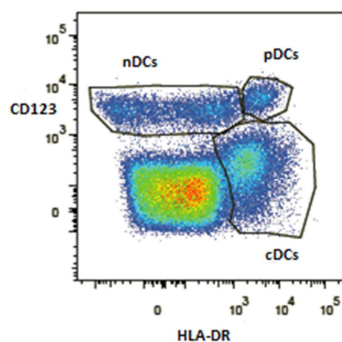


Figura 3. Poblaciones de células Lin^- de sangre periférica. En la figura se muestran los criterios de selección de las poblaciones de DCs (nDCs, pDCs y cDCs) definidas de acuerdo a su expresión de HLA-DR y CD123.

En dicho estudio se observó que la disminución de esta población en sangre periférica correlacionaba con el índice de severidad y tiempo de evolución de esta enfermedad (PASI). La caracterización fenotípica y funcional realizada en la UIMEA de la población nDC (CD123^+ , $\text{HLA-DR}^{\text{baja}}$) ha arrojado datos interesantes. El fenotipo evaluado hasta el momento de esta población es: Lin^- , $\text{HLA-DR}^{\text{baja}}$, $\text{CD11c}^{\text{baja}}$, CD4^- , CD8^- , CD20^- , $\text{BDCA-1}^{\text{baja}}$, $\text{BDCA-2}^{\text{+/-}}$, BDCA-3^- , BDCA-4^- , CD45RA^- , CD45RO^- , $\text{CD80}^{\text{baja}}$, $\text{CD86}^{\text{baja}}$, $\text{B7-H1}^{\text{+/-}}$, CD11b^+ , CD62L^+ y CLA^+ . De manera interesante esta población es positiva para el marcador CD13 lo que la puede relacionar con un linaje mieloide. Tiene además una expresión importante de CD62L, de CLA y de CXCR4, que es el receptor de la quimiocina SDF-1. Estos resultados junto con el hallazgo de que la población de nDC se encuentra disminuida en pacientes con Psoriasis activa sugieren que pudiera ser una población celular con potencial de migración a piel en condiciones de inflamación.

La población celular en estudio expresa a nivel de RNAm y proteína niveles basales de TLR-2, 4, 7 y 9. La morfología de esta población cambia notablemente después de ser cultivada en presencia de IL-3 y, en presencia del virus de influenza inactivado, se observa la formación de agregados celulares. Al ser cultivada en presencia del virus de influenza y

de los ligandos de TLRs mencionados, la población en estudio incrementa ligeramente la expresión de MHC-II y de la molécula CD40 pero no incrementa la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, ni la expresión basal de las moléculas co-inhibidoras B7-H1 y B7-DC, que son los ligandos del receptor de muerte PD-1. Estos resultados sugieren fuertemente que esta población celular no está involucrada en la presentación de antígeno a los linfocitos para la inducción de respuesta inmune y que posiblemente podría participar en la inducción de tolerancia inmunológica.

Finalmente, a nivel funcional después de ser activada en presencia del virus de influenza y de los ligandos de TLRs mencionados, la población celular en estudio expresa niveles importantes de IL-8 y niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α e IL-6; además de expresar bajos niveles de IFN tipo I en comparación con las otras poblaciones de DCs presentes en la sangre periférica. En conjunto, estos resultados sugieren que la población nDC pudiera tener capacidad migratoria ante estímulos presentes en la piel inflamada y que al expresar los TLRs 2, 4, 7 y 9 tenga el potencial de ser activada por virus, bacterias y quizá también por ligandos endógenos para participar activamente en procesos inflamatorios cutáneos en la piel.

En otro trabajo realizado en la UIMEA se examinaron sueros de pacientes con LED y se encontraron niveles aumentados de IL-8, IP-10, MCP-1, MIG y RANTES con respecto a los niveles encontrados en los sueros de sujetos sanos. De igual manera, se encontraron niveles más altos de estas cinco quimiocinas en los sobrenadantes de células de dermis de lesiones de pacientes con LED comparados con los sobrenadantes de células de dermis de individuos sanos.

En el mismo estudio se asociaron las cDCs, principalmente a la población M-DC8⁺, directamente con la patogénesis de las lesiones cutáneas de LED, debido a que se encontró que se encontraban disminuidas en la sangre periférica de los pacientes con LED activo y que, en etapas estables (sin lesiones activas, ni manifestaciones clínicas), los valores de estas células regresaban a la normalidad. Por todo esto, se argumentó que posiblemente las cDCs M-DC8⁺, durante las condiciones inflamatorias presentes en el LED, se podrían redistribuir de la sangre periférica a la piel de los pacientes con dicha patología.

4. JUSTIFICACION.

Los resultados obtenidos de la caracterización de la población nDC sugieren que esta población pudiera tener un capacidad migratoria ante estímulos presentes en la piel inflamada y ser activada por virus, bacterias y quizás también por ligandos endógenos a través de los TLRs para participar activamente en procesos inflamatorios cutáneos en la piel.

Por otro lado, los altos niveles de quimiocinas proinflamatorias encontrados en los sobrenadantes de dermis de LED, la disminución de la población de cDCs M-DC8⁺ en la sangre periférica de los pacientes con esta enfermedad y las importantes propiedades inflamatorias que posee esta población sugieren la posibilidad de que esta población esté migrando desde la sangre periférica hacia la piel y participe de manera importante en esta patología. De igual manera, aun cuando en dermis sana los números de pDCs son bajos, en biopsias de pacientes con LEC se han encontrado números altos de pDCs produciendo IFN α/β .

Por todo esto, resulta muy importante evaluar la capacidad migratoria de las poblaciones celulares en cuestión (pDCs, cDCs M-DC8⁺ y nDCs) en presencia de estímulos quimiotácticos presentes en sobrenadantes de cultivos de células de dermis de piel inflamada.

5. HIPOTESIS.

- Las células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos tienen el potencial de migrar ante estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED.

6. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar el potencial de movilización de las células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos ante estímulos quimiotácticos expresados por células de la dermis de piel lesionada de pacientes con LED.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar el potencial migratorio de las distintas poblaciones linaje negativas presentes en la sangre periférica en respuesta a IL-8.
- Comparar la migración inducida por los sobrenadantes de cultivos de células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED (SN LED) con la migración inducida por los sobrenadantes de cultivos de células de dermis de individuos sanos (SN SANO).
- Evaluar si la migración inducida por SN LED es dependiente de GPCRs.
- Evaluar la migración de las poblaciones de células linaje negativas estudiadas en presencia de la quimiocina SDF-1.

7. METODOLOGÍA

MATERIALES

Muestras de sangre periférica: Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron de concentrados leucocitarios de individuos sanos obtenidos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI.

Obtención de biopsias de piel de lesiones de pacientes con LED y controles. Las biopsias de piel de pacientes con LED fueron obtenidas de pacientes reclutados de la consulta externa de la clínica de Colagenopatías del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua y del Hospital General de México. Como controles se utilizaron biopsias de piel del tejido sobrante de sujetos sanos sometidos a cirugía plástica del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua.

Procedimiento de obtención de sobrenadantes de cultivos celulares de dermis. Se colocó la biopsia obtenida en una placa para cultivo de tejido (35 mm X 10 mm, Corning) en Dispasa (1mg/ml, Proteasa grado II, Roche) a 4°C durante toda la noche, al siguiente día se separó la lámina epidérmica y se lavó la dermis. La dermis se colocó por 72 h en una caja de cultivo con medio RPMI-1640 (Gibco) para permitir la salida, al medio de cultivo, de células provenientes de la dermis. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, se recolectó el sobrenadante y se congeló a -20°C.

Anticuerpos y reactivos para citometría. Para evaluar la viabilidad de las células se utilizó Hoescht (Roche). Los anticuerpos utilizados para exclusión de células Lin⁺ fueron CD3, CD14 y CD19 conjugados con PE (eBioscience), además de CD56 PE (BD-Pharmingen). Para la identificación de las poblaciones de células dendríticas se utilizaron los siguientes marcadores; CD123 PE-Cy5, CLA Biotina, HLA-DR APC, Estreptavidina PE-Cy7 (BD-Pharmingen), HLA-DR Biotina (Biolegend) y M-DC8 FITC (Miltenyi Biotec).

Ensayo de migración. Además de los sobrenadantes de cultivos celulares de dermis utilizados como estímulo para los ensayos de migración se utilizaron IL-8 (R&D) y SDF-1 (Peprotech). Para los experimentos de bloqueo de la quimiotaxis mediada por GPCRs se utilizó toxina pertussis (Sigma).

PROCEDIMIENTOS

Obtención de células mononucleares (PBMCs). Se diluye la sangre 1:1 en PBS y se somete a un gradiente de ficoll por 30 min a 2000 rpm, se colectan las células mononucleares y se someten a tres lavados con PBS; 1500 rpm 10 minutos, 700 rpm 10 minutos (eliminación de plaquetas) y 1500 rpm 10 minutos respectivamente. Se resuspende el botón de células en PBS y se procede al conteo en cámara de Neubauer. Se utilizó azul de tripano para identificar a las células viables.

Enriquecimiento de células Lin⁻ por perlas magnéticas. Una vez contadas, las células se marcan con anticuerpos de linaje conjugados con PE (CD3, CD14, CD19, CD56) y se incuban a 4°C por 30 minutos. Transcurridos los 30 minutos, se hacen 2 lavados con buffer MACS (PBS, suero de caballo 2%, EDTA 5 mM, azida de sodio 0.05%) a 1500 rpm por 10 min y se colocan las células a incubarse en presencia de perlas anti-PE durante 15 min a 4°C, entonces se realizan dos lavados más (Buffer MACS, 1250 rpm, 10 min). El botón de células se resuspende en 1 mL de MACS, se procede a realizar la selección negativa al hacer pasar las células a través de una columna magnética en presencia de un magneto MACS. Las células marcadas con las perlas anti-PE se quedan atrapadas en la columna, mientras que las células que pasan se recuperan y se cuentan, esta es la porción de células con la que trabajamos (células Lin⁻ enriquecidas).

Ensayos de migración en sistema transwell. La **Figura 4** muestra un esquema del sistema transwell utilizado. Los insertos transwell (Diámetro; 6.5 mm, Tamaño de poro; 0.5 µm, Corning) fueron colocados en placas de 24 pozos, cada pozo contenía 600 µL de medio RPMI-1640 2% suero fetal bovino (SFB), solo, o con sobrenadante o quimiocina, dependiendo el estímulo a evaluar. Los sobrenadantes SN SANO y SN LED se utilizaron a una dilución de 1:10. Se ponen 1 millón de células en 100 µL de RPMI-1640 2% SFB en cada transwell, el transwell se coloca en el pozo del estímulo respectivo y se permite a las células migrar durante el tiempo programado (1 o 3 h) a 36.5 °C en un atmosfera de 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de migración se retiran cuidadosamente los transwell, se colectan las células del pozo (células migrantes) y se realizan un par de lavados con RPMI-1640 2% SFB a cada pozo para colectar células que podrían haberse adherido al mismo. Por último se realiza el conteo de las células migrantes en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano para determinar la viabilidad de las células. Las células se colocan en placas de 96 pozos

para realizar la tinción para la citometría de flujo. El medio del transwell también se recolecta para contar las células no migrantes y realizar tinción de las mismas como medida de monitoreo.

Debido a que algunas poblaciones como las pDCs o cDCs no tienen tanta capacidad migratoria, se decidió colocar tres transwell por condición, 1×10^6 de células por transwell para un total de 3×10^6 células por condición. Las células migrantes de los tres pozos de la misma condición se combinan para poder obtener suficientes células migrantes de cada población para realizar la lectura de la muestra al citómetro.

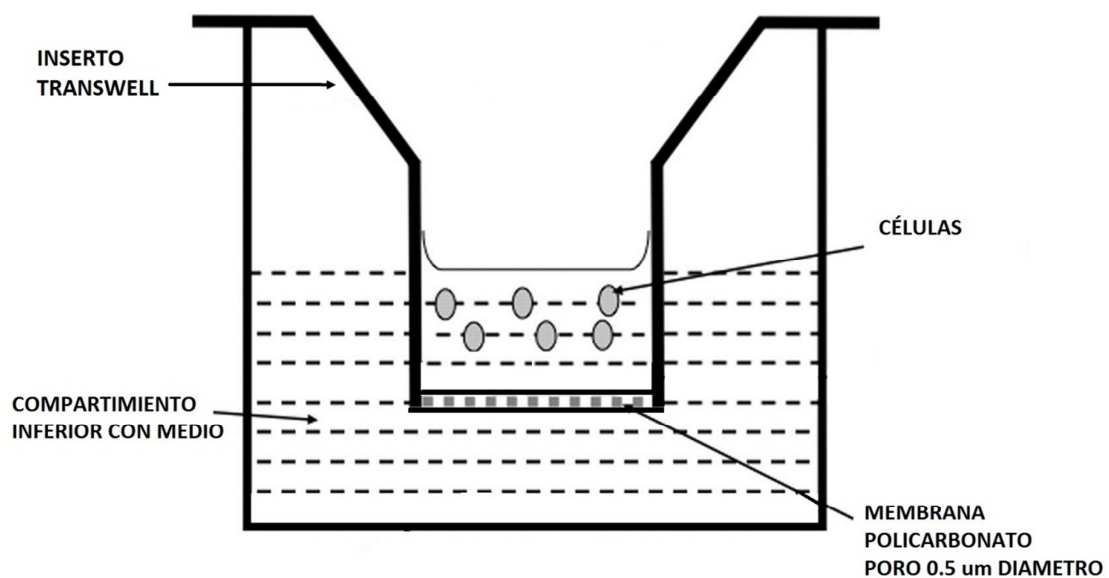


Figura 4. Sistema transwell. La figura muestra el sistema transwell utilizado en los ensayos de migración.

Bloqueo de la migración dependiente de GPCRs con toxina pertussis. Después del proceso de enriquecimiento de las células Lin^- se contaron las células y se separaron 5×10^6 células, las cuales se colocaron en RPMI-1640 2% SFB con toxina pertussis (200 ng/mL) durante 30 min en una atmósfera 5% CO_2 . Una vez transcurrido este tiempo se realizaron 2 lavados con RPMI-1640 2% SFB a 1500 rpm 10 min y se procedió con el ensayo de migración como se describió anteriormente.

Tinción de inmunofluorescencia. Las células a teñir se colocan en un pozo y se centrifugan a 1500 rpm durante 3 min, después se incuban las células con la mezcla de anticuerpos (Lin, CD123 PE-Cy5, HLA-DR APC, CLA-Biotina y M-DC8 FITC) durante 20 min

a 4°C, se realizan 2 lavados, posteriormente se agrega la estreptavidina conjugada con PE-Cy7 (para revelar la biotina) y se incuban las células nuevamente 20 min a 4°C. Transcurridos los 20 min se realizan nuevamente 2 lavados con buffer de FACS. La siguiente incubación se hace con Hoechst (para evaluar viabilidad) durante 5 min a 4°C, y se lavan las células 2 veces. Por último se fijan las células con paraformaldehído al 4% durante 20 min, se hacen dos lavados y se resuspende el botón de células en 100 µL de buffer de FACS para leerlas al citómetro de flujo. Se trabajó con un citómetro de flujo FACS Aria. Las incubaciones se realizan a 4°C y todos los lavados se realizan a 1500 rpm, 3 min en buffer de FACS.

Obtención de los porcentajes de migración de las poblaciones celulares en estudio.

Los porcentajes de migración de cada población celular se obtienen por medio de una relación entre el número de células ingresadas al experimento de dicha población y el número de células que migraron de la misma, como se expresa en la siguiente fórmula.

$$\text{Migración de la población celular en estudio} = \frac{\text{\# de células migrantes de la población celular en estudio}}{\text{\# de células ingresadas al transwell de la población celular en estudio}}$$

(% de células ingresadas al transwell)

Análisis estadístico. Para los experimentos con IL-8 y los experimentos con sobrenadantes de células de dermis se realizaron al menos 3 experimentos independientes. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba *t*-Student pareada de dos colas con una *P* < 0.05 considerada como significativa.

8. RESULTADOS

La identificación de las poblaciones de células linaje negativas (Lin^-) presentes en la sangre periférica de individuos sanos se realizó mediante citometría de flujo. Los criterios utilizados para identificar a las distintas poblaciones de células Lin^- fueron los siguientes: Partiendo de la región Células (R1) que descarta restos celulares, se seleccionan las células viables (región R2) en un histograma de hoescht, a partir de esta región se seleccionó en base al control sin teñir, la región Lin^- (región R3) que excluye a todas las células que expresan CD3 (Linfocitos T), CD14 (Macrófagos), CD19 (Linfocitos B) o CD56 (NK). De la región de células Lin^- se seleccionaron las dos poblaciones de células dendríticas que se encuentran ampliamente descritas en la literatura utilizando como parámetros la expresión de CD123 y HLA-DR en el que las pDCs son ($\text{HLA-DR}^{\text{alta}} \text{CD123}^{\text{alta}}$) y las cDCs ($\text{HLA-DR}^{\text{alta}} \text{CD123}^{\text{int-baja}}$) así como la población nDC ($\text{HLA-DR}^{\text{int-baja}} \text{CD123}^{\text{alta}}$) (Figura 5).

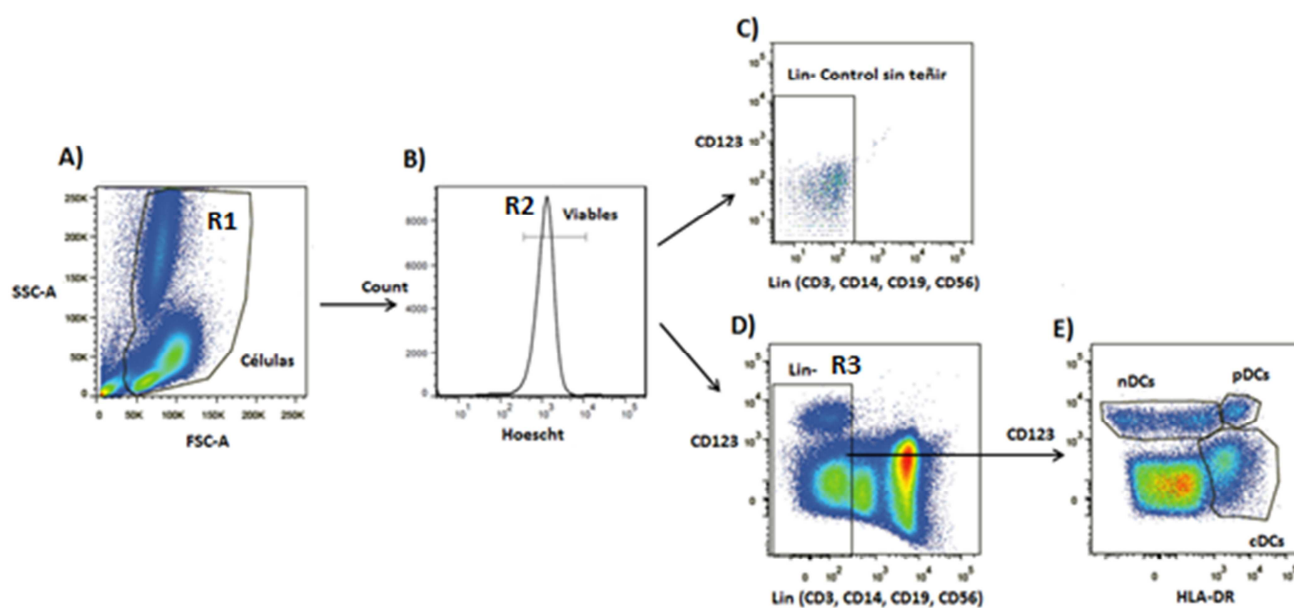


Figura 5. Selección de las poblaciones celulares. En la figura se muestran los criterios de selección de las poblaciones celulares. Partiendo de la región "Células" (R1) se seleccionan las células viables (Región R2) para entonces seleccionar la región de células Lin^- (R3) utilizando como referencia el control sin teñir (C), de esta manera eliminamos a las poblaciones celulares comprometidas con algún marcador de linaje (CD3, CD14, CD19 o CD56). (E) A partir de las células Lin^- (Región R3) se seleccionan las poblaciones celulares nDCs, pDCs y cDCs definidas de acuerdo a su expresión de HLA-DR y CD123.

Debido a que en enfermedades inflamatorias como la Psoriasis, se ha observado la participación de DCs M-DC8⁺, se decidió conocer la distribución de este marcador en las poblaciones celulares de estudio. La **Figura 6** muestra histogramas de las tres poblaciones de interés (cDCs, nDCs y pDCs) mostrando que las nDCs y pDCs no expresan el marcador M-DC8, mientras que, como ha sido reportado en la literatura², dentro de las cDCs existe una subpoblación positiva para este marcador. Esta subpoblación ha sido identificada como una subpoblación con propiedades inflamatorias importantes y su porcentaje varía desde un 20 hasta un 46% de las cDCs, de acuerdo al donador.

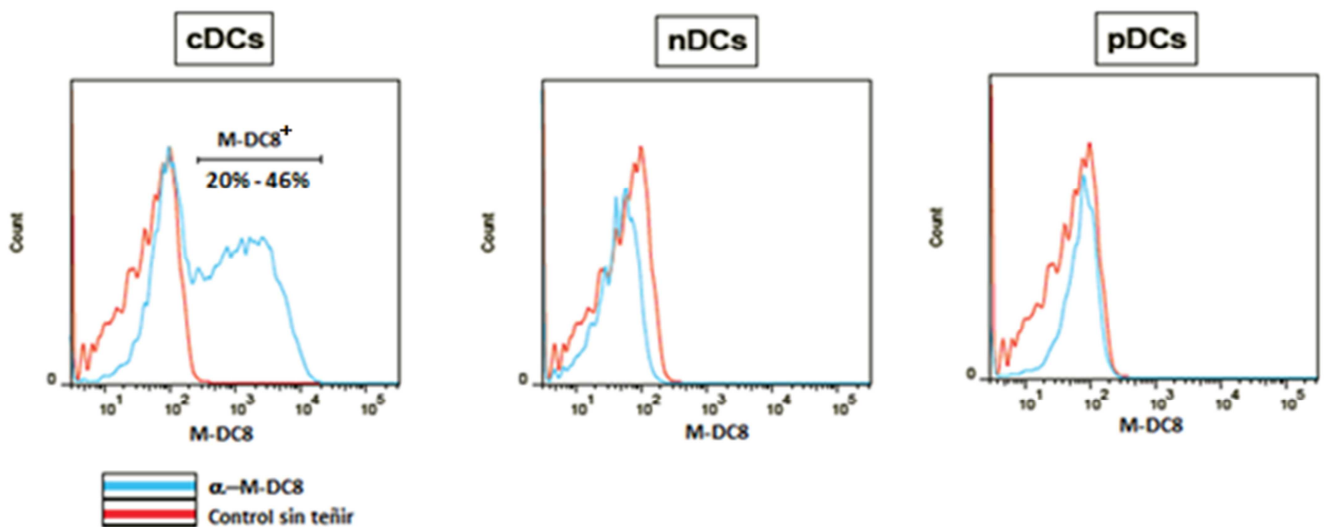


Figura 6. Expresión de M-DC8 en poblaciones de células linaje negativas. Los histogramas muestran la expresión de la molécula M-DC8 en las poblaciones celulares estudiadas cDCs, nDCs y pDCs obtenidas como se mostró en la figura 6.

Migración de células Lin⁻ presentes en sangre periférica de individuos sanos en respuesta a IL-8

En trabajos recientes se ha propuesto que poblaciones de células dendríticas presentes en sangre periférica podrían estar involucradas en la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas cutáneas al migrar hacia la piel, por lo tanto se decidió evaluar las propiedades migratorias de las poblaciones en estudio en respuesta a diferentes estímulos. Se utilizó IL-8 debido a que es una quimiocina proinflamatoria bien estudiada y a su relación con enfermedades inflamatorias crónicas. Experimentos previos demostraron que la concentración de IL-8 a la que se observó una proporción mayor de células migrantes fue de 0.5 µg/mL. Colocamos células Lin⁻ enriquecidas por perlas magnéticas a migrar durante 1 o 3 h de cultivo. En la siguiente figura se muestran dos gráficas representativas de las células migrantes y no migrantes en respuesta a IL-8. En ella se puede observar la gran capacidad migratoria de las nDCs, mientras que la migración de las pDCs y cDCs es inferior.

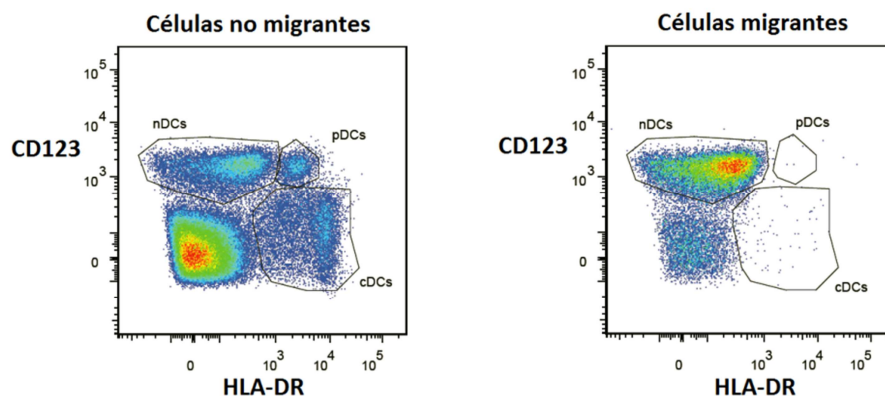


Figura 7. Gráficas representativas de las células no migrantes y las células migrantes en respuesta a IL-8. La figura ilustra la distribución de las poblaciones de células Lin⁻ en las células migrantes y en las células no migrantes utilizando IL-8 como estímulo.

Como se puede observar en la **Figura 8A**, cuando se evalúa la capacidad de movilización de las células Lin⁻ totales no se observan diferencias al comparar el control sin IL-8 con los cultivos en presencia de IL-8 a 1 h de migración. Sin embargo, al analizar la población de nDCs se observa un incremento significativo ($P < 0.05$) en el porcentaje de células ingresadas que migraron a través del transwell después de 1 h de cultivo en presencia de IL-8 con respecto al control. En cuanto a las subpoblaciones de pDCs, cDCs y la subpoblación de cDCs M-DC8⁺ la migración observada a 1 h en presencia de IL-8 fue incluso menor a la

observada en el control. En estas últimas poblaciones los porcentajes de migración fueron bajos (< 2%) comparado con los obtenidos para las células Lin⁻ totales y las nDCs.

Para determinar si las subpoblaciones de pDCs y cDCs necesitaban mayor tiempo de cultivo para migrar, se realizaron los cultivos en presencia y ausencia de IL-8 durante 3 h. Como se observa en la **Figura 8B**, a pesar de que los porcentajes de migración en las pDCs y las cDCs se incrementan ligeramente, no se observan diferencias significativas en los porcentajes de migración con IL-8 comparados con los controles sin la interleucina. La migración de las M-DC8⁺ se incrementó ligeramente, aunque la tendencia fue similar a la observada a 1 h. En cuanto a las células Lin⁻, el comportamiento fue similar al observado a 1 h, sin diferencias importantes entre el control sin IL-8 y el medio con IL-8. Finalmente, en las nDCs se observa nuevamente un incremento en el porcentaje de migración de las células ingresadas en los cultivos en respuesta IL-8 que al control. Estos resultados indican que la IL-8 es un estímulo quimiotáctico para la población de nDCs pero no así para las otras poblaciones de DCs presentes en la sangre periférica (pDCs, cDCs y cDCs M-DC8⁺).

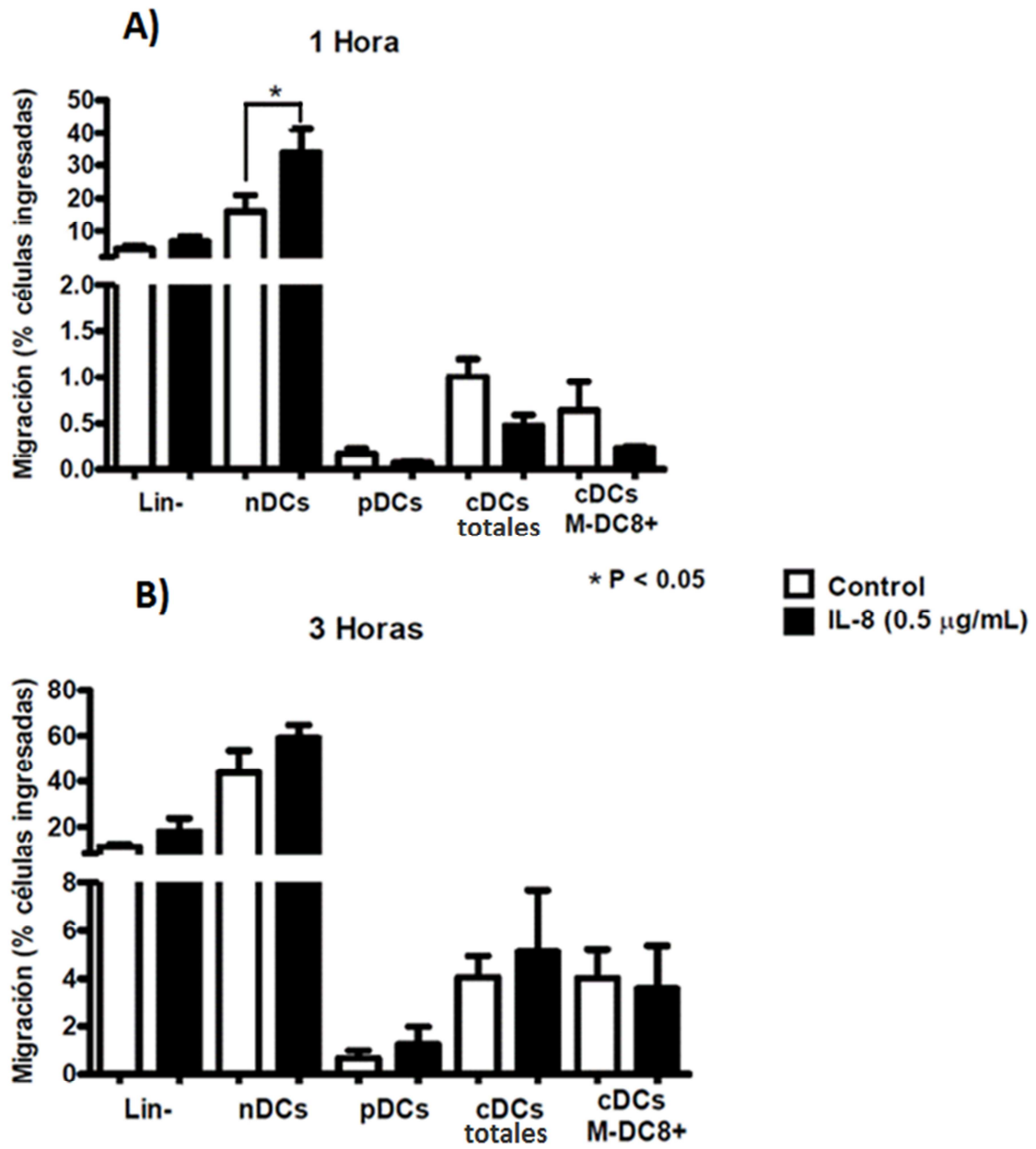


Figura 8. Migración de poblaciones de células Lin⁻ en respuesta a IL-8. 3×10^6 PBMCs en sistema transwell (6.5 mm diámetro y $0.5 \mu\text{m}$ de tamaño de poro) se dejaron migrar por 1 h (A) ó 3 h (B) utilizando RPMI 2% SFB como control e IL-8 ($0.5 \mu\text{g/mL}$). El gráfico muestra el porcentaje de células migrantes respecto al número de células ingresadas al transwell. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. *P < 0.05 (Prueba t-Student pareada).

Migración de células Lin⁻ presentes en sangre periférica de individuos sanos en respuesta a estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis provenientes de piel lesionada de pacientes con LED.

Para determinar si en la piel de pacientes con una enfermedad inflamatoria crónica cutánea pueden estar presentes estímulos quimiotácticos que induzcan la movilización de células Lin⁻ presentes en la sangre periférica de individuos sanos, se realizaron experimentos de migración en respuesta a un *pool* de sobrenadantes de cultivos de células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED (SN LED). Se utilizó un *pool* de sobrenadantes de cultivos de células de dermis de individuos sanos como control (SN SANO). Tanto SN SANO como SN LED se utilizaron diluidos 1:10. Los experimentos se realizaron a 1 y 3 h de cultivo. En la siguiente figura se muestra una gráfica representativa de los experimentos realizados en respuesta a sobrenadantes de dermis.

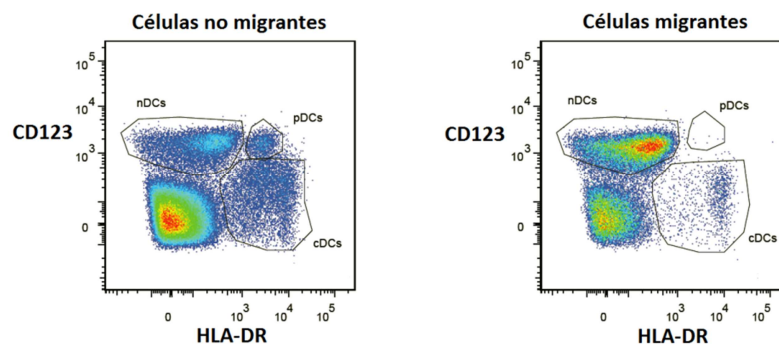


Figura 9. Gráficas representativas de las células no migrantes y las células migrantes en respuesta a estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis provenientes de piel lesionada de pacientes con LED (SN LED). La figura ilustra la distribución de las poblaciones de células Lin⁻ en las células migrantes y en las células no migrantes utilizando SN LED como estímulo.

La **Figura 10** muestra que en los experimentos de migración a 1 y 3 h se observó un porcentaje de migración muy parecido de las células Lin⁻ al comparar SN LED con SN SANO; sin embargo al evaluar la migración de las nDCs observamos nuevamente una mayor migración en presencia de SN LED con respecto a SN SANO. En el caso de la migración a 3 horas esta diferencia fue significativa ($P < 0.05$). En las pDCs nuevamente se observan porcentajes muy bajos de migración y no se observan diferencias importantes a los dos tiempos. Al evaluar el total de cDCs observamos una mayor migración en presencia de SN LED. En cuanto a la subpoblación de cDCs M-DC8⁺, a pesar de que se observan porcentajes

bajos de migración existen diferencias en presencia de SN LED con respecto a SN SANO y esta diferencia es significativa a las 3 h de cultivo ($P < 0.05$).

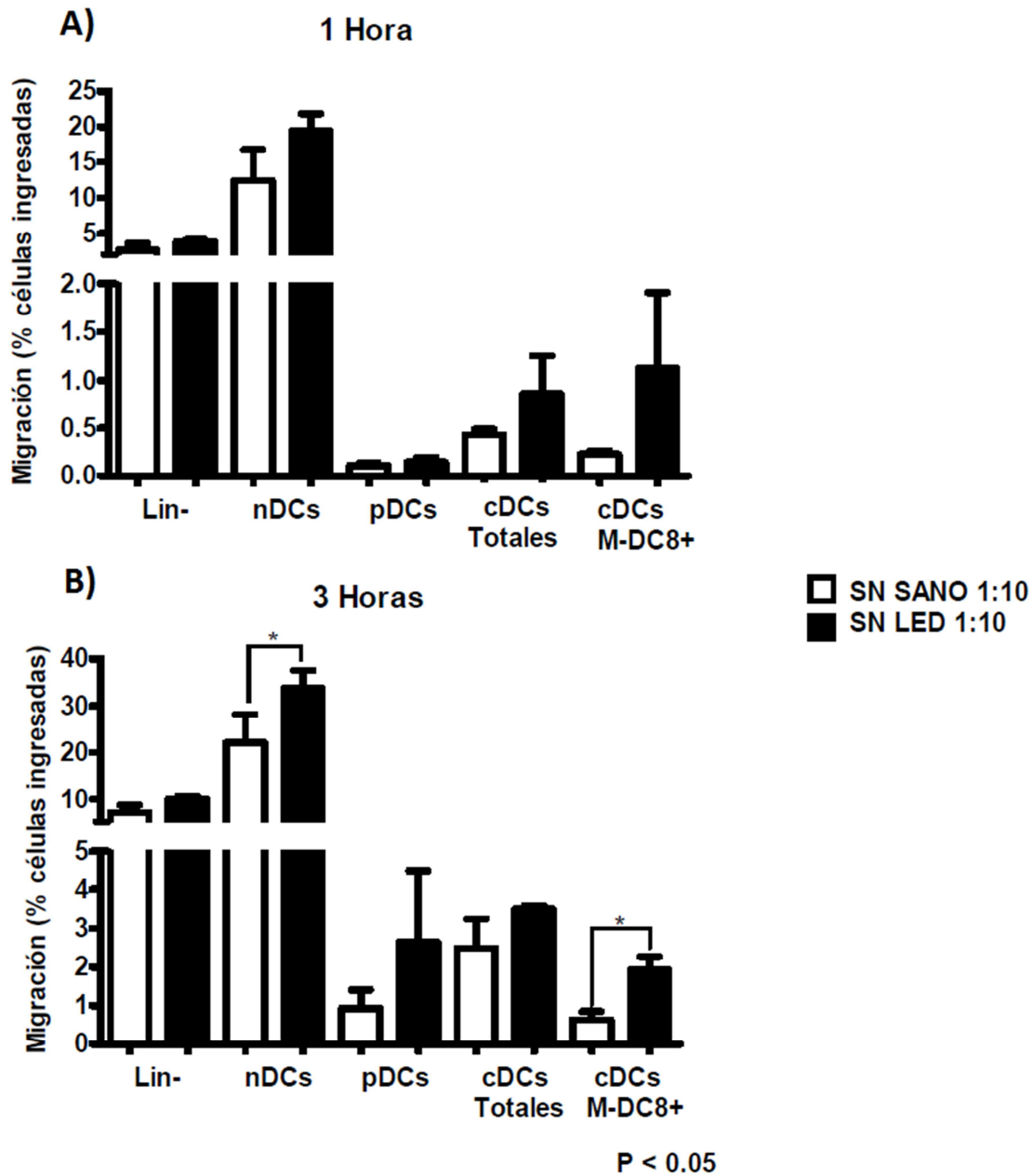


Figura 10. Migración de poblaciones de células Lin⁻ en respuesta a sobrenadantes de células de dermis. 3×10^6 PBMCs en sistema transwell (6.5 mm diámetro y 0.5 μ m de tamaño de poro) se dejaron migrar por 1 h (A) ó 3 h (B) utilizando un *pool* de sobrenadantes de dermis de individuos sanos o sobrenadantes de dermis de pacientes con LED. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. * $P < 0.05$ (Prueba *t*-Student pareada).

La migración inducida en las nDCs por SN LED es dependiente de receptores de quimiocinas.

Para determinar si la migración observada en presencia de SN LED es dependiente de GPCRs, las células fueron tratadas 30 min con toxina pertussis previo al ensayo de migración. La toxina pertussis bloquea la quimiotaxis mediada por GPCRs al adicionar covalentemente una ADP-ribosa al sitio de unión de GTP de la proteína Gai del receptor.

Como se puede observar en la **Figura 11**, la migración inducida en las células Lin⁻ y en las nDCs fue disminuida en presencia de toxina pertussis. Por el contrario, la migración observada en las pDCs y en las cDCs M-DC8⁺ no fue afectada por la presencia de toxina pertussis. Las cDCs exhibieron un mayor porcentaje de migración cuando fueron tratadas previamente con toxina pertussis.

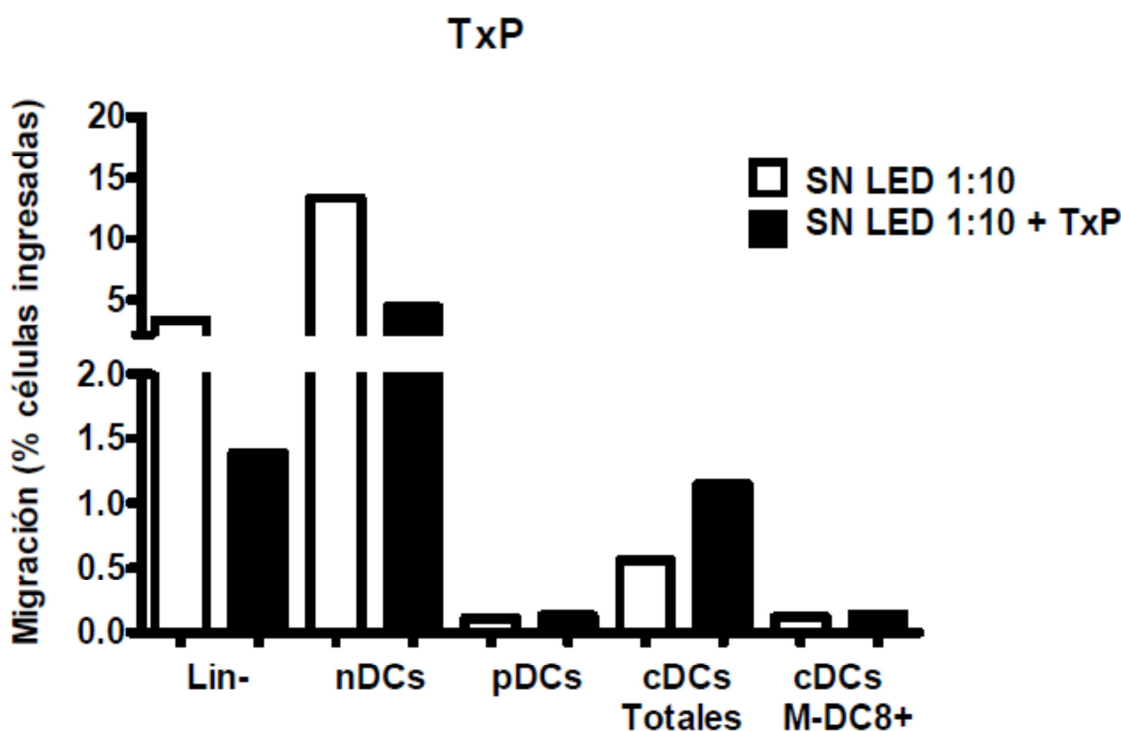


Figura 11. Dependencia de la migración de células Lin⁻ en GPCRs. La figura muestra el efecto de la Toxina Pertussis (TxP) sobre la migración de las poblaciones celulares estudiadas en respuesta a SN LED en un ensayo de migración a 3 h.

Posteriormente se evaluó la expresión de CLA, marcador que indica el potencial *homing* a piel, en las poblaciones de células Lin⁻ en estudio. CLA ha sido asociado con la patogénesis de algunas enfermedades inflamatorias crónicas de piel. La **Figura 12** nos muestra que sólo

una parte de las cDCs expresa CLA, mientras que todas las pDCs y nDCs lo expresan. Dentro de las nDCs se pueden distinguir dos subpoblaciones de acuerdo al nivel de expresión de esta molécula; nDCs CLA^{int} y nDCs CLA^{alta}. En la **Figura 13** podemos observar que dentro de las cDCs la expresión de los marcadores M-DC8⁺ y CLA⁺ es mutuamente excluyente, esto concuerda con la literatura³¹.

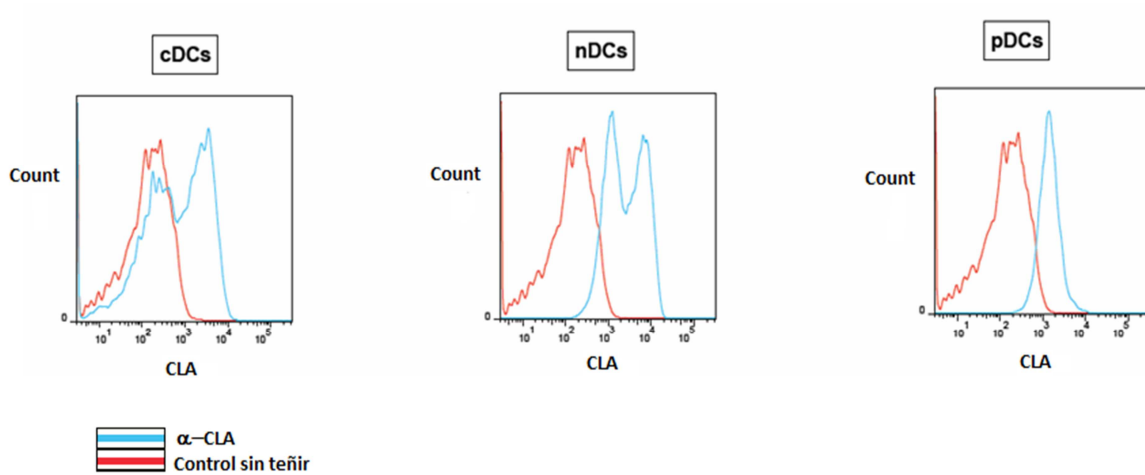


Figura 12. Expresión de CLA en las poblaciones de células Lin⁻ estudiadas. Los histogramas muestran la expresión de CLA en las cDCs, nDCs y pDCs.

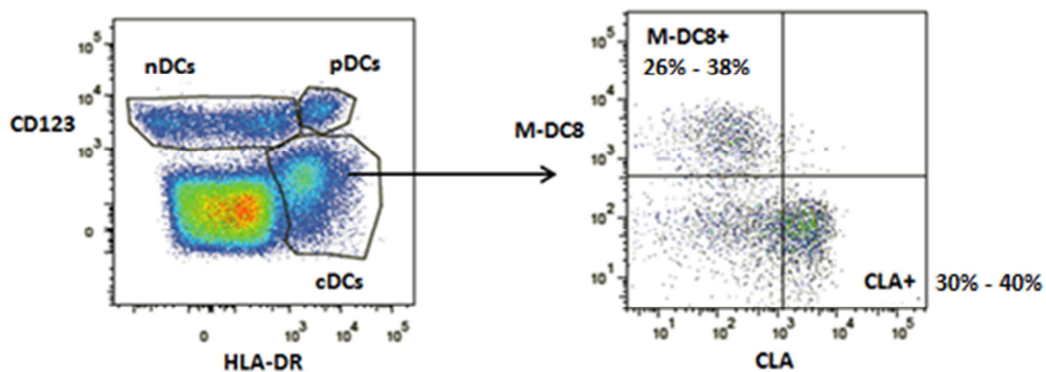


Figura 13. Subpoblaciones de cDCs de sangre periférica. Los histogramas muestran las dos subpoblaciones presentes en cDCs de sangre periférica, cDCs CLA⁺ y cDCs M-DC8⁺.

Migración de células Lin⁻ de sangre periférica en respuesta a SDF-1.

Se ha reportado que las poblaciones en estudio pDCs⁵⁴, cDCs⁵⁵ y cDCs M-CD8⁺⁵ expresan el receptor CXCR4 que es el receptor para SDF-1 (CXCL12), además, en la caracterización realizada en UIMEA de la población nDC se encontró la expresión de este receptor, por esto se decidió evaluar la capacidad de SDF-1 de inducir quimiotaxis en las distintas poblaciones de células Lin⁻ presentes en la sangre periférica de individuos sanos y compararla con la capacidad de SN LED. Los experimentos se realizaron a 3 h considerando que ese fue el tiempo al que se obtuvo un mayor porcentaje de movilización en la población de cDCs. Se decidió además evaluar si existen diferencias en el potencial migratorio de las subpoblaciones de cDCs CLA⁺ y en las nDCs CLA^{int} y CLA^{alta}. Como control se utilizó RPMI-1640 suplementado al 2% con SFB. La movilización en respuesta a SDF-1 se comparó además con la movilización en respuesta a SN LED y SN SANO. En este caso se usaron células mononucleares sin enriquecer para descartar que la manipulación del proceso de purificación por perlas magnéticas pudiera inducir algún tipo de activación en las células que afecte su potencial migratorio (**Figura 14**).

Como se puede observar en la **Figura 14A**, las células Lin⁻ presentaron un ligero aumento en la movilización en respuesta a SN LED comparado con el control y con SN SANO. Sin embargo, la movilización observada en presencia de SDF-1 fue ligeramente mayor. Al analizar la población de nDCs observamos una migración importante en presencia de SN LED, mayor a la observada con el control y con SN SANO. Esta movilización fue similar a la observada en presencia de SDF-1 (**Figura 14B**). Resultados similares se obtuvieron al evaluar la población nDC con intermedia y alta expresión de CLA.

Al evaluar la población de pDCs observamos nuevamente que los porcentajes de migración fueron muy bajos comparados con las otras poblaciones, en particular Lin⁻ y nDCs. En presencia de SDF-1 se observa un porcentaje de migración mayor comparado con SN LED, SN SANO y con el control (**Figura 14C**). En el caso de la población de cDCs totales observamos un incremento en los porcentajes de migración en presencia de SDF-1 y un ligero incremento en los porcentajes al comparar SN LED con SN SANO y con el control (**Figura 14D**). Al evaluar las subpoblaciones de cDCs observamos que en la población CLA⁺ los porcentajes de migración en presencia de SDF-1 son similares a los presentes en la población total y nuevamente observamos diferencias al comparar la migración en respuesta

a SN LED con respecto a SN SANO y al control. A pesar de que en la población M-DC8⁺ positiva también se observó un incremento en la migración en respuesta a SN LED con respecto a SN SANO, no se observó una migración importante en respuesta a SDF-1 con respecto al control. Nuevamente para esta población los porcentajes de migración observados fueron muy bajos.

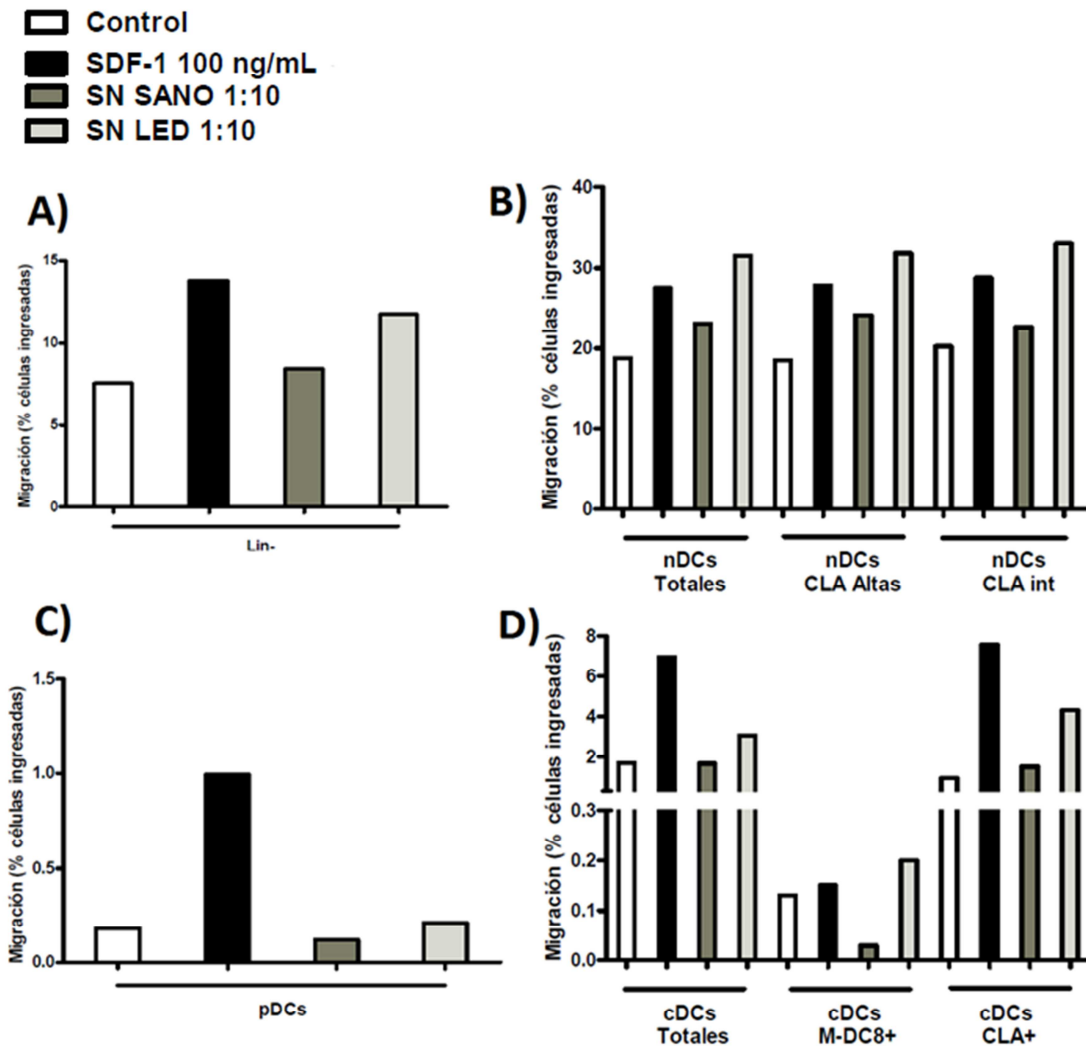


Figura 14. Migración de diversas poblaciones de células Lin⁻ en respuesta a SDF-1. 3×10^6 PBMCs en sistema transwell (6.5 mm diámetro y 0.5 μ m de tamaño de poro) se dejaron migrar por 3 h utilizando RPMI 2% SFB como control, SDF-1 (100 ng/mL), SN SANO y SN LED.

9. DISCUSIÓN

En los últimos años se han publicado trabajos^{5, 6, 63, 65, 70} en los cuales se han asociado a las poblaciones de células dendríticas con la patogénesis de enfermedades inflamatorias crónicas de la piel. Distintas poblaciones de DCs; pDCs, DCs inflamatorias dermales y recientemente cDCs M-DC8⁺ han sido encontradas infiltrando piel inflamada y produciendo citocinas proinflamatorias, por lo que se ha propuesto su participación tanto en la iniciación como en la perpetuación del fenómeno inflamatorio local. Considerando que en piel sana, estas poblaciones no se encuentran presentes o bien se encuentran en bajas proporciones, se han formulado varias propuestas. Una de las hipótesis es que algunas de estas poblaciones pueden originarse a partir de precursores presentes en la piel⁴². Por otro lado existen varios trabajos que apoyan la movilización de poblaciones de DCs de la sangre periférica a la piel en respuesta a estímulos quimiotácticos expresados por las células de la piel en condiciones de inflamación^{3, 5, 6, 43, 45}.

En este trabajo, se evaluó el potencial migratorio de distintas poblaciones de células linaje negativas presentes en la sangre periférica de individuos sanos ante la IL-8, quimiocina que ha sido ampliamente descrita por inducir la migración de polimorfonucleares⁶⁹, y ante estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED.

Los experimentos con IL-8 nos permitieron ver que la población denominada como “nDC” presenta migración en respuesta a esta quimiocina, esto concuerda con el hecho de que durante la caracterización de esta población se encontró que expresa CXCR1, uno de los receptores de esta quimiocina. Por otro lado, las otras poblaciones celulares estudiadas (pDCs, cDCs y cDCs M-DC8⁺) no mostraron movilización en respuesta a IL-8. Esto concuerda con el hecho de que entre los receptores de quimiocinas expresados por las DCs descritos hasta el momento no se encuentren los receptores de IL-8 (CXCR1 y CXCR2)⁴⁹.

En los experimentos de migración en respuesta a SN LED y SN SANO a 1 h y 3 h se observó nuevamente una alta migración de la población nDC en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes tanto en piel sana como en piel lesionada de pacientes con LED. Esto puede ser explicado por la presencia de distintas quimiocinas como IL-8, IP-10, MCP-1, MIG y RANTES en el SN SANO las cuales se ha observado que están incrementadas en SN LED. Estos

resultados confirman el potencial de movilización de las nDCs ante estímulos presentes en la dermis sana y que este potencial se incrementa notablemente ante estímulos presentes en condiciones de inflamación. Con los experimentos realizados en presencia de IL-8 se comprobó que las nDCs migran en respuesta a esta quimiocina, por lo cual sería importante realizar experimentos con los SN LED bloqueando el receptor de IL-8 para identificar si esta quimiocina es la única responsable de la migración observada de las nDCs u otras quimiocinas presentes en los sobrenadantes están participando en su movilización. Además, sería interesante evaluar la expresión de otros receptores de quimiocinas en esta población celular para determinar que otras quimiocinas podrían participar en la alta capacidad de movilización de estas células.

A diferencia de la población nDC, las otras poblaciones estudiadas muestran baja movilización en respuesta a SN SANO y SN LED; esta migración se incrementó ligeramente cuando se realizaron los experimentos a 3 h, indicando que estas poblaciones requieren de tiempos más prolongados para migrar. La migración superior exhibida por estas poblaciones en respuesta a SN LED comparado con SN SANO, nos indica que podrían existir estímulos quimiotácticos en este sobrenadante para dichas poblaciones celulares. Los experimentos con IL-8 nos permitieron comprobar que las pDCs, cDCs y cDCs M-DC8⁺ no migran en respuesta a esta quimiocina, de esta manera es posible que otras quimiocinas como RANTES, MCP-1, MIG, IP-10 o alguna otra no evaluada en el SN LED pudieran estar involucradas en la movilización de estas poblaciones, esto debido a que se ha reportado la expresión constitutiva de receptores para estas quimiocinas en poblaciones de DCs inmaduras⁴⁹.

Los experimentos con toxina pertussis nos permitieron evaluar si la migración observada en respuesta a SN LED era mediada por quimiocinas, ya que la toxina pertussis bloquea la migración dependiente de GPCRs⁴⁸, así que, la disminución del porcentaje de migración de las nDCs expuestas a la toxina pertussis en respuesta a SN LED nos permite confirmar que la migración observada es debida a la presencia de quimiocinas presentes en este sobrenadante.

Por otro lado, la mayor movilidad de las cDCs totales expuestas a la toxina pertussis en respuesta a SN LED comparada con las cDCs totales sin la toxina no es congruente con el efecto esperado. En la literatura se ha descrito que la toxina pertussis induce la producción

de citocinas proinflamatorias y aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras en las DCs^{70, 71}; sin embargo, esto no explica el aumento observado en la migración de las cDCs expuestas a la toxina pertussis. Por otro lado, la migración de las cDCs M-DC8⁺ fue muy baja. Considerando los bajos niveles de migración en respuesta a SN LED observados en las cDCs sería importante realizar experimentos utilizando otras quimiocinas o sobrenadantes de otras enfermedades inflamatorias cutáneas como Psoriasis, ya que se han encontrado cDCs M-DC8⁺ infiltrando lesiones en este padecimiento y produciendo iNOS, TNF- α e IL-23⁵, esto nos permitiría tener conclusiones más sólidas del potencial de movilización de las cDCs de la sangre periférica a la piel.

En los experimentos en respuesta a SDF-1 se observó una mayor migración de las cDCs totales comparada con SN LED, fenómeno congruente con lo reportado en la literatura ya que esta población expresa CXCR4⁵⁵, el receptor de esta quimiocina. Dentro de las poblaciones de cDCs, las CLA⁺ tuvieron un mayor potencial de migración en respuesta a SDF-1 con respecto a las cDCs M-DC8⁺. Esto sugiere que las cDCs CLA⁺ pudieran participar en procesos inflamatorios cutáneos crónicos, debido a que CLA es un marcador que confiere el potencial *homing* a piel³⁵. Por otra parte, la migración de las cDCs M-DC8⁺ en respuesta a SDF-1 fue muy baja (menor al 1%), esto difiere de lo reportado por Hänsel et al⁵., aunque esta discrepancia podría deberse a diferencias metodológicas.

La migración de las nDCs en respuesta a SDF-1 es congruente con el hecho de que esta población expresa CXCR4. Haría falta determinar los niveles de SDF-1 en SN LED para determinar si es también responsable de la migración observada en esta población, además de que existe el antecedente de que esta quimiocina se expresa en tejido psoriático⁵. De acuerdo a la expresión de CLA, las nDCs pueden subdividirse en dos subpoblaciones; nDCs CLA^{int} y nDCs CLA^{alta}, sin embargo ambas poblaciones mostraron el mismo potencial migratorio en respuesta a los estímulos evaluados.

Al evaluar la expresión de CLA en las pDCs se observó que todas las pDCs expresan este marcador, lo que podría explicar el potencial *homing* de esta población a piel inclusive en dermis sana⁴¹. La migración de las pDCs en respuesta a SDF-1 fue mayor que la observada ante los otros estímulos; sin embargo, fue de apenas 1%, además que no se ha observado una movilización importante en respuesta a SN LED. Es posible que esta población celular no responda a SDF-1 y que otras quimiocinas no evaluadas en este trabajo puedan participar

en la movilización de las pDCs, además sería importante utilizar sobrenadantes de cultivos de lesiones de Psoriasis ya que se ha reportado que las pDCs parecen participar en etapas tempranas de esta enfermedad⁴².

Los experimentos realizados con células mononucleares totales mostraron las mismas tendencias que los experimentos realizados con células Lin⁻ enriquecidas sugiriendo que el procedimiento de enriquecimiento no afecta la capacidad de migración de las poblaciones celulares estudiadas. El uso de diferentes donadores puede explicar las dispersiones observadas en los experimentos, aun así, a pesar de ser experimentos independientes se observaron tendencias y en algunos casos diferencias estadísticamente significativas. Por último, es posible que la cantidad de SN LED no fuera la óptima, por lo que sería importante realizar nuevos experimentos utilizando mayor cantidad de sobrenadante de dermis tanto de sano como de paciente.

La gran movilidad observada en las nDCs en períodos cortos de tiempo sugiere que, en respuesta a estímulos inflamatorios, esta población podría llegar primero al tejido y posteriormente las cDCs y pDCs, tomando en cuenta que, aunque escasas, existen pDCs en dermis sana. Además, debido a que los datos arrojados de la caracterización de esta población sugieren que al activarse podría producir niveles importantes de IL-8 y citocinas pro-inflamatorias como IL-1, TNF- α e IL-6, sería interesante además evaluar la presencia de nDCs en biopsias de piel de lesiones de LED. Por otra parte, también sería importante evaluar el potencial migratorio de las nDCs en respuesta a sobrenadantes de otras enfermedades inflamatorias cutáneas como Psoriasis.

En resumen, podemos concluir que la población nDC presente en la sangre periférica de individuos sanos tiene un alto potencial de movilización en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en la piel, aún en condiciones de reposo y, que esta capacidad de movilización se incrementa en condiciones de inflamación (SN LED). La migración de las nDC es dependiente de receptores de proteínas G e identificamos a la IL-8 y a SDF-1 como dos posibles quimiocinas responsables de la movilización de esta población. Nuestro estudio nos indicó además, que las cDCs tienen una menor movilidad comparada con las nDCs y dentro de las poblaciones de cDCs las que muestran una mayor capacidad migratoria son las CLA⁺. A pesar de mostrar una pobre movilidad, las cDCs M-DC8⁺ muestran una mayor migración en respuesta al SN LED que al SN SANO; sin embargo, debido a la poca

migración detectada en los experimentos realizados en este trabajo y a los datos obtenidos en presencia de la toxina pertussis no podemos asegurar que esta migración sea dependiente de quimiocinas. Además de que no parecen migrar en respuesta a IL-8 o SDF-1. Por último, las pDCs mostraron una baja capacidad migratoria y hasta el momento no identificamos estímulos potenciales presentes en la piel que puedan inducir la movilización de esta población.

Nuestros resultados no muestran a la población de cDCs M-DC8⁺ como un buen candidato para redistribuirse de la sangre periférica a la piel en condiciones de inflamación y proponen a la población nDC como un posible precursor en la sangre periférica con una alta capacidad de movilizarse tanto a piel sana como a piel inflamada para su potencial participación en procesos inflamatorios cutáneos crónicos.

CONCLUSIONES

- La población nDC presente en la sangre periférica de individuos sanos mostró una alta capacidad de movilización ante estímulos presentes tanto en piel sana como en respuesta a estímulos quimiotácticos presentes en cultivos celulares de lesiones de pacientes con LED.
- La migración de las nDCs en respuesta a estímulos quimiotácticos expresados por células de dermis de piel lesionada de pacientes con LED es dependiente de GPCRs.
- La IL-8 y SDF-1 son factores quimiotácticos para la población nDC.
- Las cDCs y cDCs M-DC8⁺ presentan una mayor migración en respuesta a estímulos quimiotácticos expresados por células de la dermis de piel lesionada de pacientes con LED que a los estímulos presentes en sobrenadantes de células de dermis de individuos sanos.
- Dentro del modelo estudiado, la capacidad migratoria de las pDCs y cDCs es baja, mientras que las nDCs presentan una alta capacidad migratoria.
- SDF-1 induce quimiotaxis en la población de cDCs CLA⁺.

REFERENCIAS

1. Morel, P.A., et al., *Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance*. Immunol Res, 2011. **50**(2-3): p. 124-129.
2. Schäkel K., et al., *6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells*. Immunity, 2002. **17**: p. 289-301.
3. Zaba, L.C., et al., *Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p. 302-308.
4. Gregorio, J., et al., *Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons*. J Exp Med, 2010. **207**(13): p. 2921-2930.
5. Hänsel, A., et al., *Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 787-794.
6. Mendez, R. E. 2009. *Caracterización fenotípica y funcional de células dendríticas en lupus discoide*. México D.F. Tesis de Maestría en Ciencias en Inmunología. Instituto Politécnico Nacional. 46 p.
7. Farkas, L., et al., *Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon α/β -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions*. Am J Pathol, 2001. **159**(1): p. 237-243.
8. Lebedeva, T., et al., *ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**: p. 251–258.
9. Tan, J.K., et al., *Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(2): p. 319-324.
10. Hawiger, D. et al. *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 769–780.
11. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD81 T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. Nature Immunol, 2005. **6**(3): p. 280–286.
12. Medzhitov R. *Toll-like receptors and innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(2): p. 135-145.
13. Iwasaki, A., et al., *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-995.

14. Johnson, T.R., et al., *Primary human mDC1, mDC2, and pDC dendritic cells are differentially infected and activated by respiratory syncytial virus*. J Plus One, 2011. **6**(1): e16458.
15. Karsunky, H., et al., *Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3⁺ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3⁺ dendritic cells in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 305-313.
16. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-661.
17. Reizis, B., *Regulation of plasmacytoid dendritic cell development*. Curr Opin Immunol, 2010. **2**(2): p. 206-211.
18. Schmid, M.A., et al., *Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment*. Immunol Rev. **234**(1): p. 32-44.
19. MacDonald, K.P., et al., *Characterization of human blood dendritic cell subsets*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4512-4520.
20. Randolph, G.J., et al., *The CD16⁺(FcγRIII⁺) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting*. J Exp Med, 2002. **196**(4): p. 517-527.
21. Riccioni, R., et al., *Interleukin (IL)-3/granulocyte macrophage-colony stimulating factor/IL-5 receptor alpha and beta chains are preferentially expressed in acute myeloid leukaemias with mutated FMS-related tyrosine kinase 3 receptor*. Br J Haematol, 2009. **144**(3): p. 376-387.
22. Getjtenbeek T. B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 33-54.
23. Martinon, F., et al., *NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens*. Trends Immunol 2005. **26**: p. 447–54.
24. Irla, M., et al., *MHC class II–restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell–mediated autoimmunity*. J Exp Med, 2010. **207**(9): p. 1891-1905.
25. O'keeffe, M., et al., *Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁺ dendritic cells only after microbial stimulus*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1307-1319.
26. Ito, T., et al., *Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells*. Blood, 2006. **107**(6): p. 2423–2431.

27. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10–producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, 2007. **204**(1): p. 105-115.
28. Chang, C.J., et al., *Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation*. J Immunol, 2000. **165**(): p. 3584-3591.
29. Piccoli, D., et al., *Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5371-5379.
30. Palucka, K., et al., *Dendritic cells: are they clinically relevant?* Cancer J, 2010. **16**(4): p. 318-324.
31. Sorrentino, R., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: from heart to vessels*. Int J Vasc Med, 2010. Article ID 430318.
32. Schäkel K., et al., *Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes*. Immunity, 2007. **24**: p. 767-777.
33. Schmitz, T., et al., *Tumoricidal potential of native blood dendritic cells: direct tumor cell killing and activation of NK cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 2005. **174**: p. 4127-4134.
34. Lowes, M. A., et al., *Increase in TNF- α and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a)*. Proc Natl Acad Sci USA, 2005. **102**(52): p. 19057-19062.
35. Mendes-Aguiar, C de O., et al., *The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis*. Clin Exp Immunol, 2009. **157**: p. 377-384.
36. Merad, M., et al., *Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8** (12): p. 935–947.
37. Flacher, V., et al., *Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Grampositive bacteria*. J Immunol 2006; **177**(11): p. 7959–7967.
38. Nestle, F.O. et al., *Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6535–6545.
39. Angel CE, et al. *CD14⁺ antigen-presenting cells in human dermis are less mature than their CD1a⁺ counterparts*. Int Immunol 2007. **19**(11): p. 1271–1279.

40. Nestle F.O., et al., *Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(5): p. 762–766.
41. Ebner, S., et al., *Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin*. Int Immunol, 2004. **16**(6): p. 877–887.
42. Nestle, F.O., et al., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-production*. J Exp Med, 2005; **202**(1): p. 135–143.
43. Zaba, L.C., et al., *Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells*. J Invest Dermatol 2009. **129**(1): p. 79–88.
44. Guttman-Yassky, E., et al., *Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(5): p. 1210–1217.
45. Johnson-Huang, L. M., et al., *Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin diseases*. J Clin Immunol, 2009. **29**(3): p. 247-256.
46. Cyster, J.G., *Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2098-2102.
47. Moser, B., et al., *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2):123–128.
48. Shi, G., et al., *Identification of an alternative Gαq-dependent chemokine receptor signal transduction pathway in dendritic cells and granulocytes*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2705-2718.
49. Colvin, B. L., et al., *Dendritic cells and chemokine-directed migration in transplantation: Where are we headed?* Clin Lab Med, 2008. **28**(3): p. 375-384.
50. Koizumi, K., et al., *Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response*. Cancer Sci, 2007. **98**(11): p. 1652-1658.
51. Zhao, D., et al., *Stromal cell-derived factor 1alpha stimulates human endometrial carcinoma cell growth through the activation of both extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Akt*. Gynecol Oncol, 2006. **103**(3): p. 932-937.
52. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845–848.
53. Muller, A., et al., *Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 50–56.

54. Mengshol, J.A., et al., *Characterization and recruitment of plasmacytoid dendritic cells in synovial fluid and tissue of patients with chronic inflammatory arthritis*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2815-2824.
55. Mengshol, J.A., et al., *Impaired plasmacytoid dendritic cell maturation and differential chemotaxis in chronic hepatitis C virus: associations with antiviral treatment outcomes*. Gut, 2009. **58**(7): p. 964-973.
56. Wong, C., et al., *Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation*. Cardiovasc Res, 2010. **86**: p. 183-191.
57. Abbas, A.K., et al., *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Saunders 2003.
58. Melgarejo, E., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. 41(5): p. 998-1001.
59. Appay, V., et al., *RANTES: a versatile and controversial chemokine*. Trends Immunol, 2001. **22**(2): p. 83-87.
60. Davidovici, B.B., et al., *Psoriasis and systemic inflammatory diseases: Potential Mechanistic Links between Skin Disease and Co-Morbid Conditions*. J Inv Dermatology, 2010. **130**: p. 1785-1796.
61. Griffiths, C.E., et al., *Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor*. J Am Acad Dermatol, 1989. **20**(4): p. 617–629.
62. Acosta-Rodriguez E.V., et al., *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 942–949.
63. Gilliet, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 594-606.
64. Sticherling, M. *Update on the use of topical calcineurin inhibitors in cutaneous lupus erythematosus*. Biologics, 2011. **5**: p. 21-31.
65. Bauer, J.W., et al., *Elevated serum levels of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus*. PLoS Med, 2006. **3**: e491.
66. Lit, L.C., et al., *Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2006. **65**(): p. 209–215.

67. Vila, L.M., et al., *Association of serum MIP-1 alpha, MIP-1 beta, and RANTES with clinical manifestations, disease activity, and damage accrual in systemic lupus erythematosus*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(): p. 718–722.
68. Maczynska, I., et al., *Proinflammatory cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18 and TNF- α) levels in sera of patients with subacute cutaneous lupus erythematosus (SCLE)*. Immunol Lett, 2006. **102**: p. 79-82.
69. Di Cioccio, V., et al., *Key role of proline-rich kinase 2 in interleukin-8 (CXCL8/IL-8)-mediated human neutrophil chemotaxis*. Immunology, 2004. **111**(4): p. 407–415.
70. Shive, C. L., et al., *The enhanced antigen-specific production of cytokines induced by pertussis toxin is due to clonal expansion of T cells and not to altered effector functions of long-term memory cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(8): p. 2422- 2431.
71. Ryan, M., et al., *Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28*. Int Immunol, 1998. **10**(5): p. 651-662.
72. Sozzani, S., et al., *The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(1): p. 1–9.