



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS) EN EPIDERMIS  
DE ARMADILLO DE NUEVE BANDAS (DASYPUS NOVEMCINCTUS  
LINN)**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

PRESENTA:

**LÓPEZ LOZANO, MARIA DEL ROCIO**

ASESOR: QUESADA PASCUAL, FAUSTO

MÉXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIA

A mi padre por haberme hecho quien soy.  
A Arturo, por todo.



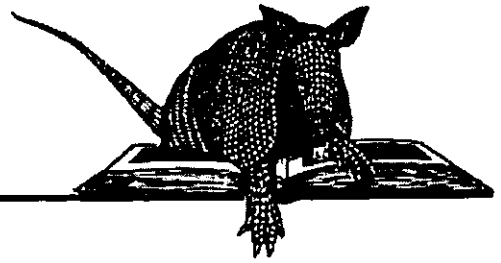
## AGRADECIMIENTOS

A el Dr. Rafael Jiménez, por ser mi maestro y amigo.  
A el Dr. Leopoldo Flores, por que los futuros proyectos se cumplan.  
A el Dr. Fausto Quesada, por aceptarme como su alumna.  
A Elena Segurajaureguí, por la ilustración de la portada.  
A Luisa Martínez, por el diseño de la portada.  
A Rodolfo Cárdenas, Carmelo Benitez y Carmen Alvarez, por su asesoría.  
A Issa, por estar a mi lado siempre.  
A Fernando y Margarita, por su confianza en mi.  
A María Fernanda, por permitirme ser su hermana.  
A Chela y Arturo, por su apoyo y cariño incondicional.  
A todos aquellos que de una u otra manera hicieron éste trabajo posible...

GRACIAS

294243

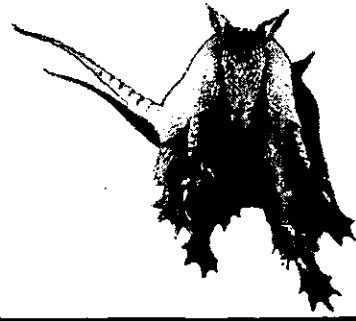
# CONTENIDO



I. Resumen .....	1
II. Introducción y Antecedentes .....	3
Preámbulo .....	3
Sistema Inmune y Células Dendríticas .....	3
Características Generales de las Células Dendríticas .....	6
Funciones de las Células Dendríticas .....	7
Captura de Antígenos .....	9
Migración y Maduración .....	13
Procesamiento de Antígenos .....	17
Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) .....	18
Complejo Principal de Histocompatibilidad clase II .....	20
Complejo Principal de Histocompatibilidad clase I .....	22
Moléculas CD1 .....	25
Ensamblaje y Transporte de Complejos MHC I y II .....	26
Presentación de Antígenos (Activación de Linfocitos T) .....	28
Moléculas Accesorias y de Coestimulación .....	30
Origen de las Células Dendríticas (Mieloide o Linfoide??) .....	37
Células Dendríticas Epidérmicas: Células de Langerhans .....	39
Armadillo de Nueve Bandas ( <i>Dasypus novemcinctus</i> ) .....	42
Características Fisiológicas y Morfológicas .....	43
Piel y Epidermis .....	44
Armadillo y Lepra .....	45
Antecedentes Históricos .....	45
El Agente Causal ( <i>Mycobacterium leprae</i> ) .....	47
El Armadillo como Modelo Experimental .....	48
Factores Óptimos para la Infección con <i>Mycobacterium leprae</i> .....	50
Experimentación y Crianza en México .....	53
Armadillo y Células Dendríticas .....	53
Antecedentes en Experimentación .....	53
Métodos Histoquímicos para Células Dendríticas .....	56
Tinción Enzimática de ATPasa .....	56
Cortes Histológicos .....	57

Resultados y Observaciones Previas	57
Morfología Típica de las Células Dendríticas	57
Densidad y Distribución de las Células Dendríticas en Epidermis	59
III. Objetivos	61
IV. Hipótesis	63
V. Material y Métodos	65
Toma de Muestras (Biopsias)	65
Separación de Capas Epidérmicas	66
Técnica de Tinción Enzimática de ATPasa	67
Cuantificación de Células Dendríticas con Microscopía Óptica	69
Observación de la Morfocitología de las Células Dendríticas (Fotografías)	70
VI. Resultados	71
Densidad de Células Dendríticas / mm <sup>2</sup>	71
Parámetros Morfométricos de las Células Dendríticas	73
VII. Análisis de Resultados	81
VIII. Discusión	85
IX. Conclusiones	93
X. Bibliografía	95
XI. Apéndices	101
Apéndice No. 1: Células de Linaje Linfoide	101
Apéndice No. 2: Iniciales y Abreviaturas Utilizadas	102
Apéndice No. 3: Sumario de Imágenes Utilizadas	107
Apéndice No. 4: Técnica de Tinción Enzimática de ATPasa	109
Apéndice No. 5: Densidad de Células Dendríticas por mm <sup>2</sup>	112
Apéndice No. 6: Parámetros Morfométricos de las Células Dendríticas	116

# I. RESUMEN




Las Células Dendríticas (DCs) son las Células Presentadoras de Antígeno (APCs) más importantes en la respuesta inmune primaria y se estudiaron en el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus* Linn.). Actualmente, este animal es el mejor modelo experimental para reproducir la lepra, ya que desarrolla una enfermedad diseminada con características clínicas, histológicas y bacteriológicas similares a las que se presentan en la lepra lepromatosa humana, provocada por el *Mycobacterium leprae*.

Utilizando la separación de capas epidérmicas, la técnica de tinción enzimática de ATPasa permite visualizar estas células mejor que los cortes histológicos y las tinciones convencionales.

Previa antisepsia y bajo anestesia, se tomaron cinco biopsias de piel de diferentes regiones anatómicas de cuatro armadillos distintos. La piel se lavó con solución salina y se incubó a 37°C en EDTA 0.5 M durante seis horas para la separación de las capas epidérmicas con forceps fino. Las capas epidérmicas se lavaron en solución salina y se fijaron con paraformaldehido-cacodilato durante 24 horas (OVN). Se incubaron en TrisMal-ATP durante 50 minutos, se lavaron nuevamente con salina y se revelaron con sulfuro de amonio. Finalmente se montaron con glicerol en un portaobjetos para su análisis al microscopio.

Se contaron las células con típica morfología dendrítica bajo objetivo de 40x obteniendo matemáticamente la densidad de células por  $\text{mm}^2$ . Los resultados obtenidos muestran que las células dendritiformes en epidermis de armadillo se encuentran en un promedio de 528 células por  $\text{mm}^2$ , comparativamente menor a la reportada en humanos, y parecen disponerse más abundantemente hacia la región cefálica que hacia la caudal. Además de cambiar la densidad, también cambia el tamaño y la morfología de estas células dependiendo de la región anatómica. Estas modificaciones, tanto en la densidad como en la morfocitología se definen por las funciones específicas de las DCs, como captura de antígenos y migración.

## II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



### PREÁMBULO

La lepra es una enfermedad granulomatosa que afecta principalmente nervios y piel. Su agente causal, el *Mycobacterium leprae*, no puede ser cultivado en medios artificiales. El armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus* Linn.) es el mejor modelo experimental que existe hasta la fecha para dicha enfermedad, de tal manera que los estudios de la respuesta inmune, tanto en armadillos sanos como infectados (ya sea artificial o naturalmente) son de gran importancia para entender el desarrollo de esta enfermedad y los cambios celulares que marcan la respuesta inmune adquirida. Las Células Dendríticas (DCs) de la epidermis, llamadas Células de Langerhans (LCs), son las Células Presentadoras de Antígeno (APCs) más importantes de este órgano. Los datos básicos sobre su distribución y su morfología son de gran utilidad para estudios posteriores en este campo, y podrían ayudar a comprender y analizar, tanto *in vivo* como *in vitro* el papel potencial de estas células en modelos de infecciones humanas, como la lepra.

### SISTEMA INMUNE Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

El sistema inmune tiene tres propiedades funcionales principales; en primer lugar, cuenta con una gran especificidad, es decir, tiene la capacidad de reconocer y distinguir a varias moléculas blanco distintas y responder a cada una de ellas de manera individual; en segundo lugar, efectúa una discriminación entre lo propio y lo ajeno, respondiendo de manera enérgica contra cualquier sustancia o cuerpo extraño al organismo; en tercer lugar, tiene memoria, es decir, tiene la capacidad de moldearse a partir de experiencias previas, de manera que los encuentros subsecuentes con un patógeno específico, originan una respuesta más rápida y vigorosa que la que se presentó en el encuentro inicial <sup>(1)</sup>.

Una respuesta inmune es una secuencia compleja e intrincada de procesos regulados, que afectan e involucran a varios tipos celulares (ver Apéndice No. 1). Se desencadena cuando un antígeno/patógeno ingresa al cuerpo y se encuentra con un grupo especializado de células llamadas

“APCs”. Estas células capturan cierta cantidad del antígeno y lo procesan para exponerlo en su membrana, de manera que pueda ser reconocido por los receptores de los linfocitos T (TCRs) cooperadores antígeno-específicos. Los linfocitos T cooperadores (LTh) una vez activados, promueven la activación de otros linfocitos, como las células B (LBs) o los linfocitos T citotóxicos (LTc); más tarde estos linfocitos activados se expanden clonalmente y realizan sus funciones específicas (atacar a las células blanco o producir y liberar inmunoglobulinas [Ig], dependiendo del tipo de linfocito) (fig. 1). En la mayoría de los casos, estos linfocitos logran eliminar o inactivar exitosamente al antígeno. En cada etapa del proceso, los linfocitos y las APCs se comunican entre sí constantemente (1).

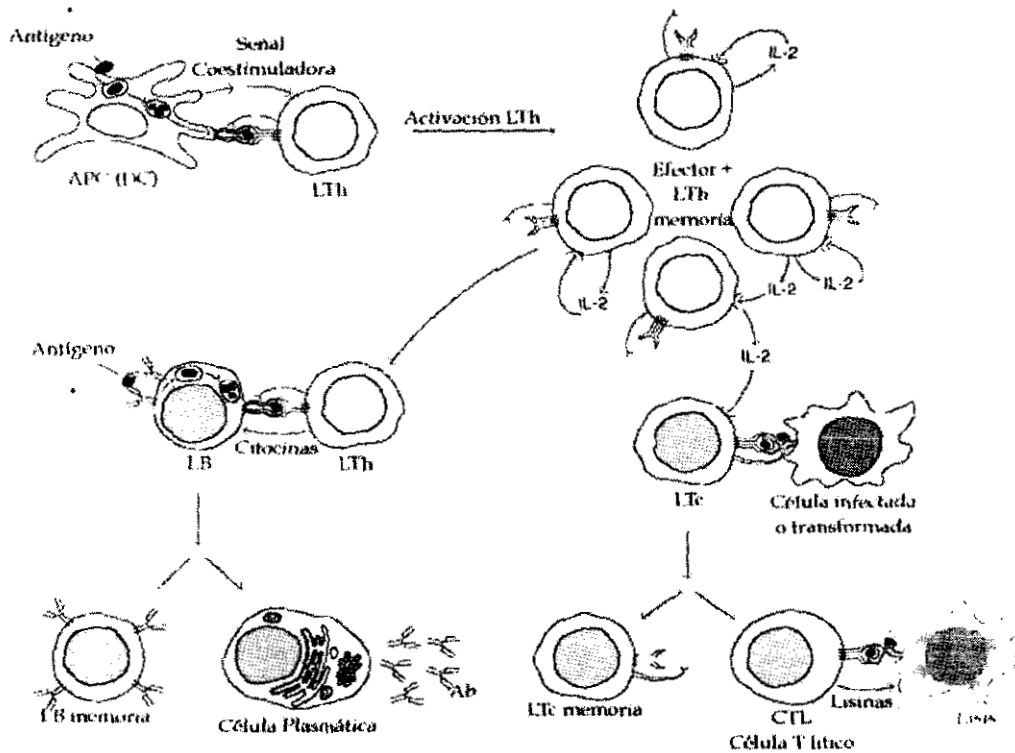


Fig. 1: Activación y expansión clonal de los linfocitos.

Los organismos superiores requieren de un sistema inmune intacto para detectar y destruir microorganismos invasores (virus, bacterias, hongos, parásitos, etc.) y para eliminar células que han sufrido alguna transformación maligna (células cancerosas) (2).

La respuesta de los organismos hacia los distintos antígenos radica en la acción de dos tipos diferentes de inmunidad: la inmunidad “inespecífica” que es innata del organismo, y la inmunidad “antígeno-específica” que es adaptativa en los seres vivos (3).



Las características del sistema inmune innato en los mamíferos incluyen: la habilidad de reconocer patógenos y/o daño tisular rápidamente y la habilidad de señalar o alertar de la presencia de peligro celular al sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato incluye células fagocíticas, células asesinas (NK), el sistema del complemento, etc. Estas células usan una gran variedad de receptores para reconocer patrones específicos de los patógenos, como ciertos lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, algunos carbohidratos y RNA viral entre otros (3).

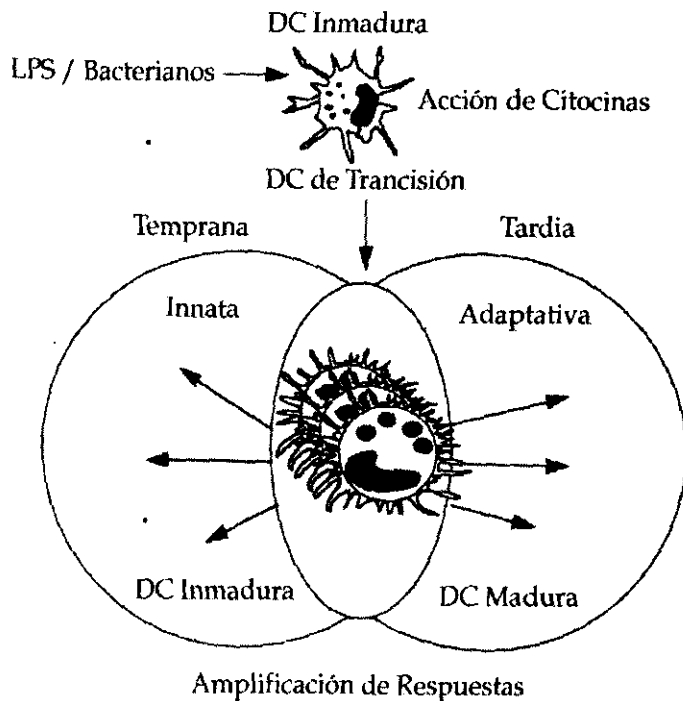


Fig. 2: Respuesta inmune innata y adaptativa.

Este grupo especializado de APCs llamadas "DCs", tienen una habilidad excepcional para la inducción y la modulación de las respuestas inmunes primarias; también tienen la capacidad de inducir tolerancia inmunológica para los antígenos que son innatos del cuerpo (Ags propios), minimizando así las reacciones autoinmunes; además de iniciar y regular las respuestas inmunes mediadas por células (CMI). Por lo cual, el conocer su funcionamiento es una herramienta indispensable para poder, eventualmente, manipular al sistema inmune (3, 4, 5, 6).

La presión evolutiva ha dado lugar al desarrollo de la inmunidad adaptativa (fig. 2), la cual se caracteriza por la habilidad de reestructurar genes de la familia de las Ig permitiendo así la creación de una gran diversidad de clones antígeno-específicos, y por contar con una memoria inmunológica. Aún así, este sistema tan sofisticado necesita ser instruido y regulado por APCs (3).

Las DCs son las únicas APCs capaces de inducir respuestas inmunes primarias, permitiendo el establecimiento de memoria inmunológica (3, 4).

## Características Generales de las Células Dendríticas

En un principio, estas células fueron caracterizadas por su morfología, pero ahora se definen mejor por criterios funcionales, que incluyen la habilidad de capturar, procesar y presentar antígenos, de migrar selectivamente a través de tejidos y de interactuar con los LTs para estimular su respuesta y activación (7).

Las DCs se encuentran en áreas discretas de tejidos no linfoides, como las LCs en epitelio (ej: piel, mucosas, pulmón), las DCs Intersticiales (ej: corazón, riñón y otros órganos), las Células Interdigitales (ej: sangre periférica y órganos linfoides secundarios), y los progenitores hematopoyéticos (ej: médula ósea y timo) (8, 9).

Hay cuatro estadios identificados en el desarrollo de las DCs (fig. 3), estos incluyen a los progenitores en médula ósea, los precursores de las DCs que circulan continuamente en sangre y linfa además de encontrarse en tejidos linfáticos, y que después de un estímulo antigénico o el reconocimiento de un patógeno, liberan grandes cantidades de citocinas limitando así la diseminación de la infección; las DCs inmaduras residentes en tejidos que poseen grandes capacidades endocíticas y fagocíticas permitiendo la captura de antígenos; y las DCs maduras presentes en órganos linfoides secundarios que expresan grandes cantidades de moléculas coestimuladoras que permiten la presentación de antígenos (3, 10, 11).

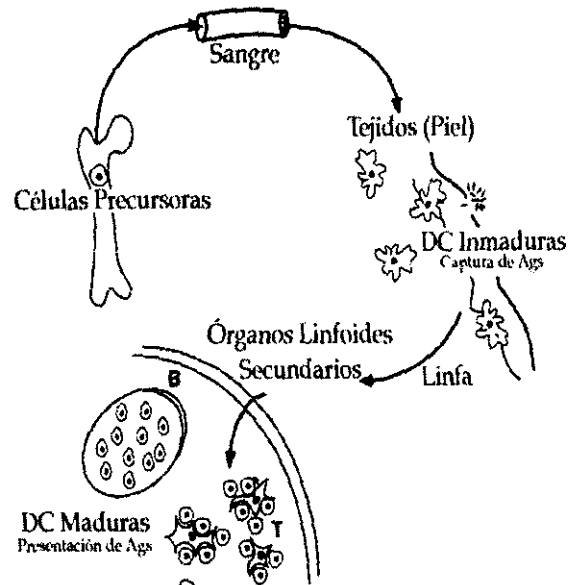


Fig. 3: Maduración y migración de las DCs.

Las DCs localizadas en la mayoría de los tejidos, como ya se mencionó, capturan y procesan antígenos en su estadio inmaduro, exponiendo así grandes cantidades de complejos peptídicos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) en su superficie; ellas sobrerregulan sus moléculas coestimuladoras y migran a los órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos, madurando y modificando su fenotipo, donde son reconocidas por LTs en estadio ya maduro. Todas estas actividades de las DCs pueden ser inducidas por agentes infecciosos y/o productos inflamatorios, por lo que las DCs resultan ser centinelas móviles

que brindan antígenos a los LTs y expresan moléculas coestimuladoras para la inducción de la inmunidad (6, 10).

Las DCs tienen gran potencia, especialmente para iniciar la respuesta de los LTs; una vez activados, estos linfocitos interactúan eficientemente con otras APCs. Los LBs son las únicas APCs que producen anticuerpos (Abs) después de la presentación de los LTs, y pueden incrementar la actividad antimicrobiana y aumentar la respuesta inmune innata, por lo que todas estas células son capaces de presentar antígenos, pero el carácter de la respuesta inmune depende de el tipo de APCs (5).

## Funciones de las Células Dendríticas

En investigaciones anteriores se ha propuesto un papel doble para las DCs, uno en la amplificación de las respuestas inmunes innatas, y otro en la activación de respuestas inmunes adaptativas. Las DCs están localizadas a lo largo de las principales rutas de entrada de microorganismos (como piel y mucosas por ejemplo), donde desarrollan su función de centinelas móviles contra los patógenos que entran al organismo (10).

Los progenitores de las DCs en médula ósea, salen a la circulación como precursores que se establecen en los tejidos, donde residen como células inmaduras con gran capacidad fagocítica. Después de un daño tisular, las DCs capturan al antígeno y migran a los órganos linfoides secundarios, donde seleccionan LTs “vírgenes” antígeno-específicos e inician la respuesta inmune (3).

Las DCs presentan antígenos a los LTh  $CD4^+$ , los cuales, una vez activados, regulan a los efectores inmunes, como los LTe antígeno-específicos  $CD8^+$  y los LBs, también regulan la actividad de los macrófagos ( $M\emptyset$ ), eosinófilos y células NK. Aún más, las DCs instruyen células efectoras en el sitio de daño tisular (3).

Así, las DCs diferenciadas o maduras están preparadas para activar a los LTs, que una vez activados por las DCs, pueden completar la respuesta inmune interactuando con otras células, en el caso de los LBs para la formación de anticuerpos, los  $M\emptyset$  (fig. 4) para la liberación de citocinas, y las células blanco para su lisis. Las DCs inmaduras, por otro lado, son menos eficaces como iniciadoras de la respuesta inmune, pero se especializan en capturar y procesar

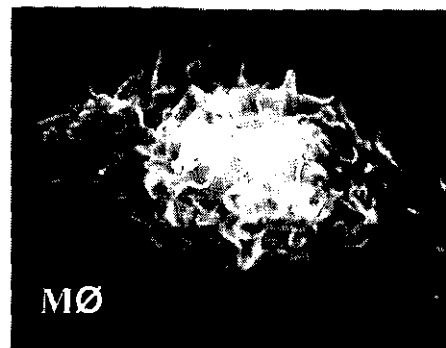


Fig. 4: Macrófago.

antígenos para formar complejos protéicos con el MHC. Hay, de esta forma, dos funciones clave de las DCs en diferentes estadios: las primeras, que aún son inmaduras, capturan y procesan antígenos formando complejos con el MHC; y las segundas, que son células ya maduras, poco después estimulan a los LTs activándolos y propiciando una respuesta inmune (fig. 5). Son necesarias tan solo unas cuantas DCs para provocar una fuerte respuesta de los LTs. Se calcula que una sola DC puede estimular de 100 a 3000 LTs, por lo cual se considera a las DCs como células especializadas en iniciar la respuesta inmune primaria (6).

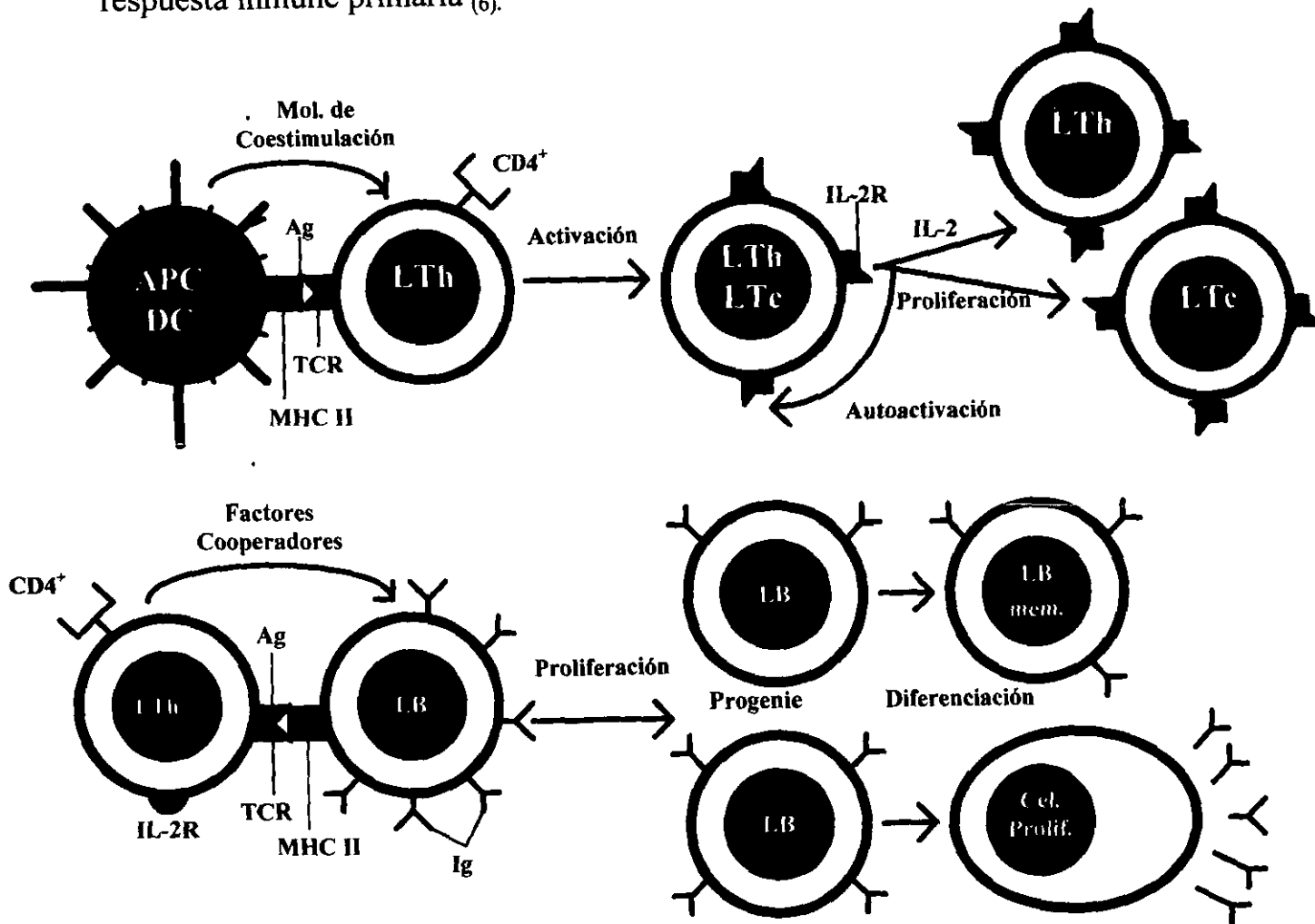


Fig. 5: Activación de linfocitos T cooperadores por DCs maduras (Presentación de Ags).

Dado que un pequeño número de DCs mezclado con muy poca cantidad de antígeno es capaz de estimular vigorosamente la respuesta de los LTs, se puede decir que una de las principales características funcionales de las DCs es su eficiencia como APCs. Otra de estas características funcionales radica en que los LTs inactivos o "vírgenes" pueden ser activados por

antígenos presentes en las moléculas MHC en la superficie celular de las DCs, ocasionando así una respuesta primaria. Y por último, las características funcionales radican en que los LTh ( $CD4^+$ ) y los LTc ( $CD8^+$ ) pueden ser activados por estas células, tanto *in vivo* como *in vitro* (5).

Las funciones de las DCs, en piel como en otros tejidos, están dadas por tres categorías de eventos o señales: La señal uno involucra factores que influyen en la eficacia de la captura, procesamiento y asociación de antígenos con productos del MHC y se da en la circulación linfática aferente, en la cual los antígenos son depositados en diferentes partes del cuerpo y capturados para su degradación o procesamiento para ser presentados a los LTs. La señal dos involucra factores que trabajan junto con la presentación de antígenos; estos últimos incluyen moléculas de adhesión que son moduladoras de la unión de las APCs con los LTs (fig 6), moléculas coestimuladoras que ayudan a la señalización de los LTs y LBs para expandirse clonalmente y diferenciarse produciendo anticuerpos, linfocinas o moléculas citolíticas, y productos solubles o citocinas que instruyen a los LTs para formar LTh tipo 1 (LTh1) y tipo 2 (LTh2); ésto ocurre en el sistema linfático central, donde los linfocitos, generalmente en órganos linfoides secundarios, son seleccionados.

La señal tres, por último, involucra factores que permiten el desarrollo de la inmunidad *in situ* e incluyen a las citocinas y vías de migración que habilitan grupos específicos de APCs y LTs a ser movilizadas y a interactuar en compartimentos anatómicos definidos; lo cual ocurre en la circulación linfática eferente, donde los linfocitos activados y las APCs trabajan juntos para llevar a cabo funciones efectoras que eliminan a los antígenos donde quiera que se encuentren (5, 12).

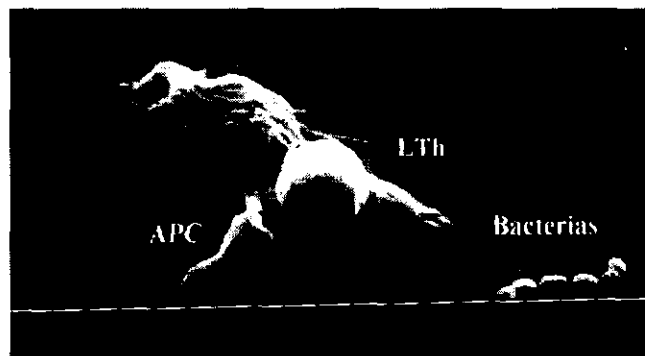


Fig. 6: Presentación de Ags.

## Captura de Antígenos

En la mayoría de los tejidos, hay DCs inmaduras residentes, incapaces de estimular a los LTs aunque muestran todas las señales accesorias requeridas para ello, pero resulta que están magníficamente equipadas para la captura de antígenos (un evento clave para la inducción de la

inmunidad) lo cual las capacita para promover la maduración y la migración de las DCs a órganos linfoides secundarios (6, 10).

Poseen una gran diversidad de características que las hacen eficaces en la captura de antígenos, ya que pueden utilizar varias vías:

1. Pueden realizar macropinocitosis formando grandes vesículas pinocíticas en donde los fluidos y solutos extracelulares están presentes (fig. 7).
2. Son capaces de ingerir partículas y microbios por endocitosis adsortiva mediada por receptores, entre los cuales se incluyen los de lectina tipo C, receptores Fc $\gamma$  tipo I y tipo II, y receptores Fc $\epsilon$ .
3. También son capaces de llevar a cabo la fagocitosis de partículas, como fragmentos celulares apoptóticos y necróticos, virus y bacterias (incluso micobacterias) así como parásitos intracelulares (fig. 8) (3, 4, 5, 6, 7, 9, 10,



Fig. 7: Macropinocitosis

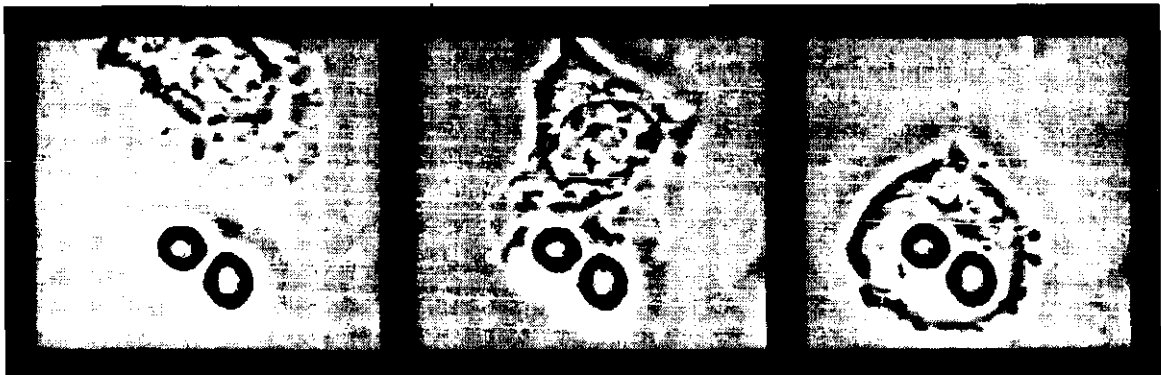


Fig. 8: Fagocitosis

Los receptores involucrados en la captura de antígenos se dividen en base a su modo de acción, e incluyen: receptores que reconocen patrones específicos, receptores del complemento (C') y receptores de inmunoglobulinas (Ig) Fc (3, 4, 5, 7, 9).

Los receptores de reconocimiento de patrones específicos se unen a moléculas de superficie con patrones estructurales que son comunes a varios microorganismos, pero que se encuentran ausentes en la superficie de células de mamíferos. Estos antígenos suelen ser carbohidratos complejos que exhiben alguna especificidad en los residuos terminales de azúcar. Las DCs expresan receptores de multilectinas de superficie que se unen a estos antígenos y facilitan la endocitosis adsortiva y la fagocitosis, como los receptores de manosa de M $\phi$  (MMR) y DEC-205, además de ser capaces de reconocer a otras moléculas semejantes a lectinas. DEC-205 en DCs

actúa como receptor de antígenos, teniendo una unión glicólica asociada al reconocimiento de dominios CHO. La expresión de esta proteína y su ligando no ha sido estudiada a fondo, por lo cual el significado de su expresión tardía en DCs presenta varias incógnitas. Los MMR son lectinas tipo C expresadas principalmente por MØ y con gran afinidad con los carbohidratos que están involucrados en la internalización y presentación de proteínas manosiladas (4, 5, 7, 9, 10).

Hay otros muchos receptores específicos que ayudan a las DCs a capturar antígenos, como el CD14 (LeuM3) o el CD11c, que son receptores de LPS bacterianos; el CD54 (molécula intracelular de adhesión ICAM-1), funciona como receptor para virus además de fijar LFA-1 (antígeno funcional de linfocitos). Las DCs también presentan algunos receptores de MØ pertenecientes a una familia de proteínas rica en cisteína (SRCR), como SR-AI y AII. El receptor MARCO se presenta en DCs, pero se sabe muy poco acerca de su función específica. CD36 y SR-BI son proteínas de unión a lípidos que también están presentes en la superficie de las DCs como receptores. Posiblemente haya algunas colectinas involucradas (1, 4).

Muchos tipos celulares que no son capaces de sintetizar Ig, tienen la propiedad de absorber anticuerpos circulantes en sus superficies mediante receptores Fc. Se han observado receptores para cada una de las clases de cadena pesada, pero sólo las de gamma ( $\gamma$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ) se han caracterizado a nivel molecular. En humano, se expresan tres receptores Fc $\gamma$  diferentes y dos Fc $\epsilon$  distintos, cada uno de los cuales tiene distribución tisular y propiedades biológicas características: los receptores Fc $\gamma$  reconocen IgG, tienen ciertos marcadores específicos relacionados (fig. 9) (Fc $\gamma$  RI/CD64, Fc $\gamma$  RII/CD32, Fc $\gamma$  RIII/CD16), y cuentan con preferencia relativa de subclase (Fc $\gamma$  RI prefiere IgG1=IgG3>IgG4, Fc $\gamma$  RII IgG1=IgG3>IgG2, y Fc $\gamma$  RIII IgG1=IgG3); los receptores Fc $\epsilon$  reconocen IgE, no cuentan con preferencia de subclase, y sólo RII tiene un marcador específico relacionado (CD 23).

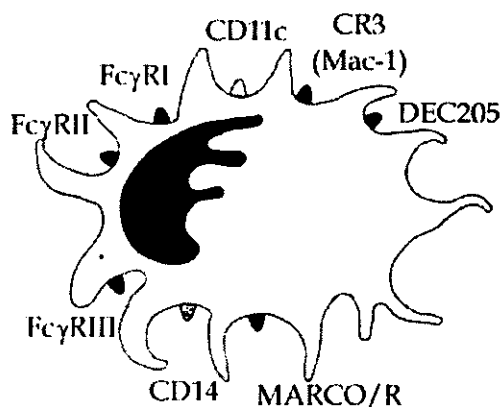


Fig. 9: Receptores Fc $\gamma$  que reconocen IgG.

En general, los receptores de alta afinidad de cada tipo (Fc $\gamma$ RI y Fc $\epsilon$ RI), tienen mayor probabilidad de fijar Ig en situaciones normales y de ese modo ocasionar los efectos biológicos más notables. Las funciones principales de los receptores Fc difieren entre los distintos tipos celulares a los

que pertenecen (DCs, MØ, células NK, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, etc.). La fijación de las moléculas IgG secretoras en los receptores Fc $\gamma$ , actúa como un “brazo” de las células para realizar citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Los receptores Fc también facilitan la fagocitosis de partículas antigénicas recubiertas por anticuerpos mediante el fenómeno de opsonización, y son importantes para desencadenar quimiotaxia y degranulación (1, 4).

Tanto el CD32 como el CD64 se expresan en DCs sanguíneas durante su diferenciación temprana, y capacitan a la célula para fagocitar actuando como opsoninas. Las LCs expresan CD32, CD64 y ambos receptores para IgE. También hay una molécula llamada CMRF-35 que es similar al receptor Fc para IgA e IgM, y ya ha sido identificada en DCs (aunque se expresa en diversas formas dependiendo de la subpoblación de DCs); su ligando aún no se ha descrito para este tipo de células (4, 5, 7).

Algunos productos de la cascada del complemento también actúan como opsoninas muy potentes debido a que las células fagocíticas expresan receptores del complemento en su superficie, los mejor estudiados son aquellos que reconocen fragmentos de C3 (C3b, C3bi y C3bg); estos receptores tienen una distribución celular característica: el receptor de C3bi, llamado CR3 (Mac-1 [glucoproteína de MØ], integrina  $\alpha$ M $\beta$ 2 o CD11b/CD18), suele estar presente en células con capacidad fagocítica. Si el C3 se une a un antígeno o partícula blanco, su receptor se fijará a través del ligando a la superficie de las células con el fragmento específico de C3. Para células fagocíticas, como es el caso de las DCs, la unión de la célula blanco con su superficie, incrementa el proceso fagocítico. El CR3 se almacena en vesículas intracelulares, desde donde es rápidamente movilizado hacia la superficie celular en respuesta a ciertos estímulos antigénicos. El CR3 es un integrante de la familia de las integrinas, y desempeña una función importante en la adherencia celular y la quimiotaxis (1, 4, 10).

El marcador CD11c (CR4) recientemente identificado, también es una integrina que funciona como receptor para fragmentos C3 del complemento, fijando C3bi, C3b y C3bg; también se le conoce como p150/95 (1, 4).

Los receptores del C' descritos para DCs son CD11b (receptor para C3) y CD11c (receptor para C4) en bajas cantidades; además se ha observado que una subpoblación de LCs expresa CD88 (receptor para C5a). Las DCs no expresan receptores CD21 (CR2) ni CD35 (CR1); se protegen de la lisis mediada por C' con la expresión de proteínas de membrana que no actúan como receptores, sino que controlan la activación del complemento: el CD59 es una proteína reguladora que previene el ensamblaje completo del complejo



C5b-9 en las células blanco, inhibiendo la lisis mediada por complemento; también están presentes CD55 y CD46, que regulan otras etapas de la cascada del complemento inhibiendo su activación (1, 4, 7).

Las DCs también son capaces de realizar macropinocitosis, formando grandes vesículas pinocíticas (0.25 a 1.0  $\mu\text{m}$ ), sobre todo en presencia de factores de crecimiento, como el factor estimulante del crecimiento de colonias de monocitos y M $\emptyset$  (M-CSF), el factor estimulante del crecimiento de colonias de granulocitos y M $\emptyset$  (GM-CSF), el factor de crecimiento de eritrocitos (EGF) y la interleucina 4 (IL-4). La actividad macropinocítica suele tomar lugar continuamente a altos niveles, permitiendo a las DCs muestrear grandes volúmenes de fluidos extracelulares y presentar eficientemente solutos protéicos presentes en muy bajos niveles (5, 10).

Una vez que las DCs inmaduras han capturado a un antígeno, éste les proporciona la señal para madurar, y sus capacidades para capturar antígenos decaen rápidamente; comienzan a formar y a ensamblar complejos antigénicos con el MHC clase II (6).

## Migración y Maduración de las Células Dendríticas

Está claro que la maduración de las DCs es crucial para que se dé la respuesta inmune. La maduración está marcada por una gran variedad de factores, sobre todo por factores microbianos e inflamatorios. En las bacterias la pared celular esta compuesta por LPS que son capaces de activar la producción de citocinas, todas ellas estimuladoras de la maduración y migración de las DCs (6).

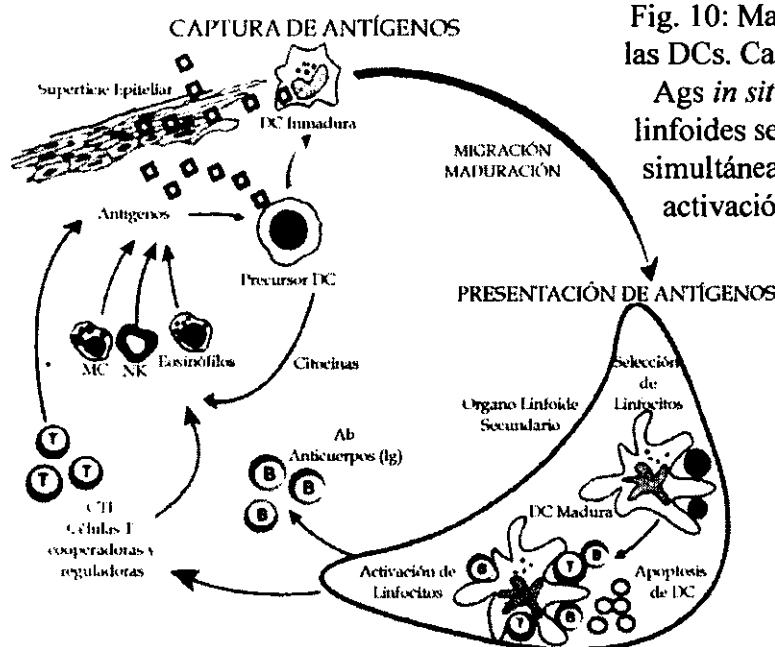


Fig. 10: Maduración y migración de las DCs. Captura y procesamiento de Ags *in situ*, migración a órganos linfoides secundarios y maduración simultánea, presentación de Ags y activación-expansión clonal de linfocitos.

Al interactuar con un antígeno o con un patógeno, las DCs inmaduras empiezan a coordinar su proceso de maduración en respuesta a una señal de peligro, la cual induce cambios fenotípicos y funcionales que culminan con la transformación de las células inmaduras a APCs. La maduración de las DCs esta íntimamente ligada con su migración desde los tejidos periféricos hasta los órganos linfoides secundarios (fig. 10) (3, 6, 10).

La maduración de las DCs es un proceso continuo que se inicia en la periferia y se completa durante la interacción DCs-LTs (3, 5).

Numerosos factores inducen y/o regulan la migración y la maduración de las DCs, incluyendo algunas moléculas derivadas de patógenos (como LPS, DNA bacterial, RNA viral, etc.), el balance entre las señales pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el microambiente local (como citocinas: TNF- $\alpha$  [factor de necrosis tumoral], IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  [factor transformador de crecimiento], GM-CSF, prostaglandinas, etc.), algunas señales derivadas de LTs, etc. El proceso de maduración esta asociado con una gran cantidad de eventos coordinados, como la pérdida de receptores para fagocitosis y endocitosis, la sobrerregulación de moléculas coestimuladoras (CD40, CD58, CD80, CD86, etc.), cambios en la morfología, aumento en los compartimentos lisosómicos, cambios en los compartimentos de MHC clase II, y aumento en el tiempo de exposición de los complejos MHC clase II - antígeno (3, 5, 6, 9, 10).

Los cambios morfológicos que acompañan la maduración de las DCs incluyen la pérdida de estructuras de adhesión, la reorganización del citoesqueleto y la adquisición de una alta movilidad celular (3).

Las caderinas son glicoproteínas transmembranales que actúan en la adherencia de uniones celulares. La E-caderina juega un papel importante en la migración, y es expresado por LCs y DCs sanguíneas; su presencia confiere a las LCs su inusual adherencia con el epitelio escamoso de la epidermis, y decae tras la activación facilitando la migración a órganos linfoides secundarios. También hay otras moléculas de adhesión que intervienen en la migración como el syndecan (CD138), la molécula endoglina endotelial (CD105) y la neuropilina (CD104/CD147). Además, las DCs expresan CD106 (molécula de adhesión celular vascular V-CAM) que es una molécula de adhesión vascular que facilita la entrada a vasos sanguíneos durante la migración, y CD31 (PECAM-1) (4, 7, 10).

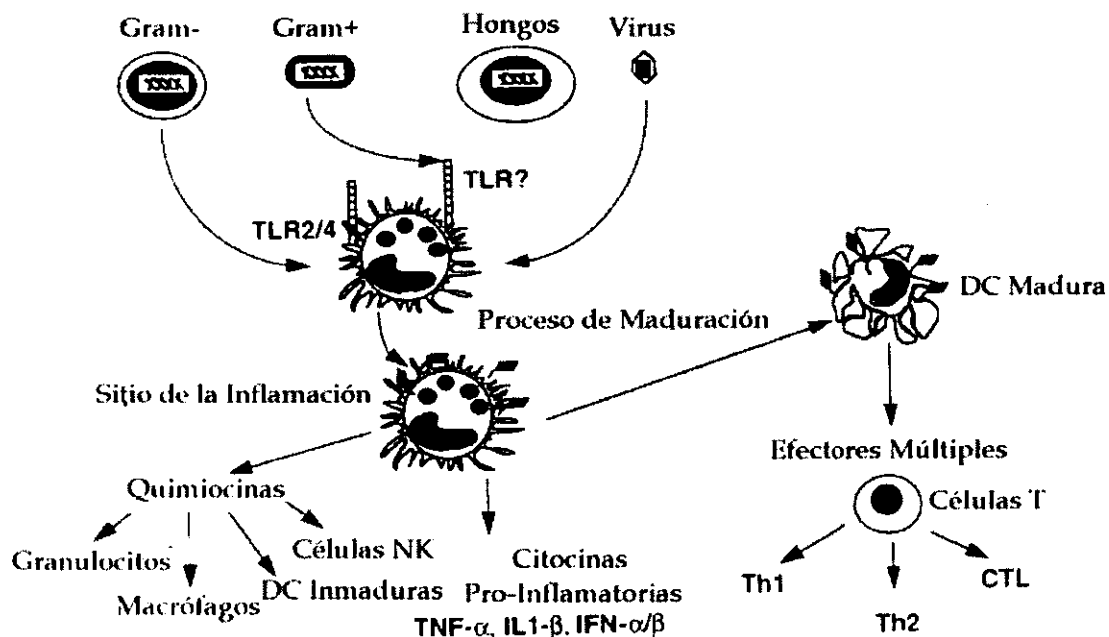


Fig. 11: Atracción y amplificación de la RI innata en el sitio de inflamación por la producción y liberación de quimiocinas y citocinas por las DCs.

Después de su interacción con un estímulo antigénico apropiado, las DCs regulan la atracción de leucocitos al sitio de inflamación y la amplificación de respuestas inmunes innatas a través de la producción de quimiocinas, citocinas pro-inflamatorias e interferones (fig. 11). Es entonces cuando adquieren sus propiedades migratorias y producen cambios en la expresión de receptores para quimiocinas. En ese momento las DCs dejan el tejido inflamado a través de la circulación linfática y se dirigen a los órganos linfoides secundarios, donde completan su maduración, atrayendo a los LTs y LBs por la liberación de citocinas (3, 6, 10).

Los productos patógenos, como los LPS y la producción local de citocinas, todas ellas mediadoras de la maduración, inducen el proceso de la migración de las DCs periféricas hacia los órganos linfoides donde hay gran cantidad de LTs. Esta migración y maduración de las DCs también involucra la acción coordinada de gran cantidad de quimiocinas; para que las DCs respondan a estas quimiocinas, expresan receptores para moléculas quimioatrayentes que presumiblemente influyen en los procesos de migración

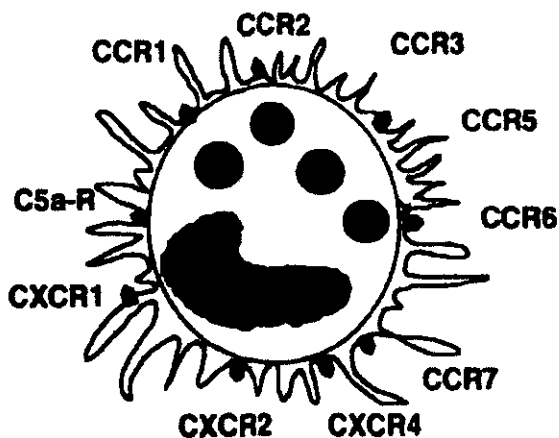


Fig. 12: Expresión en la superficie de DCs de receptores para quimiocinas que influyen en la migración.

y presentación de antígenos; por ejemplo, las DCs que se diferencian en presencia de GM-CSF e IL-13 expresan receptores de C5aR, CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2 y CXCR4 (fig. 12). Aunque la expresión de un receptor en particular no siempre indica que las DCs presentan quimiotaxis en respuesta a las quimiocinas que se unen a dicho receptor; está documentado que después de la captura de un antígeno, el estímulo inflamatorio disminuye la respuesta de las células inmaduras a ciertas quimiocinas (como la quimiocina C-C, llamada proteína inflamatoria de macrófagos MIP-3 $\alpha$ ) específicas para DCs inmaduras a través de la disminución o desensibilización de los receptores (en este caso el receptor para MIP-3 $\alpha$  llamado CCR6) dependientes de la producción autócrina de quimiocinas; en consecuencia, las DCs en maduración escapan del gradiente local de dichas quimiocinas (MIP-3 $\alpha$ ), dejando el tejido inflamado y entrando a la corriente linfática al ser atraídas por otras quimiocinas (MIP-3 $\beta$  y 6Ckina) que se expresan en los vasos linfáticos y a las que previamente se sensibilizó sobre-expresando sus receptores. Las DCs maduras entran entonces a la corriente linfática y son llevadas a las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos en respuesta a la atracción de dichas quimiocinas (MIP-3 $\beta$  y 6Ckina) y encontrándose con una gran cantidad de LTs “vírgenes”. El arribo de las DCs aumenta la cantidad de las quimiocinas atrayentes amplificando y manteniendo la señal quimiotáctica (3, 7, 9, 10).

También se han documentado otras quimiocinas que inducen la migración de las DCs como respuesta de sus receptores: quimiocinas CC como MCP-3 (proteína quimioatrayente de monocitos), MCP-4, RANTES,

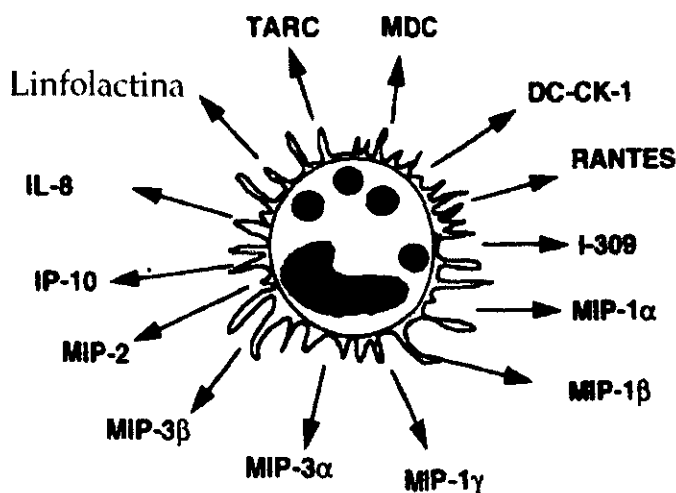


Fig. 13: Quimiocinas producidas por las DCs.

MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y MIP-5; quimiocinas CXC como SDF-1 (fig. 13). Las DCs no presentan respuesta a algunas quimiocinas C (linfotacina), CC (eotaxina) y CXC (IL-8, IP10 y Gro $\beta$ ). Y la respuesta a MCP-1 y MCP-2 se sigue discutiendo. Las DCs también responden a C5a (anafilotoxina de la cascada del complemento con acción quimiotáctica en células fagocíticas), PAF (factor activador de plaquetas con acción inflamatoria) y a algunos formil péptidos. Se ha observado que las DCs

también migran en respuesta a una quimiocina CC recientemente identificada, la MDC, producida por macrófagos y DCs (7, 9, 10).

Aparentemente hay varias quimiocinas que pueden inducir la migración de las DCs, aunque el estado de maduración de estas células así como la fuente de producción y las señales reguladoras para la secreción de muchas quimiocinas necesitan ser estudiadas más a fondo para comprender los factores que controlan y modulan las vías de migración de las DCs (9).

Durante la maduración, las DCs también cambian su capacidad para producir y responder a citocinas. Por ejemplo: las DCs maduras secretan grandes cantidades de IL-12, la cual estimula la diferenciación de LTh-1 y de células NK; las DCs maduras son resistentes a los efectos supresores de la IL-10, que puede bloquear la proliferación de LTs y la producción de TNF- $\gamma$  además de inducir la apoptosis en DCs en desarrollo. La citocina GM-CSF es de gran importancia para promover la viabilidad y maduración de las DCs (5).

Dos de los estímulos más importantes para la maduración de las DCs son el ligando de CD40 (CD40L) y el TNF- $\alpha$ . El TNF- $\alpha$  tiene un efecto importante en la maduración tardía de las DCs a partir de médula ósea y progenitores monocíticos. Las DCs pueden terminar su maduración durante la interacción con los LTs, principalmente por la expresión de CD40L. Así, para que la maduración de las DCs se complete, requiere de la señalización que le proporcionan los receptores de TNF y de su asociación con señales de transducción. La señalización adquirida por los receptores de la familia del TNF, (como por ejemplo TNF-R [CD120a/b], CD40 y TRANCE/RANK), activa a la familia de los factores de transcripción del NF- $\kappa$ B/rel, que controla la activación de muchos genes inmunes e inflamatorios. Las proteínas de NF- $\kappa$ B/rel son particularmente abundantes en DCs (rel A, p65, rel B, rel C, p50, p52), y muestran una actividad en la electromovilidad de estas células (4, 5, 6).

La activación por receptores de TNF involucra al metabolismo de esfingolípidos para producir ceramidas que median la maduración de las DCs, particularmente disminuyendo los mecanismos para captura de antígenos (5).

## **Procesamiento de Antígenos**

La presentación de antígenos es esencialmente el elemento fundamental del cual depende la respuesta de los LTs, ya sea para la inmunidad o para la tolerancia (12).

La "presentación de antígenos" se refiere a una serie de procesos que llevan a la célula a generar complejos formados por las moléculas del MHC y

una porción del antígeno nativo; esto genera al ligando que es reconocido por el receptor clonotipo de las células T (TCR) (12).

Como resultado, la presentación de antígenos implica especificidad inmunológica. De cualquier manera, todas las células que expresan productos

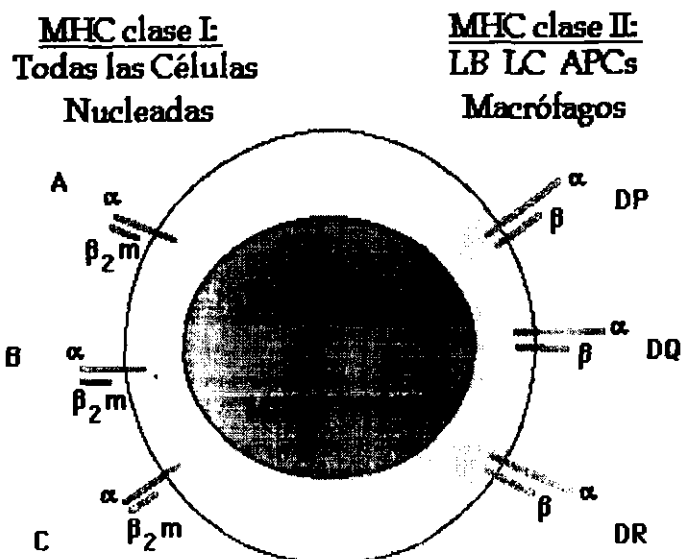


Fig. 14: Productos polimórficos del MHC presentes en DCs en el hombre.- clase I HLA-A, B, y C; y clase II HLA-DR, DQ y DP

del MHC clase I y clase II son capaces de presentar antígenos, ya que la presentación es la única función clara de los productos polimórficos del MHC (en el hombre, clase I [HLA-A, B, y C antígeno de leucocitos humanos] y clase II [HLA-DR, DQ y DP]) (fig. 14) (12).

Las DCs están bien equipadas para la captura, el procesamiento y la presentación de antígenos, y un gran número de moléculas involucradas en estos procesos ya han sido identificadas (3).

## Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

El MHC y la presentación de antígenos ha sido la base de la inmunología por décadas. Los productos del MHC unen antígenos de origen proteico y los expresan en la membrana. Estos complejos MHC-péptido son presentados y/o reconocidos por el TCR, para iniciar una respuesta o la tolerancia (5).

La unión de péptidos al MHC puede ser de dos tipos: MHC de clase I y de clase II, los cuales estimulan a los LTs citotóxicos (LTc) y a los LTs cooperadores (LTh) respectivamente. Los antígenos intracelulares son fragmentados a pequeños péptidos en el citosol de las APCs, los cuales son unidos a moléculas MHC clase I para ser reconocidos por los LTc que, una vez activados, pueden matar o destruir directamente a las células blanco. Los antígenos extracelulares que entran por una vía endocítica a las APCs son procesados y generalmente presentados por moléculas MHC clase II a LTh, los cuales tienen un efecto inmunoregulatorio (fig. 15) (6).

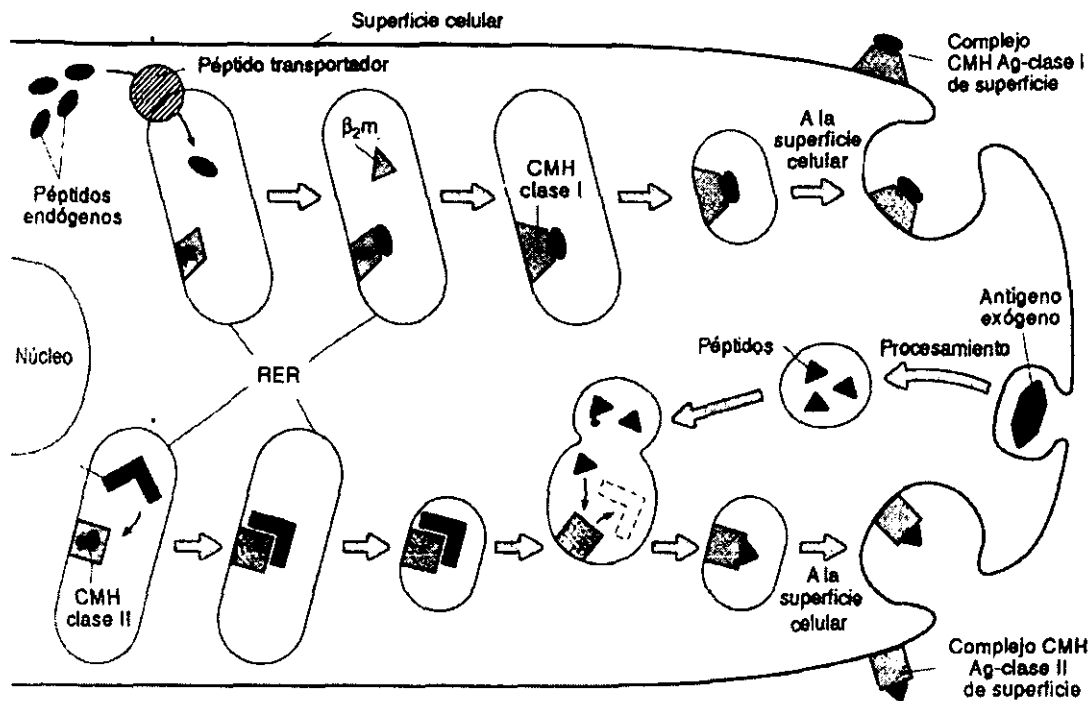


Fig. 15: Transporte y ensamblaje del complejo MHC-peptido tanto clase I como clase II dentro de la célula.

Las subdivisiones del MHC, se hacen en base a su estructura molecular; las moléculas de clase I y II, son glucoproteínas de superficie celular estructuralmente similares, que participan en la presentación del antígeno a los LTs. Hay un tercer tipo, la clase III, que constituye un grupo variado de proteínas, incluyendo a varios componentes del sistema del complemento, que no están relacionadas ni en cuanto a estructura ni en cuanto a función con las

clases I y II, y se agrupan con ellas solamente por que están situadas en la misma región cromosómica (brazo corto del cromosoma 6 en humanos) (fig. 16) (1).

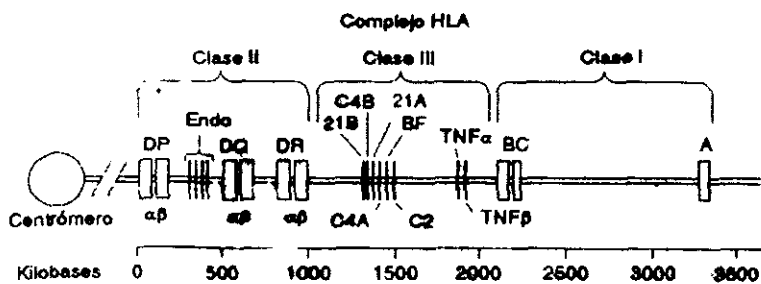


Fig. 16: Organización genética del MHC en el cromosoma 6.

Los Ags MHC de clase I se expresan en todas las células somáticas, mientras que los antígenos de clase II sólo se encuentran en unos pocos tipos celulares (APCs específicamente). Las dos clases de MHC actúan sobre distintos subgrupos de los LTs (1).

## Complejo Principal de Histocompatibilidad:HLA clase II

Las proteínas clase II (DR, DP y DQ), están constituidas cada una por dos polipéptidos unidos de manera no covalente; sin embargo, ambas cadenas están codificadas por genes polimorfos situados dentro del complejo MHC. Cada proteína clase II se forma de una cadena alfa ( $\alpha$  PM 34000) y una cadena beta ( $\beta$  PM 29000), ambas sujetas a la membrana celular, y cuentan con dos dominios extracelulares, cada uno similar a inmunoglobulina (fig. 17). El polimorfismo de las moléculas clase II está limitado al dominio amino-terminal de cada cadena, y se designan como dominios  $\alpha 1$  y  $\beta 1$ ; estos dos dominios se unen para formar el sitio de fijación del péptido. Cada dominio clase II  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  contiene un segmento elicoidal y estructuras de hoja  $\beta$ , que forman la pared y la mitad del piso, respectivamente,

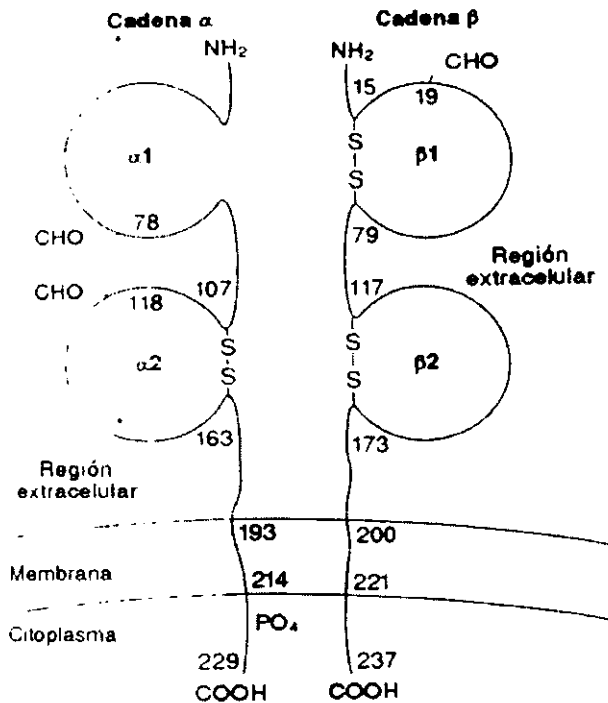


Fig. 17: Conformación espacial del MHC II. En esencia, todo el polimorfismo de las moléculas clase II está situado en las paredes y el piso de esta hendidura, lo que proporciona un sitio distintivamente contorneado para cada variante alélica. Las características fijadoras de péptidos de las moléculas clase II casi siempre son análogos a las de clase I, ya que los péptidos se fijan

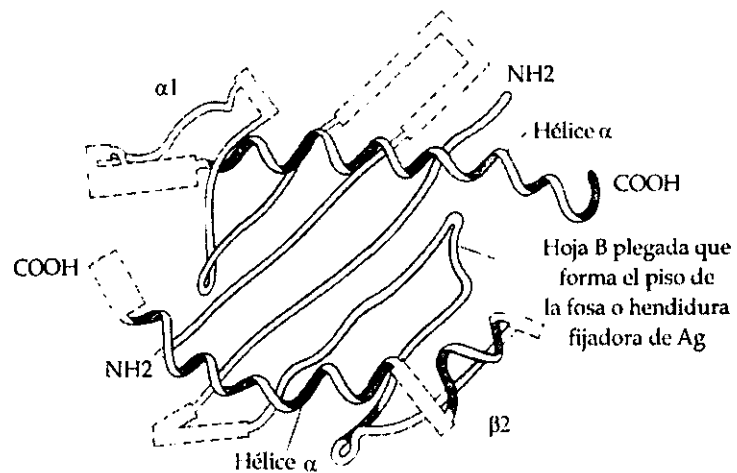
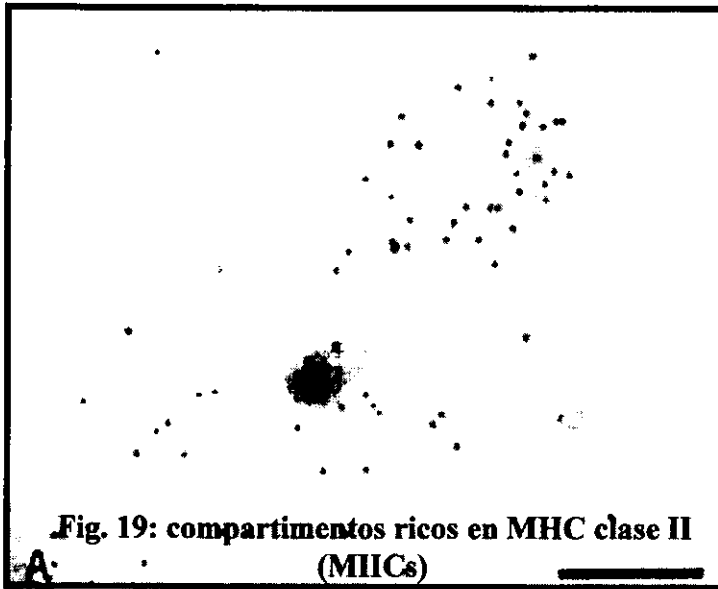


Fig. 18: Conformación espacial del sitio de unión al péptido antigénico del MHC clase II.



en una conformación extendida a través de contactos no covalentes que implican, de modo principal, la estructura principal del péptido, más que las cadenas laterales. De ahí se desprende el hecho de que cada proteína clase II tiene especificidad degenerada (o sea, puede fijar una gama muy amplia de péptidos). La hendidura fijadora de las proteínas clase II está abierta en ambos extremos y fija perfectamente péptidos un tanto más largos (de 10 a 18 aminoácidos) que los que fija la clase I (de 8 a 10 aminoácidos) (1).

En cuanto a su funcionamiento; se sabe que los antígenos solubles y particulados son capturados eficientemente por las DCs inmaduras, estos son enviados a los compartimentos del MHC clase II. Las DCs inmaduras acumulan constantemente



moléculas MHC clase II en compartimentos intracelulares parecidos a los lisosomales (también llamadas vacuolas intracelulares), conocidos como compartimentos ricos en MHC clase II (MIICs) (fig. 19), con estructuras multivesiculares y multilaminares aparentes, que suelen contener principalmente HLA-DM / H-2M, catepsina y proteínas

de membrana asociadas a lisosomas (CD107a, b). Los Ags exógenos capturados son guiados hacia los MIICs, que son compartimentos endosomales, promoviendo la eliminación catalítica de la cadena invariable (Ii) de clase II y ayudando a la unión péptida con las moléculas de clase II. El ensamblaje de los antígenos clase II dentro de las DCs sólo ocurre en ausencia de la Ii. La degradación proteolítica de la Ii es regulada por el balance que hay entre la catepsina S y su inhibidor endógeno, la cistatina C. Durante la maduración, la cistatina C disminuye, y en consecuencia, la catepsina S se incrementa, promoviendo la degradación de la Ii y la exportación de las moléculas péptidas clase II desde el RER y el aparato de Golgi hasta la superficie celular, donde son presentados a las células T (3, 5, 6).

Algunas citocinas, como el GM-CSF y la IL-4, estimulan la captura de antígenos y la formación de compartimentos MIICs en DCs inmaduras, pero tras un estímulo adicional, como LPS, TNF- $\alpha$  o CD4L, las células maduran y

pierden los MIICs para expresar grandes cantidades de productos del MHC en la superficie. Los MIICs se encuentran más abundantemente en DCs inmaduras que en ningún otro tipo celular; en las DCs maduras, los complejos MHC clase II son translocados a la superficie celular por medio de vesículas ricas en HLA clase II (CIIVs), que son vacuolas no lisosomales ricas en MHC clase II; al cabo de algunas horas (aproximadamente 12), las DCs inmaduras con gran cantidad de MIICs intracelular se convierten en DCs maduras con gran expresión de complejos del MHC clase II en su superficie, pero con pocos MIICs lisosomales en la región perinuclear. Paralelamente, la síntesis y acoplamiento de complejos MHC cambia de ser muy rápida en DCs inmaduras, a ser extremadamente lenta en células maduras; pero los complejos de superficie MHC II / péptido antigénico en las DCs maduras se vuelve en una estructura sumamente estable y con una vida media más larga ( $\pm 100$  hrs) (3, 5, 10).

## Complejo Principal de Histocompatibilidad: HLA clase I

Cada proteína clase I se expresa en la superficie celular como un dímero constituido por dos cadenas de polipéptidos enlazadas de manera no covalente; una cadena alfa o

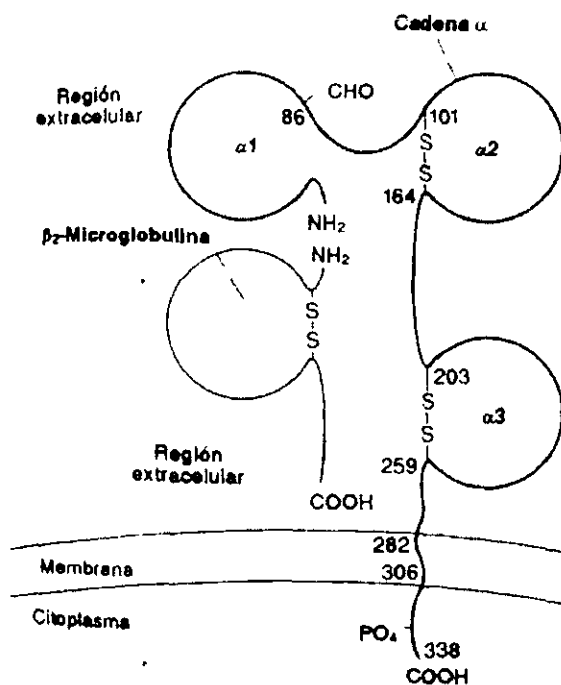


Fig. 20: Conformación espacial del MHC I. Cada una de estas moléculas diméricas está sujeta a la membrana celular por la región terminal C de la cadena α. La región extracelular de la cadena α se divide en tres dominios plegados separados, que se llaman α1, α2 y α3, cada uno de los cuales es similar a un dominio de Ig en cuanto a estructura. Casi todos los residuos polimorfos de aminoácidos están en los dominios α1 y α2. La β2m que es no polimorfa también tiene un dominio

similar al de las Igs, y se relaciona con el dominio  $\alpha 3$  no polimórfico de la cadena pesada. Aunque la  $\beta_2m$  no está implicada de modo directo en la presentación del antígeno en las proteínas clase I, se piensa que facilita el transporte de las proteínas nuevas sintetizadas desde el retículo endoplásmico hasta la superficie celular, y es probable que sirva para estabilizar su estructura (1).

Las proteínas clase I tienen una estructura tridimensional; la mayoría tiene una estructura de hoja  $\beta$  plegada, pero los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  contienen cada uno una hélice  $\alpha$ . Estas dos hélices son adyacentes y aproximadamente paralelas entre sí, y juntas forman las paredes de una hendidura en la superficie distal de la molécula; dicha hendidura sirve como sitio de fijación del péptido antigénico. Una hoja  $\beta$  plegada constituida por porciones de los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  sirve como piso del sitio. La mayoría de los residuos polimórficos de las moléculas clase I están situados en las paredes y el piso de la hendidura y, por tanto, tiene el efecto de conferir contornos ligeramente distintos al sitio de fijación en los tipos alélicos distintos de la proteína (fig. 21).

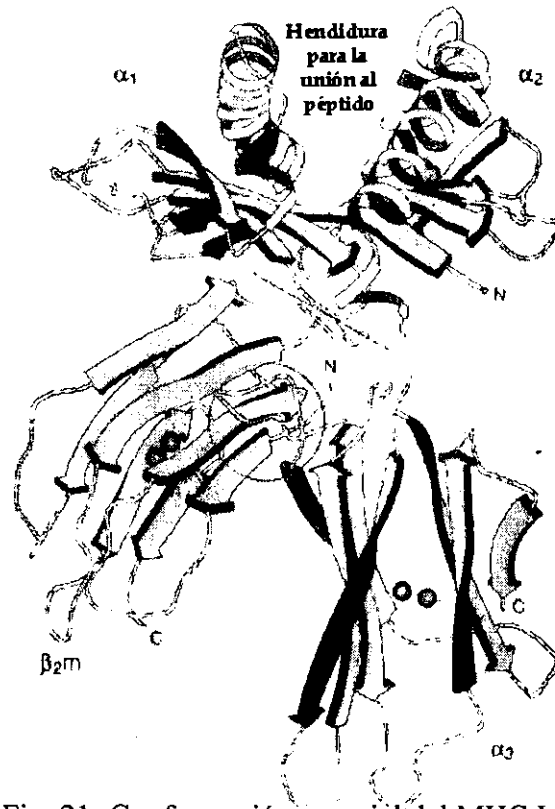


Fig. 21: Conformación espacial del MHC I. Los péptidos se unen de manera no covalente dentro de la hendidura en una conformación extendida, de modo similar a un bastón. Cada tipo alélico de una proteína clase I tiene su propia especificidad para la fijación de péptidos, que está determinada por las secuencias de las paredes y el piso del sitio peptídico de fijación (fig. 22). Una célula puede expresar proteínas clase I en el orden de  $10^6$  en su superficie, por lo cual cada célula tiene el potencial de presentar múltiples péptidos alternativos de modo simultáneo. Los péptidos captados por proteínas clase I son de tamaño nota-

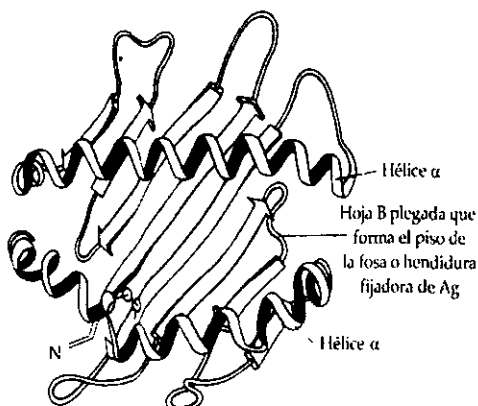


Fig. 22: Conformación espacial del sitio de unión al péptido antigénico del MHC I.

blemente uniforme, en su mayoría se caracterizan por tener de 8 a 10 aminoácidos de longitud (1).

Para generar células asesinas L<sub>Tc</sub> CD8<sup>+</sup>, las DCs presentan moléculas MHC clase I, que pueden conjugarse con antígenos tanto por vía endógena como exógena. La vía endógena de MHC clase I opera a través de la degradación de proteínas citosólicas y la dirección de péptidos hacia las recién sintetizadas moléculas de MHC clase I dentro del retículo endoplásmico. El procesamiento de antígenos ocurre primero en el citosol por medio de un sistema proteolítico dependiente de ATP (adenosin trifosfato), el cual empieza por la conjugación de ubiquitina. Las DCs, al igual que los LBs, expresan constitutivamente di-ubiquitina para procesar eficientemente a los antígenos. Las proteínas ubiquitinadas son enviadas al proteosoma, que las rompe en pequeños péptidos, los cuales son translocados al interior del retículo endoplásmico vía transportadores trans-membranales TAP 1 y 2 dependientes de ATP, y son arregladas en 8 a 10 merómeros, que se acomodan unidos a las moléculas del MHC clase I (fig. 23) (3, 5).

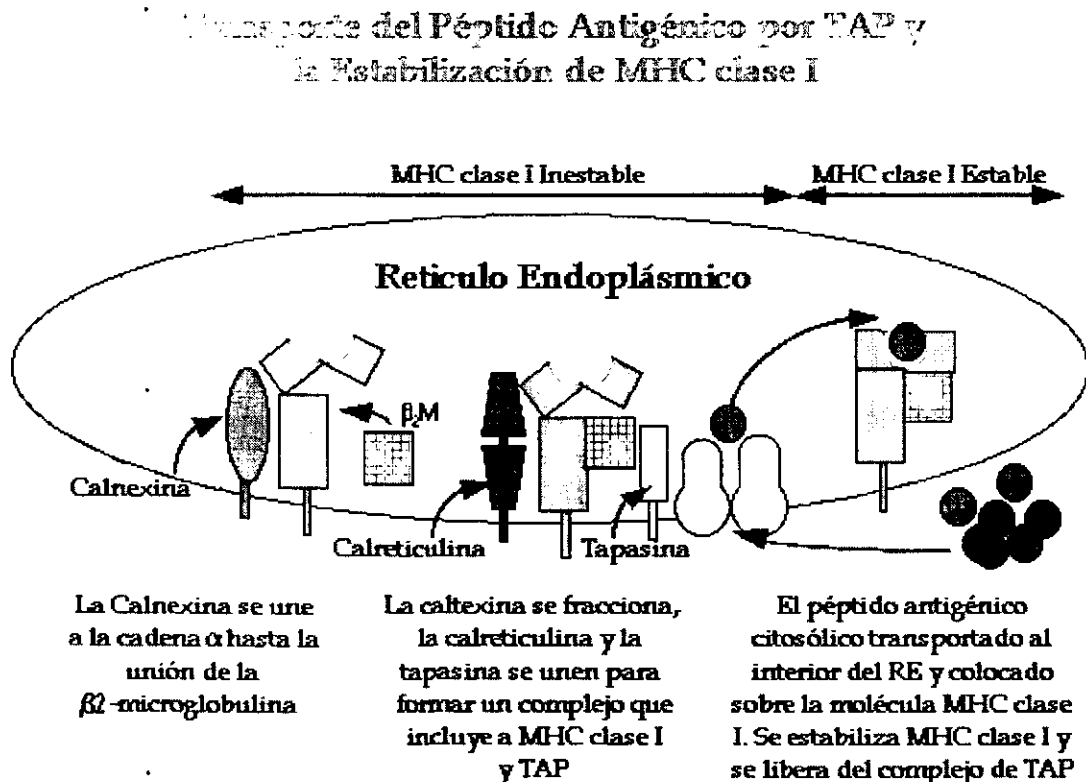


Fig. 23: Transporte del péptido antigénico en MHC clase I por TAP 1 y TAP 2.

Las DCs y los macrófagos (MØ) cuentan con una vía alternativa de MHC clase I para presentar péptidos derivados de antígenos extracelulares. Existen dos rutas para el MHC clase I exógeno que ya están completamente

descritas: una vía independiente de TAP en la cual los antígenos son principalmente hidrolizados en los endosomas (proteosomas), y otra vía dependiente de TAP con ruta fagosoma-citosol. Esta última vía está involucrada en las respuesta inmunes contra antígenos de transplantes, antígenos particulados, tumores y virus; también interviene en el desarrollo de la tolerancia (3, 5).

## Moléculas CD1

Las proteínas CD1 pertenecen a un linaje de glicoproteínas de superficie celular no polimórficas; recientemente han identificado a la familia de CD1 como moléculas no clásicas de histocompatibilidad involucradas en la presentación de antígenos no protéicos y la modulación de las respuestas de los LTs contra lípidos microbianos y glicolípidos antigénicos. Los lípidos, tanto endógenos como exógenos pueden ser presentados por estas moléculas; ésto puede contribuir a la inmunidad microbiológica, a la autoinmunidad, a la regulación inmunológica y a la respuesta a tumores. Las moléculas de CD1 son marcadores fenotípicos de las DCs que constituyen una familia de glicoproteínas no polimórficas de aproximadamente 45 kDa asociadas a  $\beta 2m$  que ensamblan antígenos no procesados en compartimentos endosómicos/lisosómicos y los presentan de una manera independiente de TAP. Hay cinco proteínas CD1 (a-e) presentes en el cromosoma 1 humano que se expresan en DCs mieloides (3, 5, 14).

La secuencia de aminoácidos presenta una homología limitada (aproximadamente 30%) en los dominios extracelulares  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  (en  $\alpha 1$  esta homología es prácticamente indetectable) entre las moléculas de CD1 y las de MHC clases I y II; estas características sugieren que las moléculas CD1 y MHC tienen un antecesor común pero constituyeron linajes diferentes que divergen en algún punto temprano de la evolución en mamíferos (14).

Las proteínas CD1 son funcionalmente heterogéneas, y se pueden dividir en dos subgrupos dependiendo de su distribución y función inmunológica: el subgrupo 1 incluye a las moléculas CD1a, b y c humanas, éstas pueden presentar glicolípidos a una gran variedad de células T, la unión de los lípidos a estas moléculas requiere de la acidificación endosomal; el subgrupo 2 incluye moléculas CD1d humanas y de ratón, y se pueden unir a una gran cantidad de diferentes antígenos y activar a un grupo restringido de células T dentro de las que se encuentran los LTc (3, 14).

## Ensamblaje y Transporte de Complejos MHC I y II

Las moléculas de MHC al igual que otras proteínas de membrana, son sintetizadas por polirribosomas en relación con el retículo endoplásmico rugoso (RER). Cuando se sintetizan por primera vez, están fijadas en la membrana del RER y se proyectan al interior de su luz. Las moléculas del MHC clase I fijan péptidos cuando aún están en el RER. Hay datos que sugieren que la fijación de un péptido por una cadena a clase I induce un cambio de conformación que facilita la relación con  $\beta 2$ ; ésta, a su vez, promueve el transporte de la molécula clase I del RER a la superficie celular (fig. 24) (1).

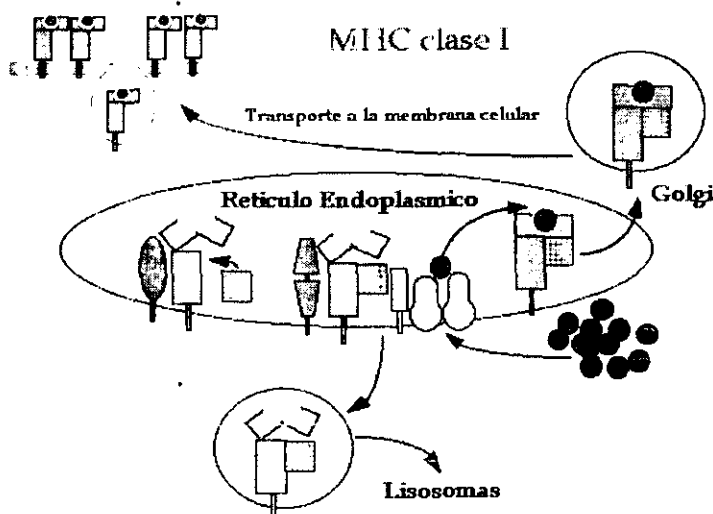


Fig. 24: Ensamblaje y transporte de MHC clase I.

de proteínas sintetizadas endógenamente en el citoplasma. Esta digestión parece realizarse, cuando menos en parte, por proteasas y peptidasas que residen en complejos citoplásmicos multienzimáticos conocidos como proteosomas. Algunos de los péptidos que se originan, se bombean después de manera activa del citoplasma al interior de la luz del RER de manera dependiente de ATP por la acción de proteínas transportadoras de péptidos. Hasta el momento se han caracterizado dos de estas proteínas, denominadas transportadoras de péptidos antigénicos 1 y 2 (TAP1 y TAP2); cada una es una membrana integral del RER que contiene múltiples regiones transmembranales y un dominio de fijación de ATP (fig. 25). Las proteínas TAP1, TAP2 y cuando menos dos

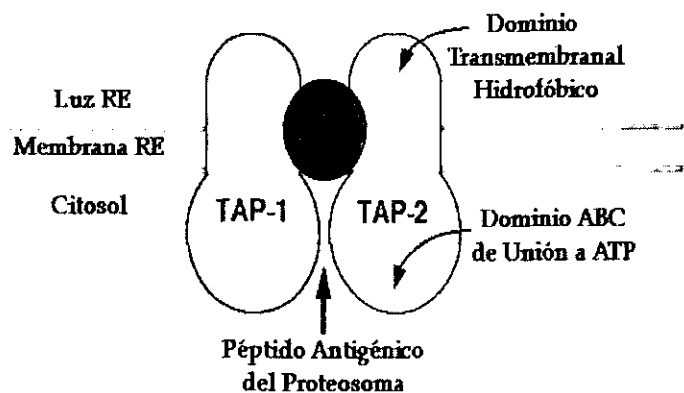


Fig. 25: Moléculas transportadoras de péptidos antigénicos TAP 1 y TAP 2.

componentes del proteosoma, son codificados por un grupo de genes dentro del *locus* del MHC clase II. Cada uno se produce en varios tipos alélicos alternativos que pueden tener especificidades diferentes de sustrato. Los mecanismos proteolítico y de transporte de péptidos actúan con suma eficiencia sólo en un subgrupo de péptidos, y teóricamente, esto influye en cuáles son los péptidos que pueden ser presentados por MHC clase I. Hay otro mecanismo que involucra moléculas de transporte o “chaperonas”, como la hsp96, que captura a los péptidos antigénicos endógenos y los introduce al RER de DCs, ahí son liberados, procesados e incorporados a los complejos del MHC clase I (1, 4).

En contraste, las moléculas clase II, deben ser transportadas desde el RER a un compartimento endosómico antes de que fijen péptidos. Durante su



Fig. 26: Cadena invariable (Ii).

fijación de péptidos de clase II, evitando la integración del sitio con cualquier péptido endógeno en la luz del RER (fig. 26). El complejo de proteína clase II y la Ii enlazada (HLA-DM), se transportan por medio de las vesículas de membrana a un compartimento endosómico (MIICs), donde se encuentran con péptidos antigénicos derivados de proteínas exógenas que han sufrido endocitosis. Aquí, la Ii se disocia y degrada, permitiendo la fijación de los péptidos exógenos a la hendidura fijadora de péptidos antigénicos que ahora no está ocupada. El complejo péptido-proteína que se origina se transloca después a la superficie celular (fig. 27) (1, 3, 4).

permanencia en el RER, las moléculas clase II de nueva síntesis (cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ) se relacionan con otra proteína llamada cadena invariable (Ii); se piensa que esta proteína obstruye estéricamente el sitio de

se encuentran con péptidos antigénicos derivados de proteínas exógenas que han sufrido endocitosis. Aquí, la Ii se disocia y degrada, permitiendo la fijación de los péptidos exógenos a la hendidura fijadora de péptidos antigénicos que ahora no está ocupada. El complejo péptido-proteína que se origina se transloca después a la superficie celular (fig. 27) (1, 3, 4).

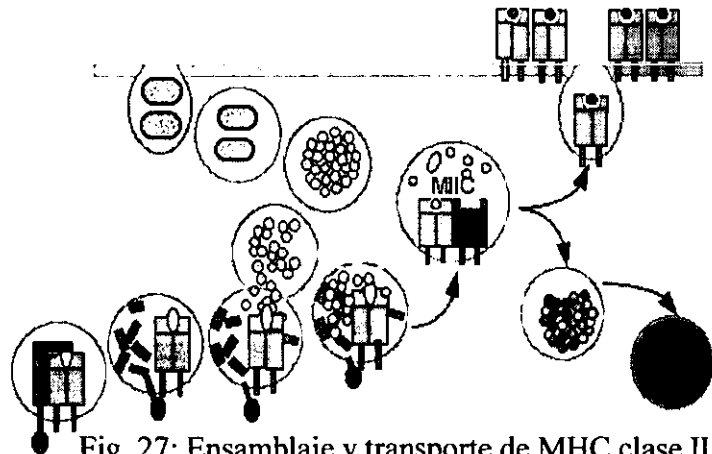


Fig. 27: Ensamblaje y transporte de MHC clase II. El complejo péptido-proteína que se origina se transloca después a la superficie celular (fig. 27) (1, 3, 4).

Por tanto, las proteínas clase I y II se desplazan por distintas vías y encuentran antígenos en compartimentos celulares diferentes. Se considera que esta diferencia en las vías de acción determina el origen del péptido que se relaciona con cada una de las clases: ya sea que se sintetice endógenamente y se transporte al RER (vía endógena; HLA clase I), o sufra endocitosis/fagocitosis y se degrade en un compartimento endosómico para después ser transportado al MIIC (vía exógena; HLA clase II) (1, 4).

## Presentación de Antígenos (Activación de Linfocitos T)

Los LBs y Ts son los mediadores de la inmunidad, pero su función está bajo el control de las DCs, quienes capturan y procesan antígenos además de expresar moléculas coestimuladoras (como las citocinas, las quimiocinas, etc.) (fig. 28). Inicialmente, migran a los órganos linfoides secundarios, secretan citocinas y presentan antígenos iniciando la respuesta inmune (6).

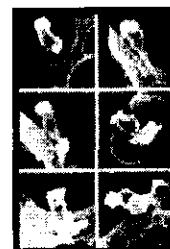


Fig. 28: DC-LT.

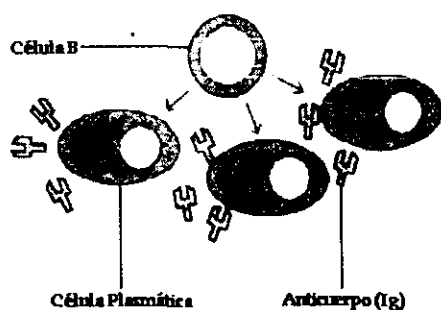


Fig. 29: LBs células secretoras de Abs

Los LBs son precursores de las células secretoras de anticuerpos (Abs) (fig. 29), y pueden reconocer directamente antígenos nativos a través de sus receptores (BCR); los LTs en cambio, necesitan que el antígeno sea procesado y presentado por las APCs. Los receptores para antígeno de los LTs (TCRs), reconocen fragmentos de antígenos unidos a moléculas del MHC en la superficie de las APCs (6).

Recientemente se ha observado que los LBs "vírgenes" responden preferentemente a las DCs de tipo intersticial y a la secreción de factores solubles, incluyendo la IL-12. Las DCs estimulan directamente la producción de anticuerpos, mientras que la proliferación de LBs es estimulada por LTh activados (6).

Los LBs funcionan como APCs cuando los antígenos tienen subunidades repetitivas (polisacáridos) y provocan una respuesta inmune mediada por anticuerpos. De cualquier manera, las DCs son indispensables para iniciar una respuesta inmune. Los LTs no responden a los LBs sin activar, pero después de la activación

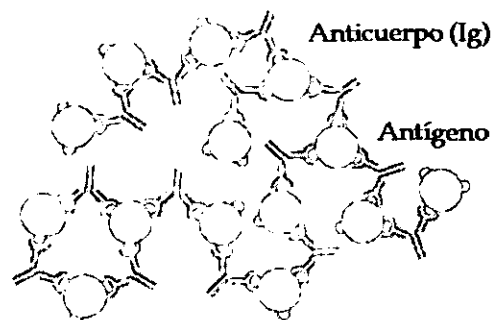


Fig. 30: Anticuerpos antígeno-específicos.



con el MHC de las DCs, los blastos de los LTs responden vigorosamente a los LBs y recíprocamente inducen a los LBs a que proliferen y produzcan anticuerpos antígeno-específicos (fig. 30) (3, 5).

El TCR es un complejo de cuando menos ocho cadenas de polipéptidos; dos de éstas (las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ ) forman un dímero enlazado con disulfuro que reconoce péptidos antigénicos fijados a moléculas de MHC y, por tanto, es la estructura de fijación de ligando dentro de complejo receptor de la célula T (fig. 31). Las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR son similares en muchos aspectos a las inmuno-globulinas. Las regiones amino-terminales de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  son sumamente polimórficas, de manera que dentro de la población total de células T hay un gran número de diferentes dímeros TCR  $\alpha/\beta$ , cada uno de los cuales cuenta con la propiedad de reconocer una combinación particular de péptido antigénico y MHC. Los TCR en las

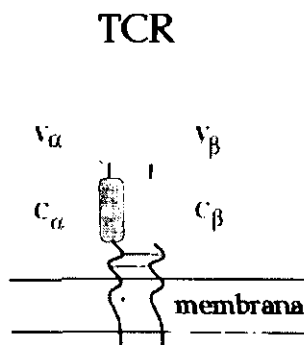


Fig. 31: TCR.

células individuales contienen sólo un tipo simple de dímero  $\alpha/\beta$ ; por tanto, los LTs individuales responden únicamente a una combinación específica de antígeno y MHC (1).

El dímero  $\alpha/\beta$  se relaciona con un complejo de proteínas que se designa como CD3. Las cadenas de CD3 no son polimórficas, y varían en tamaño de 16 a 28 kDa. Participan en la transducción de señales y, por tanto, permiten que el TCR convierta el reconocimiento de antígeno/MHC en señales bioquímicas intracelulares para la activación. En comparación con  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR, cuyas regiones intracelulares tienen una extensión de varios aminoácidos, las cadenas CD3 poseen dominios citoplásmicos grandes que van de 45 a 55 aminoácidos para el CD3 épsilon, delta y gamma ( $\epsilon$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ), a 113 aminoácidos para CD3 zeta ( $\zeta$ ) (1).

Para generar la diversidad de TCR requerida para reconocer un espectro amplio de determinantes antigénicos, los genes  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR usan una estrategia de combinación por reordenamiento de DNA similar a la de los genes de Igs (1).

Para que los LTs respondan a un antígeno, éste debe ser transformado primero en péptidos, los cuales a su vez se fijan a la hendidura de la parte superior de las moléculas MHC clase I o II. El complejo resultante de péptido-molécula MHC forma el

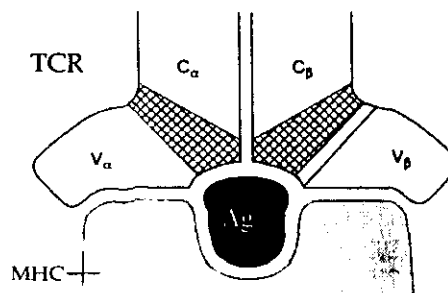


Fig. 32: Ligando para el TCR.

ligando para el TCR (fig. 32). Es probable que los contactos, tanto con el péptido como con la molécula de MHC sean fundamentales para la fijación del TCR (1).

Además del procesamiento de antígenos peptídicos que son presentados por los productos de MHC, las APCs expresan un sinnúmero de señales secundarias que modulan la unión a los LTs, interactuando con los TCR para

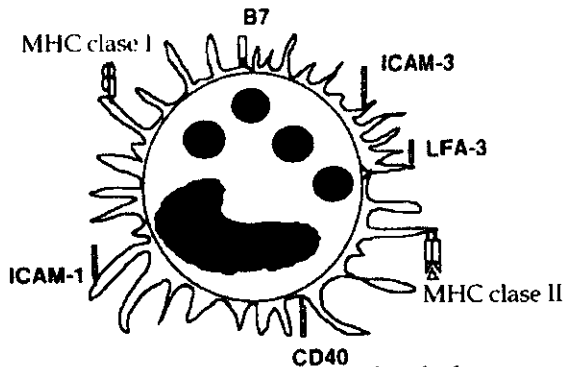


Fig. 33: Moléculas coestimuladoras.

coestimular la adhesión y señalización. Muchas de estas moléculas son glicoproteínas de membrana, como por ejemplo las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs / CD50, CD54, CD102...), y el antígeno funcional de leucocitos (LFAs / CD2, CD11a, CD58) y B7s (CD80, CD86). Todas estas propiedades (la expresión del MHC, la secreción de IL-12 y la expresión de moléculas coestimuladoras) regulan la actividad inmunológica frente a situaciones de agresión (fig. 33) (3, 5, 6).

coestimular la adhesión y señalización. Muchas de estas moléculas son glicoproteínas de membrana, como por ejemplo las moléculas de adhesión intercelular (ICAMs / CD50, CD54, CD102...), y el antígeno funcional de leucocitos (LFAs / CD2, CD11a, CD58) y B7s (CD80, CD86). Todas estas propiedades (la expresión del MHC, la secreción de

## Moléculas Accesorias y de Coestimulación (DCs/LTs)

Cuando un LT encuentra a una APC, el resultado se determina en parte por la especificidad de su TCR, así como por las señales coestimuladoras que recibe a través de otros receptores. La activación sólo se origina cuando el TCR reconoce su combinación antígeno-MHC específica, y las señales transmitidas por el TCR sólo son suficientes para ocasionar ciertos cambios bioquímicos en el LT. No obstante, en la respuesta de los LTs también influyen varias proteínas que no forman parte del TCR en su superficie, y que reconocen ligandos específicos en la APC. Estos son llamados receptores accesorios, y realizan dos funciones generales: aumentan la adhesión entre la célula T y la APC, y transducen señales a través de la membrana plasmática (fig. 34) (1).

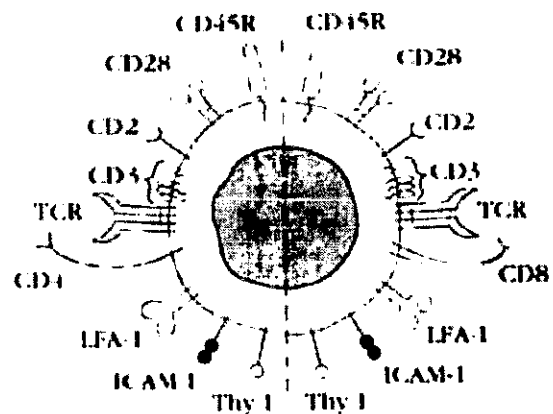


Fig. 34: Receptores accesorios.

El fenotipo superficial básico de membrana, identifica a las DCs como leucocitos. CD45<sup>+</sup> que expresan grandes niveles de moléculas MHC clase II en ausencia de marcadores asociados a otras líneas leucocíticas, incluyendo: CD3, CD14, CD15, CD16, CD19, CD20 y CD56. Muchas de las moléculas útiles para fenotipar la superficie y purificar subpoblaciones de DCs tienen funciones desconocidas, aunque se puede fenotipar poblaciones de DCs utilizando moléculas asociadas a funciones específicas. El fenotipo de las DCs que migran a través de los tejidos para interactuar con LTs se refiere principalmente a la expresión de moléculas de adhesión y receptores para quimiocinas entre otros (7).

No está bien determinado aún si la habilidad excepcional que tienen las DCs para activar a los LTs es resultado de la expresión de complejos moleculares en su membrana, o de la gran cantidad de moléculas involucradas en sus interacciones con los LTs. Los productos del MHC y los complejos proteicos clase I y II, son mucho más abundantes en las DCs (de 10 a 100 veces más) que en cualquier otro tipo de APCs, como los LBs y los monocitos. El reconocimiento de los complejos MHC-péptido en las DCs por los TCRs antígeno-específicos constituye la interacción DCs-LTs. El acercamiento DCs-LTs es mediado por una gran cantidad de moléculas de adhesión, como las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , y los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (CD2, CD50, CD54 y CD58) (3).

Dentro de la gran variedad de moléculas de adhesión que expresan las DCs se encuentran los ligandos para CD11a/ICAMs (LFA-1), CD2 (LFA-2/LFA-3), CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-2), CD102 (ICAM-3), CD28/CTLA-4 (B7s), etc; todas ellas se expresan en DCs (ICAMs, LFAs y B7s), pero presentan una regulación diferencial. Por ejemplo, CD54 se expresa en baja cantidad en DCs sanguíneas y en LCs, pero aumenta rápidamente tras la activación, lo cual facilita la unión CD/LT; CD50 en cambio, se expresa en altas concen-

traciones, pero esto varía muy poco con relación a la activación. CD102 se expresa en muy altas concentraciones en DCs y LCs, y posiblemente sea el ligando más importante en la adhesión temprana de la DC con el LT

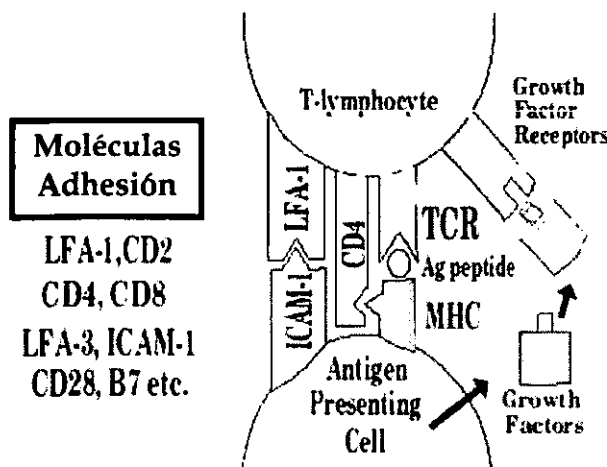


Fig. 35: Moléculas de adhesión.

funcionando como ligando para LFA-1. La adhesión directa entre la DC y el LT probablemente esté mediada por LFA-3 e ICAM-3 en los LTs, y por LFA-1, LFA-3 e ICAM-3 en las DCs; dando como resultado cambios en el fenotipo y estimulando la expresión de moléculas coestimuladoras (fig. 35) (4, 5, 7).

Es probable que la interacción inicial entre una célula T y una APC sea independiente del TCR. La afinidad del TCR por su ligando (antígeno-MHC) parece ser baja, y puede no ser lo suficientemente fuerte como para proporcionar una fijación estable a otra célula, en particular si hay un número relativamente reducido de moléculas MHC que tengan el péptido específico para el TCR. Por lo cual, la fijación inicial parece depender de manera principal de otras moléculas de el LT que fijan ligandos en la superficie de la APC. Un ejemplo de las moléculas de adhesión es el CD2, que fija una molécula de superficie celular ampliamente expresada, la cual se designa como LFA-3 . La fijación de CD2 a LFA-3, así como la de otras moléculas de adhesión a sus ligandos, al inicio origina una adhesión relativamente inespecífica de la célula T a la APC, permitiendo que el LT “explore” la superficie de la APC para la combinación apropiada de péptido antigénico y molécula de MHC. Si el TCR reconoce su antígeno específico, entonces ciertas señales mediadas por el mismo TCR conducen a cambios que estabilizan de manera adicional la interacción entre el LT y la APC. Por ejemplo, estas señales conducen a un aumento en la expresión de CD2 y modifican la molécula de adhesión de superficie del LT, LFA-1, de manera que se incrementa la afinidad de LFA-1 por su ligando en la APC (1, 4).

Otros tipos de moléculas accesorias, incluyendo receptores de Fc, receptores de complemento (C') y receptores mitógenos, pueden contribuir a los procesos de señalización que activan a las células T. Los receptores de factor del complemento (CR1-CR4) tienen propiedades inmunorreguladoras sobre los LBs y Ts. Los receptores de Ig (Fc) en los LBs permiten que éstos perciban concentraciones locales de Ig, lo cual es una vía de retroalimentación que limita o estimula la producción de anticuerpos; en los LTs ayuda a la señalización del TCR (1).

La expresión de CD4 y CD8 divide a los LTs maduros en dos subgrupos mutuamente excluyentes: los que reconocen antígenos en el contexto de MHC clase II (células CD4<sup>+</sup>) y aquellas que reconocen antígenos unidos a moléculas MHC clase I (células CD8<sup>+</sup>). El CD4 se fija directamente a moléculas del MHC clase II, probablemente en un sitio de estas

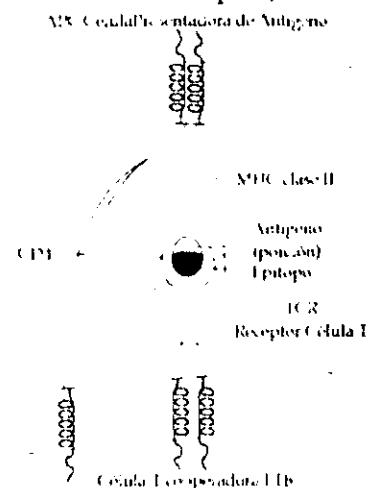


Fig. 36: Fijación del CD4 a MHC II.

proteínas que se sitúa cerca de la membrana superficial y no participa de manera directa en la fijación de péptidos (fig. 36). Por otra parte, el CD8 se fija a moléculas del MHC clase I. Por lo tanto, es posible que CD4 y CD8 interactúen con la misma molécula de MHC, como el TCR, durante la activación del LTs. Hay pruebas considerables que apoyan esta teoría, así como para sugerir que CD4 y CD8 están en proximidad cercana al TCR, funcionando como correceptores. Esta aproximación de TCR y CD4/CD8 tiene consecuencias importantes para la señalización, ya que los dominios citoplásmicos de CD4 y CD8 se relacionan de manera no covalente con la PTK (protein tirosin cinasa). (1)

Puesto que ninguno de los componentes conocido de TCR tiene actividad intrínseca de cinasa, es probable que el TCR se acople a la PTK citoplasmática no receptora. Se han implicado tres PTK en la señalización del

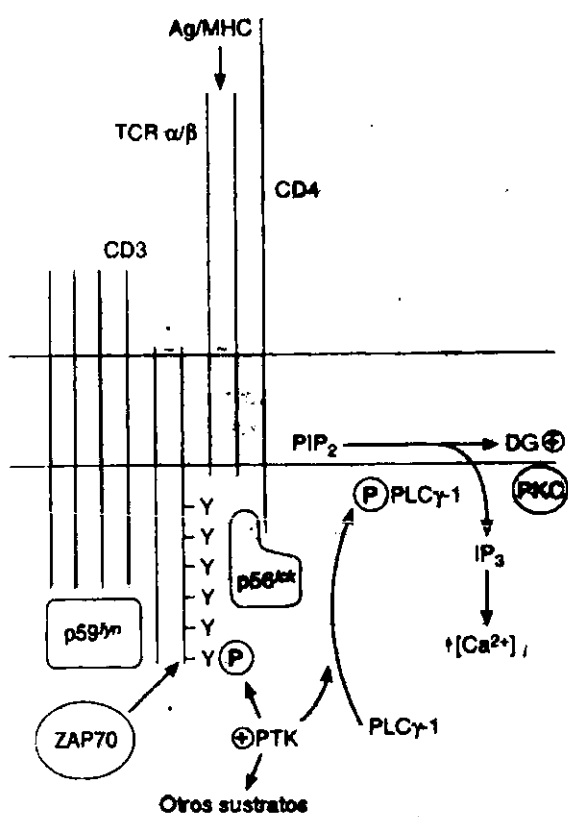


Fig.37: PTK en la señalización del TCR.

TCR: p59<sup>fyn</sup>, p56<sup>lck</sup> y ZAP70. La p59<sup>fyn</sup> se relaciona con dominios citoplásmicos de CD3; la p56<sup>lck</sup> se fija a los dominios citoplásmicos CD4 o CD8, y puede acercarse al TCR por medio de interacciones de CD4 o CD8 con el TCR; la ZAP70 se relaciona con CD3 después de la estimulación del TCR, la fosforilación de tirosina parece ser la señal para la fijación de ZAP70. La activación de PTK mediada por TCR conduce a la fosforilación de tirosina de varias proteínas intracelulares; es probable que esta fosforilación regule la actividad de ciertas enzimas claves y moléculas de señalización, permitiendo que así, el TCR transduzca señales para la activación del LT. Un sustrato conocido para la PTK activada por TCR es la fosfoli-

pasa C-gamma-1 (PLC-γ1), enzima que, cuando está activada, hidroliza al difosfato de difosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>), que es una membrana fosfolípida. La fosforilación de tirosina activa a la PLC-γ1, y la subsecuente rotura de PIP<sub>2</sub> activa a dos mensajeros secundarios: diacilglicerol (DG) y 1, 4, 5-trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>); el primero, activa a la proteincinasa C, y el último se fija a un

receptor intracelular en forma de canal, estimulando la liberación de  $Ca^{++}$  de las reservas internas al citoplasma. Los aumentos en el  $Ca^{++}$  intracelular y en la actividad de la proteincinasa C actúan sinérgicamente y parecen ser mediadores importantes de múltiples procesos subsecuentes en las respuestas del LT, incluyendo la producción de IL-2 y el desencadenamiento de la actividad citolítica (fig. 37). Es por ello que el complejo TCR-CD4 (o TCR-CD8) es mucho más eficiente para transducir señales para la activación de los LTs que el TCR por sí solo (1).

CD45 es una molécula de superficie celular de gran tamaño (180 a 220 kDa) expresada por todos los leucocitos, incluyendo a los linfocitos. La transducción de señales por el TCR requiere de la coexpresión de CD45, cuyo dominio citoplasmático tiene actividad de tirosinfosfatasa. Las células T que carecen de CD45 no pueden responder al antígeno, aún cuando expresen valores normales de TCR (fig. 38). Parece ser que se requiere de CD45 para que se realice el acoplamiento funcional del TCR y su PTK. La fosforilación de  $p56^{lck}$  en su extremo carboxi-terminal de tirosina (Tyr-505) disminuye su actividad de cinasa. Mediante la desfosforilación de Tyr-505, la CD 45 puede permitir que se active la PTK  $p56^{lck}$  durante el reconocimiento del antígeno (1, 4).

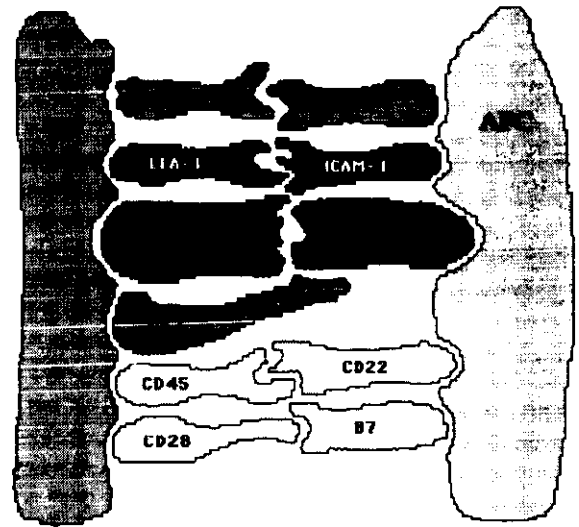


Fig. 38: Moléculas accesorias y de coestimulación.

La activación normal de los LTs requiere la acción tanto de las señales del TCR como de las generadas por moléculas accesorias (fig. 39); en ausencia de estas últimas, la estimulación del TCR induce un estado de

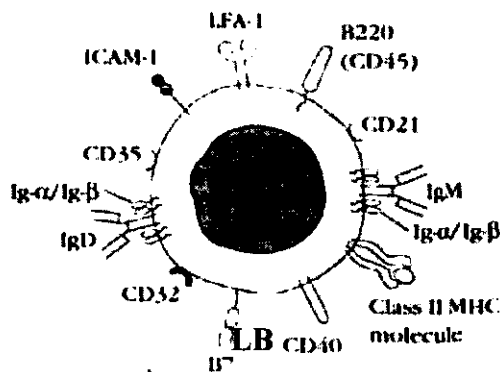


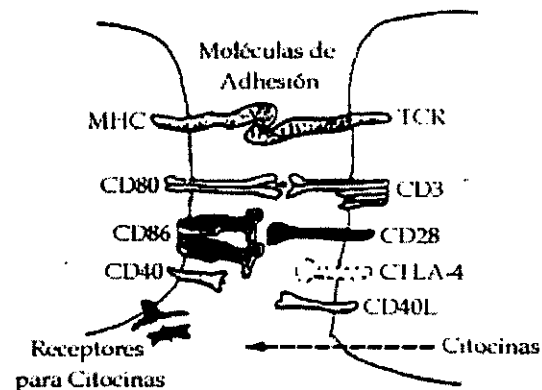
Fig. 39: Moléculas accesorias.

anergia. La naturaleza de este coestímulo ha sido objeto de interés considerable. Parece ser que, cuando menos en ciertas circunstancias, el coestímulo puede proporcionar a través de la molécula superficial de los LTs designada como CD28. Los ligandos para la CD28 son proteínas de la familia B7 (CD80/CD86) de moléculas de superficie celular que se encuentran en células B y otras APCs. Se han

identificado cuando menos tres proteínas B7 que comparten aproximadamente el 25% de identidad en secuencia; no se han determinado las funciones individuales que desempeñan en la coestimulación. La idea es que las señales que se originan como resultado de la interacción CD28/B7, proporcionan el coestímulo necesario que permite que la señalización mediada por TCR ocasione activación más que anergia. Si se bloquea B7, se pueden presentar ciertos tipos de respuestas inmunes de los LTs en ausencia de CD28, por lo cual se cree que es posible que coexistan vías alternas de coestimulación (1, 4).

Los LTs pueden ser activados por las DCs y la señalización de CD40 y su ligando CD40-L, incrementando la expresión de CD80/CD86 y la liberación de citocinas (IL-1, TNF, IL-12) y quimiocinas (fig 40). El aumento de CD40 en las DCs da como resultado la disminución en la expresión del ligando de OX40, lo cual brinda la señal para que los LTs "vírgenes" expresen IL-4 y disminuyan el receptor para la quimiocina CXCR-5, cuyo ligando dirige a los LBs hacia el interior de los folículos. De acuerdo con esto, la expresión de OX40-L trans-

Fig. 40: Moléculas de adhesión intercelular.



muta a las DCs, permitiendo la acumulación de LTh CD4<sup>+</sup> en los folículos B. Las DCs maduras también expresan el ligando de 4-1BB, el cual complementa la función del OX40-L; el 4-1BB es un coestimulador que es expresado principalmente por LTs, tanto LTh como LTc activados; las señales coestimuladoras de 4-1BB inducen la proliferación de los LTc y la producción de IFN $\gamma$  (interferon), amplificando las respuestas citotóxicas de los LTs *in vivo*. Las moléculas de OX40-L y 4-1BB son expresadas simultánea y casi exclusivamente por las DCs que se establecen cerca de los LTs (3, 4, 7).

La molécula RANK, que es un miembro de la familia del TNF-R (receptor del Factor de Necrosis Tumoral) y su ligando (RANKL/TRANCE) son expresados por los LTs activados, y estimulan la secreción de citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-12 por las DCs. Esto incrementa la sobrevivencia de las DCs, por inhibición de la apoptosis, y aumenta la respuesta y proliferación de los LTs. Además modulan el fenotipo y la función de las DCs; las LCs presentan receptores para IL-1, y tanto la IL-1 $\alpha$  como la IL-1 $\beta$  inducen la expresión de CD40 (cuya función coestimuladora ya se describió) (3, 7).

En resumen, la unión entre DCs y LTs ocurre gracias a múltiples procesos que se inician en la circulación linfática aferente, y es necesario que la DC cuente con un citoesqueleto intacto y active a la protein-quinasa C para iniciar las interacciones de adhesión. La secuencia de pasos que sigue la interacción DC-LT es la siguiente: al principio, actúan ciertas moléculas de adhesión; ICAM-3, que se expresa notoriamente en las DCs, interactúa con LFA-1 en LTs iniciando el proceso de unión (aquí ICAM-2, que también está presente en las DCs parece no jugar un papel importante); más tarde, LFA-3 en DCs incrementa el acercamiento de los LTs uniéndose a su ligando, el CD2, mientras que LFA-1, también en DCs, participa en reacciones recíprocas; CD43 parece ser el mayor contribuyente a que cambie la superficie celular, facilitando el contacto entre la membrana de las DCs y los LTs. Es entonces que empiezan a actuar las moléculas coestimuladoras transmitiendo las señales adicionales requeridas para la activación de los LTs; B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) se unen a diferentes sitios de la molécula CD28 presente en los LTs, esto libera a la ciclosporina A independiente con señal coestimuladora; hay un segundo ligando alternativo para los B7s, el CTLA-4, este ligando se expresa en los LTs activados y provee una señal negativa; la unión a B7-1 activa la diferenciación de LTh1, mientras que B7-2 a LTh2; B7-1 es estimulado eficientemente por GM-CSF, y B7-2 por IFN- $\gamma$ , mientras que la IL-4 induce la producción y expresión de ambos y la IL-10 la inhibe. CD40 es un receptor de la familia del TNF y CD40L es su ligando en los LTs; su unión provee una señal coestimuladora de gran importancia para los LBs además de estimular la expresión de B7. OX40 y OX40L son muy semejantes en cuanto a función al CD40 y CD40L, sólo que su señal activa a LTc en lugar de LBs. 4-1BB y 4-1BBL coestimulan a CD3. CD6 y su ligando, el ALCAM, estimulan la adhesión en leucocitos activados. SLAM y su ligando se expresan en DCs y LTs respectivamente, y puede que tengan función en la proliferación de LTs y la producción de citocinas. Es sólo entonces que el antígeno es reconocido y el TCR comienza la señalización para transducción; mientras que los LTs y las DCs ya tienen la señalización para producir y liberar citocinas y quimiocinas con funciones específicas. Como las citocinas IL-1 ( $\alpha/\beta$ ), TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN ( $\alpha/\gamma$ ), etc. Y como las quimiocinas MIP-1 ( $\alpha/\beta$ ), RANTES, MCP-1, etc. También se ha observado la expresión de receptores para varias de estas citocinas y quimiocinas. En otras palabras, gran cantidad de parejas moleculares funcionan en cascada optimizando la interacción entre APC y LT. Así, la comunicación molecular cumple dos objetivos: por un lado activa la proliferación, el crecimiento y la producción de linfocinas y citocinas por parte de los LTs, y por otro lado, mantiene la señalización de las DCs (3, 4, 5, 10).



## Origen de las Células Dendríticas (¿¿Mieloide o Linfoide??)

Antes se desconocía el origen de las DCs. Aunque sus precursores no habían sido bien identificados aún, se creía que estaban presentes en médula ósea y bazo. Otras DCs no fagocíticas de forma irregular se identificaron *in situ*, éstas incluían DCs foliculares de órganos linfoides, LCs epidérmicas, y células epiteliales de timo (fig. 41). Estas células no habían sido aisladas ni estudiadas a fondo, pero se creía que posiblemente pertenecieran a un linaje celular distinto (15).

Fig. 41: Forma irregular DCs.

Los progenitores de las DCs están presentes (además de otros sitios) en la medula ósea. Un pequeño grupo de progenitores hematopoyéticos  $CD34^+$  dan origen a todas las células sanguíneas y a las DCs (fig. 42). La progenie de DCs suele colonizar a todos los tejidos como DCs inmaduras sin dividirse. Gran variedad de citocinas contribuyen a su crecimiento y diferenciación. Las células que expresan el marcador  $CD34$  cuentan con progenitores para dos poblaciones diferentes de DCs: las LCs epidérmicas y las DCs dérmicas o intersticiales. Una diferencia funcional es que sólo las DCs intersticiales estimulan directamente a los LBs "vírgenes" para producir anticuerpos; los progenitores de las LCs expresan al antígeno linfocítico cutáneo (CLA: un ligando para E-selectina y una molécula mensajera en piel) y carecen de  $CD14$  (un marcador muy abundante en monocitos), además de lo cual, son incapaces de formar  $M\emptyset$ . En contraste, los progenitores de las DCs dérmicas carecen de CLA, dan origen a células  $CD14^+$  parecidas a monocitos y pueden formar algunos  $M\emptyset$

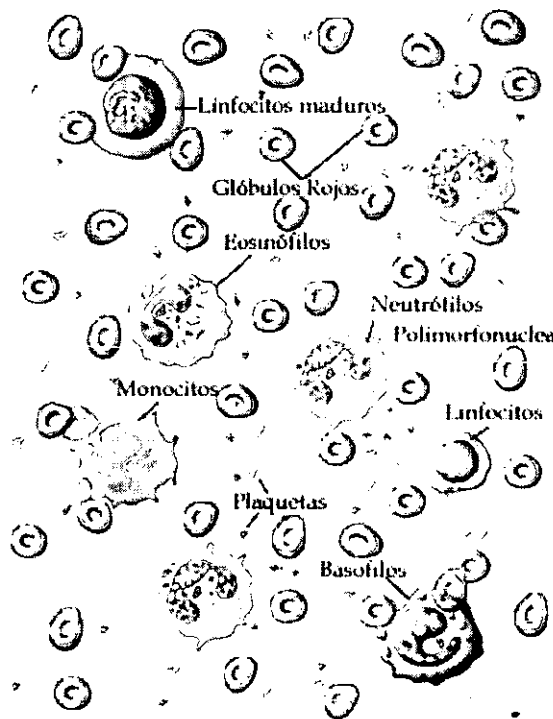


Fig.42: Células sanguíneas hematopoyéticas.

en respuesta a M-CSF, o pueden generar DCs en respuesta a GM-CSF y TNF- $\alpha$ . La mayoría de las células precursoras, son probablemente las mismas que originan a los fagocitos mononucleares (6, 8, 11).

Muchos estudios describen la existencia de precursores comunes para células fagocíticas y DCs mieloides (fig. 43). Se cree que hay tres vías distintas para el desarrollo de células mieloides que dan origen a granulocitos, monocitos/M $\phi$  y DCs a partir de un progenitor MHC clase II negativo en médula ósea. Existen precursores CD34<sup>+</sup> en médula ósea con una doble diferenciación potencial; bajo la influencia de GM-CSF, IL-3 y TNF $\alpha$ , colonias mixtas de DCs que expresan CD1a, se pueden desarrollar como LCs y monocitos/M $\phi$ . También se han identificado dos vías independientes para el desarrollo de DCs a partir de progenitores CD34<sup>-</sup> bajo la influencia de GM-CSF y TNF $\alpha$ . Los progenitores expresan CLA, adquiriendo la expresión de CD1a, proliferando y diferenciándose en DCs que exponen características de LCs (11).

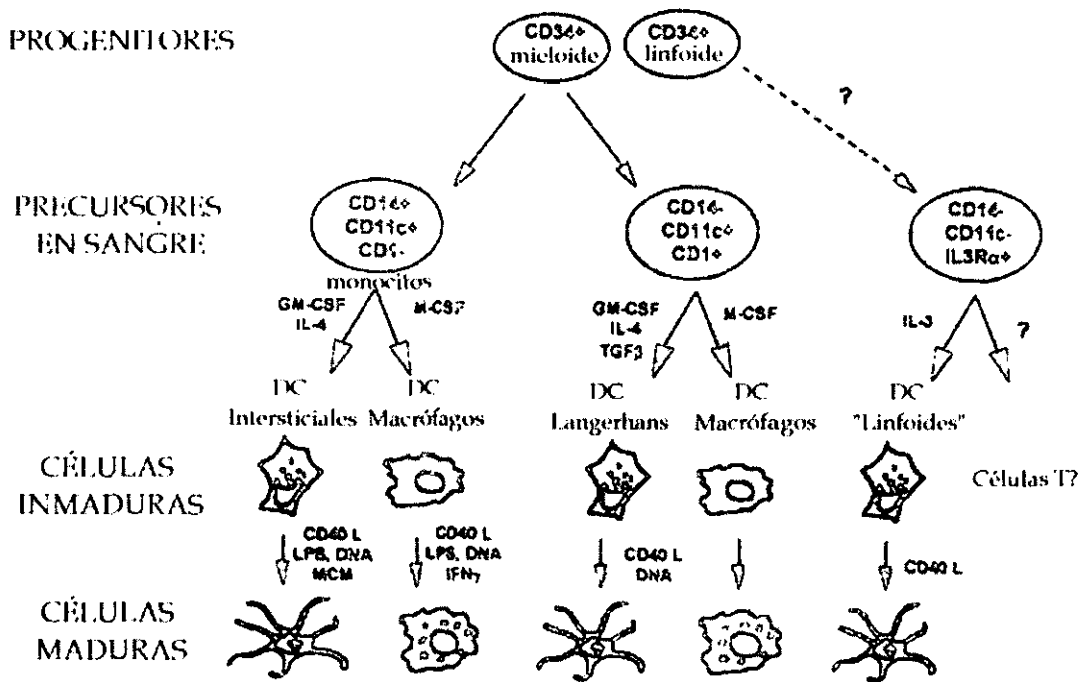
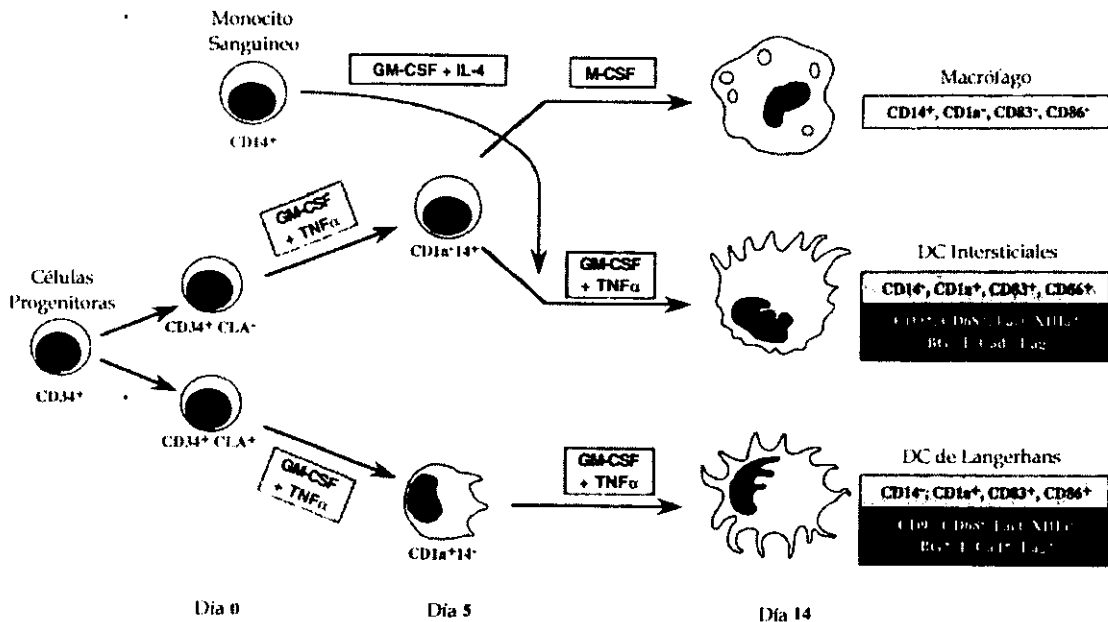


Fig. 43: Precursores comunes para células fagocíticas y DCs mieloides.

Ahora es bien aceptada la teoría de que los monocitos que se encuentran en sangre periférica se pueden diferenciar en M $\phi$  o en DCs; quedando como sus precursores inmediatos (fig. 44). La asociación de GM-CSF y la IL-4 inducen la diferenciación de los monocitos (sin proliferación), a DCs en un lapso no mayor a 5 días. Las DCs que se derivan de esta diferenciación,

muestran características morfológicas y fisiológicas de DCs inmaduras, como una alta capacidad fagocítica y endocítica, poca capacidad estimuladora, y la capacidad de migrar a órganos linfoides bajo un estímulo antigénico apropiado (11).

Fig. 44: Monocitos de sangre periférica se diferencian en MØ o DCs.



El mejor argumento de que existe un linaje linfóide en DCs se basa en estudios de reconstitución hematopoyética en ratones, pero son pocos los datos con los que se cuenta como para aseverarlo contundentemente (11).

Hay autores que sugieren que la relación entre las LCs y las células mieloides y linfoides aún está sujeta a controversias, ya que no hay ninguna demostración clara disponible. Aunque los monocitos ya han sido propuestos como los precursores inmediatos de las LCs, el origen mielóide o linfóide de este progenitor temprano de CD1a no está determinado aún (11).

## Células Dendríticas Epidérmicas: Células de Langerhans

En 1868, un estudiante de medicina, Paul Langerhans, conducido por su interés en la anatomía de los nervios cutáneos, descubrió una población de DCs en la región suprabasal de la epidermis por impregnación con sales de oro en piel humana (fig 45).



Fig. 45: Células de Langerhans.

Estas células son ahora llamadas Células de Langerhans (LCs) (2, 4, 8).

Ya que las sales de oro tienen gran afinidad por los tejidos nerviosos, Langerhans consideró a estas células como parte del sistema nervioso. Esta teoría fue mantenida por otros investigadores hasta los años 60's. Durante la década de los 50's y los 60's, otra hipótesis postuló que había una relación entre las LCs y los melanocitos. De acuerdo con ésta teoría, las LCs eran consideradas como melanocitos disfuncionales, como hijas de melanocitos en división o como melanocitos en estado inactivo de desarrollo. Luego, los estudios de microscopía electrónica de Birbeck y colaboradores, revelaron que las LCs contenían unos organelos citoplásmicos únicos (Gránulos de Birbeck [BG]). Estos autores apoyaron la teoría de que las LCs se derivaban de los melanocitos. Este postulado de relación ontogenética entre las LCs y los melanocitos y la idea de que las LCs eran parte del sistema nervioso fue desacreditado por los experimentos de Breathnach y colaboradores. Estos

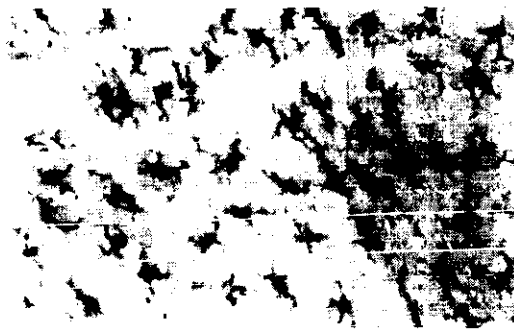


Fig. 46: Células de Langerhans en epidermis.

Desde que las LCs se describieron por primera vez, se han hecho grandes avances en las técnicas inmunológicas para caracterizarlas, se han confirmado como MØ epidérmicos especiales; pero muy poco es lo que se sabe sobre la condición de las LCs, aún sobre su número y forma (16).

Las LCs se encuentran regularmente en la epidermis y en el tejido conectivo subepidérmico de la piel ya diferenciada. Las LCs son una población móvil de DCs inmaduras de relativamente baja producción. Su residencia epidérmica es sólo un paso en su ciclo de vida. Estas se originan de precursoras en la médula ósea saliendo a la circulación por sangre periférica y poblando la piel. Bajo un estímulo activador

autores transplantaron brotes de tejido embrionario de ratón de 10 días que habían sido desprovistos de los componentes de la cresta neural al bazo de animales histocompatibles donde se continuó su crecimiento y diferenciación, demostrando la presencia de LCs en ausencia de la cresta neural (fig. 46) (8).

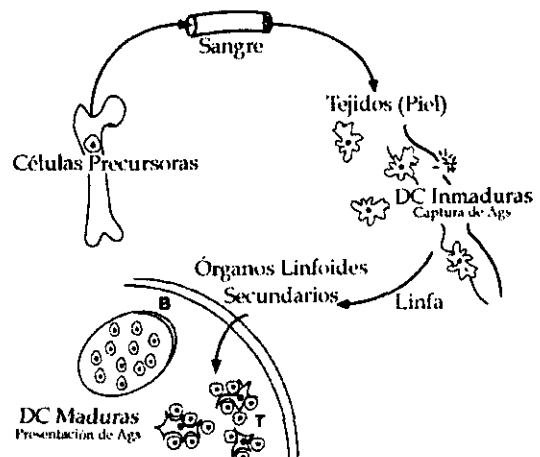


Fig. 47: Ciclo de vida, migración y maduración de DCs.

apropiado, (como un cambio antigénico), pueden dejar su compartimento cutáneo y migrar a los órganos linfoides secundarios madurando e iniciando la respuesta de los LTs (fig. 47). Con estas funciones, estas células inician sucesos que resultan finalmente en su propia muerte programada (apoptosis) (2, 8).

Hay evidencia de que la perturbación del microambiente cutáneo provoca cambios fenotípicos y funcionales en las poblaciones de LCs que son

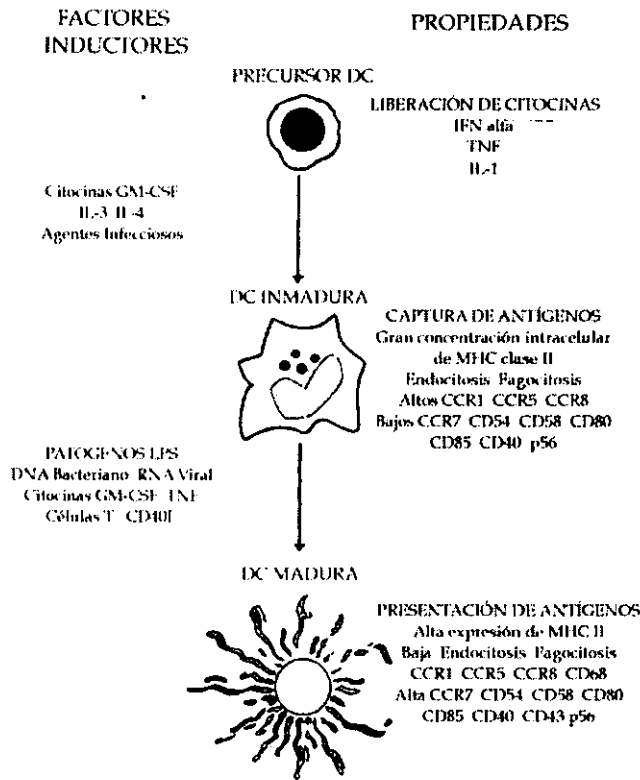


Fig. 48: Cambios fenotípicos y funcionales en las poblaciones de LCs.

constituyen el sistema inmune de la piel, tienen un espectro de diferentes funciones con implicaciones que se extienden mucho más allá de la piel misma. Estas células tienen el potencial de capturar alérgenos y agentes infecciosos, estimular vigorosas respuestas inmunes y mostrar propiedades migratorias que las equipan como la única posibilidad de comunicación entre la piel y los ganglios linfáticos. Se considera a las LCs con un rol determinante en enfermedades infecciosas, alergias, enfermedades autoinmunes, reacciones inflamatorias crónicas, el rechazo a tumores y a transplantes, y en los efectos causados por radiación ultravioleta (12).

Las DCs cutáneas, las cuales incluyen a las LCs de la epidermis, así como su contraparte en dermis y la linfa cutánea, proveen un área sumamente rica para la investigación en dermatología e inmunología (12).

similares a los observados en cultivos celulares epidérmicos. Unas horas después de un estímulo antigénico, las LCs comienzan a alargarse y a exhibir grandes cantidades de moléculas de superficie del tipo MHC clase II. Subsecuentemente, se da una marcada reducción en el número de LCs epidérmicas. La función aparente de las LCs involucra dos componentes: la toma y procesamiento de antígenos por las LCs cutáneas inmaduras; y, en los órganos linfoides regionales, la presentación de antígenos por las LCs maduras derivadas de piel (fig. 48) (2).

Las LCs epidérmicas, que

Las DCs cutáneas no son solamente APCs, sino que cuentan literalmente, con múltiples funciones accesorias para estimular a los LTs. Las DCs cutáneas, forman la barrera periférica del sistema de las DCs y han sido utilizadas para el estudio de muchísimas características comunes de las DCs (12).

El trabajo de años recientes ha establecido que las LCs son un modelo excelente para el estudio de la historia de vida de las DCs. Las DCs inmaduras, como las LCs *in situ*, capturan y procesan antígenos en la periferia. Es así como estas células suspenden el procesamiento y, maduran formando células inmunoestimuladoras muy potentes. A partir de ahí, migran a órganos linfoides donde el inmunógeno tiene la oportunidad máxima de encontrar LTs “vírgenes” (12).

## ARMADILLO DE NUEVE BANDAS (*Dasyus novemcinctus* Linn.)

El armadillo de nueve bandas es un mamífero perteneciente a la Subclase Eutheria, Superorden Edentata, Orden Xenarthra y a la Familia Dasypodidae (fig. 49). En su clasificación original dentro de los mamíferos, Linnaeus no reconoció al Orden Xenarthra dentro de ninguna otra clasificación, pero en 1780 Storr agrupó a los armadillos, los perezosos y los osos hormigueros dentro del Orden Mutici, éste después fue llamado como se le conoce actualmente. El Orden Xenarthra incluye 31 especies vivas y cuenta con ocho



Fig. 49: Armadillo de nueve bandas.

[JMLR1] Familias ya extintas. La mayoría de estas familias (como Glyptodontidae [armadillos tortuga - ya extintos] y Dasypodidae) se originaron en la época del Eoceno, hace cerca de 54 millones de años. Los armadillos han cambiado muy poco desde su aparición. La Familia Dasypodidae comprende a los armadillos, y está compuesta por seis Subfamilias; el armadillo de nueve bandas es miembro de la Subfamilia Dasypodinae, Género *Dasyus*, que se subdivide en varias especies, pero sólo tres de ellas desarrollan la lepra humana: *novemcinctus*, *hybridus* y *sabanicola*, llamados comúnmente armadillos de nueve, ocho y siete bandas respectivamente (17, 18).

## Características Fisiológicas y Morfológicas



Fig. 50: Secciones del caparazón.

En general, la característica morfológica más llamativa del armadillo de nueve bandas es la presencia del caparazón, éste se divide en tres secciones (fig. 50): la primera, llamada coraza escapular cubre la cabeza y está separada del cuerpo por una banda de piel; la segunda cubre la parte dorsal del tórax, desde la zona de la cadera alta y la pelvis extendiéndose hasta la base de la cola, la cual consta de nueve bandas móviles conectadas entre sí por bandas de piel (el número de las bandas, en este caso nueve, son características de cada especie) cada banda se compone de 50 a 75 escudos que visualmente se asemejan a las escamas de los peces; las anomalías que aparecen con frecuencia en el caparazón y el patrón de las bandas se cree que son hereditarias. La tercera sección cubre la parte posterior de cuerpo o cola, ésta es larga y está cubierta de bandas conectadas y sobrepuestas de tamaño decreciente. Hay una banda de piel entre la última sección del caparazón y la cola. El caparazón esta formado por pequeñas escamas o escudos dérmicos modificados, los cuales son muy fuertes, y le proveen protección contra las uñas y los dientes de los depredadores (fig 51) (17, 18).

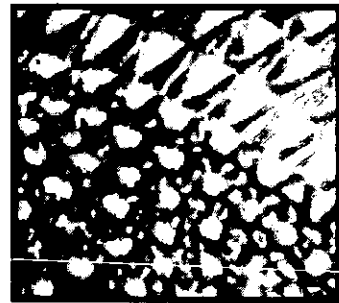


Fig. 51: Escudos dérmicos.



Fig. 52: Cabeza armadillo.

Este producto singular de la naturaleza tiene una cabeza pequeña, bastante alargada, y su cuello puede ser retraído hasta casi meter toda la cabeza en el caparazón. La cubierta de la cabeza puede compararse con una armadura, mientras que el resto del cuerpo, formado por partes ensambladas, forma una coraza de piel casi impenetrable. Su color se confunde con las rocas en su ambiente natural (fig. 52) (19).

## Piel y epidermis

Regularmente se ha considerado la piel como la puerta de entrada más probable de *M. leprae*. Las vías respiratorias superiores también son una puerta de entrada probable (20).

La piel de los armadillos tiene un pequeño número de folículos pilosos; éstos varían de grosor en las diferentes partes del cuerpo: en el abdomen son gruesos y rígidos mientras que en la cara interna de los muslos son delgados y suaves (fig. 53). La piel que cubre las bandas alrededor del cuello y al inicio de la cola, así como la que se encuentra justo a la orilla del caparazón en la parte central del animal, es suave y delgada. Estas áreas son, en general, de la misma estructura histológica, aunque hay algunas diferencias microscópicas, como son el número de folículos pilosos, el espesor del estrato córneo y del tejido subcutáneo (17).



Fig. 53: Folículos pilosos.

La estructura general de la epidermis del armadillo es similar a la de la piel humana; es delgada y varía de 5 a 7 capas celulares; está compuesta de la membrana epidérmica; de una capa basal de células cúbicas o cilíndricas, sobre las cuales se encuentra

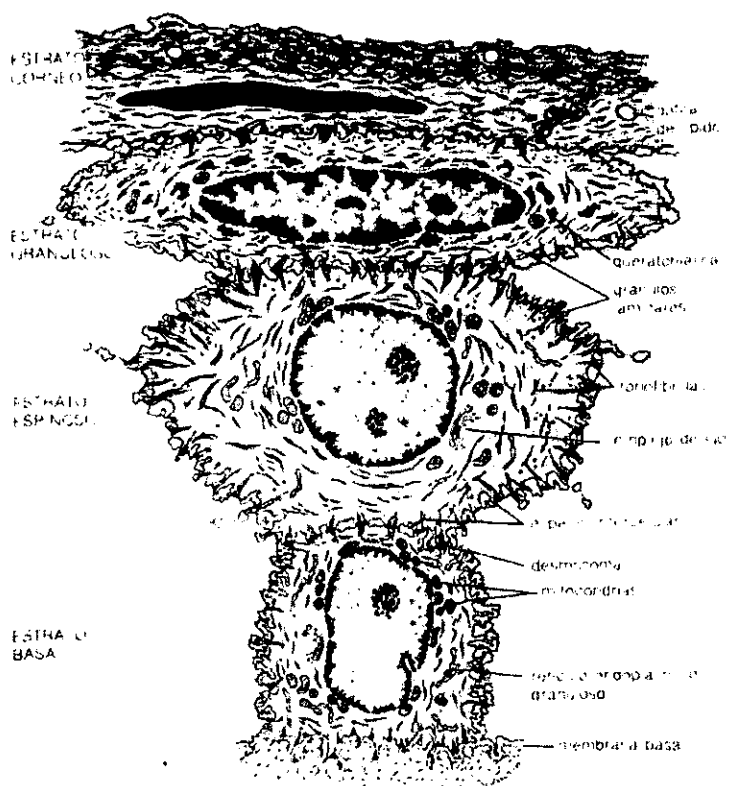


Fig. 54: Estructura general de la epidermis por capas.

el estrato espinoso (capa escamosa), consistente de dos o tres capas de células a manera de púas; del estrato granuloso que está compuesto por células "huso" - algunas de las cuales tienen una forma extremadamente elongada - distribuidas de manera paralela a la superficie de la piel y con abundantes gránulos basófilos; el estrato lucido, que no es visible pero ya ha sido identificado, y por último el estrato córneo, que es grueso, so-



bre todo en algunas áreas (como el abdomen), donde es tan grueso como todas las demás capas juntas. El pigmento melanina es escaso y se encuentra en la capa basal y en el estrato espinoso (fig. 54). El espesor de la epidermis en los armadillos es de aproximadamente 20  $\mu$ , exceptuando el estrato córneo, que mide aproximadamente 100  $\mu$  en malla abierta. La superficie del estrato granuloso es ondulada (17, 21, 22).

La dermis está compuesta de numerosos bultos de colágena que forman una masa compacta, dentro de la cual se encuentran fibroblastos, algunos mastocitos y delgados vasos linfáticos y sanguíneos. Los folículos pilosos en general escasean, pero son más abundantes en la zona del abdomen y en la región cervical (17).

La hipodermis está compuesta por tejido conectivo suelto que contiene vasos venosos, terminales nerviosas, y algunas fibras elásticas que se encuentran principalmente en la dermis, pero son observadas en menor grado en la hipodermis, éstas se disponen con variable espesor y en diferentes direcciones (17).

La piel del armadillo muestra ciertas particularidades enzimáticas: en la epidermis, las DCs resultan dopa-negativas, pero son fuertemente positivas para ciertas enzimas, como la fosfatasa alcalina y el acetato alfa-naftil esterasa; estas células se observan de gran tamaño y se tiñen con la fosfatasa alcalina y con el acetato alfa-naftil esterasa, lo cual se ve claramente en las dendritas que se extienden fuera y a través de las capas de la epidermis. Estas células se encuentran en todas las capas de la epidermis, en la unión dermoepidérmica, y aún en la parte alta de la dermis. La habilidad de estas células de sintetizar el complejo enzimático de tirosinasa en el armadillo es controvertida (23).

## Armadillo y Lepra (Antecedentes Históricos)

La lepra existe en México desde el siglo XVI, cuando fue introducida por los conquistadores españoles debido al comercio de esclavos, y posteriormente a las actividades comerciales con los pueblos del oriente de Asia, sobre todo con las Filipinas (fig. 55). Aunque la endemia del país se considera poco intensa en



Fig. 55: Introducción de la lepra por los conquistadores españoles.

relación con el panorama mundial, sigue siendo un problema de salud pública; su distribución geográfica es irregular. Sin embargo, hay una región que se identifica claramente como leprógena, ubicada en la costa del Océano Pacífico, donde en 10 estados con continuidad geográfica habitan el 78% de los enfermos. La Organización Mundial de la Salud estima que hay más de 10 millones de pacientes con lepra en el mundo (20, 24).



Fig. 56: La lepra, castigo divino.

A principios del siglo XIX se inicia la búsqueda de las causas reales del padecimiento. El desarrollo de la microscopía y la histopatología favoreció enormemente la observación y el análisis de los cambios estructurales a nivel celular asociados con esta enfermedad. Al mejorar los métodos de tinción, en 1873 Gerhard Hënrik Armaeur Hansen (fig. 57), médico noruego, observó cortes de lesiones de pacientes con lepra y propuso la teoría de que los bacilos encontrados por él eran los responsables del padecimiento, relacionando por primera vez a las bacterias con esta enfermedad; es por ello que se le considera el descubridor

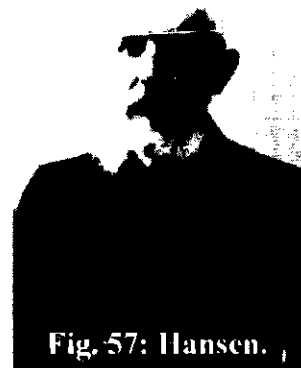


Fig. 57: Hansen.



Fig. 58: Leproma.

del agente causal de la lepra. Más tarde, en 1879, Albert Neisser aplica nuevos métodos de tinción e inicia una detallada observación de cortes de tejidos de pacientes con lepra, encontrando la presencia de abundantes bacilos en piel, hígado, bazo, ganglios linfáticos, córnea, testículos, ovarios y nervios afectados (fig. 58) (20).

La lepra es una enfermedad crónica granulomatosa que afecta principalmente a los nervios y a la piel en humanos (fig 59). La enfermedad exhibe un espectro con alta inmunidad en la forma tuberculoide y baja inmunidad en la forma lepromatosa, resultando dos tipos polares. Muchos



Fig. 59: Leprosario en Somalia.

estudios han indicado que tanto *in vivo* como *in vitro* la respuesta inmune celular se deprime en la lepra lepromatosa. <sup>15</sup> Así, la lepra se manifiesta en formas variadas que sólo pueden ser atribuidas a las características del paciente y no a las del agente causal, ya que no hay evidencia de que distintas cepas de *M. leprae* tengan diferente virulencia. La susceptibilidad de un individuo para desarrollar la lepra y presentar alguna forma particular de ésta enfermedad depende de múltiples factores, de los cuales los genéticos y los inmunológicos parecen ser los más importantes (20).

## El Agente Causal (*Mycobacterium leprae*)

El agente causal de la lepra fue llamado originalmente *Bacillus leprae* por Hansen en 1879, y hasta 1896 Lehmann y Neumann proponen denominarlo *Mycobacterium leprae* por su morfología y afinidades tintoriales; siendo este el nombre con el que se le conoce actualmente (fig. 60) (20).



Fig. 60: *Mycobacterium leprae*.

El hecho de que *M. leprae* no haya podido ser cultivado en el laboratorio ha limitado mucho su estudio; sin embargo, con el tiempo se le ha podido considerar como una micobacteria por ser un bacilo ácido-alcohol resistente, asociado a la formación de granulomas (20).



Fig. 61: Tamaño y forma del *M. leprae*.

Cuando el bacilo de Hansen (*M. leprae*) se tiñe por la técnica de Ziehl-Neelsen se visualiza como un germen de forma bacilar ligeramente curvo que mide aproximadamente de 4 a 7  $\mu\text{m}$  de largo por 0.3 a 0.4  $\mu\text{m}$  de ancho (fig. 61) (20).

A partir de su descubrimiento, se ha tratado de cultivar al *M. leprae* *in vitro*. Los intentos de numerosos investigadores modificando las condiciones y técnicas de cultivo fueron fallidos, los resultados que se supusieron acertados fueron de bacterias que estaban secundariamente asociadas a las lesiones, pero en ninguno de los casos se trató de *M. leprae* (fig. 62). Así, se llegó a la conclusión de que *M. leprae* es de vida intracelular, por lo que se intentó hacerlos crecer en cultivos de tejidos, pero los bacilos crecían limitadamente y por muy poco tiempo (20).



Fig. 62: Bacterias cultivadas asociadas secundariamente a lesiones de lepra.

## El Armadillo como Modelo Experimental

Simultáneamente a los intentos de cultivar *M. leprae* en el laboratorio, se empezó a inocular la micobacteria obtenida de nódulos leprosos humanos en diferentes animales con la finalidad de obtener un buen modelo experimental, (no sólo para conocer la morfología y la fisiología del bacilo, sino también para utilizarlo en la obtención de antígenos, el desarrollo de métodos de diagnóstico, la búsqueda de drogas anti-leprosas, el desarrollo de vacunas, además de contar con un buen abasto del agente causal), para ello se utilizaron diferentes vías de inoculación: intramuscular, intracraneal, intravenosa, subcutánea, en el ojo, en el cojinete plantar, haciendo implantes de tejidos, etc.; todo ello sin lograr el principal objetivo, que era tener un modelo experimental en donde hubiera una diseminación bacilar y así poder reproducir la enfermedad (fig. 63) (20).



Fig. 63: Micobacteria.

La larga búsqueda de un modelo animal para el estudio de la lepra ha involucrado a más de 30 especies animales, y casi tantos protocolos como investigadores para ello (25).

Se hizo en gran cantidad de animales distintos y con diferentes metodologías. En 1960 Shepard realizó el primer conteo sistemático de bacilos de *M. leprae* de un inóculo experimental en animales. Más tarde, en



Fig. 64: Armadillo de nueve bandas.

investigadores inocularon suspensiones de *M. leprae* y después de 17 a 24 meses los animales desarrollaron una infección generalizada con las características clínicas, histológicas y bacteriológicas de la lepra lepromatosa humana (fig. 64) (20, 22).

Las bacterias aisladas de lesiones de lepra lepromatosa en armadillo fueron estudiadas en comparación con el *M. leprae* humano y se demostró que son idénticos entre sí. Así, la identificación del *M. leprae* en el armadillo de nueve bandas algunos meses después de su infección experimental ha sido satisfactoriamente confirmada (fig. 65). La lepromina derivada del armadillo (lepromina-A) produjo el mismo patrón de respuesta que la lepromina derivada de humanos (lepromina-H), esto puede posibilitar la distribución mundial de un antígeno estandarizado para pruebas cutáneas. Todos estos hallazgos son de gran importancia, ya que permiten tener suficiente cantidad de bacilos para purificar sus antígenos y utilizarlos en la preparación de lepromina; métodos de diagnóstico, producción de vacunas y drogas anti-leprosas (20, 23, 24, 26, 27).

1968, la Dra. Storrs inicia las investigaciones en el armadillo tratando de reproducir la lepra humana por inoculación de bacilos de Hansen. Pero la solución para contar con un buen abasto de bacilos y tener un buen modelo animal para el estudio de la lepra, fue lograda en 1971 por Kirchheimer y Storrs, al multiplicar *M. leprae* en armadillos de nueve bandas (*D. novemcinctus*), estos in-



Fig. 65: Bacterias aisladas de armadillo.



Estos y otros factores, según se había mencionado con anterioridad, hacen al armadillo de nueve bandas el mejor modelo experimental (y posiblemente el definitivo) para las investigaciones epidemiológicas, inmunológicas y bioquímicas en las infecciones por lepra (23).

Posteriormente, en 1975, Storrs y colaboradores consiguieron transmitir la lepra al armadillo de siete bandas; y en 1978, Convit y colaboradores describieron la infección en el

Fig. 66: Armadillo de siete bandas. armadillo de ocho bandas (fig. 66) (25).

Es obvio que históricamente se ha dado mucha importancia al hecho de encontrar un modelo animal experimental para el estudio de la lepra. Más de ciento cuarenta años ha tomado el infectar a tres especies de armadillos, ratones gangliectomizados, ratas, y ardillas listadas coreanas; también han sido infectados cuatro primates (gibón, macaco de la India, gorila africano, y chimpancé), pero son necesarios más estudios para establecer a ciencia cierta su utilidad (25).

## **Factores Óptimos para la Infección con *Mycobacterium leprae***

La elección del armadillo de nueve bandas (*D. novemcinctus*) como un posible modelo experimental para el estudio de la lepra está basada en los siguientes factores:

- 1) Los armadillos tienen una temperatura (rectal) que varía entre los 30 y los 36° C y la temperatura corporal o de sus tejidos cambia de acuerdo con la temperatura del medio ambiente, lo cual es ventajoso, ya que para el estudio de la lepra *in vivo*, se requieren temperaturas corporales relativamente bajas, por que el *M. leprae* se multiplica mejor en las regiones más frías del cuerpo humano (18, 28).
- 2) El armadillo es potencialmente único como modelo de estudio para la lepra porque se reproduce regularmente en cuádruplos monocigóticos, haciendo posible la replicación de un experimento con animales genéticamente idénticos. Esto resulta particularmente relevante en la investigación de la lepra, ya que los factores genéticos constituyen uno de los mecanismos principales de resistencia contra la lepra en los seres humanos, al igual que en el resto de los animales (28).

- 3) Los armadillos tienen una vida media relativamente larga. La longevidad del armadillo no está bien establecida, pero alcanzan la talla máxima y la madurez sexual en su segundo año de edad, y resulta ventajosa para el estudio de aquellas enfermedades de desarrollo lento. Su larga gestación sugiere que pueden vivir entre 12 y 15 años en ausencia de enfermedades y accidentes (17, 18, 28).
- 4) La debilidad de su respuesta inmune los hace propensos a contraer una gran cantidad de enfermedades y procesos infecciosos. Además de la susceptibilidad a la lepra, el armadillo es susceptible a otras muchas enfermedades humanas, por lo cual el potencial de este animal para el estudio de la transmisión y la quimioterapia de las enfermedades humanas es de gran significado (17, 18).

El primer factor, que es la baja temperatura corporal, ocasionó que el armadillo se volviera interesante como modelo de investigación por el hecho de que, como ya se menciona, el *M. leprae* se multiplica mejor en las regiones más frías del cuerpo humano (fig. 67). La temperatura corporal (rectal) en el armadillo de nueve bandas, oscila, según se vio, entre los 30 y los 36° C cuando la temperatura ambiental esta cercana a los 25° C. Es por ello que se ha vuelto de gran interés como modelo experimental, debido a lo cual no ha sido difícil percibir las ventajas inherentes en las demás características arriba mencionadas (18).



Fig. 67: *M. leprae*.



Fig. 68: Cuádruplos monocigóticos de armadillo.

Adicional a la baja temperatura corporal, está el hecho de que los cuádruplos monocigóticos son producidos regularmente a partir de un solo óvulo fecundado, haciendo que este animal sea extremadamente valioso como modelo de experimentación para el estudio de la base genética que da lugar a la susceptibilidad a la lepra (fig. 68) (18).

La hembra de armadillo produce casi invariablemente cuatro crías del mismo sexo en cada camada. Esto se produce como resultado de la división de un solo huevo. La reproducción en los armadillos de nueve bandas está marcada por dos fenómenos distintivos: el largo periodo que hay entre el desarrollo del blastocisto y la implantación del huevo, y el fenómeno específico de poliembrionia, en el cual, se da la formación normal de cuádruplos idénticos. En un año normal, cerca de la mitad de las hembras quedan preñadas para finales de Julio, que es el principio de la época de crianza. A los 5-7 días de que el óvulo es fecundado, éste pasa al útero, aquí entra en una etapa donde el desarrollo cesa, y el huevo permanece libre y latente en el útero, donde está constantemente bañado por los fluidos de éste, secretados por una glándula especial, que le proporciona los suficientes nutrientes y oxígeno para que sobreviva. La implantación no ocurre sino hasta Noviembre, casi 14 semanas después de la fertilización. Durante este proceso, el blastocisto se divide en centros de crecimiento, cada uno de los cuales rápidamente se divide otra vez formando cuatro centros de crecimiento embrionario anclados a una sola placenta dentro del útero. Cada feto se desarrolla en su propio saco amniótico y con anclaje placentario independiente. Los cuatro anclajes placentarios vienen de un gran disco lobulado, pero no hay conexiones circulatorias entre los individuos. El desarrollo de cada uno de los embriones se da normalmente, y las cuatro crías nacen aproximadamente cuatro meses después, en Marzo; aunque se ha observado que algunas hembras tienen camadas a principios de Febrero, o bien, a mediados de Mayo (fig. 69). El fenómeno del retraso en la implantación puede ser en parte responsable del éxito del armadillo en algunas regiones. Sin esta característica del ciclo reproductivo, las crías podrían nacer a principios del invierno, cuando las probabilidades de sobrevivir son mucho menores. Aparentemente el ciclo es afectado por condiciones medioambientales, por ello es tan difícil la reproducción en cautiverio (17, 29, 30).





## Experimentación y Crianza en México

En México se ha establecido una colonia de armadillos para la investigación de lepra; el proyecto comenzó en 1980 en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional con un pequeño grupo de animales, la actual colonia se mantiene relativamente a bajo costo, y cumple con las normas de seguridad básicas tanto para los animales como para el personal que los manipula. Las instalaciones incluyen un crematorio y dos áreas de trabajo independientes: una designada para recibir y acoger animales para su adaptación al cautiverio (sección de cuarentena), y otra para la manutención de armadillos que están bajo observación por algún estudio. En la sección de cuarentena hay espacio suficiente para cerca de 18 animales, y en la sección de manutención para investigación se pueden albergar satisfactoriamente a más de 36 animales; a su arribo, cada animal es tatuado para ser identificado permanentemente (31).

### Armadillo y Células Dendríticas Antecedentes en Experimentación

Debido a la importancia del armadillo de nueve bandas (*D. novemcinctus*) en las investigaciones sobre la lepra, se ha estudiado la



Fig. 70: LCs en epidermis de armad.

ultraestructura de la epidermis normal en esta especie. Los estudios histopatológicos e inmunológicos de la lepra tanto experimental como naturalmente adquirida en armadillos sugieren un defecto en la mediación de la inmunidad celular (CMI) similar al defecto que se presenta en la lepra lepromatosa humana. Las LCs no han sido completamente descritas en armadillos sanos o infectados; pero hay estudios que describen la estructura de la epidermis en armadillos y proporcionan datos fundamentales de las LCs en piel de armadillo sano; éstas están involucradas en la presentación de antígenos y la activación de LTs (fig. 70). El papel de las LCs en la inmunidad celular y la descripción de los cambios en el número y la estructura de estas células en la lepra humana, hace que el estudio de éstas células en el armadillo sea un aspecto sumamente interesante (21).

En 1988, Gimenez y colaboradores investigaron la presencia de LCs en epidermis de armadillos de nueve y de siete bandas, para lo cual utilizaron dos técnicas: la separación de láminas epidérmicas con bromuro de sodio, para teñirlas con el método enzimático de ATPasa; y los cortes histológicos transversales parafinados clásicos (fig. 71), para teñirlos de manera rutinaria con hematoxilina y eosina (H&E). Por el primer método observaron células con morfología dendrítica y distribución irregular en la epidermis, mientras que por medio del segundo método (separación de láminas epidérmicas) no observaron ninguna célula con morfología dendrítica. No hicieron conteos ni sacaron conclusiones por no estar seguros de que se tratara de LCs (22).



Fig. 71: Cortes histológicos.

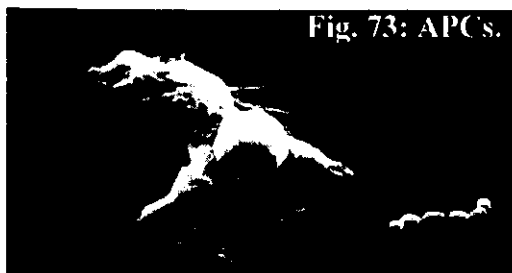


Fig. 72: LC típica.

Casi diez años más tarde, en 1995, Liu Hui-Min y colaboradores hicieron estudios en piel de armadillos, e identificaron los tres tipos celulares básicos de la epidermis humana: queratinocitos, melanocitos y LCs. Observaron células con las características ultraestructurales típicas de las LCs en la epidermis normal del armadillo en todas las áreas investigadas (abdomen, cachete, oreja y muslo) aunque su número fue menor que el correspondiente a la piel humana (fig. 72) (21).

Según estos resultados, la proporción relativa de LCs y melanocitos es menor al 1%. El porcentaje de éstas células en la epidermis de armadillo es, por lo tanto, menor que en la piel humana; aunque su número en las diferentes áreas anatómicas es similar. Estas LCs contienen gránulos de Birbeck que son morfológicamente idénticos a los encontrados en LCs epidérmicas de humanos. La evidencia sugiere, que, como en la piel humana, las LCs en la piel de armadillo pueden migrar a través de la membrana epidérmica. Estudios de los cambios celulares en armadillos con lepra naturalmente adquirida o experimentalmente inducida son necesarios para un mejor entendimiento de la depresión en la respuesta inmune. Los datos reportados en la piel de armadillo normal son muy útiles en este tipo de estudios (21).

Así, el estudio histoquímico de la piel de armadillo normal debe ser de gran interés como base para el posterior estudio comparativo de la alteración enzimática en poblaciones celulares, con vista a dilucidar las interacciones de los macrofagos y los linfocitos con el fenómeno de la inmunidad en la lepra, y desde luego, con el proceso de presentación de antígenos (fig. 73) (23).



Ya mencionamos que debido a que el armadillo de nueve bandas es un mamífero susceptible a la infección con *M. leprae*, las características inmunológicas de este animal son de gran interés. Aunque la respuesta mediada por anticuerpos en el armadillo, la capacidad proliferativa de linfocitos, y las características histopatológicas de la respuesta a la inoculación con *M. leprae* ya han sido documentadas, la caracterización de la participación de las células linfoides en las respuestas inmunes se ha estancado por la falta de anticuerpos que reaccionen con antígenos de células inmunes de armadillo (32).

Para estudiar la posibilidad de que el armadillo tenga un defecto anatómico que le genere una deficiencia inmunológica, los órganos y tejidos del sistema inmune fueron examinados en busca de una anomalía por Walsh y colaboradores en 1978. Ninguna fue encontrada. Las glándulas del timo estaban bien desarrolladas, y las áreas timo-dependientes de los ganglios linfáticos y el bazo contenían abundantes células linfoides. El examen de las placas de Peyer, la médula ósea y las amígdalas no revelaron ninguna anomalía. Se concluyó por tanto, que la morfología de los tejidos del sistema linforeticular estaban bien desarrollados e intactos (17).

Primero se hicieron estudios de las características anatómicas generales y el sistema inmune en el armadillo por Purtilo y colaboradores. Estos estudios demostraron la presencia de órganos linfoides (timo, ganglios linfáticos, bazo, etc.) con la misma apariencia típica histológica de órganos similares en otros mamíferos. Los ganglios primarios y los centros germinales fueron observados en el bazo y en los ganglios linfáticos. El conteo de leucocitos en sangre cardiaca también sugiere la distribución normal de los mamíferos (fig. 74) (17).



Fig. 74: Leucocitos en sangre cardiaca.

Más tarde, también Purtilo y colaboradores realizaron un estudio morfológico del sistema inmune, hecho con la finalidad de demostrar que un posible defecto en la morfogénesis de sus órganos linfoides pudiera ser el responsable de su susceptibilidad a la lepra. De una forma u otra, se concluyó que la susceptibilidad del armadillo a la lepra no puede ser explicada con una base morfológica. Basándose en este estudio morfológico y en los estudios previos se concluyó que la inusual susceptibilidad del armadillo a infectarse de lepra se debe a una condición fisiológica de depresión de la respuesta inmune celular (33).

## MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA CÉLULAS DENDRÍTICAS

### Tinción Enzimática de ATPasa

Para determinar la naturaleza de las células epidérmicas, se examinó su reactividad a ATP-asa, ésta enzima marca células epidérmicas citoquímicamente. Las células epidérmicas positivas para ATP-asa son poblaciones virtualmente idénticas. La microscopía electrónica reveló que las células con forma de roseta (fig. 75), así como las células positivas a ATP-asa en epidermis, exhiben la misma morfología ultraestructural clásica de las LCs, incluyendo los típicos BG (8).

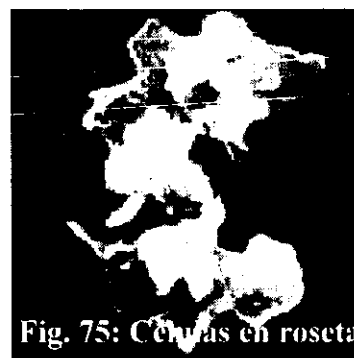


Fig. 75: Células en roseta

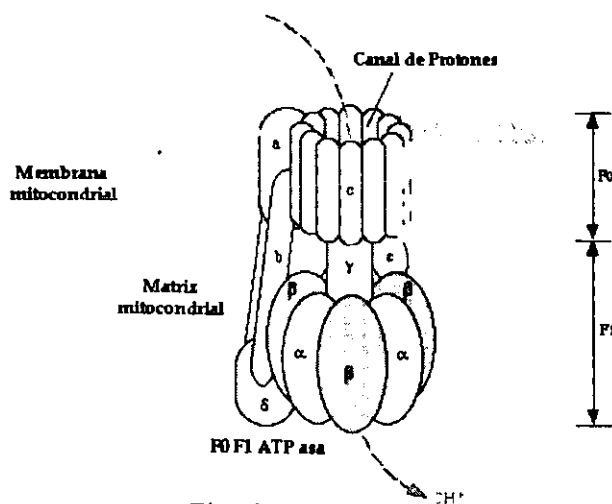


Fig. 76: Ecto-ATPasa.

La ecto-ATPasa es una enzima transmembranal que cataliza la hidrólisis del ATP extracelular (ATPe) a ADP y fosfato inorgánico, y se expresa durante la activación celular (fig. 76). Las LCs contienen altas concentraciones de ATPasa (34, 35).

Las LCs en la epidermis de los mamíferos procesan la ectoenzima dependiente de

adenosin trifosfato (ATPasa) que ha servido en forma notoria como marcador histoquímico para las DCs en gran variedad de tejidos y preparaciones. Hay reportes en los que las LCs ya han sido observadas y cuantificadas en piel por demostración histoquímica enzimática de ATPasa en epidermis (36, 37).

## Cortes Histológicos

Hoy en día, es bien sabido que las LCs son células leucocíticas dendríticas que se localizan en el epitelio escamoso estratificado y que constituyen aproximadamente del 2 al 4% de todas las células epidérmicas. En la epidermis, generalmente se localizan en posición suprabasal y se anclan a los queratinocitos vecinos vía E-caderina y  $Ca^{2+}$ . Las LCs no pueden ser fácilmente identificadas en secciones rutinarias de H&E. Su visualización y cuantificación *in situ* requiere el uso de técnicas histoquímicas y/o inmunomarcadores apropiados. Usando la técnica enzimática de ATPasa, Chen y colaboradores determinaron el rango de la densidad de LCs en epidermis humana (2).

## Resultados y Observaciones Previas

### Morfología Típica de las Células Dendríticas

Las LCs son las DCs mejor caracterizadas; éstas se localizan en las láminas basal y suprabasal de la epidermis. Las LCs son el único tipo celular en la epidermis sana que expresa MHC clase II. Estas células también han sido descritas en otros epitelios estratificados, como boca, esófago, pulmón, etc (9).

Las LCs tienen un núcleo multilobulado y son características por poseer una estructura citoplásmica trilaminar formada por una doble membrana llamada gránulo de Birbeck (BG), que ayuda a su identificación, usando estos organelos como marcadores (2, 4, 9).



Fig. 77: Prolongaciones de las DCs.

Las DCs en su estado natural continuamente expanden y retraen sus prolongaciones, mientras que, como consecuencia, su núcleo se encuentra en movimiento pulsátil (fig. 77). En contraste, la actividad de membrana fagocítica mantiene al núcleo sedentario y retraídas a las prolongaciones

(4, 15).

La morfología de las LCs observadas en armadillos difiere en cuanto a tamaño y forma de aquellas observadas en humanos. Las dendritas son más finas y más largas (fig. 78) (22).

Ninguna otra de las células sanguíneas exhibe la forma y la movilidad que les ha ganado el nombre de células “dendríticas”. *In situ*, como en piel, vías

respiratorias y órganos linfoides, las DCs son estrelladas, cuando se aíslan y se colocan en una preparación, estas células muestran numerosas dendritas finas. Cuando se miran en un microscopio electrónico, las prolongaciones son largas y delgadas, parecidas a espinas o ramificaciones (fig. 79); cuando son



Fig. 79: DC en microscopio electrónico.

observadas con un microscopio de contraste de fases, las DCs se ven grandes, con delicadas prolongaciones o vellos en muchas direcciones desde el cuerpo celular. Estas prolongaciones se expanden y retraen varias veces por día en movimientos no polarizados. La forma y la movilidad de las DCs establece y facilita su función, que es capturar y procesar antígenos para migrar a órganos linfoides secundarios y activar a LTs (6).

Las DCs, que son APCs especializadas para la activación de los LT, inician respuestas  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , especialmente *in vivo*. Las LCs epidérmicas tienen prolongaciones citoplásmicas que se extienden para establecer contacto físico y mantener la comunicación con múltiples células adyacentes (fig. 80). Las LCs  $CD1a^+$  contienen BG y se encuentran en dermis, y representan, quizá, células en movimiento hacia el sistema linfático aferente (4).

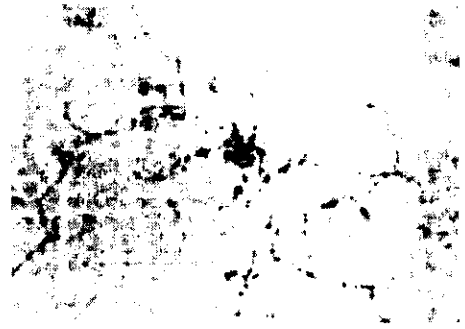


Fig. 78: Dendritas de las DCs.



Fig. 80: DCs en comunicación con otras células adyacentes.

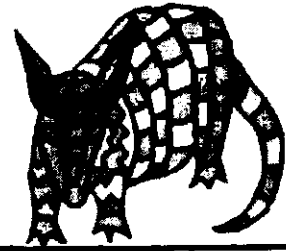
## Densidad y Distribución de las Células Dendríticas en Epidermis

En epidermis humana se observan LCs cuyo número varía entre 460 y 1000 por  $\text{mm}^2$ , encontrándose variaciones regionales en su distribución. Los estudios de Liu son contrarios a estas observaciones, posiblemente por la técnica de separación de la epidermis. Otros autores reportan que la densidad varía de  $\sim 200/\text{mm}^2$  (en palmas de las manos y plantas de los pies) hasta  $\sim 970/\text{mm}^2$  (en cara y nuca) (4, 9, 38).

El número de LCs ( $\pm 1000/\text{mm}^2$ ) cambia de acuerdo a su localización anatómica. Las LCs en la piel están sujetas a un control neuroendócrino y están asociadas íntimamente con terminales nerviosas (4).

Para consultar las iniciales y abreviaturas utilizadas, ver el apéndice no. 2.  
Para consultar el sumario de imágenes utilizadas, ver el apéndice no. 3.

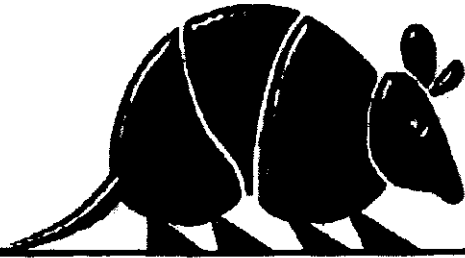
### III . OBJETIVOS



- Demostrar la eficiencia del uso de quelantes, como el EDTA, para la separación de láminas epidérmicas en piel de armadillo de nueve bandas.
- Cuantificar las células epidérmicas con típica morfología dendrítica en diferentes regiones anatómicas de la piel del armadillo sano (muslo, abdomen, axila, cuello y nuca) para determinar diferencias en su distribución (#DC/área[mm<sup>2</sup>]).
- Observar la morfología y el tamaño normal de las DCs epidérmicas en las diferentes regiones anatómicas del armadillo de nueve bandas para determinar cambios morfológicos correlacionados a aspectos funcionales.
- Continuar con investigaciones inmunológicas básicas - nivel humoral y celular - en armadillos tanto infectados como sanos, ya que la caracterización de las respuestas inmunes en armadillos normales es necesaria para comprender los cambios inmunopatológicos que acompañan el desarrollo potencial de una infección diseminada de lepra en el armadillo.



## IV . HIPÓTESIS



- 
- La separación de epidermis y el empleo de una técnica enzimática, como la ATPasa, son procesos que facilitan y optimizan la observación y cuantificación de las DCs, superando notablemente a los cortes histológicos convencionales.
  - La diferencia en cuanto al número y la forma de las DCs entre las distintas regiones anatómicas del armadillo, por analogía con el humano.

# V. MATERIAL Y MÉTODO

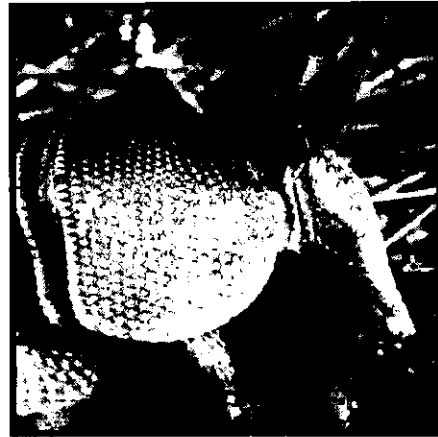


## TOMA DE MUESTRAS

Biopsias de piel normal de armadillos sanos

Material requerido:

- Ketamina (anestésico de uso veterinario)
- Isodine (como antiséptico)
- Solución Salina Isotónica
- Jeringas para insulina (1 ml)
- Gasas estériles
- Guantes estériles
- Suturas dermalon 000
- Mango de bisturí
- Navajas para bisturí
- Pinzas hemostáticas
- Pinzas porta agujas
- Cajas de Petri
- Armadillos (de la ENCB-IPN)



Procedimiento:

- Bajo anestesia con Ketamina y previa antisepsia local con isodine espuma, se toma una muestra de piel en forma de huso de las diferentes zonas anatómicas planteadas del armadillo de nueve bandas.- muslo, abdomen, cuarto delantero, cuello y nuca; para después suturar la piel del animal; las muestras son de aproximadamente 1.5-2.0 cm de largo por 0.5-1.0 cm de ancho. Estas muestras se desgrasan, se colocan en solución salina isotónica dentro de diferentes cajas de Petri y se rotulan adecuadamente para su posterior procesamiento.

## SEPARACIÓN DE CAPAS EPIDÉRMICAS

Procesamiento de las biopsias de piel de armadillos sanos

Material requerido:

EDTA 0.5 M pH 7.4

Solución salina 0.85 % (con BSA 0.1 %)

o PBS

Navajas de bisturí (# 10)

Placa de acrílico

Pinzas de disección finas

Cajas de Petri



Procedimiento:

- Tomar la biopsia de piel del armadillo.
- Colocarla en solución salina, de preferencia estéril y libre de pirógenos para evitar que las células dendríticas emigren.
- Tomar la biopsia y extenderla sobre el acrílico con la epidermis hacia arriba para cortarla en pedazos de aproximadamente  $0.5 \text{ cm}^2$  con una navaja de bisturí. Regresar los cortes a la solución salina para evitar que se sequen.
- Ambientar el EDTA a  $37^\circ \text{C}$  en las cajas de Petri (tantas como se necesiten dependiendo del número de muestras que se van a trabajar).
- Con dos pinzas de disección (sin dientes) tomar la piel con la epidermis hacia arriba y extenderla con mucho cuidado en una caja de Petri con EDTA ya tibio, de modo que la piel quede flotando sobre el EDTA con la dermis hacia abajo y la epidermis hacia arriba.
- Incubar de 6 horas a 6 horas y media a  $37^\circ \text{C}$  (puede seguirse hasta 7 u 8 horas según el caso y el protocolo original).
- Preparar cajas de Petri con solución salina (las necesarias).
- Sacar las muestras de incubación y pasarlas a solución salina, dejándolas enjuagar durante 15 minutos mínimo.
- Tomar una caja de Petri con solución salina y pasar a ella uno de los cortes de piel teniendo cuidado de que la epidermis quede hacia arriba.
- Con una pinza de disección (con dientes), tomar firmemente la piel por una esquina o extremo, y con alguna superficie fina y completamente plana (como el dorso de una navaja de bisturí o unas pinzas planas sin

dientes) deslizar presionando fuertemente para separar la epidermis (todo esto se hace dentro de la solución salina).

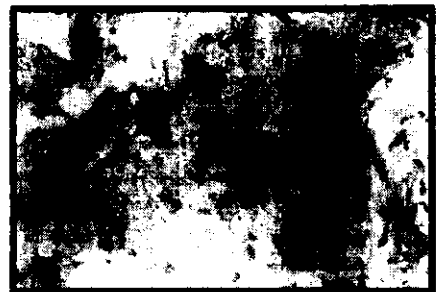
- Cuando la epidermis ha sido separada, se extiende lenta y cuidadosamente sobre solución salina o PBS dentro de otra caja de Petri limpia y se deja enjuagando, al menos por 10 minutos.

## **TÉCNICA DE TINCIÓN ENZIMÁTICA DE ATPasa**

Para la visualización de Células de Langerhans epidérmicas

### Material requerido:

- Cajas de Petri (Grande - 100 mm; Chica - 60 mm)
- Muestras de tejido (en este caso piel/epidermis de armadillo)
- Forceps de punto fino (curvado, angular y recto)
- Navaja de bisturí del # 10
- Pipetas de 5, 10 y 25 ml
- Pipetas Pasteur
- Bulbos para pipetas
- Baño María de 37 °C
- Agua destilada
- Portaobjetos
- Cubreobjetos de 50 x 50 mm
- Marcadores de tinta indeleble para rotular



### Soluciones necesarias:

- Solución salina normal (0.9 %)
- Solución de Buffer EDTA
- Solución Tris Mal
- Solución Fijadora
- Mezcla de Incubación
- Solución reveladora de Sulfuro de Amonio
- Solución de Glicerina para el montaje



### Almacenamiento de las Soluciones:

Todas las soluciones se deben mantener en un pH constante, almacenadas en refrigeración por un lapso máximo de seis meses, revisando su pH periódicamente.

Nota: La preparación de las soluciones y su almacenamiento se refiere en el Apéndice No. 2.

### Procedimiento:

- Después de separar la epidermis de la dermis, lavar las láminas epidérmicas en solución salina normal por 3 o 4 veces (cada una de 7 minutos mínimo), asegurarse de que las láminas estén extendidas en la solución para un buen lavado.
- Colocar las láminas epidérmicas en cajas de Petri con solución fijadora y guardarlas en refrigeración a 4° C, de 20 minutos a 24 horas (OVN). Descartar todos los otros tejidos y restos orgánicos.
- En un baño María a 37° C se calienta la mezcla de incubación. Tener cajas de Petri pequeñas a temperatura ambiente.
- Sacar las láminas epidérmicas del refrigerador y lavarlas tres veces en cajas de Petri pequeñas con solución salina durante 20 minutos al menos, para eliminar la solución fijadora.
- Previamente calentada a 37° C, colocar las láminas epidérmicas en la mezcla de incubación e incubar durante 50 minutos a la misma temperatura.
- Al terminar la incubación, sacar los cortes de la mezcla y lavar inmediatamente durante 7 minutos por 3 veces mínimo con solución salina.
- Bajo una campana de extracción, colocar la epidermis en cajas de Petri que contengan la solución de sulfuro de amonio para revelar. Los cortes deben tornarse oscuros (café / negro). Dejarlas ahí el tiempo necesario. (Generalmente con 1 minuto basta).
- Sacar los cortes del revelador y lavar con H<sub>2</sub>O destilada.
- Sacar los cortes del agua y colocarlos sobre un portaobjetos, una vez que estén bien extendidos, secar el agua excedente y agregar una gota de glicerol al 90% para montaje, cubrir con el cubreobjetos y presionar suavemente para remover el aire atrapado. Rotular.
- Sellar las orillas del cubreobjetos con esmalte para uñas; preferentemente transparente. Esto evita que se corra la preparación, haciéndola más duradera.
- Observar la preparación al microscopio, utilizando objetivo de 10x para ver la posición y objetivo de 40x para ver la morfología y hacer conteos.
- Desechar el restante de la solución de fijación, la mezcla de incubación y la solución reveladora. Regresar el resto de las soluciones al refrigerador, revisando el pH crítico para cada una de ellas.

## CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CON MICROSCOPIA ÓPTICA

Obtención matemática de su densidad (DC/mm<sup>2</sup>) en las diferentes regiones anatómicas de la epidermis de la piel del armadillo

Material requerido:

Microscopio óptico  
Calculadora

Procedimiento:

- Contar las células con típica morfología dendrítica en 12 campos por cada una de las preparaciones de las diferentes regiones anatómicas de los cuatro distintos animales bajo objetivo de 40x.
- Hacer la conversión del número de DCs por campo a número de DCs por mm<sup>2</sup>; para esto se utiliza la siguiente fórmula:

$$\emptyset = \frac{\text{Apertura del ocular}}{\text{Aumento del objetivo}} \quad \emptyset = \text{Diámetro}$$

$$\emptyset = \frac{18 \text{ mm}}{40x} = 0.45 \text{ mm} \quad 0.45 \text{ mm} = 450 \mu\text{m}$$

$$A = \pi r^2 \quad A = \text{Área} \quad \pi = 3.141592654$$

$$r = \text{radio} = \emptyset/2 = 450 \mu\text{m}/2 = 225 \mu\text{m}$$

$$A = \pi (225 \mu\text{m})^2 = 159043.1281 \mu\text{m}^2$$

- Hacer la conversión del número de DCs por  $\mu\text{m}^2$  a número de células por mm<sup>2</sup>; para esto se utiliza una regla de tres, tomando en cuenta que 1 mm<sup>2</sup> equivale a  $1 \times 10^6 \mu\text{m}^2$  (ver Apéndice No. 5).
- Una vez que se tiene el número de DCs por mm<sup>2</sup>, se saca un promedio de los resultados por área y por organismo, obteniendo la densidad de DCs por mm<sup>2</sup> para las diferentes regiones anatómicas estudiadas.
- Hacer una tabla con los datos obtenidos, así como las gráficas pertinentes para la interpretación y análisis de los resultados.

# OBSERVACIÓN DE LA MORFOCITOLOGÍA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

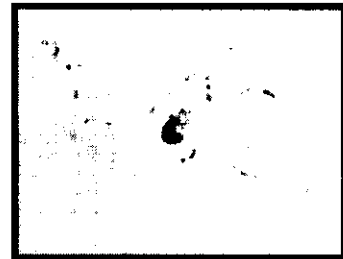
Diferencias citológicas (cambio de morfología) en las distintas regiones anatómicas de la piel del armadillo

Material requerido:

Regla o vernier

Fotografías para dimensionar

Calculadora



Procedimiento:

- Tomar las fotografías bajo el objetivo deseado.
- Tomar las medidas necesarias de las DCs, ya sea del soma celular, de sus dendritas, de la célula completa o del espacio intercelular con un vernier.

- Hacer los cálculos pertinentes:

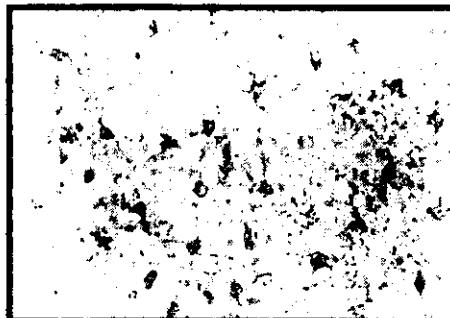
La fotografía mide 152.15 mm, el negativo mide 35.69 mm; la fotografía esta aumentada 4.26 veces del negativo, según la división de sus hipotenusas.

El aumento del tubo fotográfico es de 2.8x.

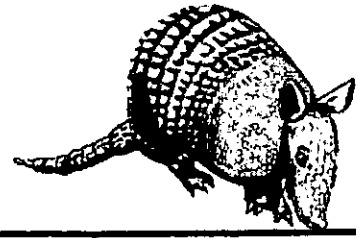
Si el objetivo utilizado es de 40x, el aumento final de la foto es de 477.12x. Así, un objetivo de 40x equivale a 477.12x en la foto; y 1 cm de fotografía equivale a 21.10  $\mu$ ; así, 50  $\mu$  equivalen a 2.4 cm y 100 $\mu$  a 4.7 cm.

Si el objetivo utilizado es de 20x, el aumento final de la foto es de 238.56x. Así, un objetivo de 20x equivale a 238.56x en la foto; y 1 cm de fotografía equivale a 42.23  $\mu$ ; así, 50  $\mu$  equivalen a 1.8 cm y 100 $\mu$  a 2.4 cm (ver Apéndice No.6).

- Con base en estos cálculos, por regla de tres se puede sacar la dimensión aproximada de las DCs, el tamaño del soma celular, la longitud de las dendritas y el espacio intercelular a partir de una fotografía.



## VI. RESULTADOS

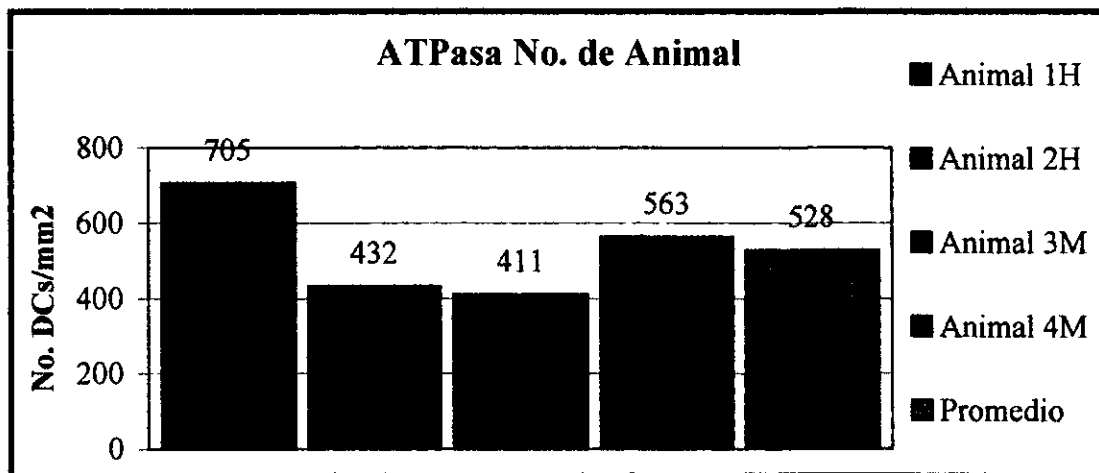


### Obtención de la densidad de Células Dendríticas (DCs)/ mm<sup>2</sup> en Armadillo de Nueve Bandas (*Dasypus novemcinctus* Linn.)

Densidad de Cél Den	Animal 1 Hembra	Animal 2 Hembra	Animal 3 Macho	Animal 4 Macho	Total de DC/mm <sup>2</sup>
Muslo	497	230	334	401	366
Abdomen	672	268	323	392	414
Axila	680	613	504	607	601
Cuello	843	553	268	639	576
Nuca	831	494	625	777	682
Promedio	705	432	411	563	528

Tabla No. 1

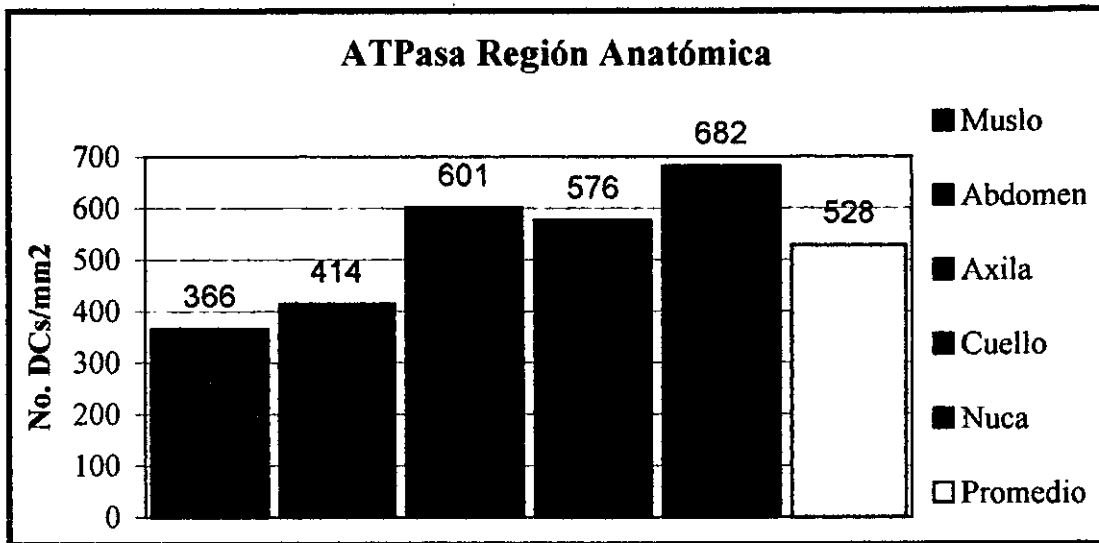
Muestra los valores obtenidos del número de DCs/mm<sup>2</sup> en los cuatro animales diferentes, estudiados en cinco distintas regiones anatómicas.



Gráfica No. 1

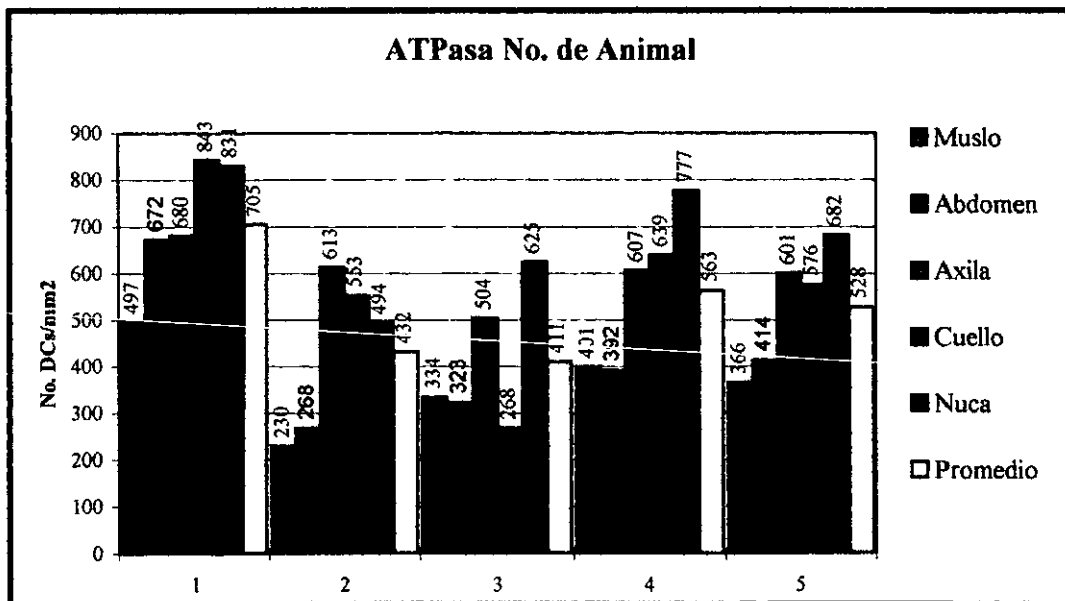
Muestra la diferencia en el número de DCs entre los diferentes armadillos estudiados, usando el promedio de las cinco regiones anatómicas en cada uno. (H=hembra, M=macho).





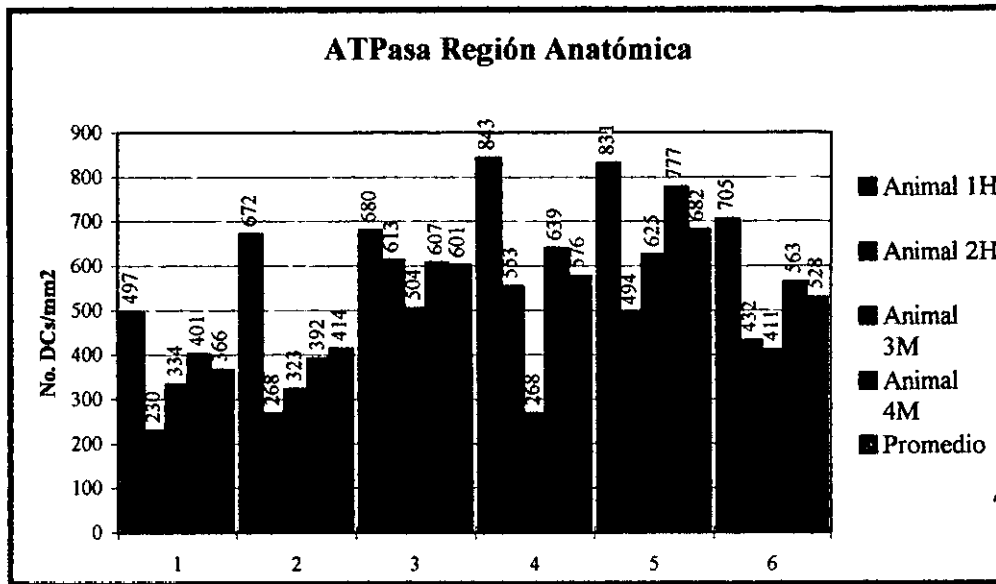
Gráfica No. 2

Muestra la diferencia en la distribución de DCs (DC/mm<sup>2</sup>) en las cinco distintas regiones anatómicas promediando a los cuatro animales.



Gráfica No. 3

Muestra la distribución de DCs (DC/mm<sup>2</sup>) en la epidermis normal de los cuatro armadillos con las cinco distintas regiones anatómicas por separado. 1=Animal 1H, 2=Animal 2H, 3=Animal 3M, 4=Animal 4M, 5=Promedio (H=hembra, M=macho).



Gráfica No. 4

Muestra la distribución de DCs ( $\text{DC}/\text{mm}^2$ ) en las cinco distintas regiones anatómicas de los cuatro diferentes armadillos. 1=Muslo, 2=Abdomen, 3=Axila, 4=Cuello, 5=Nuca, 6=Promedio.

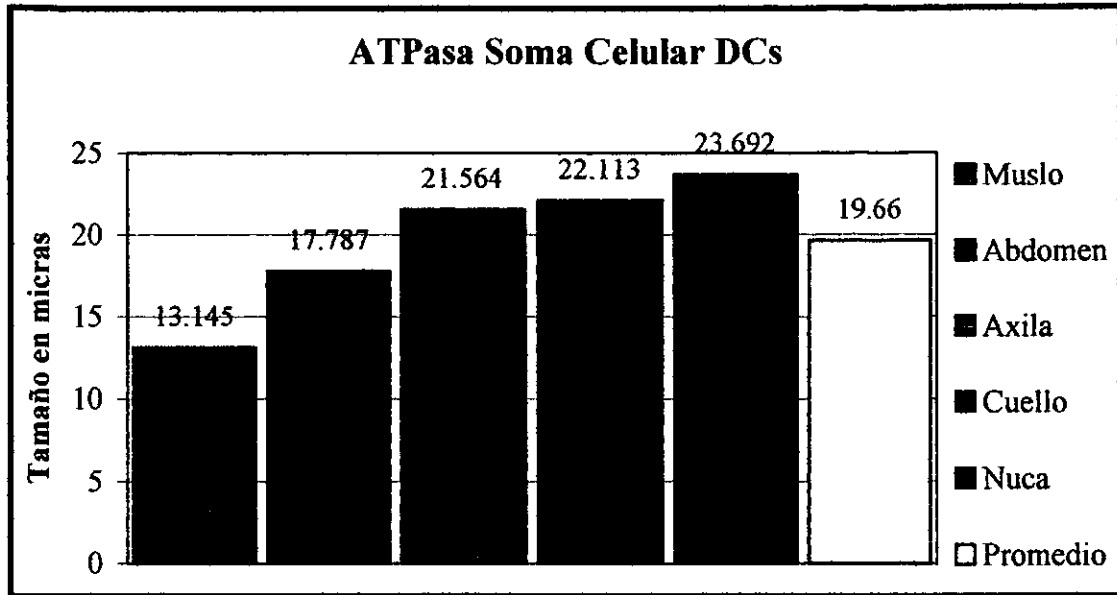


### Obtención de parámetros morfométricos de las Células Dendríticas

Micras ( $\mu$ )	Soma Celular	Dendrita Celular	Célula Entera	Ramifica 1 <sup>aria</sup> No.	Ramifica 2 <sup>daria</sup> No.	Espacio Intercelu
Nuca	13.145	43.108	56.253	4.0	4.11	44.120
Cuello	17.787	67.816	85.603	4.5	5.44	59.312
Axila	21.564	32.768	54.332	6.3	4.50	63.068
Abdomen	22.113	40.427	62.540	5.2	4.44	76.213
Muslo	23.692	77.034	100.654	4.7	5.11	116.155
Promedios	19.660	52.231	71.876	4.94	4.72	71.774

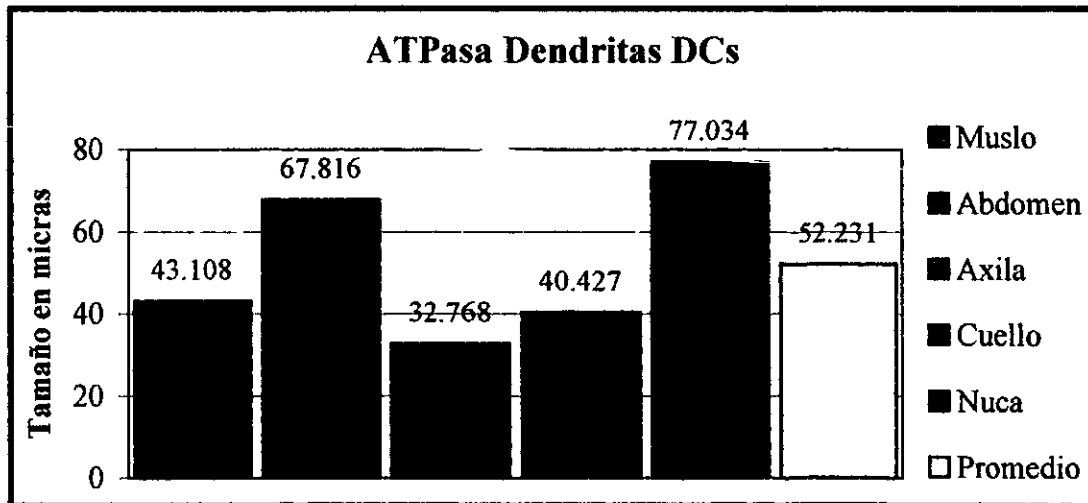
Tabla No. 2

Muestra los valores obtenidos al dimensionar fotografías en aumentos de 20x y 40x del tamaño en micras ( $\mu$ ) de diferentes parámetros (diámetro soma celular, longitud dendritas, número de ramificaciones primarias y secundarias, espacio intercelular [de soma a soma]) de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas estudiadas.



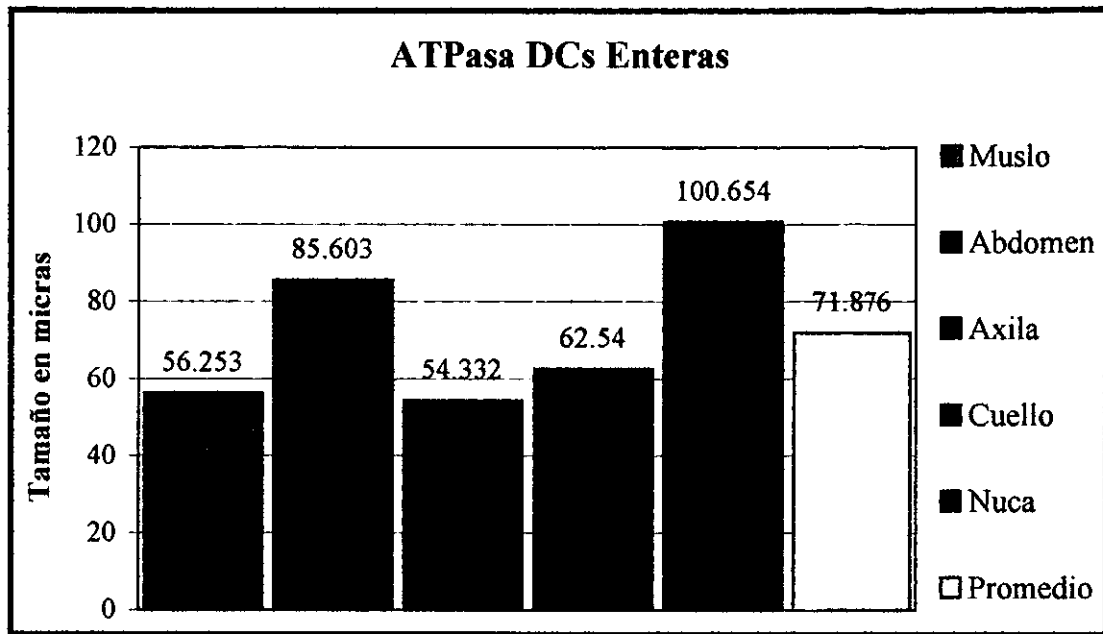
Gráfica No. 5

Muestra el tamaño del soma de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas de los cuatro armadillos en promedio.



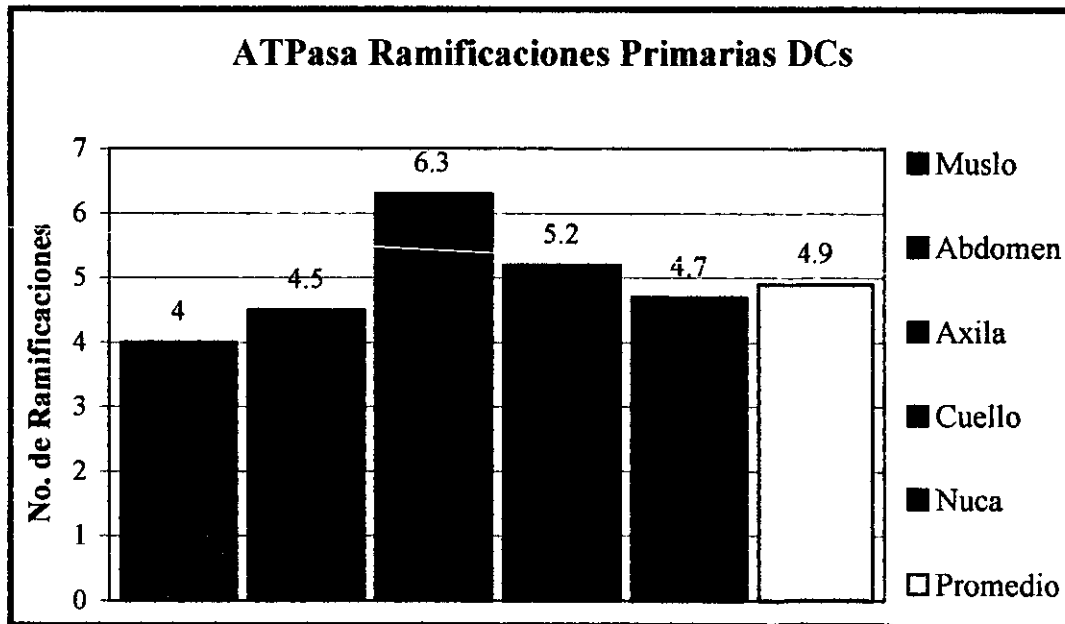
Gráfica No. 6

Muestra la longitud de las dendritas o prolongaciones de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas en promedio de los cuatro armadillos.



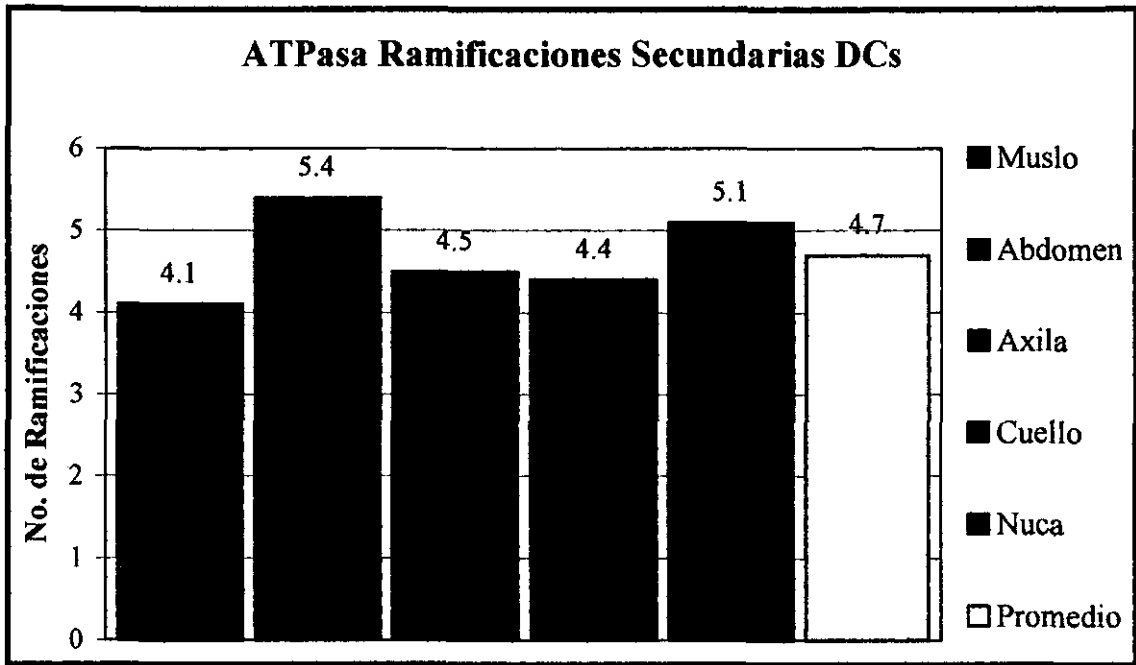
Gráfica No. 7

Muestra la longitud de las células enteras, es decir, el soma celular con las prolongaciones de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas en promedio de los cuatro armadillos.



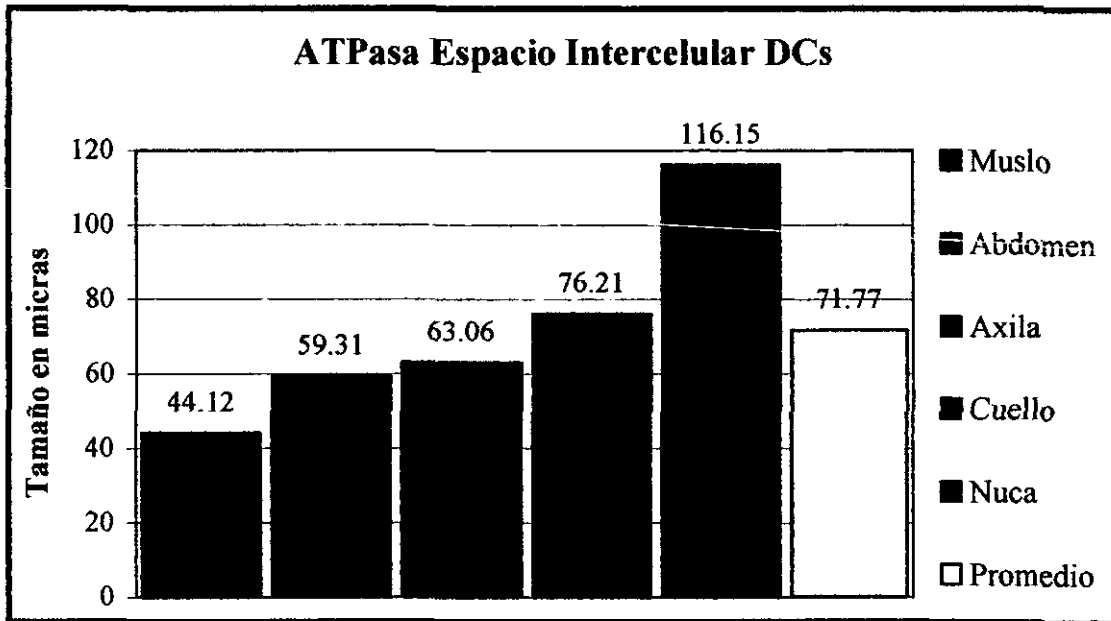
Gráfica No. 8

Muestra el número de ramificaciones primarias de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas en promedio de los cuatro armadillos.



Gráfica No. 9

Muestra el número de ramificaciones secundarias de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas en promedio de los cuatro armadillos.



Gráfica No. 10

Muestra el espacio intercelular que hay en las DCs de las cinco distintas regiones anatómicas en promedio de los cuatro armadillos.

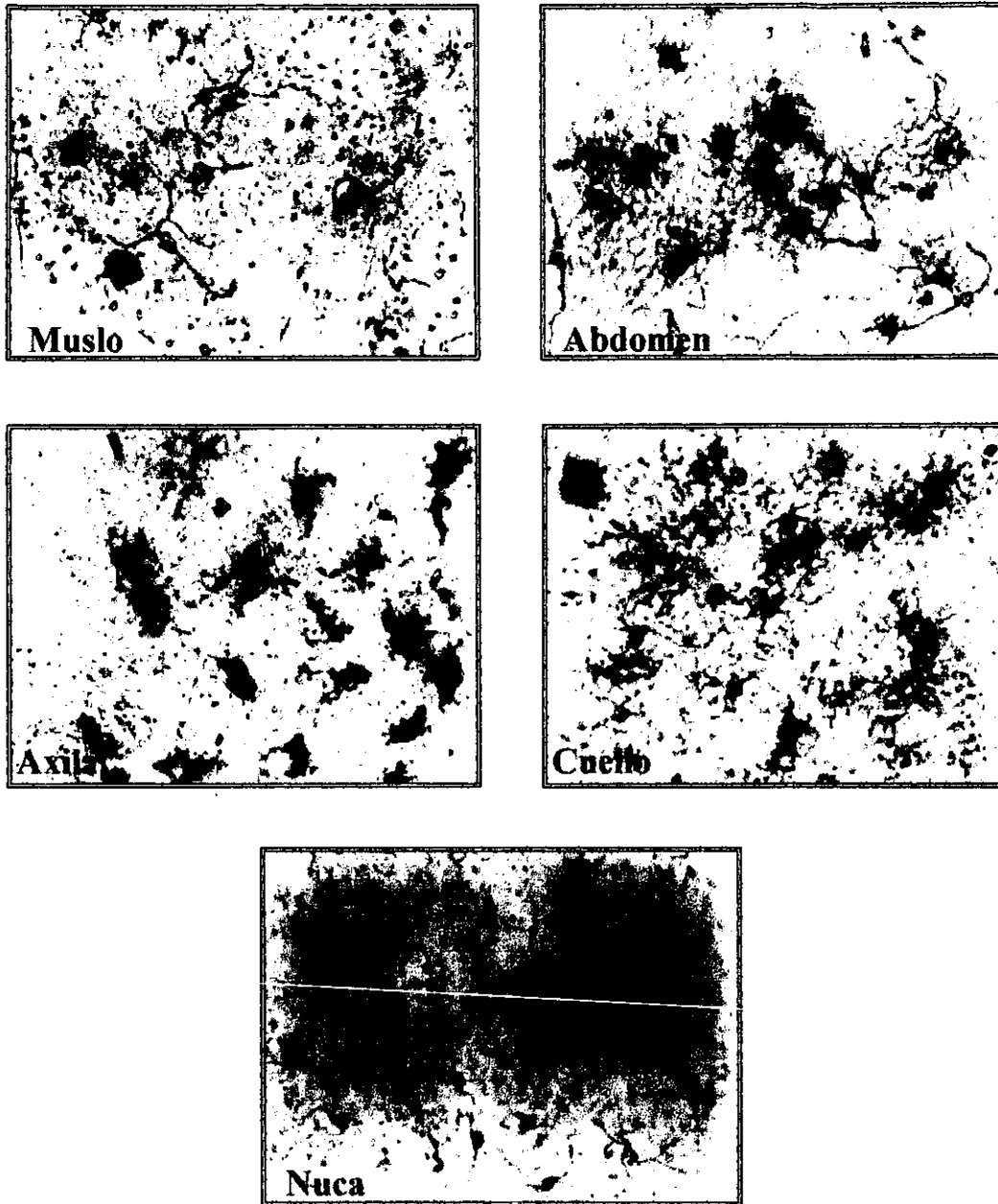


Figura No. 1

Diferencias morfológicas en las dendritas, el soma, las ramificaciones y el espacio intercelular de las DCs en las cinco distintas regiones anatómicas estudiadas (Todas las fotos se tomaron a 40x).

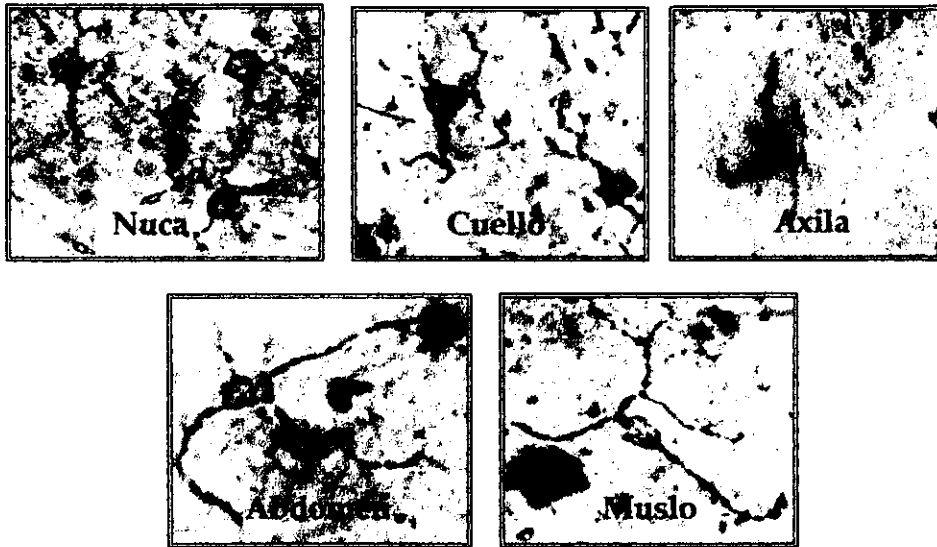


Figura No. 2

Muestra las diferencias morfológicas de las DCs más detalladamente en las cinco distintas regiones anatómicas (Todas las fotos se tomaron a 40 x, pero el aumento de las células se hizo arbitrariamente para mostrar detalle).

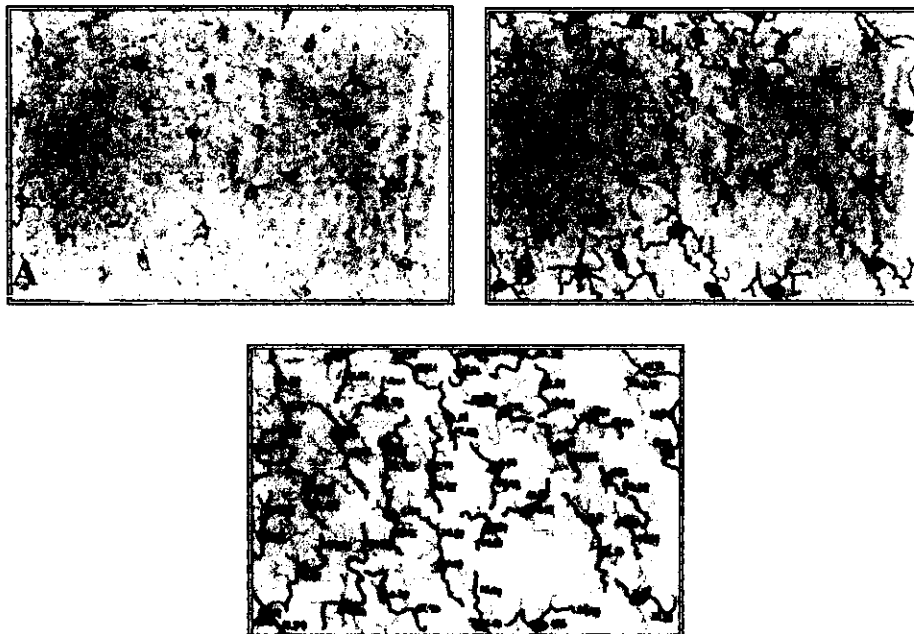


Figura No. 3

Muestra la técnica de dimensionar fotografías para medir la longitud de las dendritas y el tamaño del soma celular. A) Fotografía normal a 40x; B) Calcado de las dendritas y el soma sobre acetato; C) Calcado y medición [con vernier digital] del diámetro del soma y la longitud de las dendritas.

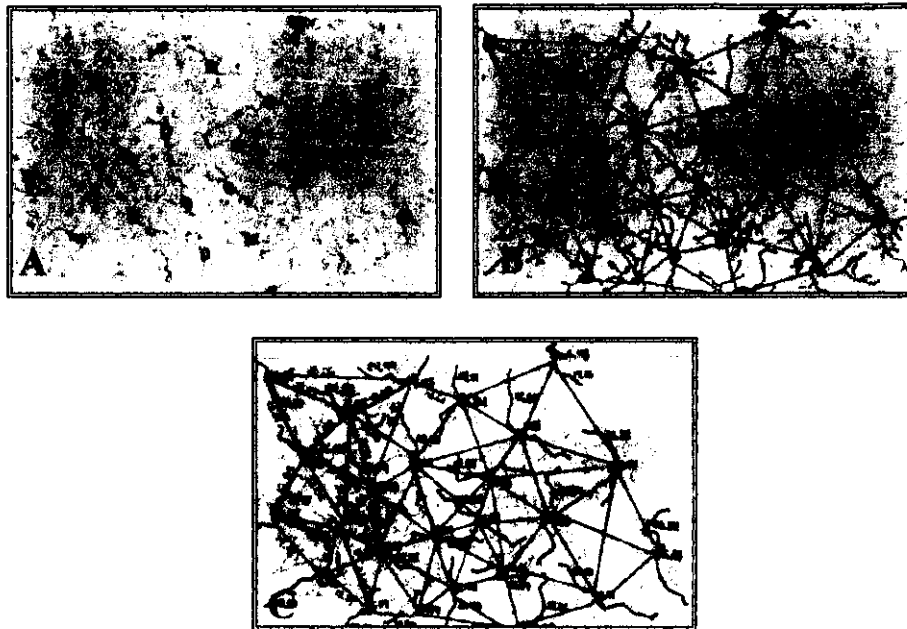


Figura No. 4

Muestra la técnica de dimensionar fotografías para medir la distancia intercelular (de soma a soma de las DCs). A) Fotografía normal a 40x; B) Calcado de las dendritas, el soma y el espacio intercelular de soma a soma sobre acetato; C) Calcado y medición [con vernier digital] del diámetro del soma, la longitud de las dendritas y el espacio intercelular.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



## VII. ANÁLISIS DE RESULTADOS



Con los datos obtenidos matemáticamente se elaboraron varias gráficas; para la densidad de Células Dendríticas encontradas en epidermis normal de armadillo de nueve bandas sano ( $DC/mm^2$ ) se hicieron dos tipos de gráficas, la primera dependiendo del número de animal trabajado (cuatro en total, dos hembras y dos machos), y la segunda dependiendo de la región anatómica estudiada (nuca, cuello, axila, abdomen y muslo); para la diferencia morfológica de las células entre las distintas regiones anatómicas también se presentan varias gráficas; se muestra la diferencia entre las distintas regiones anatómicas del tamaño del soma celular, las dendritas o prolongaciones celulares, la célula entera (tanto soma como dendritas), el espacio intercelular y la cuantificación del número de dendritas o prolongaciones presentes en las células (esto se hizo tanto de las ramificaciones primarias, es decir, de aquellas que salen directamente del soma celular, como para las secundarias, que son aquellas que se derivan de las primeras).

Quizá convenga mencionar la razón por la cual sólo se trabajó con cuatro armadillos: por que estos son animales muy susceptibles al cautiverio (son raros los que se adaptan y sobreviven), por que son de difícil captura (son de hábitos nocturnos), y lo más importante, por que son animales protegidos ya que se les cazaba masivamente por su carne y su caparazón, aunque aún no están en peligro de extinción ni amenazados (CITES).

La tabla número uno muestra los valores obtenidos matemáticamente de la densidad de Células Dendríticas por área ( $DC/mm^2$ ), tanto para los diferentes armadillos como para las distintas regiones anatómicas estudiadas. (Ver apéndice no. 5).

En la gráfica número uno, que muestra la diferencia en el número de Células Dendríticas entre los diferentes armadillos estudiados, no se observan diferencias en cuanto al sexo (los primeros dos organismos son hembras y los últimos dos machos), pero sí se observan diferencias en cuanto a la edad, ya que en los organismos más jóvenes el número de Células Dendríticas por área es mayor, como es el caso de la primera hembra y el último macho, además de

que la separación de las láminas epidérmicas también resultó más sencilla en animales jóvenes.

En la gráfica número dos, que muestra la densidad de Células Dendríticas por región anatómica, se observa un incremento de células hacia la región cefálica, y un consecuente decremento hacia la región caudal. En la región posterior de los muslos la media aritmética fue de 366 células/mm<sup>2</sup>; en la región abdominal cercana al caparazón fue de 414; en la cara externa del cuarto delantero a nivel del hombro fue de 601; en la región ventral del cuello fue de 576; y por último, en la región dorsal del cuello o nuca la media aritmética fue de 682 células/mm<sup>2</sup>.

En las gráficas número tres y cuatro, que muestran la diferencia en la distribución de Células Dendríticas (DC/mm<sup>2</sup>) tanto para los diferentes animales como para las distintas regiones anatómicas estudiadas, se puede observar el conjunto de los resultados obtenidos, comparándolos ya sea entre organismos o entre regiones anatómicas. En estas gráficas se observa lo mismo que en las dos primeras, sólo que más detalladamente, ya que se conjuntan los datos de los diferentes animales y de las regiones anatómicas analizadas.

La tabla número dos muestra los valores obtenidos matemáticamente por el análisis de las dimensiones de las fotografías de 20x y 40x, obteniendo el tamaño en micras ( $\mu$ ) de ciertas características de las Células Dendríticas de las cinco distintas regiones anatómicas estudiadas (nuca, cuello, cuarto delantero, abdomen y muslo); como serían las dimensiones del soma celular, de las dendritas celulares, de la célula completa y del espacio intercelular existente entre éstas células en la epidermis de diferentes regiones anatómicas. Además, se realizó un conteo del número de ramificaciones primarias y secundarias presentes en dichas células. (Ver apéndice no. 6).

En la gráfica número cinco, que muestra la diferencia en el tamaño del soma de las Células Dendríticas entre las cinco distintas regiones anatómicas de la epidermis del armadillo, se observa un claro incremento en el tamaño del soma celular hacia la región caudal, y un consecuente decremento hacia la región cefálica, lo cual es inverso a la densidad de células. Así, pareciera que mientras mayor es la densidad de células, menor es el tamaño de su soma, y mientras menor es la densidad, mayor es el tamaño del mismo. En la región posterior de los muslos la media aritmética fue de 23.692  $\mu$ ; en la región

abdominal cercana al caparazón fue de 22.113; en la cara externa del cuarto delantero fue de 21.564; en la región ventral del cuello fue de 17.787; y por último, en la región dorsal del cuello o nuca la media aritmética fue de 13.145  $\mu$ ; habiendo una diferencia promedio entre una región y otra de 2.643  $\mu$  en el tamaño del soma celular, aunque también se observa que hacia la región cefálica la diferencia en el tamaño del soma celular es más marcada que hacia la región caudal.

En la gráfica número seis, que muestra la diferencia en la longitud de las dendritas o prolongaciones de las Células Dendríticas entre las distintas regiones anatómicas del armadillo, se observa que, yendo de la región cefálica hacia la caudal, el tamaño aumenta notoriamente entre la nuca y el cuello, para disminuir abruptamente a la altura del cuarto delantero y de ahí aumenta de nuevo, aunque más paulatinamente hasta alcanzar su máxima longitud en los muslos.

En la gráfica número siete, que muestra la diferencia en el tamaño de las Células Dendríticas entre las distintas regiones anatómicas del armadillo, se observa prácticamente lo mismo que en la gráfica anterior debido a que la longitud de las dendritas predomina sobre el tamaño del soma celular.

En la gráfica número ocho, que muestra la diferencia en cuanto al número de ramificaciones primarias o principales (aquellas que salen directamente del soma celular) presentes en las Células Dendríticas en las distintas regiones anatómicas del armadillo, yendo de la región cefálica hacia la caudal, se observa un paulatino aumento y un posterior decremento, formando una especie de campana de Gauss, donde el mayor número de ramificaciones se presentan en la región media del animal, y disminuyen hacia los extremos, tanto cefálico como caudal. Es de notar que estos resultados concuerdan con los datos obtenidos para la longitud de las dendritas, ya que resulta inverso: mientras mayor es la longitud de las dendritas, menor es el número de ramificaciones, y a menor longitud, mayor ramificación hay.

En la gráfica número nueve, que muestra la diferencia en el número de ramificaciones secundarias (que en este caso son aquellas que salen de las ramificaciones primarias) presentes entre las DCs en las distintas regiones anatómicas del armadillo, se observa que aumenta de la nuca al cuello, y decrece en el cuarto delantero, aumentando de nuevo hasta el muslo, siendo semejante a lo que pasa con la longitud de las dendritas. Es decir, pareciera

proporcional: a mayor longitud, mayor número de ramificaciones secundarias, y viceversa, a menor longitud, menor número.

En la gráfica número diez, que muestra la diferencia en el espacio intercelular que existe entre las DCs de las cinco distintas regiones anatómicas del armadillo (tomando el espacio que hay entre los somas celulares), se observa que éste aumenta hacia la región caudal y disminuye hacia la cefálica, lo cual es lógico, porque independientemente del tamaño del soma celular, que concuerda con estos resultados, la distribución de las células también concuerda, ya que a mayor número hay menor distancia, y a menor número ésta aumenta.

En las figuras número uno y dos se muestran fotografías (40x) de las DCs en las cinco diferentes regiones anatómicas. En ellas se pueden apreciar las diferencias morfológicas más aparentes, como son: la longitud de las dendritas, el tamaño del soma celular, el espacio intercelular y el número de dendritas, tanto primarias como secundarias.

En las figuras número tres y cuatro se muestran fotografías de las DCs y de dibujos hechos sobre ellas para la técnica de dimensionar fotografías. Cada medición se tomó tres veces y se sacó un promedio, esto con la finalidad de minimizar el rango de error.

## VIII . DISCUSIÓN



La importancia de la respuesta inmune adquirida ha sido determinante para la supervivencia de las especies. En mamíferos hay notables avances en la comprensión de los procesos biológicos involucrados, pero existen aún numerosas áreas de investigación que tratan de precisar paso por paso la respuesta inmune adquirida.

El presente estudio de las DCs en armadillo de nueve bandas tiene gran utilidad, ya que hasta la fecha, resulta ser el mejor modelo experimental para la lepra humana que, como ya se ha mencionado, continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial.

El papel de las Células de Langerhans (LCs) en la inmunidad celular y la descripción de los cambios en el número y la estructura de estas células en los humanos, hace que el estudio de estas células en el armadillo sea un área sumamente relevante.

Estos hallazgos basales podrán ser de gran valor cuando se estudie el papel de estas células en la piel de los armadillos con lepra adquirida natural o experimentalmente.

Utilizando la técnica de tinción enzimática de ATPasa, el uso de quelantes como el EDTA resulta una herramienta de gran utilidad para la observación y cuantificación de DCs mediante la separación de epidermis, ya que al obtener la capa epidérmica completa, se observan las DCs también completas, apreciando por ejemplo la ramificación o la longitud de las dendritas, y mejorando así a los cortes histológicos convencionales en los cuales sólo se aprecia una pequeña parte de la DC sobre la cual se hizo el corte, sin ver a toda la célula.

La separación de la epidermis se estandarizó a través del uso del quelante EDTA, ya que con el uso de Colagenasa-Dispasa las láminas epidérmicas presentaban fragmentación y era difícil trabajar con ellas puesto que los pedazos eran muy pequeños e irregulares. También resultó más fácil la separación en los organismos jóvenes ya que en los adultos se “endurece”, y al realizar la separación de la epidermis ésta se fragmenta. Además, no se

obtienen completas las capas epidérmicas, lo cual modifica la cuantificación de las células.

Aunque es difícil establecer la edad exacta de los armadillos, sí se puede saber si son crías, juveniles o adultos por las variaciones en cuanto a tamaño y morfología característicos que presentan en los diferentes estadios.

Ya se ha utilizado la separación de capas epidérmicas con anterioridad. En 1988 Gimenez y colaboradores utilizaron bromuro de sodio a 37° C por 90 minutos para separar láminas epidérmicas de piel de armadillo, pero aparentemente no consiguieron estandarizar el método, ya que aunque afirman que observaron DCs, no pudieron cuantificarlas por presentar una distribución sumamente irregular y no realizaron ningún estudio sobre su morfología. (22)

En este estudio la cuantificación de las DCs se hizo tanto para el número de animales (cuatro en total: dos hembras y dos machos) como para la región anatómica (cinco en total: nuca, cuello, axila, abdomen y muslo). No se observaron diferencias en cuanto al sexo, es decir, las diferencias entre machos y hembras son poco significativas, pero sí la hubo en cuanto a las edades: los animales jóvenes presentan más células por  $\text{mm}^2$  que los animales adultos; aunque esto pudiera deberse a la dificultad que hubo en la separación de las láminas epidérmicas.

Existe muy poca investigación sobre de la densidad de DCs en las diferentes especies animales, incluso entre grupos étnicos humanos; pero se ha reportado que no hay diferencia significativa en el número de LCs entre sexos, y que así mismo, se observa un decremento en la densidad de células conforme aumenta la edad de los sujetos. (39) Por otro lado, es bien sabido que hay una íntima relación entre el sistema nervioso y el inmune, los neuropéptidos y las neurohormonas son capaces de regular varias funciones de muchas células cutáneas de linaje linfoide, incluidas las LCs, donde los axones y las dendritas de las células nerviosas periféricas que están en íntima relación con estas células liberan gran cantidad de neurotransmisores. (40) Ultraestructuralmente, los axones de las células nerviosas son prominentes en dermis y epidermis superficiales de la piel de neonatos, mientras que en adultos se vuelven inconspicuos, (41) lo cual significa que se liberan menos neurotransmisores en piel adulta que en piel juvenil, y si estos neurotransmisores modulan la densidad de las DCs, pudiera pensarse que la cantidad liberada de los mismos marcaría una cierta diferencia en la densidad

de estas células en piel, dependiendo de la inervación existente de acuerdo a la edad de los sujetos.

Los resultados de la cuantificación de DCs en las diferentes regiones anatómicas muestran que la densidad aumenta hacia la región cefálica y disminuye hacia la región caudal. En estas zonas se observa un pequeño decremento en el cuello (axila: 601 DC/mm<sup>2</sup>, cuello: 576 DC/mm<sup>2</sup>, nuca: 682 DC/mm<sup>2</sup>), esto posiblemente sea debido a la técnica de separación de laminas epidérmicas, ya que por razones técnicas, las muestras se tomaron por separado; en una sesión se tomaba muslo, abdomen y axila, y en otra cuello y nuca, lo cual podría haber alterado los resultados.

Pero en general los datos obtenidos concuerdan con la literatura, donde se dice que sí hay variación de la densidad dependiendo de la región anatómica, y que las células se disponen más abundantemente hacia la región cefálica que hacia la caudal. (2, 38) Lamentablemente no se encontró literatura que justifique esta distribución anatómica.

Las DCs en la epidermis de armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus* Linn.) se encuentran en una densidad promedio de 528 células por mm<sup>2</sup>, mientras que en el humano la mayor densidad (independientemente de la región anatómica) es de alrededor de 1000 células por mm<sup>2</sup>, (2, 4, 9, 38) lo cual indica que la densidad de estas células en el armadillo es comparativamente menor a la reportada en humanos, constituyendo una población menor de células en la epidermis (aproximadamente del 0.5 al 1% de la población total).

La poca literatura que existe de DCs en armadillos reporta que la densidad es menor a la reportada en humanos, y que su número en las diferentes regiones anatómicas es similar, (21) pero es posible que esto se deba a que en este estudio por primera vez se utiliza un método estandarizado para la separación de epidermis, tanto para conteo como para observación de DCs en armadillo.

Se han reportado datos opuestos debido a la técnica utilizada con anterioridad (cortes histológicos convencionales v/s separación de epidermis) en conteos de DCs, (38) de lo cual se puede deducir que no sería la primera vez que esta variación ocurriera.

Es bien sabido que en biología, a toda forma corresponde una función, y viceversa. La característica más común de las DCs es su morfología irregular, misma que está directamente ligada a su función inmunológica (captura y procesamiento de antígenos [células inmaduras] migración a

órganos linfoides secundarios [maduración y cambios fenotípicos] y presentación de antígenos a células T [células ya maduras]).

La morfología dendritiforme no puede ser correctamente medida por métodos convencionales de geometría euclidiana, la cual se limita a estructuras regulares. Pero la forma naturalmente irregular de estas células puede ser medida por sus dimensiones, las cuales están representadas por el espacio físico que ocupan en su lugar de residencia, (42) en este caso la epidermis.

Con base en este principio se hicieron estimaciones morfométricas por un análisis de imágenes (técnica para dimensionar fotografías) de varias características morfocitológicas que diferencian a estas células.

Estos análisis morfométricos proporcionan datos que sugieren que el desarrollo de la característica morfología dendritiforme irregular de estas células refleja grandes ventajas en sus propiedades inmunológicas (captura de antígenos y migración a órganos linfoides secundarios).

Así, se hicieron mediciones de varios parámetros morfométricos de estas células dependiendo de su localización anatómica.

Aquellos que están relacionados con la densidad de DCs, son los espacios intercelulares que existen entre ellas (de soma a soma); y el tamaño del soma celular.

En cuanto al espacio intercelular, se observó que hay una relación inversamente proporcional entre el número de células y la distancia que las separa, es decir: a mayor densidad, menor espacio, y a menor densidad, mayor espacio; esto es lógico, ya que mientras más células hay, más cerca se encuentran unas de otras, y mientras menos hay, más lejos están; la medición del soma celular muestra que también existe una relación inversamente proporcional con la densidad, y consecuentemente otra que es directamente proporcional con el espacio intercelular, es decir, a mayor densidad, menor tamaño y menor espacio, y a menor densidad, mayor tamaño y mayor espacio.

Además, se observó que hacia la región cefálica, el soma celular es redondeado, y según se aproxima a la región caudal, este va tomando una forma irregular, casi estrellada.

Los demás parámetros morfométricos que se tomaron en cuenta de las DCs, dependiendo de su localización anatómica, fueron: la longitud de las dendritas, el número de dendritas primarias (que son aquellas que salen directamente del soma celular), y el número de dendritas secundarias (que son aquellas que se ramifican a partir de las dendritas primarias).



Entre estos tres grupos de datos también hay una correlación lógica; la longitud de las dendritas aumenta de la nuca al cuello, luego decrece en la axila, y aumenta de nuevo para alcanzar la mayor longitud en el muslo. El número de dendritas primarias aumenta desde la región de la nuca hasta la axila, y luego decrece de ahí hasta el muslo, formando una especie de campana de Gauss. Los datos que reportan el número de dendritas secundarias, tienen semejanza con los datos de la longitud de las dendritas; aumentan de la nuca al cuello, decrecen hasta el abdomen y aumentan de nuevo en el muslo.

Así, hay una correlación entre los tres grupos de datos: en primer lugar, hay una relación inversamente proporcional entre la longitud de las dendritas y el número de dendritas primarias, es decir: a menor longitud, mayor número de dendritas primarias, y a mayor longitud, menor número; en segundo lugar, entre el número de dendritas primarias y secundarias también hay una relación inversamente proporcional, y consecuentemente una relación directamente proporcional con la longitud, es decir: a menor longitud, mayor número de dendritas primarias y menor número de secundarias, y a mayor longitud, menor número de dendritas primarias y mayor número de secundarias.

Esto es lógico funcionalmente hablando, ya que si las dendritas son largas, aunque sean menos, están más ramificadas, y si son cortas, hay más, pero están menos ramificadas. Así, cubren mayor espacio, de manera que maximizan el área para la captura de antígenos en su lugar de residencia y, subsecuentemente su movilización.

Las DCs pueden ser encontradas en tejidos linfoides y no linfoides así como en sangre periférica y circulación linfática; *ésto posiblemente esté y/o eliminaría esté* relacionado con las vías de migración de esta población celular hacia órganos linfoides secundarios, donde se realiza la presentación de antígenos a LTs.

Las LCs capturan y procesan antígenos cutáneos, iniciando la respuesta inmune al migrar desde la piel hacia los nódulos linfáticos. (43, 44, 45)

Las dendritas son prolongaciones citoplásmicas que se extienden para establecer contacto físico con múltiples células adyacentes, manteniendo una "comunicación" constante. (4)

Las DCs en su estado natural, continuamente expanden y retraen sus prolongaciones, mientras que su núcleo se encuentra en movimiento pulsátil como consecuencia; en contraste, la actividad de membrana fagocítica mantiene sedentario al núcleo, y retraídas a las prolongaciones. (15)

La forma y la movilidad de estas células facilita su función, (6) y tratándose de la captura de antígenos, sería lógico pensar que a menor densidad, mayor sería la longitud de las dendritas, ya que así cubrirían más espacio, encontrando más fácilmente a cualquier antígeno en la epidermis; pero no es así, por lo cual quizá la migración *in situ* de estas células esté relacionada con la longitud de sus dendritas; ésto sería lógico si pensamos en el espacio epidérmico que estas células tienen que cubrir como centinelas móviles del sistema inmune.

Desgraciadamente no se encontró literatura al respecto, pero suponemos que hay una íntima relación entre la distribución y la morfología de las DCs y el sistema nervioso, tanto central como periférico, y aunque la relación entre el sistema nervioso y el inmune ya está documentada ampliamente, no hay datos en cuanto a la densidad, la distribución o las características morfológicas de estas células.

Se menciona que las LCs en piel están sujetas a un control neuroendócrino, y que están asociadas íntimamente con terminales nerviosas, (4) que los neuropéptidos y las neurohormonas son capaces de regular las reacciones inmunes cutáneas, modulando la secreción de ciertas citocinas y regulando así muchas de las funciones de estas células. (40, 46)

Los neuropéptidos son liberados por nervios sensoriales que innervan la piel y se encuentran en contacto o sobreposición anatómica con células epidérmicas y dérmicas pudiendo modular directamente su función; dentro de estos neuropéptidos se encuentran la sustancia P (SP), la neuroquinina A y B (NKA, NKB), la somatostatina (SOM), el neuropéptido Y (NPY), el péptido de histidina-isoleucina (PHI), el péptido de calcitonina relacionado al gen (CGRP), el péptido liberador de gastrina (GRP), el péptido vasoactivo intestinal (VIP), la neurotensina, la bradiquinina, la acetilcolina, varias catecolaminas, endorfinas, y encefalinas. Dentro de las neurohormonas se encuentran la prolactina, la hormona estimuladora de melanina (MSH) y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que modulan efectivamente las funciones inmunes de las células en la piel, como la proliferación celular, la producción de citocinas (IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-12), la producción y expresión de moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) y la presentación de antígenos (B7-2) bajo condiciones fisiológicas o patofisiológicas. Las células inmunes son capaces de producir neuromediadores, como neuroproteínas y neurohormonas, además de expresar sus receptores en membrana. Los

neurotransmisores también afectan la función de los órganos linfoides que están innervados por terminales nerviosas. (13, 47-56)

Las citocinas, así como otras moléculas coestimuladoras y de adhesión regulan gran cantidad de las funciones de las DCs, como son la captura de antígenos, la migración, la maduración y la presentación de antígenos; por lo cual pueden también estimular o inhibir dichas funciones. Aquellas citocinas que podrían tener relación con la morfología de las DCs son:

TNF $\alpha$ : modula la función de APCs, la migración de DCs, el crecimiento y diferenciación de DCs, y finalmente, interviene en la diferenciación y activación tardía de DCs.

IL-1b: promueve la migración de DCs a gánglios linfáticos, induce la maduración de DCs, y activa a DCs epidérmicas.

IL-10: inhibe la expresión de B7-2, e inhibe la función de DCs.

IL-12: inhibe la expresión de TNF-R. (4, 12)

Tomando en cuenta estas funciones, cualquiera de ellas puede modular o alterar la morfología de las DCs en epidermis; como el tamaño del soma celular, la longitud de las dendritas y su ramificación (tanto primaria como secundaria). Esto podría depender no sólo de la innervación (cuantitativamente), sino también de la liberación diferencial de citocinas (cualitativamente), pero serían necesarios más estudios para aceptar definitivamente estas hipótesis.

## IX . CONCLUSIONES

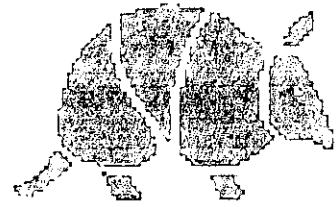


Utilizando la técnica de tinción enzimática de ATPasa, el uso de quelantes como el EDTA resulta una herramienta de gran utilidad para la observación y cuantificación de las DCs mediante el método de separación de la epidermis, mejorando notablemente a los cortes histológicos convencionales.

Las DCs en la epidermis del armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus* Linn.) se encuentran en una densidad promedio de 528 células por  $\text{mm}^2$ , comparativamente menor a la reportada en humanos; y se disponen más abundantemente hacia la región cefálica que hacia la caudal.

Además de cambiar la densidad, también cambia el tamaño y la morfología de estas células dependiendo de la región anatómica; el soma celular aumenta de tamaño hacia la región caudal, volviéndose de forma más irregular; la longitud de las dendritas es variable dependiendo de la región anatómica, pero parece ser que son más largas en las regiones que están más cercanas a los ganglios linfáticos, (por ejemplo en el cuello), donde se alargan notablemente; en cuanto al número de ramificaciones presentes en las DCs, es de gran interés que conforme más largas son las dendritas más ramificadas están y menos son.

## X. BIBLIOGRAFÍA



1. Stites P.D. (1996) "Inmunología Básica y Clínica" Editorial El Manual Moderno, 8<sup>va</sup> edición; México D.F., pp 51-84, 133-171.
2. Maurer D. and Stingl G. (1999) "Dendritic Cells in the Context of Skin Immunity" *Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 7: 111-118.
3. Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y-J., Pulendran B. and Palucka K. (2000) "Immunobiology of Dendritic Cells" *Annual Review of Immunology*; 18: 767-811.
4. Hart D.N.J. (1997) "Dendritic Cells: Unique Leucocyte Populations Which Control the Primary Immune Response" *The Journal of the American Society of Hematology, Blood*; 90: 3245-3287.
5. Steinman R.M. (1999) "Dendritic Cells" *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia; Chapter 16: 547-566.
6. Banchereau J. & Steinman R.M. (1998) "Dendritic Cells and the Control of Immunity" *Nature*; 392: 245-252.
7. Clark G.J. and Hart N.J. (1999) "Phenotypic Characterization of Dendritic Cells" *Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 29: 555-572.
8. Stingl G., Tamaki K. & Katz S.I. (1980) "Origin and Function of Epidermal Langerhans Cells" *Immunological Review*; 53: 149-174.
9. Caux Ch., Lebecque S., Liu Y-J. and Banchereau J. (1999) "Developmental Pathways of Human Myeloid Dendritic Cells" *Dendritic Cells: Biology and Clinical Applications*, Academic Press; Chapter 5: 63-83.
10. Rescigno M., Granucci F. and Ricciardi-Castagnoli P. (1999) "Dendritic Cells at the end of the Millennium" *Special Feature, Immunology and Cell Biology*; 77: 404-410.
11. Vandenabeele S. and Wu L. (1999) "Dendritic Cell Origins: Puzzles and Paradoxes" *Special Feature, Immunology and Cell Biology*; 77: 411-419.
12. Moll Heidrun (1995) "The Immune Functions of Epidermal Langerhans Cells" *Medical Intelligence Unit., MIU, R.G. Landes Company., Academic Press.*

13. Ansel J.C. Armstrong C.A., Song I., Quinlan K.L., Olerud J.E., Caughman S.W. and Bunnett N.W. (1997) "Interactions of the skin and nervous system" *Journal of Investigative Dermatology Symp. Proc*; 2(1): 23-26.
14. Porcelli S.A., Segelke B.W., Sugita M., Wilson I.A. and Brenner M.B. (1998) "The CD1 family of lipid antigen-presenting molecules" *Immunology Today, Review*; 362; 19(8): 1289-1294.
15. Steinman R.M. & Nussenzweig M.C. (1980) "Dendritic Cells: Features and Functions" *Immunological Review*; 53: 127-147.
16. Liu J., Shi Y., Kong Q. and Ye G. (1982) "Preliminary Observation on Langerhans' Cells in Leprosy" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 50(3):316-318.
17. Walsh G.P, et al. (1978) "The Armadillo as an Experimental Model in Biomedical Research" *Proceedings of a Workshop Held at the Pan American Center for Research and Training in Leprosy and Tropical Diseases, Pan American Health Organization, Scientific Publication No. 366, Washington DC, EUA; pp 140.*
18. Storrs E.E. (1971) "The Nine-Banded Armadillo: A Model for Leprosy and Other Biomedical Research" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 39(3):703-714.
19. Audubon J.J. and Bachman J. (1967) "*Dasypus peba*, Desm., Nine - Banded Armadillo" *The Imperial Collection of Audubon Animals, The Quadrupeds of North America; Dirección electrónica: (gopher://riceinfo.rice.edu:1170/00/ Armadillos/armadillo%09%09%2B).*
20. Amezcua C.M.E. (1992) "Lepra: pasado, presente y perspectivas para el futuro" *Publicación Técnica del INDRE #15, Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, México D.F.*
21. Zhou H-M., Shi A-R., Mukherjee A., Walsh G.P., Frankel S.S. and Meyers W.M. (1995) "Ultrastructure of Normal Armadillo Epidermis" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 64(2):159-165.
22. Gimenez M.F., Gimenez M.M., Resoagli E.H. y de Millan S.G. (1988) "Células de Langerhans en el Armadillo" *Review Argentine Dermatology*; 69(3): 153-155.
23. Campo-Aasen I. and Convit J. (1975) "The Histochemistry of Armadillo Skin" *Journal of Anatomy*; 120(2):337-348.
24. Meyers W.M., Kvernes S. and Binford C.H. (1975) "Comparison of Reactions to Human and Armadillo Lepromins in Leprosy" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 43(3):218-225.

25. Johnstone P.A.S. (1987) "The Search for Animal Models of Leprosy" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 55(3):535-547.
26. Job C.K., Sanchez R.M., Hunt R., Truman R.W. and Hastings R.C. (1993) "Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) as a Model to Test Antileprosy Vaccines; A Preliminary Report" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 61(3):394-397.
27. Convit J. and Pinardi M.E. (1974) "Leprosy: confirmation in the Armadillo" *Science*; 184(142):1191-1192.
28. Kirchheimer W.F. and Storrs E.E. (1971) "Attempts to Establish the Armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a Model for the Study of Leprosy. I. Report of Lepromatoid Leprosy in an Experimentally Infected Armadillo" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 39(3):693-702.
29. Texas University (1994) "Nine - Banded Armadillo" *The Mammals of Texas - Online Edition.*, Dirección electrónica: (<http://www.nsrl.ttu.edu/tmot/dasynove.htm>).
30. Audubon J.J. and Bachman J. (1967) "Nine - Banded Armadillo (*Dasypus novemcinctus mexicanus*)" *The Imperial Collection of Audubon Animals, Hammond Incorporated*; Dirección electrónica: ([gopher://riceinfo.rice.edu:1170/00/Armadillos/armadillos\\_2%09%2B](gopher://riceinfo.rice.edu:1170/00/Armadillos/armadillos_2%09%2B)).
31. Quesada-Pascual F., Rojas-Espinoza O., Santos-Argumendo L. and Estrada-Parra S. (1987) "A Mexican Armadillo (*Dasypus novemcinctus*) Colony for Leprosy Research" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 55(4):716-718.
32. Lathrop G., Scollard D.M. and Dietrich M. (1997) "Reactivity of a Population of Armadillo Lymphocytes with an Antibody to Human  $\gamma$ ,  $\delta$  T-Cells" *Clinical Immunology and Immunopathology*; 82(1):68-72.
33. Purtilo D.T., Walsh G.P., Storrs E.E. and Gannon C. (1975) "The Immune System of the Nine-banded Armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn)" *Anatomy Research*; 181: 725-734.
34. Narayanan R.B. (1986) "OKT6+ Epidermal Langerhans' Cell Numbers in DNCB Reactions Among Leprosy Patients" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 54(3):423-426.
35. Dombrowski K.E., Ke Y., Brewer K.A. and Kapp J.A. (1998) "Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function" *Immunological Reviews*; 161:111-118.
36. Liu J.H., Shi Y.F., Kong Q.Y., Yang L.H., Li W.Z. and Ye G.Y. (1984) "Observations on Langerhans' Cells in Leprosy Using Monoclonal

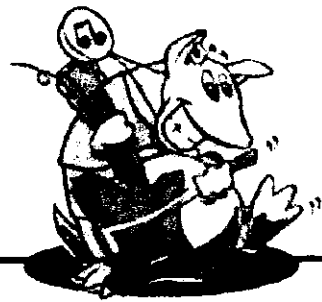
- Antibody OKT6" International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases; 52(4):524-526.
37. Chaker M.B., Tharp M.D. and Bergstresser P.R. (1984) "Rodent Epidermal Langerhans Cells Demonstrate Greater Histochemical Specificity for ADP Than ATP and AMP" The Journal of Investigative Dermatology; 82(5): 496-500.
  38. Mathur K.N. (1984) "Epidermal Langerhans' Cells in Subtypes of Leprosy"; Liu Jihe (1984) "Response to Letter of Dr. Mathur, et al." International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases; 52(1):92-93.
  39. Wong W.K., Kamaruddin A. and Goh C.L. (1995) "A Study of Langerhans Cells in Normal Cadaveric Skin of Chinese in Singapore" NSC (National Skin Center) Bulletin, An in House Publication to Promote Education and Research in Dermatology; 6: 1.
  40. Torii H., Tamaki K. and Granstein R.D. (1998) "The effect of neuropeptides/hormones on Langerhans Cells" Journal of Dermatology Sci; 20: 21-28.
  41. Egan C.L., Viglione-Schneck M.J., Walsh L.J., Green B., Trojanowski J.Q., Whitaker-Menezes D. and Murphy G.F. (1998) "Characterization of Unmyelinated Axons Uniting Epidermal and Dermal Immune Cells in Primate and Murine Skin" Journal of Cutaneous Pathology; 25(1):20-29.
  42. Grizzi F., Internati C.M. and Dioguardi N. (1999) "Functional and morphological quantitative evaluation of human myeloma dendritic cells" Dirección electrónica: (<http://userwww.sfsu.edu/~camicro/abstracts.htm>).
  43. Funnell R. (1999) "Epidermal dendritic (Langerhans) cells: Immunologic sentinels of infection" Dirección electrónica: (<http://cmmg.biosci.wayne.edu/asg/dendritic.html>).
  44. Weissman D., Yuexia L., Orenstein J.O. and Fauci A.S. (1995) "Both a precursor and a mature population of dendritic cells can bind HIV" Journal of Immunology; 155(8): 4111-4117.
  45. Udey M.C. (1998) "Langerhans cells function in health and disease" Dirección electrónica: (<http://cmmg.biosci.wayne.edu/asg/dendritic.html>).
  46. Hosoi J., Ozawa H. and Granstein R.D. (1999) " $\beta$ -Endorphin binding and regulation of cytokine expression in Langerhans cells" Annual N.Y. Academy Sci; 20; 885; 405-413.
  47. Scholzen T., Armstrong C.A., Bunnett N.W., Luger T.A., Olerud J.E. and Ansel J.C. (1998) "Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems" Experimental Dermatology; 7(2-3): 81-96.



48. Lambert R.W. and Granstein R.D. (1998) "Neuropeptides and Langerhans cells" *Experimental Dermatology*; 7(2-3): 73-80.
49. Torii H., Hosoi J., Asahina A. and Granstein R.D. (1997) " Calcitonin gene-related peptide and Langerhans cells function" *Journal of Investigative Dermatology Symp. Proc*; 2(1): 82-86.
50. Staniek V., Misery L., Peguet-Navarro J., Abello J., Doutremepuich J.D., Claudy A. and Schmitt D. (1997) " Binding and in vitro modulation of human epidermal Langerhans cell functions by substance P" *Arch. Dermatology Research*; 289(5): 285-291.
51. Torii H., Hosoi J., Beissert S., Xu S., Fox F.E., Asahina A., Takashima A., Rook A.H. and Granstein R.D. (1997) "Regulation of Cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide" *Journal of Leukococyte Biology*; 61(2): 216-223.
52. Misery L. (1996) "Neuro-immuno-cutaneous system" *Phatology Biology, (Paris)*; 44(10): 867-874.
53. Misery L. and Claudy A. (1995) "Interactions of neuromediators and neurohormones on dendritic cells, monocytes and macrophages" *Phatology Biology, (Paris)*; 43(10): 876-881.
54. Asahina A., Hosoi J., Grabbe S. and Granstein R.D. (1995) "Modulation of Langerhans cell function by epidermal nerves" *Journal of Allergy Clinical Immunology*; 96(6-2): 1178-1182.
55. Asahina A., Moro O., Hosoi J., Lerner E.A., Xu S., Takashima A. and Granstein R.D. (1995) "Specific induction of cAMP in Langerhans cells by calcitonin gene-related peptide: relevance to functional effects" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 92(18): 8323-8327.
56. Hosoi J., Murphy G.F., Egan C.L., Lerner E.A., Grabbe S., Asahina A. and Granstein R.D. (1993) "Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide" *Nature*; 363(6425): 159-163.
57. Jha P., Balakrishnan K., Talawar G.P. and Bhutani L.K. (1970) "Status of Humoral Immune Responses in Leprosy" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 39(1):14-19.
58. Binford C.H., Storrs E.E. and Walsh G.P. (1976) "Disseminated Infection in the Nine-Banded Armadillo (*Dasypus novemcinctus*) Resulting from Inoculation with *M. leprae*" *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*; 44(1-2):80-83.
59. Fukunishi Y., Meyers W.M., Walsh G.P., Johnson F.B., Binford C.H., Okada S. and Nishiura M. (1984) " Ultrastructural Features of Macrophages of Armadillos Infected with Actively Multiplying

- Mycobacterium leprae*” International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases; 52(2):198-202.
60. Young S., McAdam K., Smith P., Fine P., Rees R.J.W., Banerjee D., McDermott-Lancaster D., Young D., Convit J., Breenan P., Shinnick T., Walker L., Van Landingham R., Bloom B., Andersen A. and Haslov K. (1995) “Analysis of Vaccines Prepared from Armadillo-Derived *M. leprae*; Results of an Inter-Laboratory Study Coordinated by the World Health Organization” International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases; 63(1):48-55.
  61. Storrs E.E., Walsh G.P., Burchfield H.P. and Binford C.H. (1974) “Leprosy in the Armadillo: New Model for Biomedical Research” Science; 183:851-852.
  62. Rojas-Espinosa O., Jimenez-Zamudio L. & Arce-Paredes P. (1994) "Activación Secuencial de la Inmunidad Celular y la Inmunidad Humoral en la Lepra: Consideraciones con Base en Hallazgos Recientes" Review of Latin-American Microbiology; 36: 213-219.
  63. Texas University (1998) "Nine - Banded Armadillo" Texas, Parks & Wildlife., Nature; Dirección electrónica: (<http://www.tpwd.state.tx.us/nature/wild/mammals/dillo.htm>).
  64. Kaufmann S.H.E. (1999) “Immunity to Intracellular Bacteria” Fundamental Immunology., Fourth Edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; Chapter 40: 1335-1371.
  65. Czernielewski J., Vaigot P., Blachon F., Desbas C., Delasalle B. and Pruineras M. (1985) “Biology of Human Epidermal Langerhans Cells: Cell Cycle Studies” Scand Journal of Immunology; 21(5):479-484.
  66. Czernielewski J., Vaigot P. and Pruineras M. (1985) “Epidermal Langerhans Cells – a Cycling Cell Population” Journal of Investigative Dermatology; 84(5):424-426.
  67. Vaigot P., Czernielewski J. and Pruineras M. (1985) “Detection of Distinct Subpopulations of Langerhans Cells by Flow Cytometry and Sorting” Cytometry; 6(5):422-427.

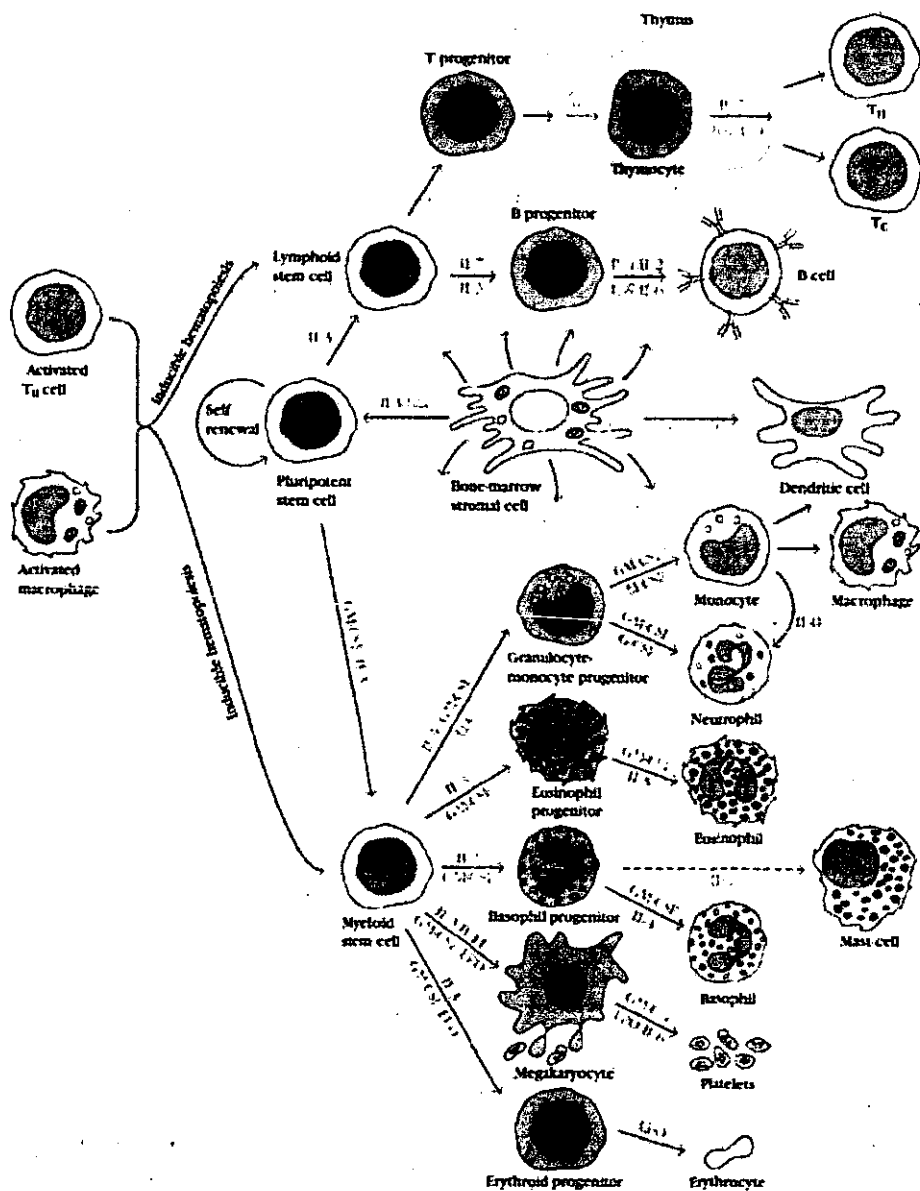
# XI. APÉNDICES



## APÉNDICE No. 1

### CÉLULAS DE LINAJE LINFOIDE

Células involucradas en la respuesta inmune (origen, desarrollo y factores que intervienen en su maduración y diferenciación).



## APÉNDICE No. 2

### INICIALES Y ABREVIATURAS UTILIZADAS

Ab	Anticuerpo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependientes de Abs
ADP	Adenosin difosfato
Ag	Antígeno
ALCAM	Ligando de CD6
APC	Célula presentadora de Ag
ATP	Adenosin trifosfato
ATPasa	Enzima ATP fosfohidrolasa, ATP pirofosfohidrolasa
ATPe	Adenosin trifosfato extracelular
$\beta$ 2m	beta 2 microglobulina
B7	Ligando para CD28, coestimulación presentación de Ags
BCR	Receptor de las células B
BG	Gránulos de Birbeck
BSA	Albúmina sérica bovina
C'	Complemento
C3	Tercer componente del C'
C3b	Fragmento de C3 mediador de la inmunoadherencia
C3bg	Fragmento de C3
C3bi	Fragmento de C3
C4	Cuarto componente del C'
C5a	Fragmento de C5 promotor de quimiotaxis, anafilotoxina
C5b	Fragmento de C5
Ca <sup>2+</sup>	Calcio molecular
CC	Quimiocina C-C, eotaxina
CCR	Receptor para CC
CD	Grupos de diferenciación
CD1	T6. Presentación de Ag a LTs $\gamma/\delta$ , moléculas no clásicas de histocompatibilidad
CD102	ICAM-3. Molécula intracelular de adhesión
CD104	Neurotelina. Molécula de adhesión que interviene en la migración
CD105	Molécula endotelial. Interviene en la migración

CD106	V-CAM. Molécula de adhesión celular vascular que interviene en la migración facilitando la entrada a vasos sanguíneos
CD107	Proteína de membrana asociada a lisosomas
CD11a	LFA-1 cadena $\alpha$ . Integrina que fija ICAM; media la adherencia de leucocitos a células endoteliales
CD11b	Mac-1, CR3. Integrina, receptor para fragmento del C' C3bi, fibrinógeno o factor X de coagulación
CD11c	CR4. Integrina, receptor para fragmento del C' C3bi
CD120a-b	Receptores de la familia del TNF-R, señalización
CD138	Syndecan. Molécula de adhesión que interviene en la migración
CD14	LeuM3. Receptor de LPS
CD147	Neurotelina. Molécula de adhesión que interviene en la migración
CD15	Syalyl Lewis X. Oligosacárido, fijado por proteínas ELAM-1 en células endoteliales, receptor de LTs residente en piel
CD16	Fc $\gamma$ RIII. Receptor Fc de baja afinidad para IgG, marcador de línea celular para células NK
CD18	LFA-1 cadena $\beta$ . Integrina, fija ICAM, media la fijación de leucocitos a células endoteliales
CD19	B4. Señalización
CD2	T11. Fija LFA-2 y 3, señalización
CD20	B1. Señalización
CD21	CR2, B2. Receptor para fragmento del C' C3b, CD23 y virus
CD23	Fc $\epsilon$ RII. Receptor Fc de baja afinidad para IgE, ligando para CD21, se comporta como molécula de adhesión y factor de crecimiento en diferentes células
CD28	Media la estimulación de LTs por fijación de proteína B7 en APC activadas, señalización
CD3	T3, Leu3a. Correceptor para MHC clase II, marcador para LTh, señalización, receptor para virus
CD31	PECAM-1. Molécula de adhesión que interviene en la migración
CD32	Fc $\gamma$ RII. Receptor Fc de afinidad media para IgG, señalización
CD34	Sialomucina. Ligando para selectina L, adhesina vascular para ganglios periféricos
CD35	CR1. Receptor para fragmento del C' C3b
CD36	Receptor para lípidos
CD4	T4, Leu4. Transduce señales del TCR, marcador de línea celular de LTh
CD40	Media la cooperación de LTs fijando el ligando inducible

	(CD40L) sobre la superficie de LTh activados, señalización
CD43	Leucosialina. Ligando de sialomucina para ICAM-1
CD45	Antígeno leucocitario común, T200, B220, Isoformas: CD45 R, CD45 RA, CD45 RO. Fosfatasa de tirosina, isoformas múltiples de dominio extracelular, modula señalización, isoforma CD45RO (LTs) que fija CD22 (LBs)
CD46	Proteína reguladora que inhibe la lisis mediada por C'
CD50	ICAM-2. Molécula intracelular de adhesión
CD54	ICAM-1. Fija LFA-1 o CD43, receptor para virus y hongos
CD55	Proteína reguladora que inhibe la lisis mediada por C'
CD56	N-CAM. Adherencia de células NK, marcador de línea celular para células NK
CD58	LFA-3. Ligando para CD2, molécula coestimuladora en presentación de Ags
CD59	Proteína reguladora que previene el ensamblaje completo del complejo C5b-9 en las células blanco, inhibiendo la lisis mediada por C'
CD6	T12. Función desconocida
CD64	FcγRI. Receptor de alta afinidad para IgG
CD8	T8, Leu2a. Correceptor para MHC clase I, marcador de LTc, señalización
CD80	B7 <sub>1</sub> . Promueve la activación de LTh tipo 1, señalización y coestimulación en presentación de Ags
CD86	B7 <sub>2</sub> . Promueve la activación de LTh tipo 2, señalización y coestimulación en presentación de Ags
CD88	Receptor para el fragmento C5a del C'
CGRP	Péptido de calcitonina relacionado al gen
CIIV	Vacuolas no lisosomales ricas en MHC clase II
CITES	Listado de animales y plantas en peligro de extinción, amenazados, endémicos o bajo alguna restricción especial
CMI	Respuesta inmune mediada por células
CMRF-35	Proteína similar al receptor Fc para IgA e IgM
CR1-CR6	Seis receptores diferentes para los fragmentos C3 del C' que se encuentran en diversos tipos celulares
CTLA-4	CD28. Ligando para B7s
CXC	Quimiocina CXC
CXCR	Receptor para CXC
DC	Células dendríticas

DEC-205	Receptor para multilectinas que facilita la fagocitosis
DG	Diacilglicerol
DNA	Acido desoxiribonucleico
EDTA	Quelante. Acido etilendiamintetraacetico
EGF	Factor de crecimiento de eritrocitos
Fc	Moléculas receptoras para fijación de Igs
Fcε	Moléculas receptoras para fijación de IgE
Fcγ	Moléculas receptoras para fijación de IgG
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y Mø
Groß	Quimiocina CXC
GRP	Péptido liberador de gastrina
H&E	Hematoxilina y eosina (tinción)
HLA	Antígeno de leucocitos humanos
ICAM	Molécula intracelular de adhesión
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
Ii	Cadena invariable
IL	Interleucina
Ip <sub>3</sub>	Inositol 1, 4, 5-trifosfato
kDa	Kilo Daltones
LB	Linfocitos B
LC	Células de Langerhans
LeuM3	CD14. Receptor de LPS
LFA	Antígeno funcional de leucocitos
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Linfocitos T
LTc	Linfocitos T citotóxicos
LTh	Linfocitos T cooperadores
LTh1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
LTh2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
μ	Micra
Mø	Macrófago
Mac-1	Glucoproteína 1 de Mø
MARCO	Receptor para Ags en DCs, facilita la fagocitosis
M-CSF	Factor estimulador de colonias de monocitos y Mø
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad

MIIC	Compartimento endosómico rico en MHC clase II
MIP	Proteína inflamatoria de MØ
µm	Micrometro
MMR	Receptor para manosa de MØ
MSH	Hormona estimuladora de melanina
NF-κB/rel	Factor de transcripción que controla la activación de muchos genes inmunes e inflamatorios, incluye: rel A, p65, rel B, rel C, p50, p52
NK	Células asesinas naturales
NKA	Neuroquinina A
NKB	Neuroquinina B
NPY	Neuropéptido Y
p150/95	CD11c, CR4. Integrina que funciona como receptor para fragmentos C3 del C'
PAF	Factor activador de plaquetas
PECAM	CD31. Molécula de adhesión que interviene en la migración
pH	Potencial de hidrógeno
PHI	Péptido histidina-isoleucina
PIP <sub>2</sub>	Difosfato de fosfatidil inositol
PLC-γ1	Isoforma 1 de fosfolipasa C gamma
PM	Peso molecular
PTK	Proteín tirosin cinasa. Tirosincinasa proteína
-R	Receptor de...
RANK	Receptor de la familia del TNF-R, ligando para TRANCE
RANTES	Quimiocina CC estimuladora de producción y liberación de citocinas, señalización
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA	Acido ribonucléico
SLAM	Molécula de APCs cuyo ligando está en LTs, señalización para promover la producción de citocinas
SOM	Somatostanina
SP	Substancia P
SR-BI	Proteína de unión a lípidos, actúa como receptor
SRCR	Receptor de MØ perteneciente a una familia de proteínas rica en cisteína, como SR-AI y AII
TAP	Proteínas transportadoras de péptidos antigénicos
TCR	Receptor de LTs



TGF	Factor transformador de crecimiento
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRANCE	Receptor de la familia del TNF-R, ligando para RANK
V-CAM	CD106. Molécula de adhesión celular vascular que interviene en la migración facilitando la entrada a vasos sanguíneos
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
ZAP70	Ligando para CD3, induce la fosforilación y aumenta la señalización del TCR

## APÉNDICE No. 3

### SUMARIO DE IMÁGENES UTILIZADAS

Figura 1	Activación y expansión clonal de Linfocitos
Figura 2	Respuesta innata y adaptativa iniciada por DCs
Figura 3	Estadios identificados en el desarrollo de las DCs
Figura 4	Macrófago MØ
Figura 5	Funciones de las DCs en diferentes estadios de maduración
Figura 6	Presentación de Ags, Unión APC-LTh
Figura 7	Macropinocitosis
Figura 8	Fagocitosis
Figura 9	Receptores Fc $\gamma$ en DCs que reconocen IgG
Figura 10	Maduración y migración de las DCs
Figura 11	Regulación de las DCs en su producción de quimiocinas
Figura 12	Expresión de receptores para moléculas quimioatrayentes
Figura 13	Secresión de otras quimiocinas por las DCs
Figura 14	Productos del MHC I: A, B, y C, y MHC II: DR, DQ y DP
Figura 15	Tipos de unión de péptidos antigénicos al MHC
Figura 16	Ubicación cromosómica y genética del MHC
Figura 17	Composición de la proteína clase II: cadena alfa y beta
Figura 18	Cada dominio clase II $\alpha$ 1 y $\beta$ 1 contiene estructuras de hoja $\beta$
Figura 19	Compartimentos ricos en MHC clase II (MIICs)
Figura 20	Composición de la proteína clase I: cadena alfa y $\beta$ <sub>2m</sub>
Figura 21	Estructura tridimensional de las proteínas clase I
Figura 22	Especificidad de clase I para la fijación de péptidos

Figura 23	Transporte para MHC clase I por TAP
Figura 24	Ensamblaje y transporte de MHC clase I
Figura 25	Moléculas transportadoras de péptidos antigénicos 1-2 (TAP)
Figura 26	Cadena invariable (Ii)
Figura 27	Ensamblaje y transporte de MHC clase II
Figura 28	Presentación de Ags (DC-LT)
Figura 29	LBs: precursores de las células secretoras de anticuerpos
Figura 30	Anticuerpos antígeno-específicos
Figura 31	Conformación del TCR: cadenas $\alpha$ y $\beta$
Figura 32	El complejo MHC-Ag forma el ligando para el TCR
Figura 33	Moléculas coestimuladoras de la adhesión y la señalización
Figura 34	Receptores accesorios
Figura 35	Moléculas de adhesión que expresan las DCs
Figura 36	Fijación del CD4 a moléculas del MHC clase II
Figura 37	PTK en la señalización del TCR: p59 <sup>lyn</sup> , p56 <sup>lck</sup> y ZAP70
Figura 38	CD45 como molécula para reconocimiento del antígeno
Figura 39	Moléculas accesorias para señalización y unión
Figura 40	CD40 y su ligando CD40-L como moléculas accesorias
Figura 41	DCs no fagocíticas de forma irregular identificadas <i>in situ</i>
Figura 42	Progenitores hematopoyéticos que dan origen a todas las células sanguíneas
Figura 43	Precusores comunes para células fagocíticas y DCs mieloides
Figura 44	Monocitos de sangre periférica se diferencian en MØ o DCs
Figura 45	Células de Langerhans
Figura 46	Células de Langerhans en epidermis
Figura 47	Ciclo de vida, migración y maduración de DCs
Figura 48	Cambios fenotípicos y funcionales en las poblaciones de LCs
Figura 49	Armadillo de nueve bandas <i>Dasyus novemcinctus</i>
Figura 50	Secciones en que se divide el caparazón
Figura 51	Escudos dérmicos del caparazón
Figura 52	Cabeza del armadillo
Figura 53	Folículos pilosos de la piel
Figura 54	Estructura general de la epidermis por capas
Figura 55	Introducción de la lepra por los conquistadores españoles
Figura 56	La lepra como castigo divino
Figura 57	Gerhard Hénrik Armaeur Hansen
Figura 58	Lepromas

Figura 59	Leprosa de leproario en Somalia
Figura 60	<i>Mycobacterium leprae</i>
Figura 61	Tamaño y forma del <i>M. leprae</i>
Figura 62	Bacterias cultivadas asociadas a lesiones de lepra
Figura 63	Micobacteria obtenida de nódulos leprosos humanos
Figura 64	Armadillos de nueve bandas ( <i>D. novemcinctus</i> )
Figura 65	Bacterias aisladas de lesiones de lepra en armadillo
Figura 66	Transmision de lepra al armadillo de siete y ocho bandas
Figura 67	Multiplicación de <i>M. leprae</i> en regiones corporales frías
Figura 68	Cuádruplos monocigóticos de armadillo
Figura 69	Cuádruplos monocigóticos
Figura 70	LCs en epidermis de armadillo
Figura 71	DCs en cortes histológicos transversales parafinados clásicos
Figura 72	Cél con características ultraestructurales típicas de las LCs en epidermis normal de armadillo
Figura 73	Proceso de presentación de antígenos
Figura 74	Células de sangre cardiaca
Figura 75	Células con forma de roseta
Figura 76	Ecto-ATPasa
Figura 77	Expansión y retracción de las prolongaciones en DCs
Figura 78	Dendritas finas y largas de las DCs
Figura 79	Dendritas finas de DC en microscópio electrónico
Figura 80	Dendritas que mantienen constante comunicación con múltiples células adyacentes

## APÉNDICE No. 4

### TÉCNICA DE TINCIÓN ENZIMÁTICA DE ATPasa

Para la visualización de células de Langerhans epidérmicas.

1º Solución Buffer EDTA.-

Usando Sal Disódica

6.83 g NaCl

0.20 g KCl

1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

7.60 g Na<sub>2</sub>(EDTA)

Usando Ácido EDTA\*

6.83 g NaCl

0.20 g KCl

1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5.83 g Ácido EDTA

De preferencia, en un frasco volumétrico de 1 l, (\*adicionar 10 ml de NaOH 10 N a la Solución de Ácido EDTA para disolver los químicos secos), ajustar el pH a 7.4 usando HCl o NaOH, aforar a 1 l, refrigerar (máximo por seis meses) manteniendo el pH en 7.4.

#### 2° Solución Tris Mal.-

23.7 g Trizma Maleato

34.0 g Sacarosa

En un frasco volumétrico de 500 ml, adicionar 350-400 ml de H<sub>2</sub>O destilada para el Trizma Maleato; agitar para disolver, entonces adicionar la Sacarosa, dejar disolver por varios minutos, ajustar el pH a 7.3 y aforar a 500 ml, refrigerar (máximo por seis meses) manteniendo el pH en 7.3.

#### 3° Solución Salina Normal (0.9 %).-

1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada

9.0 g NaCl

En un frasco volumétrico de 1 l, adicionar el NaCl al agua destilada y agitar para disolver. Refrigerar (máximo por seis meses). [0.1 % BSA : 0.1 g BSA x 100 ml agua destilada]

#### 4° Solución Cacodilato 0.5 M.-

⊗ Cuidado: Compuesto Arsénico.

26.75 g Sal Sódica Ácido Cacodilato

250 ml H<sub>2</sub>O destilada

Adicionar los químicos secos en un frasco volumétrico de 250 ml, adicionar 50 ml de agua y revolver para disolver, aforar a 250 ml y disolver completamente. Refrigerar (máximo seis meses).

#### 5° Solución 20% Paraformaldehido.-

⊗ Utilizar máscara y preparar bajo una campana de extracción.

20.0 g Polvo Paraformaldehido

100 ml H<sub>2</sub>O destilada

1 ml NaOH 2N

Calentar el agua a 60-65° C (casi a que suelte el hervor) en un frasco tapado de 250 ml, adicionar el polvo de paraformaldehido y agitar para humedecer el polvo, adicionar una mosca (agitador) y revolver por varios minutos en una platina a 65° C, adicionar el NaOH y continuar agitando hasta que la solución quede clara; enfriar hasta la temperatura ambiente (debajo de la campana de extracción). Refrigerar (máximo por seis meses).

⊗ **Soluciones de Trabajo:**

Deben hacerse justo antes de usar y desechar el sobrante.

6° Solución fijadora.-

- 10 ml Solución Cacodilato
- 10 ml Solución Paraformaldehido
- 90 ml H<sub>2</sub>O destilada

Adicionar las soluciones a una probeta graduada de 125 ml y mezclar completamente. Ajustar el pH a 7.3-7.4 y descartar el sobrante al terminar.

7° Mezcla de Incubación.-

- a) Hervir 50 ml de H<sub>2</sub>O destilada
  - Calentar 42 ml de Solución Tris Mal en baño María a 37° C.
- b) Solución de Magnesio
  - 0.5 g MgSO<sub>4</sub>
  - 10 ml H<sub>2</sub>O hirviendo

Adicionar el polvo de sulfato de magnesio a un frasco de vidrio esmerilado, agregar el agua hirviendo y revolver para disolver completamente.

- c) Solución Guía
  - 0.1 g Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>
  - 5 ml H<sub>2</sub>O hirviendo

Adicionar el polvo de nitrato de plomo, o polvo guía, a un frasco de vidrio esmerilado, agregar el agua hirviendo y revolver para disolver completamente.

- d) Mezcla Final
  - 0.01 / 0.005 g Polvo ADN (Adenosin 5' Trifosfato)
  - 42 / 21 ml Tris Mal Caliente
  - 5 / 2.5 ml Solución de Magnesio
  - 3 / 1.5 ml Solución Guía

Adicionar los ingredientes al Tris Mal caliente, revolviendo para disolver completamente después de cada adición, si la solución se empieza a poner turbia, checar el pH de la solución de Tris Mal, ésta debe de estar en 7.3-7.4, o de lo contrario la solución guía se precipitará. Descartar el sobrante al terminar.

8° Solución de Glicerina para el Montaje.-

Glicerol:PBS en relación de 9:1 con 0.1% de N-Propil Gallato.

No hace falta descartar el sobrante ni refrigerarlo, solamente taparlo bien en un frasco cerrado a temperatura ambiente.

## APÉNDICE No. 5

### DENSIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS POR mm<sup>2</sup>

Cuantificación de células dendríticas con microscopía óptica y obtención matemática de su densidad (DC/mm<sup>2</sup>) en las diferentes regiones anatómicas de la epidermis de la piel del armadillo.

Los valores obtenidos en el conteo microscópico fueron:

Armadillo/EDTA	107	122	68	51		
ATPasa/Hembra1	118	66	23	91	—————→	40x
Muslo/09Ago99	53	64	16	64		
Armadillo/EDTA	93	56	55	49		
ATPasa/Hembra1	63	108	67	66	—————→	40x
Muslo/17Ago99	112	96	110	97		
Armadillo/EDTA	62	102	83	93		
ATPasa/Hembra1	85	92	87	85	—————→	40x
Muslo/17Ago99	80	91	83	94		
Armadillo/EDTA	122	113	73	112		
ATPasa/Hembra1	102	86	72	123	—————→	40x
Abdomen/07Sep99	89	85	158	148		
Armadillo/EDTA	100	85	125	108		
ATPasa/Hembra1	128	135	109	52	—————→	40x
Axila/23Ago99	120	84	177	86		
Armadillo/EDTA	94	68	142	127		
ATPasa/Hembra1	93	97	112	152	—————→	40x
Axila/30Ago99	92	94	137	76		

Armadillo/EDTA	105	158	143	161		
ATPasa/Hembra1	122	106	111	154	—————>	40x
Cuello/30Ago99	149	179	98	124		
Armadillo/EDTA	157	142	141	93		
ATPasa/Hembra1	118	120	119	128	—————>	40x
Nuca/07Sep99	141	116	163	147		
Armadillo/EDTA	36	73	26	17		
ATPasa/Hembra2	52	31	14	33	—————>	40x
Muslo/27Sep99	26	43	18	71		
Armadillo/EDTA	44	27	37	51		
ATPasa/Hembra2	21	15	48	72	—————>	40x
Abdomen/27Sep99	34	61	43	59		
Armadillo/EDTA	123	82	152	68		
ATPasa/Hembra2	123	109	47	66	—————>	40x
Axila/27Sep99	82	160	96	62		
Armadillo/EDTA	138	113	81	99		
ATPasa/Hembra2	89	66	97	152	—————>	40x
Cuello/05Oct99	74	52	105	37		
Armadillo/EDTA	50	130	63	32		
ATPasa/Hembra2	29	98	47	129	—————>	40x
Nuca/05Oct99	182	15	31	137		
Armadillo/EDTA	56	12	43	64		
ATPasa/Macho3	32	59	50	92	—————>	40x
Muslo/10Nov99	48	71	57	53		
Armadillo/EDTA	42	61	40	58		
ATPasa/Macho3	47	48	37	60	—————>	40x
Abdomen/10Nov99	53	46	62	62		

Armadillo/EDTA	65	69	47	107		
ATPasa/Macho3	72	52	112	75	→	40x
Axila/10Nov99	77	95	98	93		
Armadillo/EDTA	37	15	61	35		
ATPasa/Macho3	42	46	40	41	→	40x
Cuello/16Nov99	29	68	43	39		
Armadillo/EDTA	115	123	119	98		
ATPasa/Macho3	99	137	102	36	→	40x
Nuca/16Nov99	107	132	109	16		
Armadillo/EDTA	60	78	56	69		
ATPasa/Macho4	47	58	73	71	→	40x
Muslo/29Nov99	53	62	81	58		
Armadillo/EDTA	48	61	35	73		
ATPasa/Macho4	56	92	103	54	→	40x
Abdomen/29Nov99	21	87	48	69		
Armadillo/EDTA	44	63	150	75		
ATPasa/Macho4	68	77	182	98	→	40x
Axila/29Nov99	55	169	66	112		
Armadillo/EDTA	96	99	98	74		
ATPasa/Macho4	87	113	83	122	→	40x
Cuello/07Dic99	105	101	87	154		
Armadillo/EDTA	115	161	97	12		
ATPasa/Macho4	187	128	83	167	→	40x
Nuca/07Dic99	152	136	52	193		



Con estos valores se realizó el cálculo matemático del número de DCs por  $\text{mm}^2$  con la formula correspondiente (ver material y método pp 69):

Animal	Reg. Anatómica	Promedio a 30x	Promedio / $\text{mm}^2$
Armadillo 1	Muslo	79	497
Armadillo 1	Abdomen	107	672
Armadillo 1	Axila	108	680
Armadillo 1	Cuello	134	843
Armadillo 1	Nuca	140	831
Armadillo 2	Muslo	37	230
Armadillo 2	Abdomen	43	368
Armadillo 2	Axila	98	613
Armadillo 2	Cuello	92	553
Armadillo 2	Nuca	79	494
Armadillo 3	Muslo	53	334
Armadillo 3	Abdomen	51	323
Armadillo 3	Axila	80	504
Armadillo 3	Cuello	41	268
Armadillo 3	Nuca	99	625
Armadillo 4	Muslo	64	401
Armadillo 4	Abdomen	62	392
Armadillo 4	Axila	97	607
Armadillo 4	Cuello	102	639
Armadillo 4	Nuca	124	777

Más tarde se hizo un cálculo total donde se juntaron todos los datos y se obtuvo valores de DCs /  $\text{mm}^2$  para el número de animal, la región anatómica y los promedios correspondientes:

Densidad de Cél Den	Animal 1 Hembra	Animal 2 Hembra	Animal 3 Macho	Animal 4 Macho	Total de DC / $\text{mm}^2$
Muslo	497	230	334	401	366
Abdomen	672	268	323	392	414
Axila	680	613	504	607	601
Cuello	843	553	268	639	576
Nuca	831	494	625	777	682
Promedio	705	432	411	563	528

## APÉNDICE No. 6

### PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Diferencias citológicas (cambio de morfología) de las DCs en las distintas regiones anatómicas de la piel del armadillo.

Con la técnica de dimensionar fotografías (ver material y método pp 70) se obtuvieron valores de diferentes parámetros morfométricos de las DCs en las diferentes regiones anatómicas sin importar el número de animal al cual pertenecían las muestras. Los valores obtenidos fueron:

\* Diámetro Soma Celular en milésimas de cm (se tomo la parte más ancha del soma para hacer la medición):

#### Nuca 40x

0.635	0.565	0.621	0.545	0.695	0.696
0.669	0.548	0.691	0.534	0.659	0.566
0.569	0.587	0.568	0.489	0.537	0.643
0.508	0.628	0.806	0.626	0.917	0.704
0.623	0.514	0.636	0.581	0.570	0.883
0.782	0.517	0.599	0.688	0.620	0.599
0.716	0.577	0.511	0.622	0.543	0.546
0.643	0.711	0.625	0.719	0.635	0.586
0.559	0.711	0.558	0.718	0.654	0.499
0.682	0.590	0.671	0.670	0.574	0.532
0.539	0.628	0.687	0.534	0.506	0.585
0.575	0.605	0.687	0.488	0.687	0.593
0.603	0.659	0.674	0.681	0.650	0.584
0.644	0.600	0.640	0.659	0.629	

#### Cuello 40x

0.623	0.829	0.860	1.147	0.809	0.948
0.714	0.874	0.709	0.808	0.872	1.101
0.692	1.063	0.761	0.917	1.013	0.835
0.837	0.766	0.763	0.632	0.688	0.609
1.097	0.934	0.880	0.838		

Axila 40x

1.109	1.157	0.972	1.063	0.906	0.908
1.068	1.132	0.872	1.100	0.962	1.173
0.967	0.606	0.786	0.854	1.034	1.285
0.634	0.609	0.912	1.363	1.547	1.379
0.932	1.959	1.105	0.808	1.081	0.736
0.716	0.646	0.929	1.086	1.156	1.030
0.709	1.128	1.290	1.164		

Abdomen 40x

0.951	0.706	0.862	0.872	1.301	0.808
1.191	1.469	1.000	1.143	1.211	0.990
0.795	0.924	1.153	0.980	1.619	0.887

Muslo 40x

1.347	0.932	1.798	0.648	1.205	1.184
0.792	1.009	1.696			

Muslo 20x

0.413	0.660	0.635	0.525	0.617	0.549
0.508	0.621	0.527	0.491	0.464	0.510
0.452	0.497				

\* Longitud Dendritas en milésimas de cm (se tomaron las dendritas más largas para hacer la medición):

Nuca 40x

2.301	2.423	2.647	2.449	2.795	3.131
1.873	3.269	3.207	2.471	2.310	2.395
2.605	3.488	2.785	2.239	3.687	1.916
2.648	2.529	3.576	3.484	3.761	2.636
3.382	2.159	2.975	2.961	4.008	3.139
2.158	2.261	5.895	2.329	2.449	2.484
2.468	1.882	3.681	1.880	2.222	2.674
1.472	2.483	1.575	2.964	2.858	1.610
2.526	3.366	0.899	4.490	2.984	2.888
3.161	5.875	2.169	2.790	2.517	2.592
1.701	3.437	2.483	1.401	1.550	2.123

2.034	2.484	2.286	1.087	2.286	2.487
3.552	2.921	2.060	2.106	2.407	1.779
2.362	3.122	3.551	2.719	2.476	

Cuello 40x

3.644	4.261	2.814	3.942	3.753	4.148
3.905	4.298	1.968	3.995	5.267	4.157
4.922	7.478	2.254	4.475	3.723	3.618
4.556	3.650	4.397	3.719	3.835	5.261
4.922	3.439	5.226	1.926		

Axila 40x

3.288	2.879	2.358	3.030	3.391	2.629
3.618	2.789	2.139	2.444	3.147	2.577
2.370	2.414	3.244	2.427	2.689	3.736
2.494	2.187	2.755	3.092	2.814	2.171
2.503	2.865	1.681	2.882	2.652	1.006
1.886	2.294	1.909	3.407	2.812	1.993
1.647	1.344	2.514	2.879		

Abdomen 40x

4.916	3.632	2.254	2.878	3.491
1.494	2.905	2.332	2.259	2.691
4.844	4.020	2.268	2.714	2.842
2.448	2.889	2.474		

Muslo 40x

6.459	5.821	6.107	3.188	4.669	3.139
3.068	3.127	2.692			

Muslo 20x

2.183	5.041	2.678	2.155	1.924	2.370
2.837	3.205	2.994	2.843	2.678	1.859
1.626	2.884				

Con los valores obtenidos se hizo la conversión de cm a  $\mu$  por regla de tres (ver material y método pp 70) para cada una de las regiones anatómicas estudiadas; sumando ambos valores se obtuvo el tamaño total de la DC:

Región Anatómica	Localización Celular	Promedio en cm	Conversión a micras ( $\mu$ )
Nuca	Soma	0.623	13.145
Nuca	Dendritas	2.043	43.108
Nuca	Célula	2.666	56.253
Cuello	Soma	0.843	17.787
Cuello	Dendritas	3.214	67.816
Cuello	Célula	4.057	85.603
Axila	Soma	1.022	21.564
Axila	Dendritas	1.553	32.768
Axila	Célula	2.575	54.332
Abdomen	Soma	1.048	22.113
Abdomen	Dendritas	1.916	40.427
Abdomen	Célula	2.964	62.540
Muslo	Soma	1.179	23.692
Muslo	Dendritas	3.073	77.034
Muslo	Célula	4.252	100.654

\* Espacio Intercelular en centecimas de cm (se tomo la medición de soma a soma para cada región anatómica):

Nuca

23.88	18.68	35.76	20.64	11.66	15.02
11.03	43.06	16.23	14.61	22.45	23.02
19.41	13.75	15.60	23.95	14.62	24.48
34.15	17.71	10.29	24.67	26.21	

Cuello

32.66	37.11	30.15	40.07	19.35	29.06
28.50	23.59	52.79	12.19	23.64	35.09
34.80	20.66	31.86	15.81	30.97	6.94
35.71	19.27	52.39	15.68	18.31	

Axila

41.54	22.21	28.04	36.44	21.10	19.47
30.03	45.76	28.41	44.28	13.60	17.70
45.42	23.86	32.87	22.62	54.73	32.75
25.06	30.21	9.14	29.92	32.06	

Abdomen

58.41	49.38	45.07	30.92	13.30	3.44
30.87	35.80	18.77	5.68	8.03	93.57
41.68	54.75	65.10	24.82	35.90	32.97
41.94	30.39	48.50	36.66	24.71	

Muslo

59.99	42.73	37.93	63.61	53.79	38.32
93.39	85.34	74.28	93.58	47.51	53.37
69.21	43.12	35.48	57.10	85.17	58.43
35.12	25.07	21.65	36.10	55.74	

Con los valores obtenidos se hizo la conversión de cm a  $\mu$  por regla de tres (ver material y método pp 70) para cada una de las regiones anatómicas estudiadas:

Región Anatómica	Producto en cm	Conversión
Nuca	2.091	44.120
Cuello	2.811	59.312
Axila	2.989	63.068
Abdomen	3.612	76.213
Muslo	5.505	116.155

\* Número de Ramificaciones Primarias (se contaron las ramificaciones que salen directamente del cuerpo celular o soma de la DC):

Nuca

3	5	5	4	3	5	5	5	5	4	3	3	3	3	4
4	6	4	4	6	7	3	3	3	4	2	6	4	4	4
7	3	4	4	7	3	4	3	4	5	4	3	3	2	3
2	4	3	3	4	4	3	4	5	3	3	3	4	4	3
4	4	5	5	4	3	3	3	3	5	4	4	6	4	2

6 5 5 2 5 4 5

Habiendo un promedio de 4.0 ramificaciones primarias en la región de la nuca en armadillos.

### Cuello

7 2 6 4 4 6 6 3 5 6 3 5 4 4 5  
6 4 4 4 2 5 5 6 3 5 4 3 6 4

Habiendo un promedio de 4.5 ramificaciones primarias en la región del cuello en armadillos.

### Axila

4 4 4 7 6 8 11 7 6 7 6 9 5 4 9  
9 9 6 7 2 10 7 8 4 8 4 3 11 3 6  
6 7 6 3 3 6 7 6 7

Habiendo un promedio de 6.3 ramificaciones primarias en la región de la axila en armadillos.

### Abdomen

4 3 7 5 3 4 6 3 9 8 4 7 5 5 3  
3 8 7

Habiendo un promedio de 5.2 ramificaciones primarias en la región del abdomen en armadillos.

### Muslo

7 4 3 6 3 4 4 4 3 3 4 4 2 3 3  
5 4 3 2 9 6 8 6 12

Habiendo un promedio de 4.7 ramificaciones primarias en la región del muslo en armadillos.

\* Número de Ramificaciones Secundarias (se contaron las ramificaciones que salen o brotan de las ramificaciones primarias de las DCs):

### Nuca

3 3 2 3 5 4 2 1 3 3 7 2 4 7 8  
4 8 5 4 8 4 7 2 7 3 3 1 2 4 5  
2 3 3 3 7 2

Habiendo un promedio de 4.11 ramificaciones secundarias en la región de la nuca en armadillos.

Cuello

8 3 11 5 2 2 2 11 3 6 12 2 3 8 6  
3 10 1 11 2 6 3 2 2 2 12 5 11 8 3  
3 8 3 6 1 10

Habiendo un promedio de 5.44 ramificaciones secundarias en la región del cuello en armadillos.

Axila

2 6 2 1 11 3 6 4 1 2 11 4 7 3 4  
2 4 8 11 2 4 1 6 4 3 7 3 11 2 4  
1 2 8 4 6 2

Habiendo un promedio de 4.50 ramificaciones secundarias en la región de la axila en armadillos.

Abdomen

4 3 18 4 2 2 2 4 4 4 5 6 3 3 2  
2 1 11 4 5 6 4 4 2 2 3 3 2 2 2  
11 3 11 4 1 11

Habiendo un promedio de 4.44 ramificaciones secundarias en la región del abdomen en armadillos.

Muslo

4 8 2 3 3 13 2 4 13 5 4 5 3 4 2  
5 3 9 5 5 5 12 4 2 4 3 13 3 3 2  
2 5 3 9 4 8

Habiendo un promedio de 5.11 ramificaciones secundarias en la región del muslo en armadillos.



\* Caracteres morfocitológicos medidos en las DCs de epidermis de armadillo de nueve bandas:

Vicerias ( $\mu$ )	Célula Entera	Dendrito Celular	Soma Celular	Espacio Intercelular	Ramifica 1 <sup>da</sup> No.	Ramifica 2 <sup>da</sup> No.
Nuca	56.253	43.108	13.145	44.120	4.0	4.11
Cuello	85.603	67.816	17.787	59.312	4.5	5.44
Axila	54.332	32.768	21.564	63.068	6.3	4.50
Abdomen	62.540	40.427	22.113	76.213	5.2	4.44
Muslo	100.654	77.034	23.692	116.155	4.7	5.11
Promedios	71.876	52.231	19.660	71.774	4.94	4.72