



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LA AMINOPEPTIDASA N (CD13) EN LA MADURACIÓN DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

Q. F. B. María Guadalupe García Patiño

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo
Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS**

**Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

MÉXICO, D. F. Octubre, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Enrique Ortega Soto en el laboratorio del cuál es titular, mismo que pertenece al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto se realizó gracias al financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Clave de proyecto: 178803) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) (Clave del proyecto: IN210314). Durante la realización del proyecto, la sustentante fue becaria del CONACyT con el registro número 288933 y recibió beca del proyecto previamente mencionado de la DGAPA para la conclusión de las actividades de investigación, la escritura de tesis y la obtención de grado.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación fue posible gracias al apoyo técnico y asesoría brindados por parte de la Dra. Elizabeth Mendoza Coronel.

Los concentrados leucocitarios utilizados en la presente investigación se obtuvieron en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” gracias a la colaboración de la E.B.C. Graciela Rosas Alquicira y de la Dra. Mónica Viveros Rogel, ambas pertenecientes al Departamento de Infectología de dicho instituto.

Se agradecen los aportes hechos a la presente investigación por parte del comité tutor: Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonzo y Dra. María Gloria Soldevila Melgarejo.

Se agradece el apoyo técnico de la M. en I. B. B. Claudia Angélica Garay Canales durante el aislamiento de las células.

Se agradece a los miembros del jurado: al Dr. Raúl Mancilla Jiménez, a la Dra. Gladis del Carmen Fragoso González, a la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian, a la Dra. Leticia Moreno Fierros y al Dr. Ignacio Camacho Arroyo, por la revisión del escrito, así como por sus aportaciones, observaciones y comentarios.

Al Q. F. B. Carlos Castellanos Barba por su apoyo en la Unidad de Citofluorometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Victor Daniel Garzón Cortés, al M. en C. Oscar Hernández Campos, a la MVZ Georgina Díaz Herrera, al MVZ. Jorge Omar García Rebollar y a Patricia Gutiérrez Rosas por su apoyo técnico y atención en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

MÁS AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Al Dr. Ortega por permitirme desarrollar esta investigación en su laboratorio. Gracias por su apoyo, asesoría y confianza durante la realización del proyecto.

Estoy infinitamente agradecida con Ely. En verdad agradezco tus consejos, asesoría, tu disposición, el tiempo que me dedicaste, el haber compartido tu amplia gama de conocimientos conmigo, en fin... por las incontables veces en las que *me echaste la mano* con los experimentos. Gracias además, por los consejos de vida y no sólo me refiero a los consejos de vida académico-científica. Mis sinceros agradecimientos y profunda admiración. Muchas, muchas, muchas gracias. Gracias también a la vida y al destino por ponerte en mi camino. 😊

Al ser más maravilloso y extraordinario que me ha concedido la vida: mi mo, Ma. Matilde Patiño Hernández. Ni todas las palabras ni todas mis acciones serían suficientes para agradecer todo lo que has hecho por y para mí. Gracias por brindarme tu apoyo, amor y confianza, siempre de la manera más incondicionalmente posible. Gracias por ser la base sobre la que se ha construido la parte positiva y productiva de la que estoy hecha. Gracias por darme más de lo que merezco. Gracias por tu entrega total. ♥

A otro ser maravilloso que me ha concedido la vida: mi abuelita Tilita, Domitila Hernández Pantaleón. Por encomendar mis proyectos y persona para que marchen adecuadamente, con bienestar y éxito. Gracias por sus pensamientos, deseos y sentimientos positivos y por sus oraciones. ♥

A mi papá, Raúl García Cázares por tu paciencia y cariño. 🧑

A mi grandiosísimo hombre, mi amor, héroe, compañero y pre-esposo Gus. Gracias por el apoyo, cariño, compañía y tiempo compartidos conmigo, sobre todo durante la realización de este proyecto. Gracias por la comprensión, la empatía, la paciencia y la disposición para escucharme y aconsejarme, gracias por las palabras de aliento; tú sabes lo que es hacer ciencia. Gracias por estar a mi lado siempre, gracias por absolutamente todo Gustschav. ♥

A la gente sumamente agradable que me topé en el lab: Ofe, Andrea, Diego-go, Enrique Jr. y nuevamente a Ely. Por compartir las penas y alegrías que le trae a uno la investigación. Por permitir que el trabajo en el lab se desarrollara en un ambiente bastante grato y cordial. Y cómo no, gracias también, por compartir “la hora de comer”; por cierto: ¿comen a las dos? 🍴🍷

A la gente que sin ser del laboratorio me brindó todo su apoyo para que este trabajo fuera posible. A la Dra. Laura Bonifaz, a la Dra. Mónica Rogel y de manera muy especial agradezco a la cDra. Luz María Mora Velandia y a la E.B.C. Graciela Rosas Alquicira por toda su atención, asesoría, amabilidad y disposición para ayudarme a la realización esta investigación. Muchas gracias.

Al resto del grupo de trabajo del laboratorio del Dr. Ortega, porque de alguna forma permitieron que se concretara este trabajo: Claudia, Ale, Ana Diana, Sujhey, Natalia, la Sra. Raquel y sobre todo a la Dra. Ileana Licon Limón por sus enseñanzas, apoyo, motivación, interés, comentarios, observaciones y sugerencias.

A los donadores de sangre cuyas células se utilizaron para realizar este trabajo.

A Lety García Gutiérrez por su amable atención y apoyo en los trámites durante la maestría, y cómo no, también se agradecen los regaños.

A mis amadísimos hermanos-amigos de toda la vida: Alex, Clem, Mike, Roy y Sil que siempre están al pendiente de mí, escuchándome, jalándome las orejas y motivándome. ♥

A los minicompañeros (Plutón, Melón y Sandía) =^ · ɿ · ^= que permanecían a mi lado cuando de documentarme y escribir para este trabajo se trataba. 🐱

“Ciencia es el arte de crear ilusiones convenientes que el necio acepta o disputa, pero de cuyo ingenio goza el estudioso, sin cegarse ante el hecho de que tales ilusiones son otros tantos velos para ocultar las profundas tinieblas de lo insondable.”

Carl Gustav Jung

"La ciencia, [...] está hecha de errores; pero de errores que conviene cometer, porque conducen poco a poco a la verdad".

Jules Gabriel Verne,

Viaje al Centro de la Tierra

“Creo en la evidencia. Creo en la observación, las mediciones, el razonamiento y la confirmación por medio de observadores independientes. Crearé en cualquier cosa, sin importar que tan loca o ridícula si hay evidencia que la soporte. Mientras más loca y más ridícula, eso sí, más firme y sólida tendrá que ser la evidencia”.

Isaac Asimov

“El mérito de todas las cosas está en su dificultad.”

Alexandre Dumas,

Los Tres Mosqueteros.

“Juzga tu éxito según lo que has sacrificado para conseguirlo.”

Tenzin Gyatso, Dalai Lama XIV

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS</u>	1
<u>RESUMEN</u>	5
<u>INTRODUCCIÓN</u>	6
I. CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs).....	6
I. I. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	6
I. II. FUNCIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	13
I. II. I. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS.....	14
I. III. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	20
I. III. I. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	25
II. AMINOPEPTIDASA N (CD13).....	32
II. I. CD13 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	38
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	41
<u>HIPÓTESIS</u>	42
<u>OBJETIVOS</u>	42
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	43
1. CÉLULAS.....	43
1.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS (moDCs).....	43
1.1.1. OBTENCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS.....	43
1.1.2. DIFERENCIACIÓN DE MONOCITO A CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	44
1.2. ESTIMULACIÓN DE moDCs.....	45
1.2.1. ESTIMULACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO (LPS).....	45
1.2.2. ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE CD13.....	45
2. INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE moDCs.....	47
2.1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE.....	47
3. EVALUACIÓN FUNCIONAL DE moDCs.....	48
3.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS.....	48
3.2. ENSAYOS DE ENDOCITOSIS DE DEXTRANO.....	49

3.3.	ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD4 ⁺	50
3.3.1.	TINCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMCs) CD14 ⁻ CON CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ÉSTER (CFSE).....	50
3.3.2.	REACCIÓN LEUCOCITARIA MIXTA (MLR).....	50
3.3.3.	INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA ANTI-CD4.....	51
4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51
<u>RESULTADOS</u>	52
	OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y SUBSECUENTE DIFERENCIACIÓN A moDCs.....	52
	LA ESTIMULACIÓN DE CD13 EN moDCs NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE QUE INDUCE EL TRATAMIENTO CON LPS.....	55
	LA ESTIMULACIÓN DE moDCs CON LPS INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE CD13.....	60
	LA ESTIMULACIÓN DE CD13 EN moDCs NO MODULA LA SECRECIÓN DE CITOCINAS QUE SE INDUCE POR LA ESTIMULACIÓN CON LPS.....	61
	LA ESTIMULACIÓN SIMULTÁNEA DE CD13 Y TLR4 DISMINUYE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE moDCs.....	63
	LA ESTIMULACIÓN DE CD13 NO AFECTA LA CAPACIDAD DE moDCs PARA ESTIMULAR LINFOCITOS T CD4 ⁺	65
<u>DISCUSIÓN</u>	68
<u>RESUMEN DE LOS HALLAZGOS REALIZADOS</u>	75
<u>CONCLUSIÓN</u>	75
<u>PERSPECTIVAS</u>	76
<u>REFERENCIAS</u>	78
<u>ANEXOS</u>	92
	ANEXO A. EFECTOS DE LA ADICIÓN DE IgG1 MURINA CONTROL SOBRE EL FENOTIPO Y FUNCIONES DE moDCs.....	92
	ANEXO B. SOLUCIONES EMPLEADAS.....	96

ABREVIATURAS

(6Ckine):	quimiocina con 6 cisteínas
(Ag):	antígeno.
(ANOVA):	análisis de varianza.
(APC):	célula presentadora de antígeno.
(APhC):	aloficocianina.
(ATF-2):	factor de transcripción activador 2.
(BCL10):	proteína del linfoma de células B/linfoma 10.
(BDCA):	antígeno de células dendríticas sanguíneas.
(BMDCs):	células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea.
(CARD9):	proteína 9 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa.
(CCL):	quimiocina con motivo C-C.
(CCR):	receptor para quimiocinas con motivo C-C.
(CD):	cúmulo de diferenciación.
(CD40L):	ligando de CD40.
(cDCs):	células dendríticas convencionales.
(CFSE):	carboxifluoresceína succinimidil éster.
(CLEC):	lectina de tipo C.
(CLRs):	receptores tipo lectina de tipo C.
(CR3):	receptor 3 del complemento.
(CREB):	elemento de unión en respuesta al AMP cíclico.
(CTL):	linfocito T citotóxico.
(CTLA-4):	antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos.
(CX3CR1):	receptor 1 de la quimiocinas con motivo C-X-X-X-C.
(CXCL):	quimiocina con motivo C-X-C.
(CXCR):	receptor para quimiocina con motivo C-X-C.
(DAMPs):	patrones moleculares asociados a daño.
(DCIR):	receptor inhibitor de células dendríticas.
(DCs):	células dendríticas.
(DC-SIGN):	molécula no-integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas.
(^{dim}):	expresión disminuida.

(DNA)	ácido desoxirribonucleico
(DNA CpG):	ácido desoxirribonucleico rico en los nucleótidos citosina y guanina.
(ERK):	quinasas reguladas por señales extracelulares.
(ESAM):	molécula de adhesión específica de células endoteliales.
(FAK):	cinasa de adhesión focal.
(FcRs):	receptores para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas.
(FcαR):	receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas tipo A.
(FcγR):	receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas tipo G.
(FcεR):	receptor para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas tipo E.
(FITC):	isotiocianato de fluoresceína.
(FLT-3L):	ligando de tirosina cinasa 3 tipo Fms.
(FXIIIa):	fibrinolisina.
(GM-CSF):	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.
(H+L):	cadena ligera y pesada.
(HCl):	ácido clorhídrico.
(HCoV-229E):	coronavirus humano 229 E.
(hDC):	célula dendrítica humana.
(HEPES):	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfónico.
(^{hi}):	expresión elevada.
(HLA):	antígeno leucocitario humano.
(HSP):	proteína de choque térmico.
(ICAM):	molécula de adhesión intracelular.
(ICOS):	coestimulador inducible de células T.
(ICOSL):	ligando del coestimulador inducible de células T.
(IDO):	indolamina-2,3-desoxigenasa.
(IFN):	interferón.
(IgG):	inmunoglobulina de tipo G.
(IL):	interleucina.
(IMF):	intensidad media de fluorescencia.
(iNOS):	sintasa inducible de óxido nítrico.
(IRAK):	cinasa asociada al receptor de IL-1.
(IRF3):	factor de transcripción regulador 3.

(ITAM):	motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina.
(ITIM):	motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina
(Jak):	cinasa Janus.
(JNK):	cinasa N-terminal de c-Jun.
(LC):	célula de Langerhans.
(Lin):	linaje.
(^{lo}):	expresión baja.
(LPS):	lipopolisacárido.
(mAb):	anticuerpo monoclonal.
(Mac-1):	antígeno 1 de macrófagos.
(MAL):	molécula adaptadora de MyD88.
(MALT1):	proteína 1 de traslocación del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa.
(MAPK):	proteína cinasa activada por mitógenos.
(MAPKK):	cinasa de la cinasa de proteínas activadas por mitógeno.
(mDC):	célula dendrítica madura.
(MDMs):	macrófagos derivados de monocitos.
(MHC):	complejo principal de histocompatibilidad.
(MIICs):	compartimentos ricos en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.
(MIP-3β):	proteína inflamatoria de macrófagos 3 β .
(MLR):	reacción mixta leucocitaria.
(moDCs):	célula dendrítica derivada de monocitos.
(MR):	receptor de manosa.
(mRNA):	ácido ribonucleico mensajero.
(MyD88):	proteína codificada en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide.
(Mϕs):	macrófagos.
(NALP)	receptor con dominios NACHT, LRR y pirina.
(NFκB):	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
(NKs):	células asesinas naturales.
(NLRs):	receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos.
(OX40L):	ligando de OX40.

(PAMPs):	patrones moleculares asociados a patógenos.
(PBMCs):	células mononucleares de sangre periférica.
(PD):	proteínas de muerte celular programada.
(pDCs):	células dendríticas plasmocitoides.
(PD-L):	ligando de la proteína de muerte celular programada.
(PE):	ficoeritrina.
(PGE₂):	prostaglandina E ₂ .
(PI3K):	fosfoinositol 3-cinasa.
(PRRs):	receptores de reconocimiento de patrones.
(Raf-1):	cinasa de serina/treonina.
(Rho-GTPasas):	proteínas codificadas por la familia de genes homólogos a Ras.
(RNA):	ácido ribonucleico.
(SCF):	factor de células troncales.
(SFB):	suero fetal bovino.
(Siglec):	inmunoglobulina tipo lectina que une ácido siálico.
(Src):	proteína no receptor con actividad de tirosina cinasa.
(STAT):	transductor de señales y activador de la transcripción.
(Syk):	tirosina cinasa de bazo.
(TCR):	receptor de los linfocitos T.
(TGF-β):	factor transformante de crecimiento beta.
(Th1):	linfocitos T colaboradores tipo 1.
(Th17):	linfocitos T colaboradores tipo 17.
(Th2):	linfocitos T colaboradores tipo 2.
(TLRs):	receptores tipo <i>Toll</i> .
(TNF-α):	factor de necrosis tumoral alfa.
(TRAF):	factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral.
(Treg):	linfocitos T reguladores.
(TRIF):	adaptador que contiene el dominio homólogo a <i>Toll</i> /IL-1R e induce IFN-β.
(Tyr⁶):	tirosina localizada en la posición 6.
(v:v):	volumen a volumen.
(WT):	<i>wild type</i> /silvestre.
(XCR):	receptor de quimiocinas con motivo C.

RESUMEN

La aminopeptidasa N (CD13) es una enzima multifuncional que tiene elevada expresión en células de origen mieloide, tal es el caso de células dendríticas (DCs). Con base en la capacidad de CD13 para llevar a cabo y modular procesos celulares tales como internalización de moléculas y partículas, y la activación de vías de señalización; en este proyecto se evaluó el efecto de la estimulación de CD13 sobre características fenotípicas y funcionales que acompañan el proceso de maduración en DCs derivadas de monocitos (moDCs). La estimulación de CD13 mediante el anticuerpo monoclonal (mAb) 452, no modificó la expresión de marcadores de superficie, el perfil de citocinas secretadas ni la capacidad de las moDCs para estimular linfocitos T CD4⁺. Considerando la participación de CD13 en modulación de funciones celulares, se evaluó su capacidad para modular efectos inducidos por la estimulación de moDCs a través de la estimulación del receptor tipo *Toll* TLR4 empleando dos concentraciones de lipopolisacárido (LPS)—óptima y subóptima—. Se encontró que, la estimulación concomitante de CD13 con el mAb 452 y concentraciones subóptimas de LPS, inducen una disminución de la capacidad endocítica de las moDCs, comparada con la estimulación con LPS solo. Lo anterior indica que la estimulación a través de CD13 no induce ni modula la maduración de DCs, sin embargo, es capaz de modular la capacidad endocítica de las células en presencia de LPS, ligando de TLR4.

INTRODUCCIÓN

I. CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Entre los componentes celulares que forman parte del sistema inmunológico se encuentran las células dendríticas (DCs), un grupo heterogéneo de leucocitos [1] esenciales para la inducción de respuestas inmunológicas adaptativas y la regulación de las mismas [2], al dirigir el tipo, la magnitud y la especificidad de la respuesta [3]. Este tipo de células fueron primeramente descritas entre los esplenocitos de ratón, como células con prolongaciones en su superficie y cuya principal función es la presentación antigénica para estimular eficientemente a linfocitos T. Entre el grupo de células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales, las DCs son las únicas capaces de activar efectivamente a linfocitos T *naïve* [4, 5].

Al igual que otros leucocitos, las DCs se diferencian a partir de precursores hematopoyéticos, pudiendo originarse tanto de precursores comunes linfoides como de precursores mieloides comunes; excepto las células de Langerhans (LCs) que se originan de precursores embrionarios durante la gestación [3, 6, 7].

I. I. SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Diferentes subpoblaciones de DCs residen en distintos órganos del cuerpo, difieren en cuanto a la expresión de marcadores de superficie, se especializan en funciones inmunológicas distintas y son diferentes también en cuanto a su origen y en los factores de transcripción que se activan durante su desarrollo [6, 8]. Dada esta heterogeneidad, ha resultado complicado establecer una definición de DCs. Tan es así, que a la fecha no existe una definición molecular de lo que es una DC, pese a que la mayoría de las subpoblaciones de DCs presentan una elevada expresión de CD11c y moléculas tipo II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II). Más bien, las DCs se definen por su capacidad para activar respuestas de células T y por la expresión de combinaciones de marcadores [9].

Las subpoblaciones de DCs se han caracterizado sobre todo en ratón. Una clasificación de estas células, las agrupa en convencionales (cDCs) —que provienen de un progenitor común de células dendríticas, también se incluyen algunas derivadas de monocitos— y no convencionales (Fig. 1). A su

vez, las cDCs han sido divididas en migratorias y linfoides. Las migratorias se encuentran en el tejido periférico (hígado, riñón, tracto gastrointestinal, piel y pulmón) y luego de capturar antígeno, son capaces de migrar a órganos linfoides para interactuar con linfocitos. Estas DCs migratorias, se clasifican con base en la expresión de CD103, CD8 α y CD11b [6, 10, 11]. El grupo de DCs migratorias también incluye a las LCs, que se localizan en la epidermis y se caracterizan por mostrar una elevada expresión de langerina (CD207) [3, 7, 11].

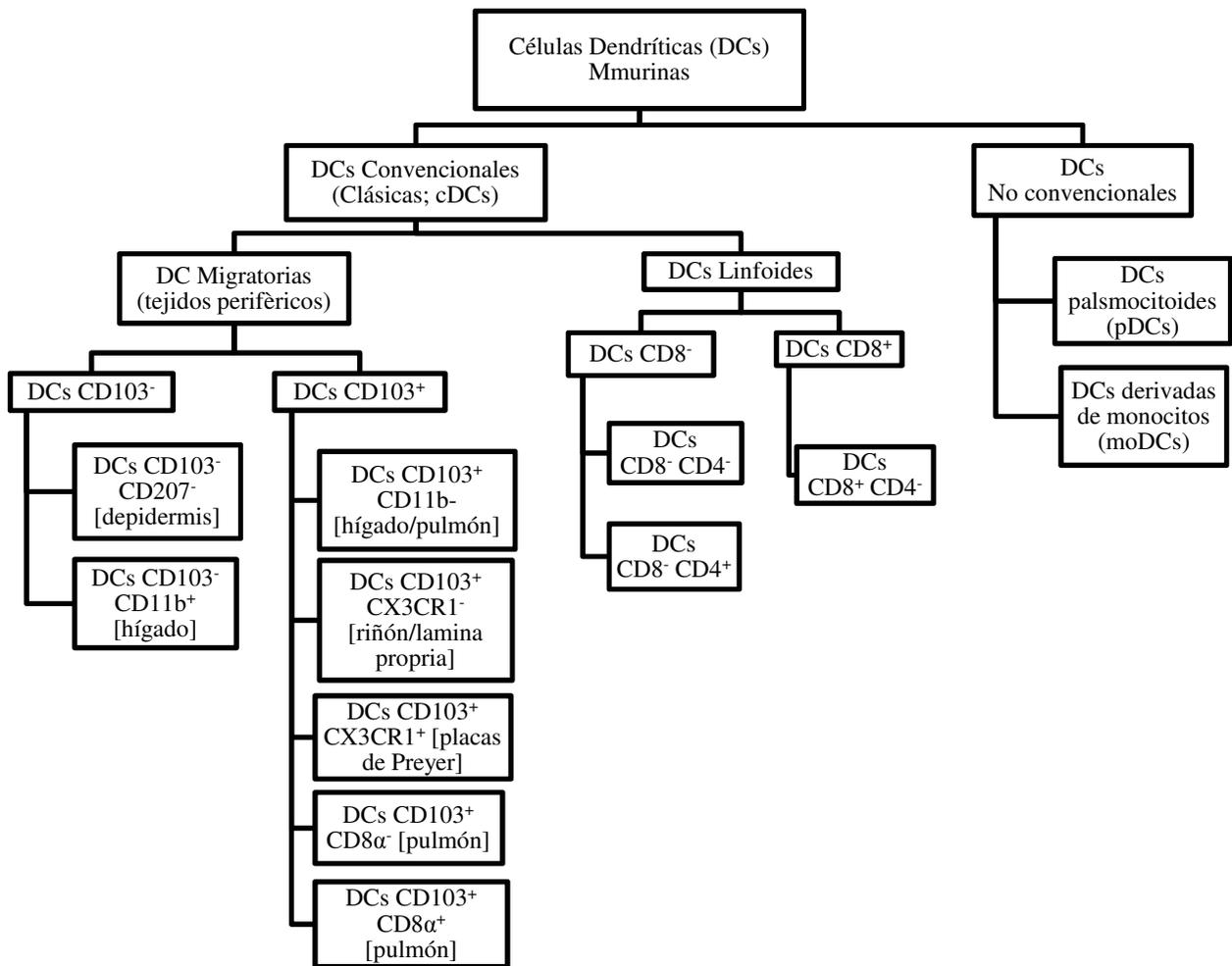


Figura 1. Clasificación de las subpoblaciones de DCs murinas. Las DCs de ratón se clasifican en dos grandes grupos: Convencionales o clásicas (cDCs) y no convencionales. Las cDCs se subclasifican en migratorias y linfoides; las subpoblaciones comprendidas por estos grupos se distinguen por la expresión de los marcadores que se indican, así como por su localización anatómica señalada dentro de corchetes. Las DCs no convencionales incluyen células dendríticas plasmocitoides y células dendríticas que se originaron a partir de monocitos (moDCs). (Modificado de la referencia [6]).

Por otro lado, las DCs linfoides, como lo sugiere su nombre, se localizan en órganos linfoides tales como el bazo, el timo y nódulos linfáticos y se clasifican con base en la expresión de CD4 y CD8 [6]. Luego de su estimulación, las DCs son capaces de llegar a las zonas de linfocitos T de dichos órganos, tal es el caso de las DCs CD8⁻ receptor 2 inhibitor de células dendríticas⁺ (DCIR2⁺) que antes de ser estimuladas, se ubican en la pulpa roja del bazo [12].

En el grupo de las DCs no convencionales, se incluyen las DCs plasmocitoides (pDCs) y las DCs derivadas de monocitos (moDCs) [6].

Las pDCs se localizan en tejido linfoide, no linfoide y en sangre, y se caracterizan por la expresión de la cadena α del receptor de interleucina 3 (CD123), del antígeno 2 de células dendríticas sanguíneas (BDCA-2/ CD303) y del antígeno 4 de células dendríticas sanguíneas (BDCA-4/CD304/neurofilina). Expresan altos niveles de los receptores tipo *Toll* (TLRs) 7 y 9, lo que las dota de elevada capacidad para detectar ácido ribonucleico (RNA) de cadena simple y ácido desoxirribonucleico rico en los nucleótidos citosina y guanina (DNA CpG); además poseen la capacidad de secretar grandes cantidades de interferones (IFNs) de tipo I en respuesta a infecciones virales [11].

Como lo sugiere su nombre, las moDCs se originan a partir de monocitos y lo mismo que otras DCs, tienen la capacidad para activar respuestas T CD4⁺ antígeno específicas, así como de efectuar presentación cruzada a células T CD8⁺. Originalmente se consideró a los monocitos de sangre como precursores de macrófagos (M ϕ s) tisulares, sin embargo, experimentos recientes han respaldado la idea de que no todos los M ϕ s tisulares se originan de monocitos y que los monocitos al migrar a tejidos pueden dar origen a DCs [13]. Tomando como base la existencia de un progenitor común de granulocitos, M ϕ s y DCs y teniendo como antecedente la obtención de DCs a partir del cultivo de precursores de DCs, tanto de médula ósea como de sangre periférica, con el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), Sallusto y Lanzavecchia [14], obtuvieron DCs a partir del cultivo de monocitos humanos con GM-CSF. Más tarde, Muller y colaboradores, rastrearon monocitos (CD11b⁺ F4/80⁻) mediante la administración subcutánea de microperlas fluorescentes; monocitos que luego de internalizar dichas perlas, migraron hasta las zonas de T en nódulos linfáticos y que en estas zonas, tales células presentaban un fenotipo característico de DCs: (MHC-I^{hi}, MHC-II^{hi}, CD86^{hi}, B220⁻, CD11c^{dim}) [15]. Posteriormente se observó que la obtención de DCs a partir de monocitos fagocíticos de microperlas se veía afectada por la presencia de bacterias, lo que sugiere que la obtención de M ϕ s o DCs a partir de monocitos, está complejamente regulada y determinada por la presencia de factores de crecimiento y de estímulos inflamatorios [16]. Recientemente se ha

considerado que cDCs pudieran originarse a partir de monocitos incluso en condiciones no inflamatorias [17].

Las DCs en humano presentan elevada expresión del antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR⁺) y son linaje negativas (Lin⁻) (CD3⁻, CD19/20⁻ y CD56⁻), además de estas dos características, se ha considerado la expresión de otros marcadores para clasificar las DCs como mieloides o como pDCs (Fig. 2).

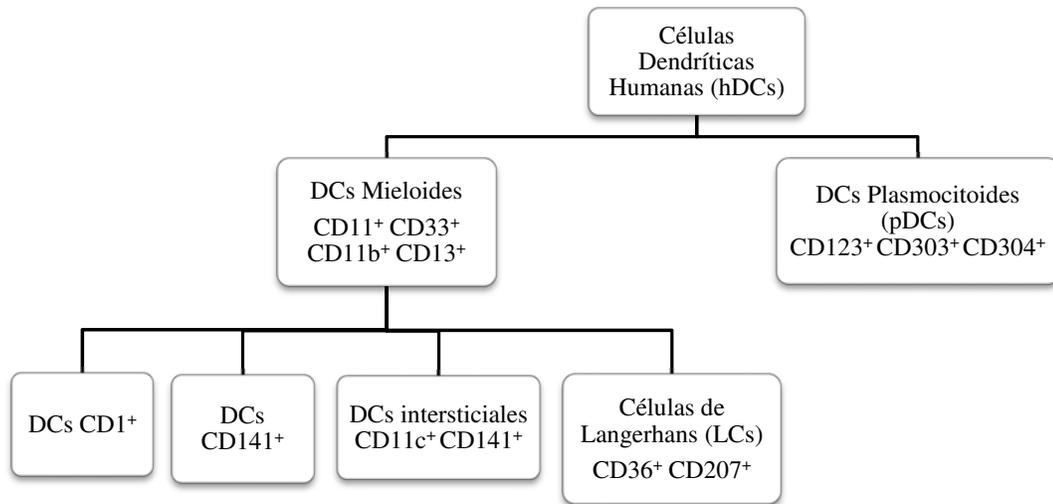


Figura 2. Clasificación de las subpoblaciones de células dendríticas humanas (hDCs) con base en la expresión de algunos marcadores. Las hDCs están comprendidas en dos grandes grupos: mieloides (convencionales) y plasmocitoides. Las DCs mieloides comprenden subpoblaciones que se distinguen por la expresión de algunos marcadores. Las plasmocitoides (pDCs) expresan de forma característica CD123 CD303 CD304.

Las DCs mieloides, que corresponden a las llamadas clásicas o convencionales en ratón, expresan marcadores mieloides como CD11c, CD13, CD33 y CD11b, aunque carecen de CD14 y de CD16. Las DCs mieloides de sangre periférica en humano, se han clasificado como CD1c⁺ (BDCA-1) y CD141⁺ (BDCA-3) que se consideran homólogas de las CD11b⁺ y de las CD8/CD103⁺ murinas, respectivamente. Las DCs mieloides CD141⁺ se han localizado en la paracorteza de nódulos linfáticos, amígdalas, bazo, médula ósea, piel, pulmón e hígado; estas células realizan presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺. Las DCs mieloides CD1c⁺ se localizan en sangre, tejido no linfático como piel,

hígado, intestino y pulmón y órganos linfoides como nódulos linfáticos y bazo. Otra subpoblación de DCs mieloides, dentro de las DCs CD11c⁺, son las DCs CD14⁺, en un principio denominadas DCs intersticiales, su homólogo en ratón corresponde a DCs CD11b⁺ derivadas de monocitos que expresan la molécula de adhesión específica de células endoteliales (ESAM) y estas células sólo han sido identificadas en tejido y no en sangre periférica y, fenotípicamente, son similares a Mφs: expresan CD163, CD11b, el receptor 1 de la quimiocinas con motivo C-X-X-X-C (CX3CR1), fibrinolisina (FXIIIa) y la molécula no-integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas (DC-SIGN/CD209), aunque tienen una muy elevada expresión de moléculas MHC-II y de CD11c. Se localizan tanto en tejido no linfóide como en la paracorteza de tejido linfóide y resultan menos eficientes en la estimulación de linfocitos T *naïve* en comparación con las DCs CD1c⁺ [3, 18].

Las pDCs en humanos carecen de la expresión de antígenos mieloides y se caracterizan por la expresión de CD123, CD303 y CD304. Estas células difícilmente se localizan en tejido periférico sano aunque son rápidamente reclutadas a zonas de inflamación. Se pueden encontrar en sangre y órganos linfoides en las zonas de linfocitos T [18].

Las LCs fueron las primeras DCs de tejido en ser descritas. Las LCs son CD36⁺, CD1⁺, ATPasa⁺ y positivas para el receptor de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas de tipo E (FcεR⁺), además de expresar la lectina de tipo C langerina (CD207) y gránulos de Birbeck —organélos citoplásmicos que participan tanto en la endocitosis mediada por receptor, así como en el procesamiento y presentación de antígenos [19]—. Estas células se localizan principalmente en la epidermis y en epitelio de bronquios, cavidad oral y mucosa genital, aunque tienen la capacidad de diferenciarse en células migratorias. Además, estas células son capaces de autorrenovarse.

A pesar de que se han identificado células con características fenotípicas similares en sangre periférica y en suspensión de tejidos como piel, hígado y pulmón, generalmente se emplea nomenclatura distinta para DCs de tejido y de sangre. Así, las DCs también pueden clasificarse por su localización anatómica, la que a su vez se encuentra estrechamente relacionada con la función que llevan a cabo (Fig. 3). La clasificación funcional-anatómica distingue entre DCs migratorias, también denominadas DCs de tejido o no linfoides y DCs residentes.

Las DCs migratorias son capaces de migrar desde tejidos periféricos hacia nódulos linfático luego de haber adquirido antígeno, hasta órganos linfoides secundarios. En reposo, en el tejido se pueden encontrar DCs CD1c⁺ (BDCA-1⁺), CD141⁺ (BDCA-3⁺) y algunas pDCs.

Las DCs residentes se localizan en los tejidos linfoides y no provienen de DCs de tejido, entre ellas se encuentran DCs mieloides CD1c⁺, DCs mieloides CD141⁺ y pDCs, además de algunas subpoblaciones de DCs CD14⁺ [18].

Algunos autores [3], incluyen DCs de sangre periférica y DCs inflamatorias en la clasificación funcional-anatómica. Entre las DCs de sangre periférica, que se consideran precursoras de DCs de tejidos y de DCs de ganglios linfáticos, se encuentran pDCs, DCs CD1c⁺ y DCs CD141⁺ inmaduras [3]. En humano, también se han encontrado DCs inflamatorias: DCs productoras de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y TNF- α (Tip-DCs)—puesto que cualquier DC mieloides, luego de su estimulación, es capaz de expresar iNOS y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el término Tip-DCs hace referencia a un estado de activación de DCs y no a un subtipo de DCs [20]— y en piel inflamada se han encontrado pDCs y un tipo de DCs que presenta una glicosilación característica (6-sulfoN-acetil lactosamina) en el ligando 1 de la glicoproteína selectina P, llamadas slan DCs [3].

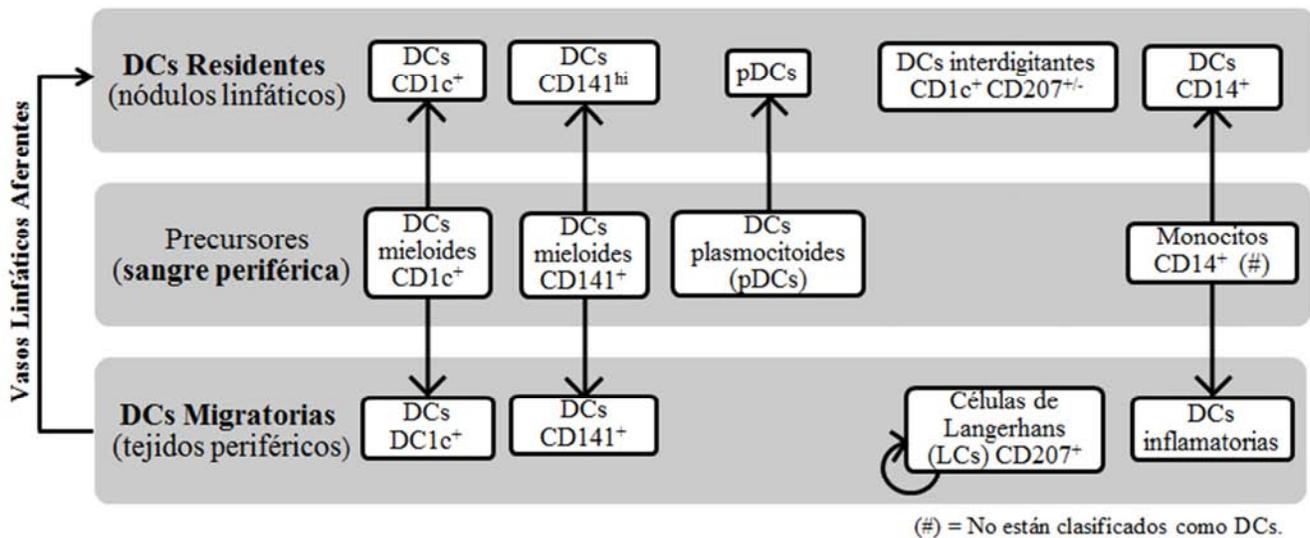


Figura 3. Clasificación funcional-anatómica de hDCs. Monocitos (que no pertenecen al grupo de DCs) y células mieloides y plasmocitoides de sangre periférica son considerados los precusores putativos de las DCs residentes de nódulos linfáticos, así como de las diferentes subpoblaciones de DC migratorias localizadas en distintos tejidos periféricos, a su vez, éstas últimas pueden llegar a nódulos linfáticos. Por su parte, las células de Langerhans son capaces de autorrenovarse. (Modificado de la referencia [18]).

Sin duda, el modelo animal más empleado para la investigación inmunológica es el murino; específicamente en cuanto al estudio de DCs pocos estudios se han realizado con DCs humanas recién aisladas de tejido [21] dada la dificultad para recuperar suficientes células. Por razones como ésta, la clasificación de DCs se basa sobre todo en los descubrimientos realizados en ratón. Por el momento, no se han identificado contrapartes humanas para cada una de las subpoblaciones de DCs murinas conocidas (Tabla 1), sólo ha sido posible establecer homología entre las pDCs y las LCs. Entre las razones a las que este problema obedece se encuentran la diversificación de ambas especies, hace aproximadamente 80 millones de años, a partir de lo cual cada especie evolucionó de forma independiente. Otra situación que dificulta la identificación de subpoblaciones equivalentes en ratón y humano es el hecho de que en el modelo murino, las principales fuentes para el estudio de DCs son el bazo y los ganglios linfáticos, en tanto que en humano, las DCs se obtienen principalmente de piel y sangre [3].

Tabla 1. Homología entre células dendríticas humanas y murinas. Se muestra la correspondencia entre diferentes subpoblaciones de DCs que hasta el momento se ha establecido entre humanos y ratones. (Modificado de la referencia [18]).

Subpoblación		Características	
		Humano	Ratón
Mieloides/ Clásicas	Principal subpoblación	CD1c ⁺ Dectina 1 ⁺ (CLEC7A ⁺) Dectina 2 ⁺ (CLEC6A ⁺)	CD11b ⁺ (tejidos periféricos) CD4 ⁺ CD11b ⁺ (linfoides) ESAM ⁺
	Especializadas en presentación cruzada	CD141 ⁺ CLEC9A ⁺ XCR1 ⁺	CD103 ⁺ (tejidos periféricos) CD8 ⁺ (linfoides) CLEC9A ⁺ XCR1 ⁺ CD207 ⁺
Plasmocitoides		CD303 ⁺ (CLEC4C ⁺) CD304 ⁺ (neurofilina ⁺) CD123 ⁺ (IL-3R ⁺)	B220 ⁺ Siglec H ⁺
Derivadas de monocitos		CD14 ⁺ CD209 ⁺ (DC-SIGN ⁺) Factor XIII A ⁺	CD11b ⁺ CD64 ⁺ (tejidos periféricos) CX3CR1 ⁺ CD14 ⁺
		DCs inflamatorias CD1c ⁺ CD16 ⁻	moDC CD209 ⁺ (DC-SIGN) CD206 ⁺

I. II. FUNCIONES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dada su calidad de células APCs profesionales, las DCs se han considerado puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Las funciones inmunológicas que se han comprobado en DCs, mismas en las que participan como APCs, son:

- **Inicio de las respuestas de células T.** Además de su elevada capacidad para estimular linfocitos T, las DCs son las únicas APCs capaces de estimular linfocitos T *naïve*, por ello resultan esenciales en la respuesta inmunológica hacia diversos patógenos. DCs localizadas en mucosas se encargan de capturar antígenos de microorganismos y llevarlos consigo hasta los nódulos linfáticos. Los linfocitos T *naïve*, llegan desde la sangre hasta los nódulos linfáticos, donde se encuentran con las DCs que llegaron desde los tejidos periféricos acarreando antígenos. Además de poseer la capacidad única de estimular linfocitos T *naïve*, son las células con la mayor eficiencia para estimular linfocitos T de memoria [22, 23] La presentación antigénica a células T CD4⁺, culmina con la polarización de las mismas a alguno de los tipos de células T efectoras: células cooperadoras 1 (Th1), que participan en las respuestas contra bacterias intracelulares; Th2, con importancia en la respuesta a infecciones parasitarias; Th17 con papel en la defensa contra hongos, bacterias extracelulares e incluso desarrollo de autoinmunidad. La polarización de linfocitos T es multifactorial y se encuentra determinada por la compleja interacción entre APCs y linfocitos T, las moléculas coestimuladoras que median dicha interacción, citocinas predominantes en el microambiente, así como por el tipo y cantidad del antígeno presentado [24]. Por otro lado, antígenos presentados por DCs en moléculas MHC-I a linfocitos T CD8⁺ *naïve*, culminan con la diferenciación de éstos hacia linfocitos T citotóxicos (CTLs) antígeno específicos, con participación activa, principalmente, en infecciones virales [25].
- **Tolerancia central.** Las DCs no sólo son de importancia en la defensa contra microorganismos; las DCs también participan en mantener la tolerancia inmunológica durante la homeostasis. En el timo, el mecanismo mediante el cual las DCs participan en procesos de tolerancia, es mediante la presentación de antígenos propios para que se lleve a cabo la selección negativa de timocitos. Las DCs que residen en el timo, adquieren antígenos de las células tímicas epiteliales para presentarlos a los timocitos y poder eliminar los timocitos con elevada afinidad por antígenos propios. Un mecanismo más mediante el que las DCs contribuyen a la tolerancia central es mediante la recirculación de DCs periféricas al timo donde

presentan antígenos propios y de esta manera, inducen la delección clonal y la generación de linfocitos T reguladores (Treg) [22, 26].

- **Tolerancia periférica.** La participación de las DCs en la tolerancia periférica puede llevarse a cabo bajo dos vertientes: 1) DCs que han internalizado cuerpos apoptóticos en la periferia y que no se encuentran maduras, son capaces de dirigirse a nódulos linfáticos donde pueden realizar presentación de antígenos propios. 2) Las DCs migran a sitios de inflamación para activar linfocitos Treg que suprimen a linfocitos T autorreactivos, evitando, de esta forma, respuestas autoinmunes patogénicas [22, 27].

I. II. I. PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

La principal función de las DCs es la presentación antigénica a linfocitos T (Fig. 4), capacidad que no es constitutiva de DCs. Generalmente, la presentación eficiente de antígenos requiere de características especiales en las DCs, de forma que para llevarse a cabo, es necesario que la célula sufra cambios fenotípicos y funcionales que la hagan competente para llevar a cabo esta función. El proceso durante el que llevan a cabo estos cambios, comúnmente se denomina maduración.

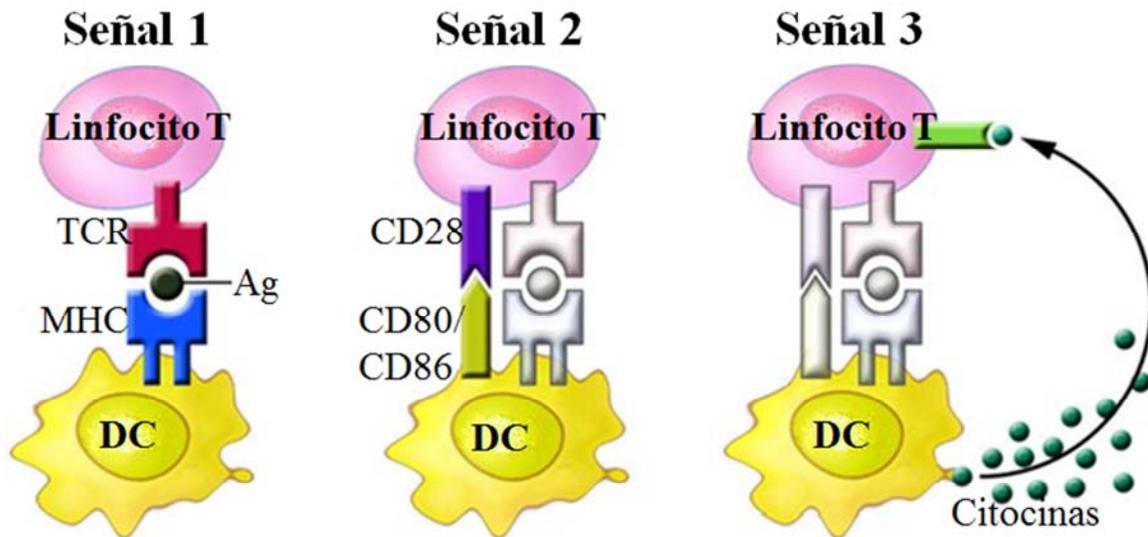


Figura 4. Presentación antigénica. La activación de linfocitos mediante la presentación antigénica requiere de tres señales. La señal 1 consta de la interacción de péptidos derivados del antígeno (Ag) procesado unidos a moléculas del MHC, con el receptor TCR del linfocito. La señal 2 está dada por la interacción de moléculas en la superficie de ambas células: el CD28 del linfocito entrega señales de activación al interactuar con CD80 y CD86 presentes en DCs; estas mismas moléculas pueden entregar señalización negativa si interactúan con la molécula CTLA-4. La señal 3 corresponde a citocinas que son percibidas por receptores para las mismas expresadas por el linfocito. (Modificado de la referencia [28]).

Ampliamente extendido se encuentra el concepto de que las DCs pueden encontrarse en dos estados funcionales: maduro e inmaduro, siendo este último en el que las DCs son capaces de iniciar respuestas inmunes, es decir, de estimular linfocitos T, resultando en la proliferación clonal de los mismos y en el inicio de respuestas inmunológicas adaptativas. El estado funcional maduro de una DCs, correlaciona con algunos cambios fenotípicos (maduración fenotípica) como el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas del MHC y CD40; sin embargo, recientemente se ha encontrado que no todas las DCs fenotípicamente maduras, promueven la inmunidad de células T, algunas, más bien, participan en la inducción de tolerancia. En la actualidad, el término “madura” para referirse a una DC no está homologado y puede tener diferentes acepciones dependiendo del grupo de investigación que lo utilice.

Comúnmente, se propone que luego de entrar en contacto con un estímulo de maduración, las DCs localizadas en tejido periférico capturan y procesan antígenos provenientes de dicho estímulo, al mismo tiempo migran a órganos linfoides secundarios mientras disminuyen su capacidad para internalizar antígeno, y se tornan más eficientes para estimular a linfocitos T [5].

Las DCs son capaces de internalizar antígenos propios y ajenos mediante diversos mecanismos: macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor—mediante la participación de lectinas tipo de C como el receptor de manosa (MR/CD206), DEC-205 (CD205) o receptores para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas (FcRs)— o mediante fagocitosis [5, 29].

De manera común, la disminución de la endocitosis en DCs, se reconoce como característica de la maduración de dichas células, pues se considera que al internalizar antígeno, las DCs se estimulan de tal forma que disminuyen su capacidad de realizar internalización subsecuente. La disminución en esta función evita que se monten respuestas inmunológicas contra antígenos propios luego de que se han internalizado antígenos patogénicos y se han desencadenado cambios que favorecen la activación de linfocitos; sin embargo, no todos los procesos de internalización disminuyen en la misma medida ni con la misma cinética en respuesta a la internalización antigénica. Procesos como la fagocitosis, en efecto, disminuyen luego de la activación de DCs; otros como la macropinocitosis, también disminuyen, aunque, inmediatamente después de que la DC es estimulada mediante señales inflamatorias, la capacidad macropinocítica se incrementa y es posteriormente, cuando disminuye. Otros procesos de internalización como la endocitosis mediada por receptores tales como los receptores para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas de tipo G (FcγRs) y DEC-205, continúan llevándose a cabo de manera eficiente, aun cuando la DC ha recibido alguna señal de estimulación [29]. Y aunque

el concepto más extendido es que todos los procesos de internalización disminuyan una vez que la DC ha sido activada, las DCs maduras siguen siendo capaces de internalizar antígenos a través de procesos como la endocitosis [5, 29].

Además de la disminución en su capacidad de internalización antigénica, otros de los cambios fenotípicos que se inducen en las DCs luego de la captura de antígeno, son la modificación en la capacidad de adherencia y la reorganización del citoesqueleto con la finalidad de incrementar la capacidad migratoria de la célula.

Para que se lleve a cabo la migración, se requiere de la acción coordinada de quimiocinas, por lo que una vez capturado el antígeno, las DCs disminuyen la expresión o desensibilizan receptores para quimiocinas como la quimiocina 20 con motivo C-C (CCL20/MIP-3 α), CCL3 y CCL5 al tiempo que aumenta la expresión de receptores para otras quimiocinas, tal es el caso del receptor 7 para quimiocinas con motivo C-C (CCR7), además de que se tornan más sensibles a quimiocinas como MIP-3 β (ELC, Exodus 3), CCL19, CCL21 y la quimiocina de tejido linfoide secundario (SLC/quimiocina con 6 cisteínas 6Ckine/Exodus 2), que, dada su elevada expresión en vasos linfáticos, permite que las DCs viajen a través de ellos hasta llegar a nódulos linfáticos. Una vez en los nódulos linfáticos, las DCs se dirigen específicamente a la paracorteza, esto gracias a la presencia de MIP-3 β y 6Ckine secretadas en esta zona [30, 31].

Una vez estimuladas, las DCs, también son capaces de secretar quimiocinas cuyo blanco son otros tipos celulares. *In vitro* se ha identificado que las primeras quimiocinas producidas por DCs que han reconocido estímulos de maduración son la quimiocina 1 con motivo C-X-C (CXCL1), CXCL2, CXCL3 y CXCL8 (IL-8), las tres primeras actuando sobre células asesinas naturales (NKs) y la última en neutrófilos. Luego de aproximadamente cuatro horas de haberse estimulado, las DCs secretan CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL3, CCL4 y CCL5 que reclutan células T de memoria y monocitos. En tiempos más tardíos, se secretan CXCL3, CXCL19, CCL21 y CCL22, que tienen efecto sobre linfocitos B y T cooperadores foliculares, linfocitos T *naïve* y Treg, respectivamente [32]. Sin embargo, no todas las DCs localizadas en órganos linfoides secundarios se encuentran en estado maduro, algunas de las DCs localizadas en estos sitios se encuentran en estado de reposo y provienen directamente de precursores de médula ósea, no de DCs de órganos periféricos [5].

Al tiempo que las DCs migran hacia los nódulos linfáticos, van realizando el procesamiento del antígeno. Antes de capturar antígeno, las DCs acumulan moléculas del MHC-II formando complejos

con la cadena Ii en compartimentos intracelulares denominados compartimentos ricos en MHC- II (MIICs). Al capturar el antígeno, éste se dirige hacia los MIICs, donde moléculas HLA-DM promueven la remoción de la cadena invariante asociada a MHC-II, para que péptidos derivados del antígeno internalizado queden cargados en las moléculas MHC-II. Al internalizar antígenos, la síntesis de MHC-II y traslocación de ésta en complejos con el antígeno a la superficie celular, se incrementa y se estabiliza, de tal forma que los antígenos permanecen expuestos en la superficie celular varios días, disponibles para interactuar con los receptores de los linfocitos T (TCRs) y estimular linfocitos T CD4⁺ [30, 31]; la interacción entre moléculas del MHC-péptido con TCR, constituyen la primera señal de activación para el linfocito y por sí sola es insuficiente para activar a los linfocitos. La estimulación de linfocitos T CD8⁺ ocurre cuando les son presentados antígenos que son cargados en moléculas MHC-I mediante procesamiento endógeno o exógeno. Moléculas distintas a las codificadas en el MHC, también participan en presentación de antígenos, aunque no necesariamente proteicos, tal es el caso de las moléculas pertenecientes a la familia de CD1, que participan en la activación de linfocitos T, durante la presentación de antígenos lipídicos [30, 33].

La excepcional capacidad de las DCs para estimular linfocitos T no depende únicamente de la elevada expresión y estabilidad de complejos MHC-antígeno en la superficie celular. La interacción específica de los TCRs de los linfocitos con los complejos MHC-antígeno y la asociación de las moléculas señalizadoras del complejo CD3 y cadenas ζ es tan sólo la primera señal de interacción entre los linfocitos y las DCs, su estabilidad está mediada por diversas moléculas de adhesión, como las integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ o por miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas CD2, CD50, CD54, y CD58. Las moléculas encargadas de mantener la activación de las células T (segunda señal), a través de señales de supervivencia y proliferación, son las moléculas coestimuladoras, entre ellas se encuentran miembros de la familia de proteínas B7 (CD80 y CD86) que se unen a CD28 en las células T. El ligando del coestimulador inducible de células T (ICOSL/CD275) también actúa como coestimuladora al unirse al coestimulador inducible de células T (ICOS/CD278) en la superficie de los linfocitos T. Otras moléculas coestimuladoras pertenecen a la superfamilia TNF como el ligando de CD137, CD252 y CD70 que se unen a receptores de proteínas de la superfamilia TNF como CD137, CD134 y CD27; generalmente, la expresión de estas últimas moléculas se induce luego de la estimulación de TCR y de CD28. Sin embargo, la segunda señal no siempre es dada por moléculas coestimuladoras, las DCs pueden expresar moléculas denominadas coinhibidoras cuya consecuencia al interactuar con linfocitos T, es inhibir la activación de éstos. Los linfocitos T expresan receptores de coinhibición como los

miembros de la familia de CD28: como el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4/CD152) y la proteína 1 de muerte celular programada (PD-1/CD279). La expresión de ambas moléculas se induce sólo después de la estimulación de la célula mediante antígeno. Mientras que CTLA-4 es capaz de unirse a CD80 y CD86, PD-1 se une a sus ligandos PD-L1 (CD274) y a PD-L2 (CD273). La relevancia fisiológica de la señalización desencadenada por el estímulo de estas moléculas reside en la prevención de autoinmunidades, así como de la respuesta inmunológica desregulada ante infecciones [30, 33, 34].

Finalmente, existe una tercera señal que determina el destino de los linfocitos T estimulados por una DC. Esta señal está constituida por factores solubles (citocinas, factores estromales, etcétera) que dirigen la polarización de los linfocitos. El reconocimiento del antígeno, junto con la coestimulación y la estimulación a través de mediadores solubles, conducen a la polarización (hacia Th1, Th2, Th17, Treg), a la estimulación de CTLs y a la expansión clonal de linfocitos, así como a su diferenciación en células T efectoras y en células T de memoria [5, 35].

De manera general, las moléculas que proporcionan la primera y la segunda señal de activación para los linfocitos T, aumentan su expresión en la superficie de DCs que han sido estimuladas mediante el reconocimiento de antígenos, es por ello que se ha vuelto común utilizarlas como indicadores de maduración, pasando por alto el hecho de que una alta expresión de estas moléculas no necesariamente correlaciona con la capacidad de DCs para iniciar respuestas inmunológicas por linfocitos T. DCs estimuladas y con elevada expresión de estas moléculas pueden inducir tolerancia inmunológica. Esta situación representa uno de los motivos por los que el término “madura” ha adoptado diferentes significados en el contexto de las DCs. Un significado más adecuado del término “madura” para denominar a una DC sería el que corresponde al sinónimo de inmunogénica. Las DCs inmunogénicas son aquellas capaces de activar linfocitos T CD4⁺, de inducir respuesta en CTLs y de dirigir la diferenciación o polarización de linfocitos Th (en general) y que éstos resulten funcionales y no sólo son capaces de inducir su proliferación; estrictamente, sólo una DC que sea capaz de llevar a cabo estas funciones, podría ser denominada madura o inmunogénica [34].

Históricamente y de manera no muy adecuada, el término “inmaduras” se ha empleado para referirse tanto a DCs en reposo —células que son ignoradas por linfocitos—, como a DCs que inducen tolerancia; a estas últimas, también se les ha llamado “DCs semimaduras” o “DCs maduras tolerogénicas”. Actualmente se sabe que existe la posibilidad de que DCs participen en procesos

tolerogénicos sin la necesidad de reconocer estímulos externos; sin embargo, en muchos casos, la capacidad de inducir tolerancia por DCs se consigue como consecuencia del reconocimiento de estímulos específicos. Sólo en este último caso, sería aceptable denominar a tales células “maduras tolerogénicas”. En tanto que el término “tolerogénicas” resulta adecuado para referirse a ambos grupos de células. Considerando lo anterior, el vocablo “inmadura” podría emplearse más acertadamente para hacer referencia a las DC es reposo, aunque se ha demostrado que la presentación de antígenos por LCs en estado basal, no necesariamente resulta en inactivación de linfocitos T; en algunos casos puede resultar en inducción de respuestas inmunológicas [5].

Por otro lado, el término “maduras” se ha usado para aludir tanto a DCs inmunogénicas (también llamadas DCs activadas) [34], así como a DC tolerogénicas, empleándose con mayor frecuencia y amplitud para denominar a las primeras (Fig. 5).

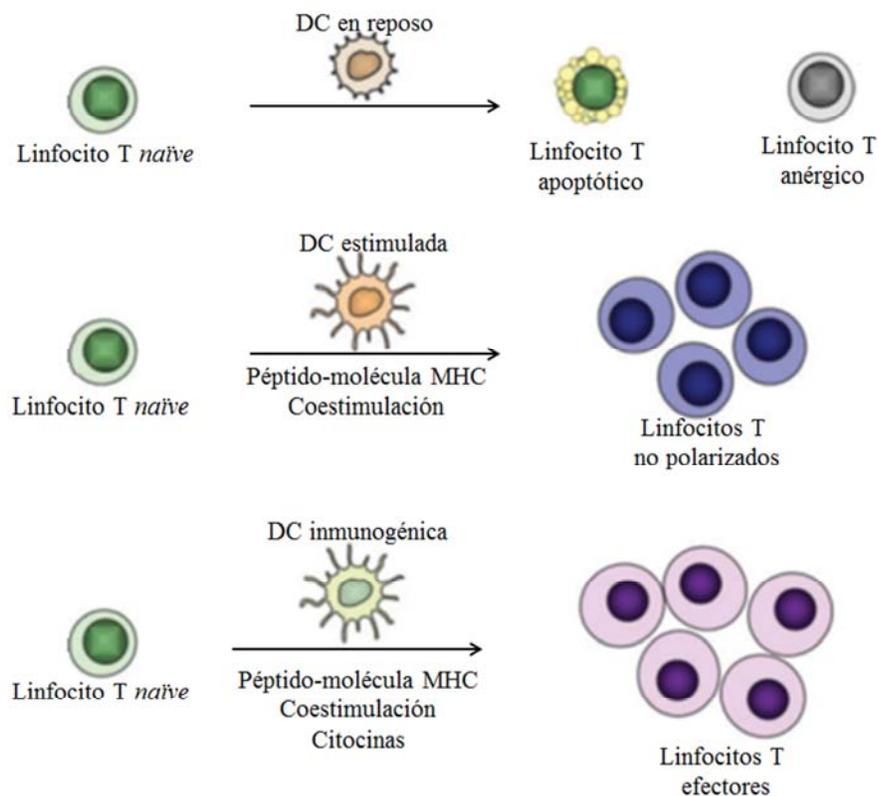


Figura 5. Resultado fisiológico de la estimulación de linfocitos T *naïve* con DCs en diferentes estados funcionales. La estimulación de linfocitos T *naïve* por una DC en reposo no es productiva, por lo que el linfocito muere por apoptosis o entra en anergia. DCs estimuladas que interactúan con linfocitos T *naïve* a través de la primera y segunda señal, inducen la expansión clonal de linfocitos, pero no la polarización de éstos. Solo la interacción de DCs con linfocitos T *naïve* a través de las tres señales de activación, los conducen a linfocitos efectores. (Modificado de la referencia [34]).

En ocasiones, sólo tomando en cuenta características fenotípicas como expresión de moléculas de superficie o producción de citocinas [36] se ha considerado que las DCs se encuentran en estado maduro, empleando esta definición como equivalente a DC inmunogénicas. Las DCs estimuladas con mediadores inflamatorios suelen denominarse “maduras” [37] —aunque actualmente se sabe que la única forma de llevar una DC a estado maduro es mediante su estimulación con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [34]—, “semimaduras” o “parcialmente maduras” [38]; de forma más acertada se les llama “parcialmente activadas” [34].

En este trabajo, en adelante, para hacer referencia a una “DC madura (mDC)” o “DC inmunogénica”, se utilizará el primero de estos términos. En tanto que al emplear el término “estimulación”, que se empleará como sinónimo de “activación” de DCs, se hará con la intención de señalar que las DCs han reconocido un estímulo, sin hacer distinción entre el efecto funcional que tienen sobre las células, es decir, sin importar si dicho estímulo las torna inmunogénicas, tolerogénicas o parcialmente activadas.

Dada la heterogeneidad de las DCs, así como las diferencias entre los modelos *in vivo* e *in vitro*, puede esperarse que no todas las subpoblaciones de DCs *in vivo*, se comporten de la misma forma después de haber sido estimuladas y que, no necesariamente, luego de la estimulación de las DCs se presenten todos los fenómenos biológicos antes mencionados o que se presenten de la misma forma [5].

I. III. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

El reconocimiento de estímulos en el microambiente, que se realiza a través de la interacción de ligandos con receptores de DCs, es necesario para que las DCs lleven a cabo sus funciones inmunológicas. En ausencia de un estímulo externo, las DCs se encuentran en un estado no estimulado como células en reposo. Como ya se mencionó, en respuesta a algunos estímulos, las DC sufren cambios fenotípicos y funcionales mediante los cuales se tornan APCs eficientes.

Las DCs son capaces de responder a dos tipos de señales: 1) Señales exógenas, constituidas por PAMPs, que son directamente reconocidas por las DCs y 2) señales endógenas, que son compuestos del propio hospedero, tales como citocinas y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que

pueden producirse por las propias DCs o por otros tipos celulares en condiciones de estrés; el reconocimiento de tales señales endógenas, finalmente conduce a una activación indirecta o estimulación “*trans*” (Fig. 6). Y aunque muchos estímulos inducen cambios fenotípicos asociados con la maduración de las mDCs no todos generan los mismos cambios funcionales, ni las tornan inmunogénicas; más bien, el reconocimiento directo de PAMPs por DCs, es la acción fundamental para que se pueda efectuar una respuesta inmunológica mediante células T, mientras que la estimulación indirecta de las DCs, ocasionada por el reconocimiento de mediadores inflamatorios sólo amplifica la respuesta a PAMPs.

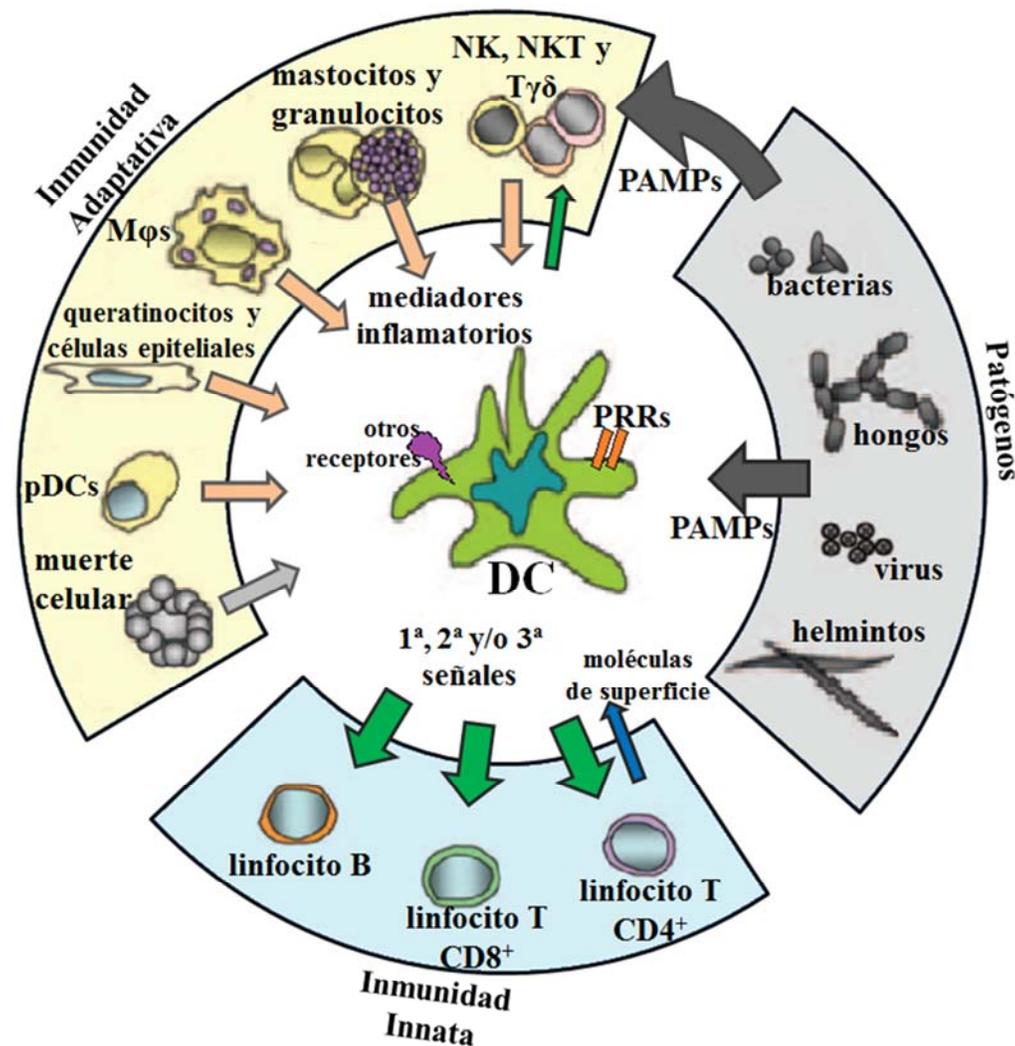


Figura 6. Estímulos involucrados en la activación de DCs. Estímulos externos provenientes de patógenos pueden activar directamente a DCs a través de inducir señalización por PRRs. Estos mismos estímulos activan otras células de la inmunidad innata y a su vez, estas células producen estímulos endógenos (mediadores inflamatorios) que pueden activar a las DCs de manera *trans* a través de distintos receptores. Una DC activada puede interactuar con linfocitos, amplificando la señal inmunológica. A su vez, los linfocitos retroalimentan a DCs mediante contacto por moléculas de superficie o solubles. (Modificado de la referencia [32]).

El tipo de respuesta que resulte de la activación de las DCs, depende de la naturaleza y de la intensidad de la señal que perciban las células, así como de su duración y, esto a su vez, está determinado por el tipo de receptores que se activen en la DC durante el reconocimiento. Es importante destacar que, diversas subpoblaciones de DCs poseen diferente repertorio de receptores en su superficie [1, 33, 39-41].

Durante la activación de DCs se ha reportado la participación de a) receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), b) receptores para citocinas, c) moléculas de la familia del receptor de TNF, d) FcRs y e) receptores para señales endógenas de daño (Fig. 6).

a) Las estructuras conservadas entre diversos microorganismos, denominados PAMPs, son reconocidos por PRRs. La combinación de patrones que posee cada microorganismo es distinta, de forma que distintos microorganismos poseen la capacidad de estimular diferentes PRRs en las DCs. Los PRRs se han clasificado dentro de tres grandes familias de moléculas:

- 1) TLRs. En DCs humanas, de sangre periférica, se ha identificado la expresión de TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8 y TLR10; en las pDCs se ha demostrado la expresión de TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 y TLR10; mientras que las LCs expresan TLR1, TLR2, TLR3, TLR6, y TLR10
- 2) Los receptores tipo lectina de tipo C (CLRs). Las DCs expresan una diversa gama de CLRs que reconocen residuos carbohidratados presentes en glicoproteínas y están involucrados principalmente en captura e internalización de antígenos. La estimulación de DCs en reposo, tanto *in vitro* como *in vivo*, llevada a cabo exclusivamente a través de CLRs permite el desarrollo de tolerancia inmunológica. De forma análoga a los TLRs, distintas subpoblaciones de DCs expresan diferentes CLRs, así por ejemplo, se ha detectado la expresión de BDCA-2 en pDCs, de CD207 en LCs y de DC-SIGN en DCs intersticiales.
- 3) Receptores tipo dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NLRs). Estos receptores que pueden detectar PAMPs (como fragmentos de peptidoglicano o RNA exógeno) y DAMPs (como ácido úrico) y que pueden dar lugar al ensamblaje del inflamasoma se expresan en DCs, ejemplo de ello son NOD-1 y NOD-2 cuya

estimulación concomitante con TLR4 resulta sinérgica en moDCs. Otras subpoblaciones de DCs como LCs, expresan otros NLRs como el receptor 1 que contiene los dominios NACHT, LRR y pirina (NALP1), e incluso, una isoforma de NALP3 se ha identificado como específica para DCs [32, 39, 42-44].

- b) Las DCs están dotadas de receptores para citocinas como TNF- α , IL-1 β e IFNs de tipo I, que se secretan como respuesta a patógenos; sin embargo la señalización que se produce luego de la activación de éstos, aunque necesaria para montar respuestas inmunológicas, sólo es capaz de amplificar la señal que se produce por la estimulación de PRRs. La sola estimulación de DCs a través de citocinas pro-inflamatorias ha demostrado ser insuficiente para obtener DCs inmunogénicas. *In vitro*, han sido observadas algunas características fenotípicas que se modifican con la activación de DCs en respuesta a la estimulación con estos mediadores inflamatorios, tales como el incremento en la expresión de marcadores. Sin embargo, también se ha demostrado que dichos mediadores son necesarios para determinar el tipo de respuesta que se obtenga tras la activación de PRRs y tienen influencia sobre el potencial inmunogénico de las DCs, amplificando la activación de estas células [34]. Si bien es cierto que la activación de DCs *ex vivo* a través del uso exclusivo de un coctel de citocinas ha resultado en incremento en la expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígeno (CD80, CD83, CD86 y HLA-DR), disminución de la capacidad endocítica, producción de IL-12 y activación de linfocitos en reacciones mixtas leucocitarias (MLRs); *in vivo* no se han obtenido DCs inmunogénicas capaces de iniciar respuestas de células T CD4⁺ al estimularlas exclusivamente con citocinas [32, 34, 36, 39, 40, 42].
- c) Cuando interactúan una DC y un linfocito T, no sólo la DC activa al linfocito, sino que los linfocitos T, a través de moléculas de la familia del receptor TNF, como el ligando de CD40 (CD40L), el ligando de Fas (FasL) o el ligando de OX40 (OX40L) que interactúan, respectivamente, con CD40, Fas (CD95) u OX40 (CD134) expresados en las DCs son capaces de activar a estas últimas [32, 39, 42].
- d) En DCs murinas, se ha identificado la expresión de Fc γ RI (CD64), Fc γ RIII (CD16) y de Fc γ RII (CD32), mientras que en moDCs se han podido detectar Fc γ RII (CD32) y los receptores para la fracción cristalizable de inmunoglobulinas de tipo A (Fc α R/CD89); las

LCs expresan Fc γ RI and Fc ϵ RI (CD23). Y aunque la sola estimulación de los FcRs es insuficiente para que la DC se torne inmunogénica, se sabe que la señalización que se inicia al estimular FcRs resulta en la modulación de funciones de las DCs. La internalización de complejos inmunes a través de estos receptores e incluso, el sólo entrecruzamiento de los FcRs activadores, que poseen el motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM), además de permitir el procesamiento y presentación antigénica, activa vías de señalización en las que participan cinasas de tirosina como las de la familia de las proteínas no receptores con actividad de tirosina cinasa (Src) o la tirosina cinasa de bazo (Syk). Esto resulta en un incremento en la expresión de marcadores de maduración, así como en la presentación antigénica a linfocitos [45-48]. Van Egmon y colaboradores identificaron la existencia de sinergismo, dependiente de la señalización a través del motivo ITAM y la proteína codificada en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), en la producción de citocinas proinflamatorias al estimular moDCs con *Escherichia coli* opsonizada con inmunoglobulinas de tipo G (IgG), respecto a la estimulación de DCs con la bacteria sin opsonizar [49].

- e) Como ya se ha mencionado, las DCs, no sólo son capaces de responder a estímulos externos, también reconocen señales endógenas que se liberan en condiciones de estrés, durante infecciones virales o durante algunos tipos de muerte celular. Estas señales de daño, actúan como adyuvantes, estimulando las respuestas inmunológicas primarias. Siendo de origen endógeno, estas señales pueden llegar actuar como iniciadores del rechazo de trasplantes, durante la regresión espontánea de tumores e incluso, desencadenar autoinmunidades. En ocasiones, las señales de daño semejan PAMPs, de forma que pueden ser reconocidas por PRRs, esto se ha encontrado para moléculas como productos de degradación del hialuronato, fibronectina A, fibrinógeno, proteínas de choque térmico (HSP) y β -defensinas; sin embargo, no todas las señales de daño son similares a PAMPs. Moléculas como bradiquininas, a través de receptores de bradiquininas y nucleótidos como ATP a través de su reconocimiento por receptores purinérgicos, participan en el establecimiento de repuestas tipo Th1 al permitir la producción de IL-12 en DCs [1]. Matzinger y colaboradores demostraron que la internalización de restos necróticos, pero no apoptóticos por DCs, induce activación tanto fenotípica como funcional en estas células [50]. El efecto de células necróticas sobre DCs, se ha atribuido a moléculas como

HSP90B1, HSP90 y HSC70 y, aunque CD91 ha sido identificado como receptor para estas proteínas, se desconoce si está involucrado en la activación de DCs por células necróticas [32, 39, 42].

Como se señaló previamente, algunas de estas señales conducen solo a la activación parcial de las DCs, resultando en células que no son inmunogénicas. Las DCs estimuladas únicamente a través de mediadores proinflamatorios incrementan la expresión de marcadores como CD86, CD40 y CCR7, sin embargo, no producen suficientes cantidades de citocinas proinflamatorias, lo que finalmente, repercute en su capacidad para inducir diferenciación de células T CD4⁺ *naïve*. Las DCs así estimuladas, provocan la expansión de linfocitos T CD4⁺, pero éstos son incapaces de producir IL-4 o IFN- γ e incapaces de colaborar con células B. Un escenario similar se ha observado durante la estimulación de linfocitos T CD8⁺; al estimular éstos con DCs activadas directamente a través de ligandos de TLRs, se obtiene proliferación y supervivencia de linfocitos T CD8⁺ *naïve*, así como la diferenciación de los mismos a CTLs; en tanto que los linfocitos T CD8⁺ *naïve* estimulados con DCs activadas en forma *trans* (a través de mediadores inflamatorios producidos por otras células) ocasionando la proliferación, pero no la supervivencia ni la diferenciación hacia CTLs de los linfocitos T CD8⁺ *naïve* [34, 51].

I. III. I. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

La estimulación de receptores en DCs desencadena eventos de señalización específicos que modulan funciones celulares como la producción de citocinas, la internalización de antígenos, la ruta intracelular del procesamiento antigénico o la producción de especies oxidativas, de forma tal que se permita el desarrollo de la respuesta inmunológica. Asimismo, la coestimulación de diferentes receptores resulta en procesos celulares sinérgicos o inhibidores que determinarán la respuesta inmunológica a montar [52-54].

Diversos estímulos captados por DCs resultan en la activación de diversas vías de señalización (Fig. 7). Las principales vías involucradas en la activación de DCs son la del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y las de las proteínas cinasas activadas

por mitógenos (MAPKs). Igualmente, y aunque estudiadas en menor grado, vías como las de la cinasa Janus y de transductores de señales y activadores de la transcripción (Jak/STAT) también tienen participación en la activación de las DCs [39, 55, 56].

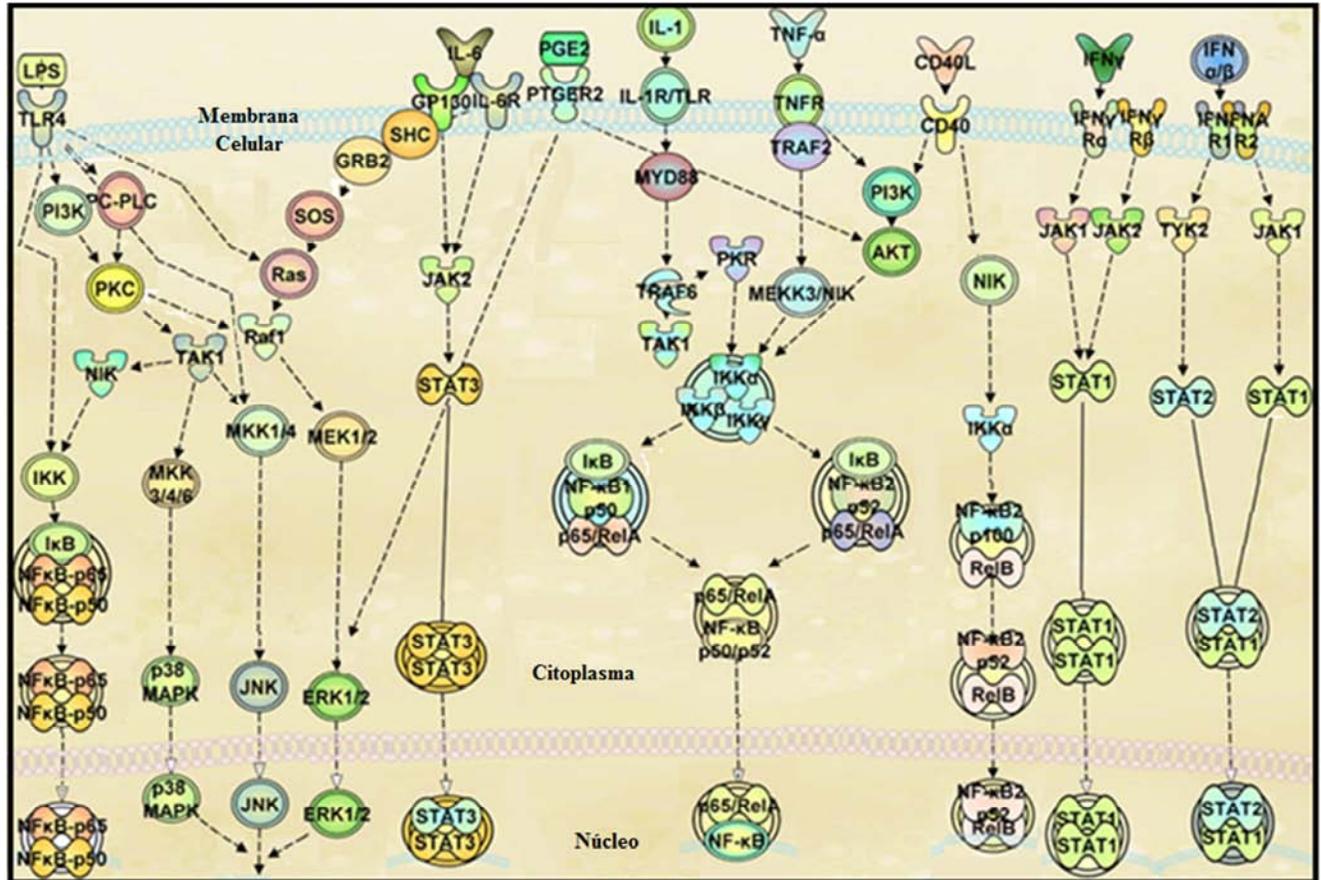


Figura 7. Vías de señalización activadas en DCs. Diferentes estímulos extracelulares activan vías de señalización diversas (NF-κB, MAPKs y Jak/STAT). La interacción entre las moléculas que señalizan en estas vías puede resultar en efectos antagónicos o sinérgicos sobre las funciones celulares. (Modificado de la referencia [55]).

La activación de la vía del NF-κB, en DCs, puede conseguirse al estimular PRRs mediante sus diferentes ligandos. Finalmente, esta señalización culmina en el incremento de la expresión de moléculas como CD80, CD83, CD86 y CCR7 en la superficie de las DCs y también permite la remodelación en el citoesqueleto de actina.

Watts y colaboradores observaron que en células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea (BMDCs), la señalización a través de TLR4 puede realizarse en forma dependiente o independiente de MyD88. En el caso de la señalización a través de MyD88, se recluta la molécula

adaptadora de MyD88 (MAL) y el factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6), con la posterior participación de miembros de la familia de la cinasa asociada al receptor de IL-1 (IRAK). La estimulación con lipopolisacárido (LPS) también puede activar otros factores como el factor de transcripción reagulatorio 3 (IRF3) y otras vías como la de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK), aunque esta activación es mucho menor en comparación con la activación inducida sobre otras cinasas de la familia de las MAPKs [57, 58]. En cuanto a otros TLRs, la señalización iniciada por el estímulo de TLR2 y TLR9, es completamente dependiente de MyD88; contrariamente, la señalización por TLR3, al igual que en otros tipos celulares, no depende de dicha molécula adaptadora, sino más bien la señalización se lleva a cabo con la participación del adaptador que contiene el dominio homólogo a *Toll*/IL-1R e induce IFN- β (TRIF). Para definir la necesidad de la presencia de MyD88, se han realizado experimentos en DCs deficientes de MyD88; al estimular éstas a través del TLR4, son capaces de incrementar la expresión de CD40, CD80 y CD86, así como de estimular linfocitos T CD4⁺, gracias a que la señalización por TLR4 puede realizarse de forma independiente de MyD88. Esto que sugiere que MyD88 no es imprescindible en todos los cambios que acompañan la maduración, sin embargo, aunque algunas características permanecen inalteradas en DCs carentes de esta proteína adaptadora, procesos como la producción de citocinas, se ve afectados por su ausencia [58-62]. Alternativamente, la vía de NF- κ B puede activarse a partir de la estimulación de otros PRRs como los RLRs RIG y MDA5 [62].

Grupos de trabajo como el de Rescigno y el de Khwaja demostraron que el tratamiento de DCs inmaduras con LPS activa diferentes vías de señalización. El efecto del LPS en la expresión de MHC-II y CD86 en la superficie de DCs es regulado por la vía de NF- κ B, en tanto que la expresión de moléculas como CD80, CD83 y también de CD86, depende de la activación de la isoforma α de p38MAPK, lo que ulteriormente, conduce a la activación del factor de transcripción activador 2 (ATF-2) y del elemento de unión en respuesta al AMP cíclico (CREB). La isoforma α de p38MAPK también tiene participación en la activación de DCs cuando éstas se estimulan usando DNA CpG. Por otro lado, independientemente de la traslocación de NF- κ B al núcleo, la supervivencia de DCs estimuladas con LPS, depende tanto de la activación de las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), específicamente, mediante su fosforilación por la cinasa de la cinasa de proteínas activadas por mitógeno (MAPKK), como de la fosforilación de la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) [57, 63].

CLRs como dectina 1, señalizan a través de su motivo tipo ITAM, lo que posibilita el reclutamiento de Syk, lo que conduce al posterior reclutamiento de la proteína 9 que contiene el dominio de reclutamiento de caspasa (CARD9), que junto con la proteína 1 de traslocación del linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT1) y la proteína del linfoma de células B/linfoma 10 (BCL10) activan a NF- κ B, lo que conduce a la producción de citocinas como IL-10, TNF- α e IL-12.

En el caso de DC-SIGN, a pesar de no poseer motivos ITAM ni motivos de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM), se ha observado que su estimulación conduce a la activación de la cinasa de serina/treonina (Raf-1), con la posterior activación de ERK e incluso, se ha evidenciado que puede llevar a la activación de proteínas codificadas por la familia de genes homólogos a Ras (Rho-GTPasas) [54].

La activación de DCs a través de CD40 requiere del reclutamiento de CD40, de TRAF2/3 y de cinasas de la familia Src hacia dominios ricos en colesterol de balsas lipídicas de la membrana celular, de esta forma se permite la activación de p38MAPK a través de TRAF2/3, mientras que Src cinasas como Lyn, activan a ERK.

Interferones, tanto de tipo I como de tipo II, llevan a la activación de STAT-1 e IRF-1, y puesto que la señalización inducida por IFN es dependiente del tipo celular y del tiempo en el que la célula sea estimulada, en células en reposo, interferones de tipo I conducen a la fosforilación de STAT y de STAT 4 en DCs activadas [55].

El TNF- α también activa de manera importante componentes de las vías del NF- κ B, de las ERKs, de JNK y de la p38MAPK. Ionóforos de calcio estimulan DCs mediante la activación de calmodulina y calcineurina, lo que finalmente lleva a la activación de NF- κ B. Por otra parte, la estimulación de FcRs en DC conlleva a la fosforilación de Syk y ERK, siendo Syk indispensable en la activación de DCs mediante complejos inmunes [39].

A pesar de que la estimulación de uno solo de los receptores expresados en DCs, es capaz de provocar cambios fenotípicos y funcionales en las DCs, se necesita de la cooperación entre múltiples receptores a fin de desarrollar una respuesta inmunológica efectiva, ya que la consecuencia funcional

de cada vía de señalización es estímulo específica, teniendo la posibilidad de actuar como regulador positivo o negativo de otras vías [52, 64].

Lanzavecchia y colaboradores se encuentran entre los pioneros del estudio de los efectos de la coestimulación de TLRs en DCs. Ellos mostraron que, en comparación la estimulación independiente de distintos TLRs, la estimulación tanto de TLR3 como de TLR4 en simultaneidad con la estimulación de TLR8, favorece el incremento en la secreción de IL-12 e IL-23 y en la expresión del ligando de Notch, Delta-4. Esto tiene como consecuencia un aumento en la capacidad de DCs para polarizar linfocitos hacia el tipo Th1 y en la duración de dicha capacidad [65]. De forma similar, la coestimulación de otras combinaciones de TLRs, como TLR3 ya sea con TLR5, o con TLR2/6, ocasiona un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, especialmente de IL-12 en moDCs [66]. Incluso se ha determinado que en ocasiones, es suficiente emplear concentraciones subóptimas de ligandos de múltiples TLRs para observar respuestas celulares que no son perceptibles cuando se realiza la estimulación de cada uno de esos receptores en forma aislada; ejemplo de ello es la estimulación simultánea de TLR3 y TLR7 con concentraciones subóptimas de sus respectivos ligandos, lo cual induce la producción de niveles suficientemente elevados de IL-12 e IL-27 por moDCs, lo que permite que se generen respuestas efectivas de tipo Th1 [52]. Mecanismos como los anteriores, también potencian las respuestas de linfocitos T CD8⁺, lo que se ve reflejado en un incremento en su proliferación, en la producción de citocinas y en su capacidad para aventajar la supresión inducida por Treg.

Los efectos sinérgicos resultantes de la coestimulación de diversos TLRs, no se limitan a la producción de citocinas; por estudios *in vivo*, se sabe que la expresión de marcadores de superficie también puede modularse positivamente en respuesta a la estimulación sincrónica de algunos TLRs. Entre los marcadores cuya expresión se ve favorecida se encuentran CD40 en respuesta a la coestimulación de las combinaciones TLR4 y TLR7/8, TLR2 y TLR3, TLR3 y TLR9, TLR3 y TLR4, TLR3 y TLR7/8; OX40L que se incrementa en respuesta a la coestimulación de TLR4 y TLR7/8, TLR2 y TLR3 o de TLR3 y TLR7/8 y CD86 por estimulación de TLR2 y TLR3 o de TLR3 y TLR7/8 [67].

De manera contrastante, otros trabajos han evidenciado que la coestimulación de distintos TLRs puede resultar antagónica, de forma tal, que el efecto de la estimulación de alguno de estos TLRs, se ve

atenuado por la estimulación de otro de ellos. Ejemplo de lo anterior se observa durante la estimulación de TLR2, que modula negativamente la producción de citocinas generadas por la estimulación de TLR4 y de TLR7/8, a pesar de tener efecto nulo sobre las citocinas producidas mediante la estimulación de TLR5. Un ejemplo específico de ello es la síntesis de IL-12p35 y de CXCL10 que se obtiene de la estimulación de TLR3 o de TLR4 y que se ve interrumpida cuando además de cualquiera de estos dos TLRs, se estimula TLR2 [52, 68].

Las consecuencias funcionales derivadas de la estimulación simultánea de diferentes tipos de PRRs también han sido estudiadas, principalmente, las que resultan de la estimulación concomitante de TLRs y CLRs.

En moDCs, la estimulación sincronizada de TLR3 con dectina-1, incrementa la expresión de CCR7 respecto a la mera estimulación de TLR3, además se incrementa la producción de IL-10, IL-23 e IL-12. En moDCs, se observó que si bien la estimulación independiente de dectina-1 y de TLR7/8 no induce producción de IL-12, la estimulación simultánea de ambos receptores, además de inducir IL-12, incrementa la expresión de IL-23 y de IL-10, que, aunque en menores niveles, ya logra inducirse con la sola estimulación de dectina-1 [52, 69].

DC-SIGN es capaz de regular positivamente la producción de IL-10 que se induce a partir de la estimulación de TLRs en DCs. Disminución en la producción de citocinas proinflamatorias se presenta al estimular CLR como DCIR que ejercen su efecto sobre IL-12 y TNF- α inducidos por la estimulación de TLR8.

Miembros de la familia de los NLRs también pueden actuar de forma sinérgica con la estimulación por TLRs. La estimulación de NOD1 o de NOD2 incrementa la inducción de IL-12p70 mediada por la estimulación de TLR3, TLR4 o de TLR9. Estos dos receptores NOD también presentan sinergismo sobre los efectos de la estimulación de TLR4 en DCs, obteniéndose linfocitos T con una producción elevada de IFN- γ cuando éstos son activados con DCs estimuladas por ambos receptores [52].

Incluso, la estimulación de otros receptores que no pertenecen a la familia de PRRs pueden modular las respuestas que parten de la estimulación de estos últimos.

La internalización de restos apoptóticos opsonizados con iC3b, a través de CD11b/CD18 (antígeno 1 de macrófagos/Mac-1 o receptor 3 del complemento (CR3)), dos horas previas a la estimulación de CD40 o de TLR4 en moDCs inhiben el incremento en la expresión de HLA-DR y de CD86 [70].

La producción de citocinas que se obtiene de la estimulación de pDCs con complejos inmunes que contienen DNA de pacientes con lupus eritematoso sistémico, se debe a la interacción entre las vías de señalización que parten de la estimulación de FcγRIIa (CD32) y de TLR9 [71].

En el caso de moDCs, la coestimulación FcγRIIa y de TLR2, resulta en el incremento de la secreción de las citocinas IL-1β e IL-23 en un moderado aumento de IL-10 y de IL-6; así como en un pronunciado incremento en la secreción de TNF-α. Esta última citocina también se ve altamente incrementada cuando los TLRs que se estimulan junto con FcγRIIa son TLR4, TLR3 o TLR7/8 [72].

Dunnen y colaboradores identificaron que en moDCs, la estimulación de FcγRIIa favorece las respuestas inmunológica tipo Th17 al aumentar la producción de IL-1β e IL-23 que se induce por la estimulación de TLR2, TLR4 o de TLR5. Específicamente, la estimulación de FcγRIIa, incrementa la transcripción de IL-1β y activa a la caspasa 1 que es la responsable del corte hacia la forma activa de la pro-IL-1β. Finalmente, el cultivo de DCs con linfocitos T CD4⁺, provoca un incremento en la producción de IL-17 por linfocitos cuando las DCs son activadas a través de ambos receptores [73].

Más allá de la coestimulación de PRRs, se ha recurrido a la estimulación simultánea de receptores que no pertenecen a esta familia. En un intento por recrear el microambiente proinflamatorio en el que se produce la activación de DCs en condiciones inflamatorias fisiológicas, se han empleado mezclas de citocinas para estimular DCs, lo que induce la activación de múltiples vías de señalización y cuyo efecto, no necesariamente es igual a la suma de las vías activadas por cada una de estas citocinas en forma independiente, debido a los efectos sinérgicos o antagónicos que se generan entre ellas. Es por ello que uno de los cocteles de maduración mayormente utilizados, incluso en la clínica durante terapia antitumoral, es el que consta de IL-1β, IL-6, TNF-α, y prostaglandina E₂ (PGE₂), citocinas que pueden obtenerse mediante la estimulación con LPS [55]. El uso de este coctel a partir de la activación de vías de señalización como las de MAPK, Jak/STAT y la del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) provoca un aumento en la expresión de los marcadores CD83, CD86, moléculas MHC-I y MHC-II, CCR7 y de la molécula 1 de adhesión intracelular (ICAM-

1), e induce proliferación en linfocitos T estimulados con estas DCs [37, 74]. Es importante destacar que aunque Enk y colaboradores observaron que la estimulación de linfocitos con DCs activadas a través de este coctel de citocinas, resultaba en linfocitos capaces de secretar IFN- γ [37]. A la fecha se sabe que es indispensable la estimulación de DCs a través de TLRs para obtener una activación completa de DCs y a su vez esto desencadene polarización de células T *naïve*, por ello, Reis y colaboradores sugieren que algunos de los efectos inmunogénicos obtenidos de estos estímulos podrían deberse a contaminación durante los experimentos con PAMPs [34] Y, si bien, este coctel induce la activación de la vía de NF κ B por la vía alternativa, que se desencadena por el reconocimiento de TNF- α , se ha observado que esta activación resulta insuficiente para que se desarrollen respuestas inmunológicas efectivas debido a la limitada producción de IL-12 y a la limitada capacidad de las DCs estimuladas de esta manera para estimular repetitivamente linfocitos T CD8⁺ [75]. Un inconveniente más se presenta con el uso de la PGE₂, pues aunque favorece la migración y retención de DCs en los nódulos linfáticos, induce la indolamina-2,3-desoxigenasa (IDO), así como el incremento en la producción de IL-10, afecta la producción de CCL19, impidiendo la atracción de linfocitos T *naïve*, además favorece la disminución en la producción de IL-12. Las características antes mencionadas favorecen respuestas tolerogénicas [55, 76].

II. AMINOPEPTIDASA N (CD13)

Entre las moléculas de superficie que expresan las DCs, con excepción de las pDCs [77], se encuentra la aminopeptidasa N (alanil aminopeptidasa/CD13/EC.3.4.11.2), que es una glicoproteína dimérica de membrana, conformada por 963 aminoácidos y con un peso aproximado de 160 kDa. Pertenece a la familia M1 de las metalopeptidasas y su actividad catalítica, dependiente de zinc, consiste en remover, mediante hidrólisis, aminoácidos, preferentemente de naturaleza neutra, del extremo N-terminal de algunos péptidos, con prioridad por residuos de alanina, fenilalanina y leucina [78, 79]. Cada monómero consta de siete dominios estructurales: un dominio citoplásmico correspondiente a la parte N terminal de la proteína que comprende tan sólo siete residuos, un dominio embebido en la membrana celular, otro rico en residuos de serina/treonina y el resto designados como dominios I, II, III y IV. En el dominio II se localizan tanto el sitio de unión a zinc (distinguido por el motivo consenso ³⁸⁸HEXXHX₁₈E⁴¹¹ característico de metalopeptidasas), como el sitio catalítico de la enzima (que presenta el motivo ³⁵²GXMEN³⁵⁶) (Fig. 8). Además de la forma anclada a membrana, se conoce una forma soluble de CD13 [78-81].

A.



B.

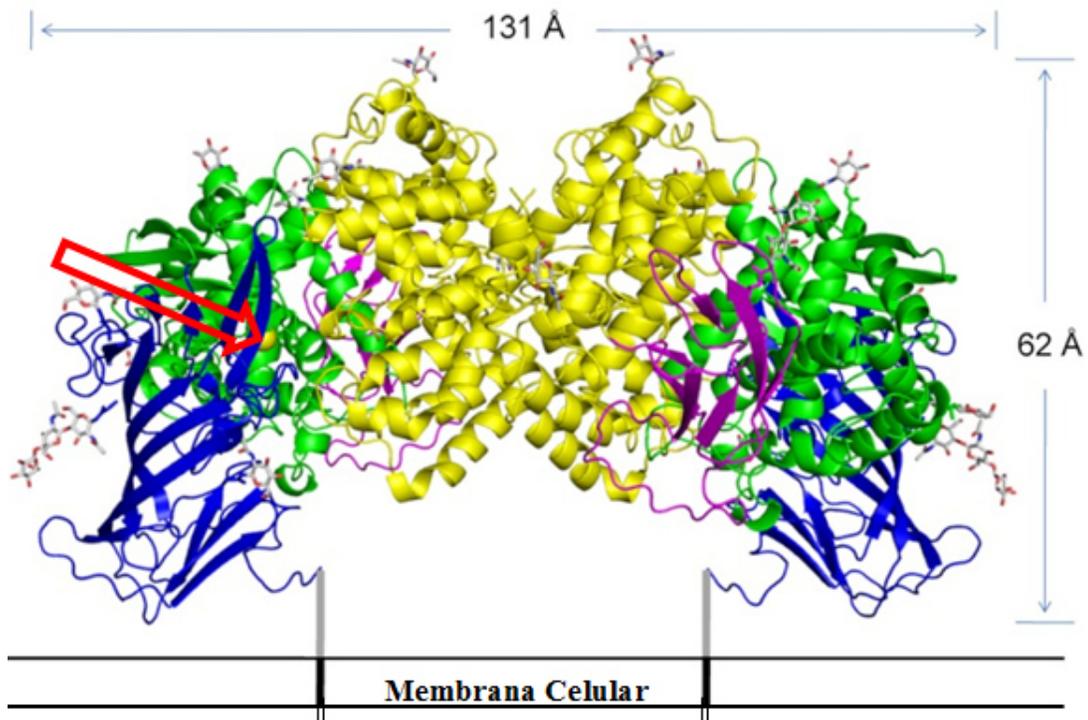


Figura 8. Representación estructural de CD13. A. La estructura primaria (cadena de aminoácidos) de CD13 se muestra como una barra de colores. Cada color representa un dominio distinto de la proteína: en azul se muestra el dominio I, en verde el II, en magenta el III y en amarillo el dominio IV; en gris está representado el dominio enriquecido en residuos de serina y treonina, en negro el dominio transmembranal y en blanco la pequeña porción citoplasmática. Los números señalan los aminoácidos correspondientes a los límites entre cada dominio. B. La estructura terciaria (dímero) de CD13 se muestra en un modelo de listones. La flecha roja señala una esfera amarilla, que representa un ion de zinc en el sitio activo. Con el modelo de barras y esferas (en gris y rojo), se muestran algunas *N*-glicosilaciones. (Modificado de la referencia [80]).

En vista de que sus funciones no se limitan a la escisión de aminoácidos, CD13 ha sido clasificada como una proteína multifuncional, siendo algunas de sus funciones dependientes, y otras independientes de su actividad enzimática [78].

La aminopeptidasa N se encuentra conservada en gran número de especies y en humanos se encuentra expresada no sólo en células hematopoyéticas de origen mieloide, también en etapas tempranas durante la diferenciación de linfocitos B y T o en sus estados activados [82, 83], así como en células epiteliales de los túbulos proximales renales, de los bordes en cepillo de la mucosa intestinal y de los canalículos biliares, en sistema nervioso central, en osteoclastos, fibroblastos y en células endoteliales activadas [82].

Algunas de las funciones de CD13, cuya ejecución depende la participación de su actividad enzimática, se enlistan abajo:

- Regulación del tiempo de vida media y actividad de péptidos. Entre los sustratos sobre los que CD13 puede ejercer su actividad enzimática, se encuentran algunas encefalinas que al ser hidrolizadas en el extremo N terminal, disminuyen su tiempo de vida media. De igual forma, CD13 puede hidrolizar proteínas de matriz extracelular como la entactina y la colágena tipo IV. Otro de sus sustratos es la angiotensina III, a partir de cuya hidrólisis por CD13, se obtiene angiotensina IV, lo que repercute sobre la presión arterial. *In vitro* se ha confirmado la actividad de CD13 sobre glutatión, somatostatina y péptidos derivados del receptor de trombina. Asimismo, se sugiere que CD13, podría estar participando en la escisión de aminoácidos de citocinas como IL-1 α e IL-1 β , aunque por su gran tamaño y por la capacidad limitada de CD13 para actuar enzimáticamente solamente sobre péptidos pequeños, CD13 podría valerse de proteínas auxiliares, como CXCL11, para llevar a cabo la remoción de aminoácidos en estas citocinas
- Invasividad tumoral. Se ha encontrado que la expresión de CD13 correlaciona directamente con la capacidad invasiva de algunas células tumorales.
- Proliferación. La actividad enzimática de CD13 favorece la proliferación de líneas celulares de leucemia y carcinoma, además de inducir resistencia a la apoptosis [78].
- Quimiotaxis. Pacientes con sarcoidosis presentan una elevada expresión de CD13 en M ϕ s alveolares y por estudios *in vitro* pudo determinarse que CD13, a través de su actividad enzimática, resulta quimiotáctica para linfocitos tanto CD4⁺ como CD8⁺, teniendo mayor impacto sobre los primeros [84]. De forma similar, en pacientes con artritis reumatoide la expresión, lo mismo que la actividad de CD13 se encuentra elevada en fibroblastos sinoviales y correlaciona con la cuenta de linfocitos en dicho fluido [85].

- Motilidad celular. El tratamiento de las células de la línea de cáncer de pulmón CL1-5, con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD13, indujo una disminución en la capacidad migratoria de estas células; en tanto que en células CL1-0, que no poseen alta capacidad invasiva y que no expresan CD13, la expresión estable de una mutante sin actividad enzimática de CD13, incrementó su capacidad migratoria [86]. Similares resultados en cuanto a la inhibición de la migración usando mAbs anti-CD13 se han obtenido en otras líneas celulares provenientes de fibrosarcoma y carcinoma de colon.
- Angiogénesis. CD13 promueve la angiogénesis mediante la degradación de proteínas de matriz extracelular y la generación y modulación de la actividad de péptidos angiogénicos y factores de crecimiento [78].

Entre las funciones que puede llevar a cabo CD13, sin que esté involucrada su actividad enzimática, se encuentran las siguientes:

- Receptor viral. En humanos, CD13 funge como receptor del coronavirus 229 E (HCoV-229E), de lo cual es responsable la región comprendida entre los aminoácidos 288 y 295. También se ha visto implicada en infecciones por citomegalovirus.
- Internalización de colesterol. Inhibidores de la absorción intestinal del colesterol ejercen su efecto a través de su unión a CD13. Posiblemente, CD13 participen en este proceso en asociación con FcγRs [78].
- Adhesión. Menrad y colaboradores observaron que en células de melanoma WM1158, CD13 se concentraba en los puntos de contacto célula-célula y que se encontraba asociada a componentes de matriz extracelular [87]. Por otra parte, a partir del estudio de la expresión de CD13 en linfocitos, se evidenció la inducción de la expresión de la aminopeptidasa N como consecuencia del contacto de linfocitos con células CD13⁺ como células epiteliales y monocitos/Mφs [81]. Ortega y colaboradores, señalaron que el uso del mAb anti-CD13 452 en la línea monocítica U937, induce agregación homotípica de éstas células, esto sin que la actividad enzimática de CD13 se encuentre involucrada en tal efecto [88]. En este mismo grupo de trabajo, encontró que para que se pueda llevar a cabo dicha agregación, es necesaria la disociación entre galectina-3 y CD13, misma que se presenta de manera constitutiva en células U937 [89]. CD13 también se ha visto involucrada en adhesión heterotípica; la adhesión entre monocitos y células endoteliales se obtuvo mediante el tratamiento de células U937 con HCoV-229E que, al igual que anticuerpos anti-CD13, permite el entrecruzamiento de la

aminopeptidasa, induciendo señalización y posteriormente, polimerización de actina [90]. Más recientemente Shapiro y colaboradores evidenciaron que la adhesión durante el tráfico de monocitos en condiciones inflamatorias puede llevarse a cabo gracias a la fosforilación de la tirosina 6 (Tyr⁶) citoplásmica de CD13, dependiente de Src; esto permite la posterior activación de la cinasa de adhesión focal (FAK) y ERK, lo que culmina en la remodelación del citoesqueleto. Lo anterior permitió corroborar que CD13 se activa en procesos inflamatorios, haciendo posible el tráfico celular al sitio de inflamación [91].

La participación fisiológica de CD13 no se limita a las funciones antes mencionadas. En forma vasta, CD13 se encuentra involucrada en procesos inmunológicos, algunos de los cuales se mencionan brevemente a continuación.

En 1996, Tokuda y Levi reportaron que monocitos, células fagocíticas, expresan una gran cantidad de CD13 [92], hecho que ya sugería la participación de CD13 en procesos fagocíticos. Más tarde, Ortega y colaboradores evidenciaron el papel de CD13 en procesos fagocíticos tanto en cultivos primarios de monocitos y Mφs como en la línea celular U937. En este trabajo, se determinó que CD13 es capaz de modular positivamente la fagocitosis llevada a cabo por FcγRI y se observó la redistribución de CD13 hacia la copa fagocítica y su posterior internalización hacia el fagosoma. Demostraron también que las partículas fagocíticas que interactúan de manera específica y simultánea a través de CD13 y de FcγR, son internalizados de forma más eficiente respecto a las partículas que interactúan exclusivamente a través de FcγRI y que la estimulación de ambas moléculas a la vez, resulta en un aumento en la cantidad y el tiempo de fosforilación de Syk [93]. Recientemente, el mismo grupo de trabajo, confirmó que CD13 actúa como receptor fagocítico primario en monocitos, MDMs y en la línea monocítica THP-1; la actividad enzimática de CD13 no es necesaria para la ejecución de esta función, mientras que la activación de PI3K, sí lo es; también durante la fagocitosis se identificó la activación de Syk, aunque no fue indispensable para el proceso [94]. Aunado a esto, se identificó que el entrecruzamiento de CD13, ocasiona producción de especies reactivas de oxígeno, proceso con carácter microbicida que suele desencadenarse luego de la fagocitosis en neutrófilos y Mφs [94, 95].

El papel de CD13, también se ha estudiado en otros procesos de internalización en otras especies. En la línea murina J774, se observó que CD13 colocaliza con el MR y se internaliza junto con éste durante la internalización de albúmina, proceso para el que no se requiere de su actividad enzimática [96]. En cerdos, la aminopeptidasa N, pudo identificarse como receptor endocítico de *Escherichia coli*

enterotoxigénica mediante su interacción con la fimbria F4 a través de residuos de carbohidratos presentes en el ácido siálico de dicha fimbria, así como a través de anticuerpos anti-CD13 [97].

Por otro lado, la expresión de CD13 se ha visto modulada por algunas citocinas. En distintos microambientes *in vitro*, caracterizados por la presencia de ciertas citocinas, como en el caso de monocitos humanos cultivados en presencia de IL-4 [98] o en el de células murinas tipo M ϕ de la línea celular J774 expuestas a IFN- γ , se ha podido identificar la regulación positiva de la expresión de CD13. También en células J774, se evidenció que la dexametasona induce la regulación a la baja de la expresión de CD13 [96].

La inhibición de la actividad enzimática de CD13 ha demostrado tener efectos inmunomodulatorios. Por ejemplo, en células mononucleares (PBMCs) y linfocitos T humanos estimulados, la inhibición de la actividad enzimática de CD13, anula la producción de IL-1 β y de IL-2 e induce la producción del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) [83].

En el caso de linfocitos Treg de pacientes con cáncer pulmonar de células no pequeñas, el tratamiento de estas células con el mAb anti-CD13 9E4, provocó que los linfocitos tuvieran una menor capacidad para producir TGF- β e IL-10 y además, mostraron una menor expresión de factor de crecimiento transformante beta anclado a membrana (mTGF- β), lo mismo que de PD-1, teniendo como consecuencia la anulación de la función supresora de células Treg [99]. La inhibición *ex vivo* de la actividad enzimática de CD13 en Treg incrementó los niveles de mRNA tanto de TGF- β , así como de Foxp3; estas células al ser transferidas a ratones que presentaban colitis inducida mediante el modelo de dextrano sulfato de sodio, disminuyeron la severidad de la colitis [100].

Riemman y colaboradores se encuentran entre los primeros grupos de trabajo en estudiar la señalización que desencadena la estimulación de CD13 mediante el uso de anticuerpos anti-CD13. La estimulación de células de las líneas U937 y Mono-Mac-6, así como de monocitos de fluido pericardial, usando diversos anticuerpos anti-CD13, indujo flujo de [Ca²⁺]. De manera peculiar, un anticuerpo que no interfiere con la actividad enzimática de CD13, necesitó de un anticuerpo secundario para ejercer este efecto; no así los anticuerpos que afectan la actividad enzimática de CD13, demostrando que no es necesario que se lleve a cabo el entrecruzamiento de CD13 para observar algunos de sus efectos. Para que este proceso pueda llevarse a cabo, es necesario que se fosforilen las MAPKs ERK1/2, JNK y p38. De manera importante, pudo determinarse que uno de los efectos de esta señalización es el incremento en los niveles del mRNA de IL-8 [101].

II. I. CD13 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS

Hasta el momento, poco se sabe acerca de las funciones que llevan a cabo las DCs en las que podría tener participación relevante CD13 (Tabla 2).

Gluckman y colaboradores [102] plantearon la posible participación de CD13 en el desarrollo de Mφs y DCs derivados de precursores CD34⁺ de sangre de cordón umbilical, cultivando los precursores en presencia del ligando de la tirosina cinasa 3 tipo FMS (Flt-3L), del factor de células troncales (SCF), de GM-CSF y de TNF-α. Cultivando por separado, las células con elevada expresión de CD13 que no estaban comprometidas hacia ningún precursor (CD13^{hi} Lin⁻) de las células con baja expresión de CD13 que tampoco estaban comprometidas hacia algún linaje (CD13^{lo} Lin⁻), en presencia de los mismos factores de crecimiento, las células CD13^{lo} Lin⁻ no se expandieron, a diferencia de las CD13^{hi} Lin⁻. La expansión de estas últimas se vio afectada cuando se inhibió la actividad de aminopeptidasa de CD13, pero también cuando las células se cultivaron en presencia de un anticuerpo anti-CD13 que no incide sobre la actividad enzimática.

Continuando en el ámbito del desarrollo de las DCs, inhibidores de la actividad enzimática de CD13, afectan la viabilidad y capacidad de monocitos cultivados con GM-CSF e IL-4 para dar origen a moDCs [103].

Más recientemente, se desarrollaron ratones deficientes de CD13 (CD13^{-/-}). Estos ratones presentan un desarrollo normal, con un ligero incremento en el número de linfocitos T presentes en el timo. Empleando células provenientes de estos ratones CD13^{-/-}, se realizaron estudios *in vitro* en los que no se encontró diferencia en la fagocitosis por DCs CD13⁺ y DCs CD13⁻, demostrando de esta manera que no se requiere de la presencia de CD13 para que se lleve a cabo fagocitosis a través de FcγR [104], aunque se ha mostrado que es capaz de modular la fagocitosis a través de estos receptores.

Para evidenciar el papel modulador de CD13, se llevó a cabo el entrecruzamiento de CD13 en moDCs mediante el anticuerpo anti-CD13 452 y un anticuerpo secundario, sin que este entrecruzamiento estuviera mediado por la partícula a fagocitar; esto resultó en un incremento en la capacidad de internalización de dicha partícula; además, de forma similar a como se ha visto en otras células, las moDCs son capaces de fagocitar a través de CD13 sin que se requiera de la participación adicional de otro receptor fagocítico [105].

CD13 también se encuentra implicada en la activación de linfocitos. El cocultivo de moDCs — pretratadas con el mAb anti-CD13 7H5— con linfocitos T autólogos en presencia de CD3 soluble, afectó la capacidad de las moDCs para inducir proliferación de los linfocitos tanto CD4⁺ como CD8⁺, teniendo un efecto más pronunciado sobre linfocitos T *naïve*. A partir de estos resultados se sugirió que uno de los mecanismos a través de los cuales CD13 participa en la activación de linfocitos por DCs, es mediante la generación de péptidos activos (solubles o expresados en la membrana celular) que permiten el inicio de la transducción de señales en moDCs [106].

De manera destacable, CD13 tiene impacto sobre la presentación antigénica, principal función de las DCs. La presentación antigénica cruzada, llevada a cabo por BMDCs también se ve influenciada por CD13. En DCs murinas, se ha identificado una mayor expresión de CD13 en la subpoblación CD8⁺, subpoblación con participación relevante en la presentación cruzada de antígenos tumorales y virales, lo mismo que en su contraparte humana de moDCs (CD141⁺CD11c⁺). Además, ratones CD13^{-/-} llevan a cabo presentación cruzada con mayor eficiencia que ratones *wild type* (WT). Estos hallazgos sugieren que CD13 regula en forma negativa la presentación antigénica cruzada llevada a cabo por DCs mediante la modulación negativa de ciertos mecanismos de internalización [107].

Otro de los mecanismos mediante los que CD13 se encuentra involucrada en la presentación antigénica es a través de su capacidad para hidrolizar péptidos potencialmente antigénicos —cargados [108] o no [109] en las moléculas MHC-II— a través de la escisión de algunos residuos presentes en el extremo N terminal de tales péptidos. CD13 expresado en la superficie de moDCs, es capaz de degradar péptidos, disminuyendo de esta forma su capacidad de unión a moléculas MHC-II, por lo que no son presentados a linfocitos [109]. No necesariamente el procesamiento de péptidos por CD13 presente en la membrana de APCs, resulta en la disminución de la presentación, pues tal como señalan Stryhn y colaboradores [108], la modificación de péptidos ya cargados en moléculas MHC-II puede contribuir al incremento en el reconocimiento del antígeno durante la presentación, así como a la sensibilidad y especificidad de respuestas mediadas por linfocitos Th.

Tabla 2. Evidencia experimental de la participación de CD13 en funciones de DCs.

Aporte	Modelo	Referencia
Expresión de CD13 correlaciona con capacidad de precursores para proliferar y comprometerse a precursores de Mφs y DCs.	DCs derivadas de precursores humanos CD34 ⁺	[102]
Inhibición de actividad enzimática de CD13 en monocitos, interfiere con su diferenciación a DCs.	moDCs humanas	[103]
CD13 actúa como receptor fagocítico en moDCs y modula la fagocitosis mediada por otros receptores.	moDCs humanas	[105]
CD13 soluble en cocultivos de moDCs-linfocitos, afecta proliferación de linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ .	moDCs humanas	[106]
DCs involucradas en presentación cruzada (CD8 ⁺ en ratón y moDCs CD141 ⁺ CD11c ⁺ en humano) tienen elevada expresión de CD13. Ratones CD13 ^{-/-} son menos eficientes realizando presentación cruzada.	DCs CD8 ⁺ de bazo (ratones WT) moDCs humanas BMDCs (ratones CD13 ^{-/-})	[107]
CD13 de moDCs, mediante su actividad enzimática, modifica péptidos, afectando su presentación hacia linfocitos T.	moDCs humanas	[109]

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

CD13 es una enzima multifuncional que se encuentra altamente expresada en células de origen mieloide, esto incluye a DCs [81]. Poco se sabe sobre la participación de CD13 en las funciones realizadas por estas células.

Por el momento, se sabe que CD13 participa en numerosos procesos celulares tales como adhesión, migración, regulación de la actividad de moléculas bioactivas [78] y, de manera destacable, se sabe que CD13 participa en procesos de internalización: modula positivamente la fagocitosis a través de FcγRs [93] y de otros receptores como dectina-1 [105], se sugiere que tenga participación en procesos de endocitosis mediada por receptor [96], en cerdos funge como uno de los receptores para *Escherichia coli* enterotoxigénica [97], mientras que en humano y en otros mamíferos funciona como receptor para coronavirus [78]. Recientemente, se caracterizó a CD13 como un receptor fagocítico [94] y se determinó que su estimulación en la membrana celular desencadena procesos de señalización [91, 94, 101].

Al tener capacidad para actuar como receptor en procesos de internalización, CD13 podría actuar de manera similar a otros receptores de la inmunidad innata, como las lectinas de tipo C, cuya función no se limita a la internalización de material hacia la célula, sino que modulan procesos que se presentan durante la maduración de DCs, sobre todo la producción de citocinas y la expresión de moléculas de superficie [52, 110].

El objetivo de este trabajo es evaluar si la estimulación a través del entrecruzamiento de CD13 modula procesos asociados a la maduración de DCs, aportando evidencia que permita continuar con la caracterización de CD13 en su papel como molécula moduladora de las funciones de células mieloides.

HIPÓTESIS

La estimulación de células dendríticas a través del entrecruzamiento de CD13 modulará positivamente la maduración de las mismas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la estimulación de CD13 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos modula positivamente la maduración inducida por el lipopolisacárido (LPS).

OBJETIVOS PARTICULARES

- I) Determinar la capacidad de CD13 para modular la expresión membranal de marcadores de maduración (CD80, CD83, CD86 y HLA-DR) inducida por LPS en células dendríticas.
- II) Determinar la capacidad de CD13 de modular la secreción de citocinas provocada por LPS.
- III) Determinar el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre la capacidad endocítica de células dendríticas estimuladas por LPS.
- IV) Determinar el efecto del entrecruzamiento de CD13 en células dendríticas estimuladas con LPS para inducir la proliferación de linfocitos T CD4⁺.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CÉLULAS

Las células empleadas para llevar a cabo los experimentos, fueron células dendríticas derivadas de monocitos humanos (moDCs).

1.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANOS (moDCs)

1.1.1. OBTENCIÓN DE MONOCITOS HUMANOS

Los monocitos a partir de los cuales se obtuvieron las moDCs se aislaron de concentrados leucocitarios de donadores sanos de sexo masculino obtenidos en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Los concentrados leucocitarios se centrifugaron en tubos de polipropileno (Biofil) a 1000 g durante 20 minutos a 10 °C, sin freno ni aceleración (Eppendorf centrifuge 5810R). Luego de la centrifugación, se conservaron 15 mL de suero sanguíneo autólogo y el resto del suero se desechó. El suero conservado se inactivó incubándose durante 30 minutos a 56 °C, después de lo cual se centrifugó a 4400 g durante 20 minutos a 4 °C (Sorvall Legend March), desechando el botón celular. La superficie de las placas de cultivo (Costar) a utilizar se cubrió con suero autólogo inactivado y se incubaron durante 45 minutos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Después de retirado el suero autólogo, el paquete celular del concentrado leucocitario se diluyó 1:2 con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) estéril atemperada a 18-20 °C. Dos volúmenes de la suspensión celular, ya diluida, se colocaron cuidadosamente sobre un volumen de Lymphoprep (Axis-Shield) en un tubo de polipropileno, evitando la perturbación de la fase formada por el polímero. Colocadas ambas fases, los tubos, se sometieron a centrifugación durante 30 minutos a 1000 g a temperatura de 20 °C sin freno ni aceleración. Con ayuda de una pipeta, se retiró y desechó el 80 % de suero-PBS (capa superior). El anillo celular, correspondiente a las células mononucleares, se transfirieron a un tubo de polipropileno, donde se adicionó PBS a 4 °C hasta obtener un volumen final

de 50 mL. La suspensión celular se centrifugó a 400 g durante 10 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante por decantación y se descompactó completamente el botón celular. Se realizaron dos lavados adicionales con 40 mL de PBS a 4 °C. Descompactado el botón celular, los eritrocitos presentes se lisaron con 2 mL de solución para lisis durante 3 minutos a 4 °C. Transcurrido este tiempo el volumen se completó a 50 mL con PBS a 4 °C y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados adicionales con 40 mL de PBS.

Las células mononucleares se resuspendieron en 40 mL de RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) complementado, libre de suero fetal bovino (SFB). Se tomó una alícuota de la suspensión para realizar conteo celular en una cámara de Neubauer (Propper). Se tomaron 90×10^6 células mononucleares y los monocitos se obtuvieron por selección positiva mediante el uso de un anticuerpo anti-CD14 acoplado a perlas magnéticas (MACS Miltenyi Biotec) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. De forma breve, los PBMCs se incubaron con las perlas anti-CD14, se lavaron con solución de lavados para separación (autoMACS Rinsing Solution) complementada con 5 % de SFB y se hicieron pasar por una columna con perlas magnéticas (LS Column, MACS, Miltenyi Biotec) sometida a un campo magnético (MACS MultiStand, MidiMACS Separator, Miltenyi Biotec) para retener las células CD14⁺. Se retiró el campo magnético y las células CD14⁺ se recuperaron de la columna mediante su elución con solución de lavados. Las células CD14⁺ se centrifugaron y se resuspendieron en medio RPMI-1640 al 10 % de SFB. Obtenidos los monocitos de cada donador se sembraron en una caja para cultivo celular de 24 pozos (400 000 células por pozo en un volumen de 1 mL de RPMI-1640 al 10 % de SFB).

La pureza de los monocitos obtenidos, se evaluó a través de la expresión de CD14 (anti-CD14 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), Beckman Coulter), usando citometría de enfoque acústico (Attune Acoustic Focusing Cytometer, Life Technologies).

1.1.2. DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS A CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para diferenciar los monocitos a moDCs, inmediatamente después de terminado el aislamiento, se adicionaron interleucina 4 recombinante (IL-4, PeproTech) a una concentración final de 10000 U/mL y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante (GM-CSF, PeproTech) para obtener una concentración final de 1000 U/mL. Las células se mantuvieron en cultivo a 37 °C en

atmósfera húmeda al 5 % de CO₂. El día tres después del aislamiento, se reemplazaron 500 µL de medio, con RPMI-1640 fresco complementado al 10 % de SFB con IL-4 (1000 U/mL) y GM-CSF (1000 U/mL) en cada pozo. Al quinto día después del aislamiento se realizó una tinción de superficie para confirmar la diferenciación hacia moDCs (Apartado 2. INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE moDCs). Como control negativo del proceso de diferenciación a moDCs, monocitos recién aislados se cultivaron sin citocinas en medio complementado con 10 % de SFB por 5 días; en este caso se obtuvieron MDMs.

1.2. ESTIMULACIÓN DE moDCs

Las moDCs se estimularon con el mAb anti-CD13 452 y con LPS, ligando de TLR4.

1.2.1. ESTIMULACIÓN CON LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)

Obtenidas las moDCs (día quinto después del aislamiento), se adicionó, como estímulo de maduración LPS (*Escherichia coli* 0111:B4. Sigma-Aldrich) a dos concentraciones diferentes. Una subóptima: 0.05 ng/mL y una óptima: 5 µg/mL. Las células permanecieron en contacto con este estímulo durante 48 horas, después de lo cual se colectó el sobrenadante para determinar la producción de citocinas y las células se emplearon para determinar el nivel de expresión de marcadores de maduración, así como la capacidad endocítica y de estimulación de linfocitos T CD4⁺.

1.2.2. ESTIMULACIÓN A TRAVÉS DE CD13

Obtenidas las moDCs a partir de monocitos y antes de adicionar el LPS, las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD13, clona 452 (estéril), a dos concentraciones distintas (1 o 10 µg por cada 1x10⁶ células, equivalentes a 0.125 µg/mL y 1.25 µg/mL, respectivamente). Transcurrido el tiempo de incubación, para promover el entrecruzamiento de CD13, se adicionó un anticuerpo secundario (IgG de conejo anti-IgG cadenas ligera y pesada (H+L) murina (Zymed)) (estéril), a una concentración de 1 µg para 1x10⁶ células (0.125 µg/mL). Como control

negativo del entrecruzamiento, se empleó una IgG1 murina (Abcam) con especificidad de unión desconocida, de la misma subclase que el anticuerpo 452; a esta condición también se le adicionó el mismo anticuerpo secundario y a la misma concentración que a las células tratadas con el anticuerpo 452.

Para algunas células, el entrecruzamiento de CD13 se realizó en presencia de dos diferentes concentraciones de LPS (punto 1.2.1.). Como control positivo de maduración, las células se estimularon solamente con 5 µg/mL de LPS. Los diferentes estímulos a los que se sometieron las células de un mismo donador, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos para la estimulación de moDCs. Después de haber obtenido moDCs, se sometieron a los siguientes tratamientos durante 48 horas, luego de lo cual se evaluaron características fenotípicas y funcionales relacionadas con su maduración.

Células	Estímulos			
	LPS	mAb 452	Anti-IgG murina (H+L)	Isotipo IgG1
moDCs	-	-	-	-
moDCs	-	-	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL
moDCs	-	-	0.125 µg/mL	1.25 µg/mL
moDCs	-	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL	-
moDCs	-	1.25 µg/mL	0.125 µg/mL	-
moDCs	0.05 ng/mL	-	-	-
moDCs	0.05 ng/mL	-	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL
moDCs	0.05 ng/mL	-	0.125 µg/mL	1.25 µg/mL
moDCs	0.05 ng/mL	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL	-
moDCs	0.05 ng/mL	1.25 µg/mL	0.125 µg/mL	-
moDCs	5 µg/mL	-	-	-
moDCs	5 µg/mL	-	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL
moDCs	5 µg/mL	-	0.125 µg/mL	1.25 µg/mL
moDCs	5 µg/mL	0.125 µg/mL	0.125 µg/mL	-
moDCs	5 µg/mL	1.25 µg/mL	0.125 µg/mL	-

Una vez adicionados los estímulos, las células permanecieron en cultivo a 37 °C, en contacto con los estímulos durante 48 horas. Después de este tiempo, se colectó el sobrenadante para determinar la

concentración de algunas citocinas presentes y las células se emplearon para determinar el nivel de expresión de marcadores de maduración, la capacidad endocítica y de estimulación de linfocitos T CD4⁺ por las células.

2. INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE moDCs

Luego del cultivo con IL-4 y GM-CSF, la diferenciación de los monocitos a moDCs se evaluó mediante la expresión de CD1a y CD14, mientras que después de CD13 y de TLR4, se evaluó la expresión de CD83, CD80, CD86 y de HLA-DR como indicadores de la estimulación de las moDCs.

2.1. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE

Luego de la obtención de moDCs y de la estimulación de éstas a través de CD13 y/o LPS, la expresión de los marcadores de superficie de moDCs: CD83, CD80, CD86, HLA-DR y/o de CD13, así como la de los marcadores de monocitos y Mφs CD14 y de células dendríticas CD1a, se determinó mediante análisis citométrico. Para ello se resuspendieron 1×10^5 células en 50 μ L de solución amortiguadora de lavados para citometría. Se adicionaron los anticuerpos: 1.5 μ L de anti-CD83 humano marcado con FITC (eBioscience), 7.5 μ L de anti-HLA-DR marcado con ficoeritrina (PE) (Beckman Coulter), 0.5 μ L de anti-CD86 humano marcado con violeta brillante 421 (brilliant violet 421) (BD Pharmingen), 0.5 μ L de anti-CD80 humano marcado con aloficocianina (APhC) (BD Pharmingen), 5 μ L de anti-CD1a PE (BD Pharmingen), 1 μ L de anti-CD14 FITC (Beckman Coulter) o 1 μ g de mAb 452.

Las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos protegiéndose de la luz. Concluida la incubación, a las células se les adicionaron 100 μ L de solución amortiguadora de lavados para citometría y se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 453 g, posteriormente se lavaron dos veces con 200 μ L de solución amortiguadora de lavados para citometría, centrifugando a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 90 μ L de solución de fijación para citometría.

La inmunotinción de CD13 se realizó indirectamente. Luego de lavar el exceso de mAb 452, las células se incubaron en 50 μ L de solución de lavados para citometría con 0.16 μ L de IgG de cabra anti-IgG de ratón (anticuerpo secundario) marcado con FITC (Zymed), durante 30 minutos a 4 °C. Se adicionaron 100 μ L de solución de lavados para citometría y se realizó una centrifugación a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados más, cada uno con 200 μ L de solución de lavados para citometría. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en 90 μ L de solución de fijación para citometría.

La fluorescencia de las células se determinó mediante un citómetro de enfoque acústico (Attune Acoustic Focusing Cytometer. Life Technologies). Se capturaron 10 000 eventos de cada condición y se evaluó la expresión de los marcadores celulares con base en la intensidad media de fluorescencia (IMF) utilizando el programa Attune Citometric Software (Life Technologies).

3. EVALUACIÓN FUNCIONAL DE moDCs

3.1. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS

Transcurridas las 48 horas de incubación con el LPS y/o con el mAb 452, se colectó el sobrenadante del cultivo celular para determinar la concentración de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α por ensayo de perlas citométricamente ordenadas por intensidad de fluorescencia para determinar concentración de citocinas (CBA BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del proveedor. El ensayo permite realizar la determinación de la concentración de citocinas presentes en cada muestra gracias a que perlas con diferente intensidad de fluorescencia, detectadas por un canal en el citómetro de flujo, se encuentran acopladas a Abs que reconocen las citocinas de interés, es decir, las perlas acopladas a anti-IL-8 tienen la mayor intensidad de fluorescencia, seguida de la fluorescencia de perlas conjugadas con IL-1 β , así en orden decreciente fluorescencia: anti-IL-6, anti-IL-10, anti-TNF y anti-IL-12. Un segundo grupo de perlas conjugadas con anticuerpos que reconocen las mismas citocinas, pero marcadas con un fluorocromo detectable en un canal distinto se emplea para formar un “sándwich” con la citocina de interés, de tal forma que la fluorescencia debida a este segundo grupo de perlas se incrementa cuando existe una mayor concentración de la citocina de interés en la muestra. Finalmente, para determinar la

concentración de cada citocina, la fluorescencia del segundo canal, se interpola en una curva de fluorescencias correspondientes a una curva estándar realizada con concentraciones conocidas de cada una de las citocinas a determinar.

De manera breve, la forma en la que se realizó el ensayo fue la siguiente: se prepararon curvas estándar para cada citocina (0 – 5000 pg/mL). El sobrenadante de cada uno de los tratamientos, así como las muestras de la curva estándar, se incubaron, protegiendo de la luz, durante 3 horas con las perlas conjugadas con anticuerpos que reconocen cada una de las citocinas a determinar. Las muestras se lavaron e inmediatamente después analizó la intensidad de la fluorescencia de cada una mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur. BD Biosciences) utilizando el programa CellQuest (BD Biosciences). El análisis de los resultados se realizó con el programa FlowJo 7.6 (Tree Star).

3.2. ENSAYOS DE ENDOCITOSIS DE DEXTRANO

Luego de incubar durante 48 horas las DCs con el estímulo de maduración y/o el mAb 452, las células se emplearon para realizar ensayos de endocitosis de dextrano conjugado con FITC de la siguiente forma:

2.5×10^5 células de cada una de las diferentes condiciones de estímulo previo, se lavaron con PBS centrifugando a 300 g durante 5 minutos a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 200 µL de dextrano-FITC (peso molecular promedio 40 000 Da) (Sigma-Aldrich) 1 mg/mL en RPMI 1640 complementado y al 10% de SFB.

Las células de cada una de las condiciones de estimulación se dividieron en dos partes, una parte se incubó en un tubo a 4 °C y otro a 37 °C durante 60 minutos protegiendo de la luz. Transcurrida la incubación se adicionaron 100 mL de PBS frío y se lavó centrifugando a 300 g durante 5 minutos a 4 °C. Se realizaron dos lavados más con 200 µL de PBS frío centrifugando a 300 g durante 5 minutos a 4 °C.

Las células de cada tubo se fijaron con 90 µL de solución de fijación para citometría. Para apagar la fluorescencia externa correspondiente a dextrano-FITC no internalizado, se realizó una dilución 1:1

(v:v) de la suspensión de las células fijadas con azul tripán (Sigma-Aldrich) (1 mg/mL en buffer de citratos pH = 4.5) y la fluorescencia de las células se determinó capturando 10 000 eventos de la región de interés por citometría de enfoque acústico (Attune Acoustic Focusing Cytometer. Life Technologies).

3.3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T CD4⁺

3.3.1. TINCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (PBMCs) CD14⁻ CON CARBOXIFLUORESCÉINA SUCCINIMIDIL ÉSTER (CFSE)

Las células que no se retuvieron en la columna sometida al campo magnético durante el aislamiento de monocitos (punto 1.1.1.) se colectaron en un tubo de polipropileno estéril nuevo, se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a 20 °C, se resuspendieron en 10 mL de PBS 5 % de SFB a 4 °C y se volvieron a centrifugar. Se determinó el número total de células contando en una cámara de Neubauer y hasta 50 x 10⁶ células, se resuspendieron en 1 mL de PBS 5 % de SFB, se adicionó la carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) para que ésta quedara a una concentración de 5 µM en la suspensión de células CD14⁻. Inmediatamente después las células se cubrieron de la luz y la suspensión se agitó vigorosamente. Las células con CFSE se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Para lavar el exceso de CSFE, se adicionaron 10 mL de PBS 5 % de SFB a temperatura ambiente y las células se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos a 20 °C. Se realizaron dos lavados más de la misma forma. Las células se resuspendieron en RPMI complementado al 10 % de SFB llevándolas a una concentración de 1 x 10⁶ células /mL. Se sembraron 100 000 células en pozos de una placa de 96 pozos (NUNClone). La tinción con CFSE se corroboró con un microscopio de epifluorescencia (Axioskop. Zeiss).

3.3.2. REACCIÓN LEUCOCITARIA MIXTA (MLR)

Luego de estimular durante 48 horas las moDCs de cada donador, usando el mAb 452 en presencia o

no de LPS, se contaron y tomaron 33 333 células de cada condición para sembrarse en pozos donde se tenían sembradas 100 000 PBMCs CD14⁻ alogénicas, teñidas con CFSE, de tal forma que quedaran en cocultivo, 33 3333 moDCs (células estimuladoras) : 100 000 PBMCs CD14⁻ (células respondedoras) (razón 1:3), en un volumen final de 200 µL/pozo. Como control negativo de activación se cultivaron PBMCs CD14⁻ en ausencia de moDCs. Los cocultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ durante 3 días.

3.3.3. INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA ANTI-CD4

Transcurridos los tres días de cocultivo, las células de cada condición se cosecharon, se centrifugaron y se lavaron con solución de lavados para citometría, posteriormente, se incubaron, protegidas de la luz, en 50 µL de la misma solución, en presencia de 0.5 µL del Ab anti-CD4 conjugado con APhC (Abcam) a 4 °C durante 30 minutos. Se adicionaron 100 µL de solución amortiguadora de lavados para citometría y se centrifugaron a 4 °C durante 5 minutos a 453 g, posteriormente se lavaron dos veces con 200 µL de solución amortiguadora de lavados para citometría, centrifugando a 453 g durante 5 minutos a 4 °C. Finalmente, las células se resuspendieron en 90 µL de solución de fijación para citometría y se capturó la fluorescencia de 8 000 eventos CD4⁺ en un citómetro de enfoque acústico. La proliferación de las células CD4⁺, se evaluó mediante el índice de proliferación, definido como la suma de las células en cada una de las divisiones dividido entre el número teóricamente calculado de células parentales, utilizando el programa FlowJo 7.6 (Tree Star).

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la diferencia estadística entre la expresión de marcadores en la superficie de moDCs y de MDMs se utilizó una prueba t de Student. El resto de los experimentos, se analizó estadísticamente mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas, seguida de una prueba *post hoc* usando el método de Tukey. En cada prueba se consideró significancia estadística para valores con $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California.

RESULTADOS

OBTENCIÓN DE MONOCITOS Y SUBSECUENTE DIFERENCIACIÓN A moDCs

Por provenir de un tejido humano de, relativamente, fácil acceso [111], además de la velocidad y las cantidades superiores de células que se obtienen, en comparación con otras fuentes de DCs [112], el uso de moDCs se ha extendido considerablemente tanto en la investigación como en el área clínica. Todos los experimentos realizados en el presente trabajo de investigación se llevaron a cabo en moDCs humanos, por lo que fue primordial obtener monocitos con elevada pureza. Dichos monocitos se obtuvieron a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos mediante gradiente de densidad y selección positiva a través de la expresión de CD14. Para determinar el grado de pureza de las células obtenidas al finalizar el aislamiento, se determinó la expresión de CD14 por inmunofluorescencia directa. CD14 es una molécula que por su elevado nivel de expresión, se emplea como marcador de monocitos y Mφs [113]. Para cada uno de los aislamientos realizados, el porcentaje de células CD14⁺, fue superior al 88 % (Fig. 9A). Analizando la pureza correspondiente a monocitos de 10 donadores distintos, en promedio, 94.23 ± 2.94 % células provenientes de cada aislamiento, resultaron positivas para CD14 (Fig. 9B).

Habiendo obtenido monocitos suficientemente puros, se procedió a la obtención de moDCs, cultivando a los monocitos durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF, citocinas que impiden la diferenciación de los mismos hacia Mφs y favorecen la proliferación y desarrollo de las células hacia DC, respectivamente [111]. Para corroborar la obtención de moDCs, dado que no hay una combinación específica de la expresión de marcadores que defina a las DCs, se evaluó la expresión, tanto de CD14 como de CD1a en las células obtenidas, pues de manera característica, durante la obtención de DCs humanas *in vitro*, disminuye la expresión de CD14 y aumenta la de CD1a [112], aunque ésta última, no lo hace homogéneamente. La disminución en la expresión de CD14 se observó en más del 90 % (Fig. 10A) de las moDCs que se obtuvieron y a pesar de que sólo un porcentaje cercano al 30 % (Fig. 10B) de las células resultaron positivas para la expresión de CD1a, la IMF de las moDCs correspondiente a la expresión de cada una de las moléculas es significativamente distinta de la de Mφs, esto en 10 donadores distintos (Figs. 10C y 10D). Puesto que no existe una combinación de marcadores que defina a DCs, las células obtenidas del tratamiento de monocitos con citocinas, se consideraron dendríticas con base en la disminución en la expresión de CD14, así como el aumento en la expresión de CD1a y la inducción en la expresión de CD83 en respuesta a LPS (abordada a detalle más adelante).

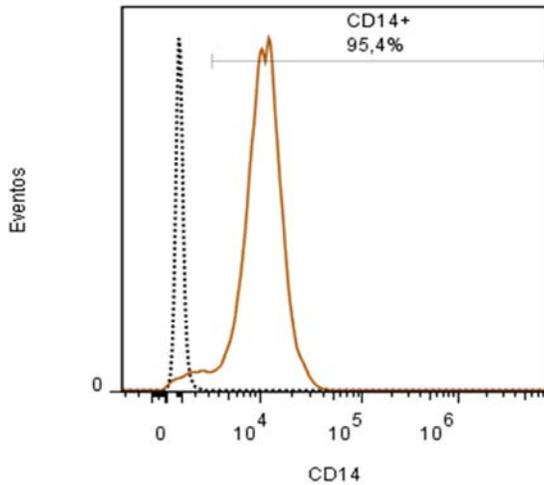
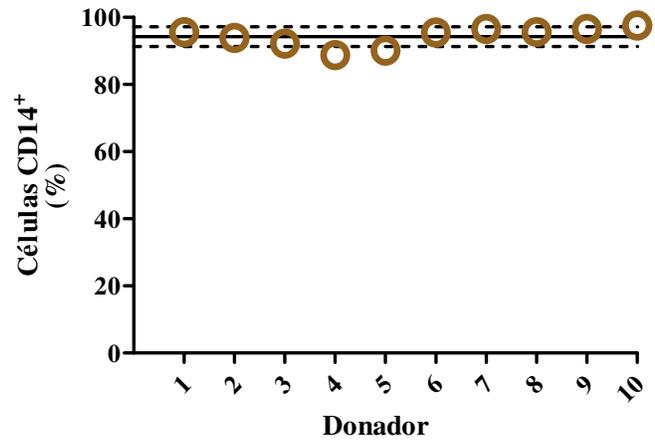
A**B**

Figura 9. Porcentaje de células CD14⁺ obtenidas luego del aislamiento a partir de concentrados leucocitarios. Se aislaron monocitos a partir de concentrados leucocitarios de donadores sanos de sexo masculino, mediante gradiente de densidad y selección positiva con anticuerpos anti-CD14 acoplados a perlas magnéticas. Terminado el aislamiento, las células obtenidas se marcaron con un anticuerpo anti-CD14-FITC y, mediante citofluorometría, se determinó el porcentaje de células CD14⁺ (correspondiente a monocitos). **A.** Histograma representativo de la expresión de CD14 en células recién aisladas (línea café continua), provenientes de un donador; la línea punteada corresponde a la fluorescencia de células sin teñir y el porcentaje (95.4 %) corresponde a las células positivas para la expresión de CD14. **B.** Se muestra el porcentaje de células CD14⁺ obtenidas luego del aislamiento de células correspondiente a 10 donadores distintos (circunferencias cafés). La línea continua representa el promedio del porcentaje de células CD14⁺ obtenidas (94.23 %) y las líneas punteadas corresponden a la desviación estándar entre los porcentajes de estos donadores.

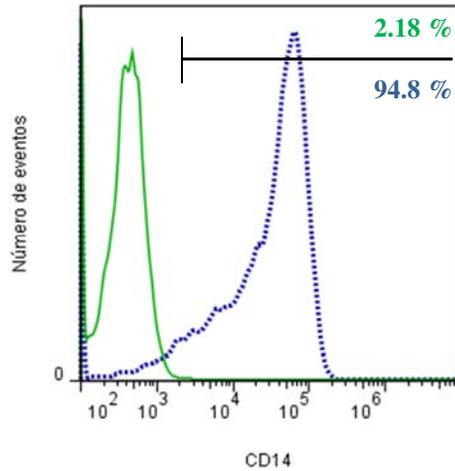
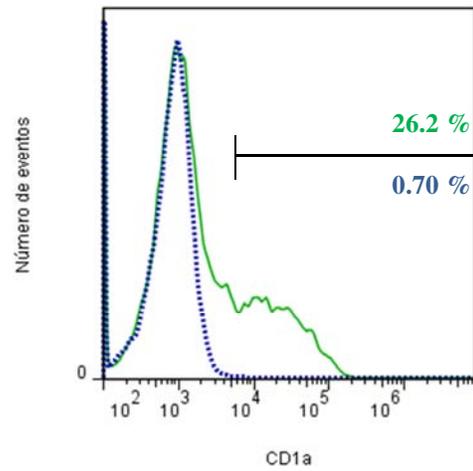
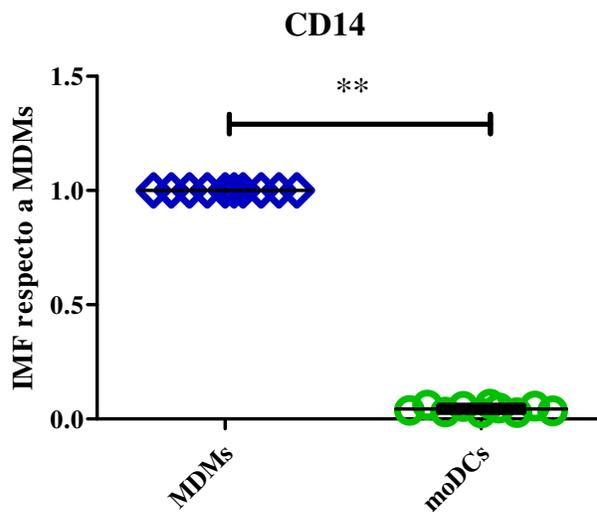
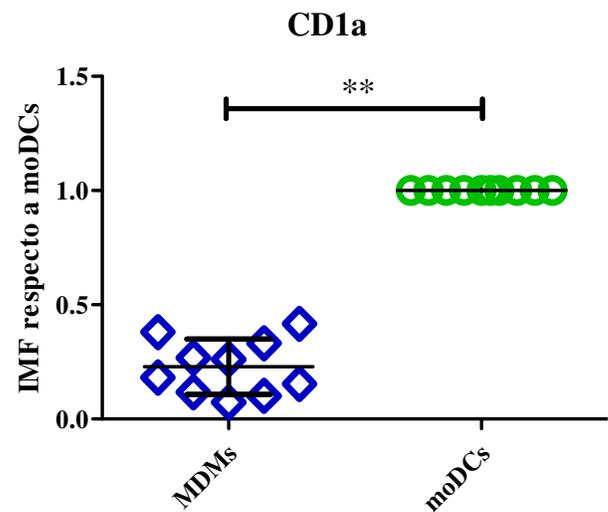
A**B****C****D**

Figura 10. Discriminación fenotípica entre células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs) y macrófagos derivados de monocitos (MDMs) autólogos. **A.** y **B.** Histogramas representativos de la expresión de CD14 (**A**) y CD1a (**B**) en moDCs (líneas verdes continuas) obtenidas del cultivo de monocitos humanos en presencia de IL-4 (1000 U/mL) y de GM-CSF (1000 U/mL) durante 5 días, así como en MDMs (líneas azules punteadas) obtenidos del cultivo de monocitos autólogos en ausencia de citocinas. Los porcentajes superiores corresponden a moDCs positivas y los inferiores a MDMs positivos para la expresión del marcador correspondiente. **C.** y **D.** Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de CD14 (**C**) relativa a la expresión de esta molécula en MDMs (rombos azules) y a la expresión de CD1a (**D**) relativa a la expresión de esta molécula en moDCs (circunferencias verdes) correspondiente a 10 donadores distintos. Las barras horizontales corresponden al promedio de las IMF normalizadas y las barras de error indican la desviación estándar. ** = $p \leq 0.01$.

LA ESTIMULACIÓN DE CD13 EN moDCS NO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE QUE INDUCE EL TRATAMIENTO CON LPS

La maduración en moDCs, que se presenta luego del reconocimiento de algún estímulo específico, frecuentemente se ve reflejada en cambios fenotípicos y funcionales en la célula. Entre los cambios que se presentan durante la maduración están: el incremento en la expresión de marcadores de superficie relacionados con el proceso de presentación antigénica [30], incremento en la migración dirigida por las quimiocinas CCL19 y CCL21 [30, 114], así como modificación en el perfil de la secreción de citocinas [30]. Por lo tanto, para estudiar la capacidad de CD13 para modular la maduración, se evaluaron algunos de estos cambios en moDCs estimuladas a través de esta molécula.

Ya que la maduración de moDCs se obtiene mediante su estimulación a través de TLRs [34], se utilizó LPS —ligando de un complejo de reconocimiento y señalización del que forma parte TLR4— para inducir la maduración de las células. Las moDCs se cultivaron en presencia de dos concentraciones distintas de LPS (0.05 ng/mL o 5 µg/mL) durante 48 horas, siendo la menor de ellas subóptima a fin de poder evidenciar modulación positiva en caso de haberla. Estas concentraciones, así como el tiempo de incubación se determinaron en trabajos previos del laboratorio [115].

Por otro lado, se realizó la estimulación de CD13 en moDCs, recurriendo a una estrategia que, hasta el momento es ampliamente usada a falta de la plena identificación de ligandos naturales para CD13. La técnica empleada, consiste en llevar a cabo el entrecruzamiento de CD13 mediante el empleo de mAbs anti-CD13 [78, 101]. Así, para estudiar el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre cada una de las características fenotípicas y funcionales evaluadas durante este trabajo, las moDCs se incubaron a 4 °C con el mAb anti-CD13 452, cuyo efecto sobre la actividad enzimática, es sólo la disminución parcial de la misma [88, 94]. Posteriormente y de manera simultánea a la adición de LPS, se agregó un anticuerpo secundario que reconociera al mAb 452. Considerando que las DCs expresan FcRs [47] y que los anticuerpos empleados para la estimulación de las DCs pudieran ser reconocidos a través de éstos y los efectos observados no ser específicos de la estimulación de CD13, como control, en vez de emplear el mAb 452, algunas DCs fueron incubadas a 4 °C con una IgG1 murina, de igual subclase que el mAb 452, aunque de especificidad desconocida y posteriormente, con el mismo anticuerpo secundario y las mismas concentraciones de LPS que las células estimuladas con el mAb 452. Además, para determinar si la estimulación de las moDCs exclusivamente a través de CD13, podía inducir cambios fenotípicos o funcionales sobre las moDCs y no sólo las modulaba, tanto la estimulación con

el mAb anti-CD13 452 como con la realizada con el anticuerpo control de isotipo, se realizaron en ausencia de LPS.

De manera similar a lo reportado en la línea celular U937 [88], luego de 48 horas de incubación las moDCs estimuladas con el mAb 452, presentaron agregación homotípica, siendo más grandes los agregados celulares en las células estimuladas con la mayor cantidad del mAb. Esta agregación, se presentó incluso en células estimuladas con LPS y no se observó en células que no recibieron tratamiento con el mAb (Fig. 11A). También en las células tratadas con el mAb 452, se pudo observar que algunas células, sobre todo las que no se encontraban formando agregados, se encontraban mayormente adheridas a la caja de cultivo (células fusiformes) en comparación con las que no fueron sometidas a la incubación con el mAb (Figs. 11A y 11B). En cuanto a las células estimuladas con LPS, las que se estimularon con 0.05 ng/mL, eran morfológicamente muy similares a las que no se estimularon con LPS, tanto las que tenían el mAb 452, como las que no. Sin embargo, en aquellas que se estimularon con 5 µg/mL de LPS, se pudo observar la presencia de dendritas (Fig. 11B), resultando más evidentes en el caso de las células sin el anticuerpo 452. Las células estimuladas con mAb 452 también presentaban dendritas, sin embargo, como se encontraban ya fuera en agregados o adheridas al fondo de la caja de cultivo, se dificultó su observación.

Para determinar si el entrecruzamiento de CD13 ejercía algún efecto sobre los cambios fenotípicos causados por la estimulación con LPS, luego de la incubación durante 48 horas con los estímulos descritos, se evaluó la expresión de marcadores de superficie, cuya expresión en moDCs suele incrementarse tras la estimulación con LPS [116-118]. La expresión de CD80, CD83 y CD86, como podía esperarse, aumentó en moDCs estimuladas solamente con LPS para cualquiera de las concentraciones empleadas (Fig. 12A), aunque sólo la mayor de ellas provocó un incremento estadísticamente significativo en la expresión de estos marcadores (Fig. 12B). Sin embargo, la estimulación de CD13 en moDCs no afectó dicha expresión, ni en presencia de cualquiera de las dos concentraciones de LPS, ni en ausencia de LPS (Figs. 12A y 12B). La expresión de HLA-DR, aunque se incrementó en células tratadas con la mayor de las concentraciones de LPS, no se vio modificada de manera significativa con ninguno de los estímulos empleados (Figs. 12A y 12B). Tampoco la IgG1 control modificó la expresión de marcadores, en ninguna condición (ANEXOS Fig. 17).

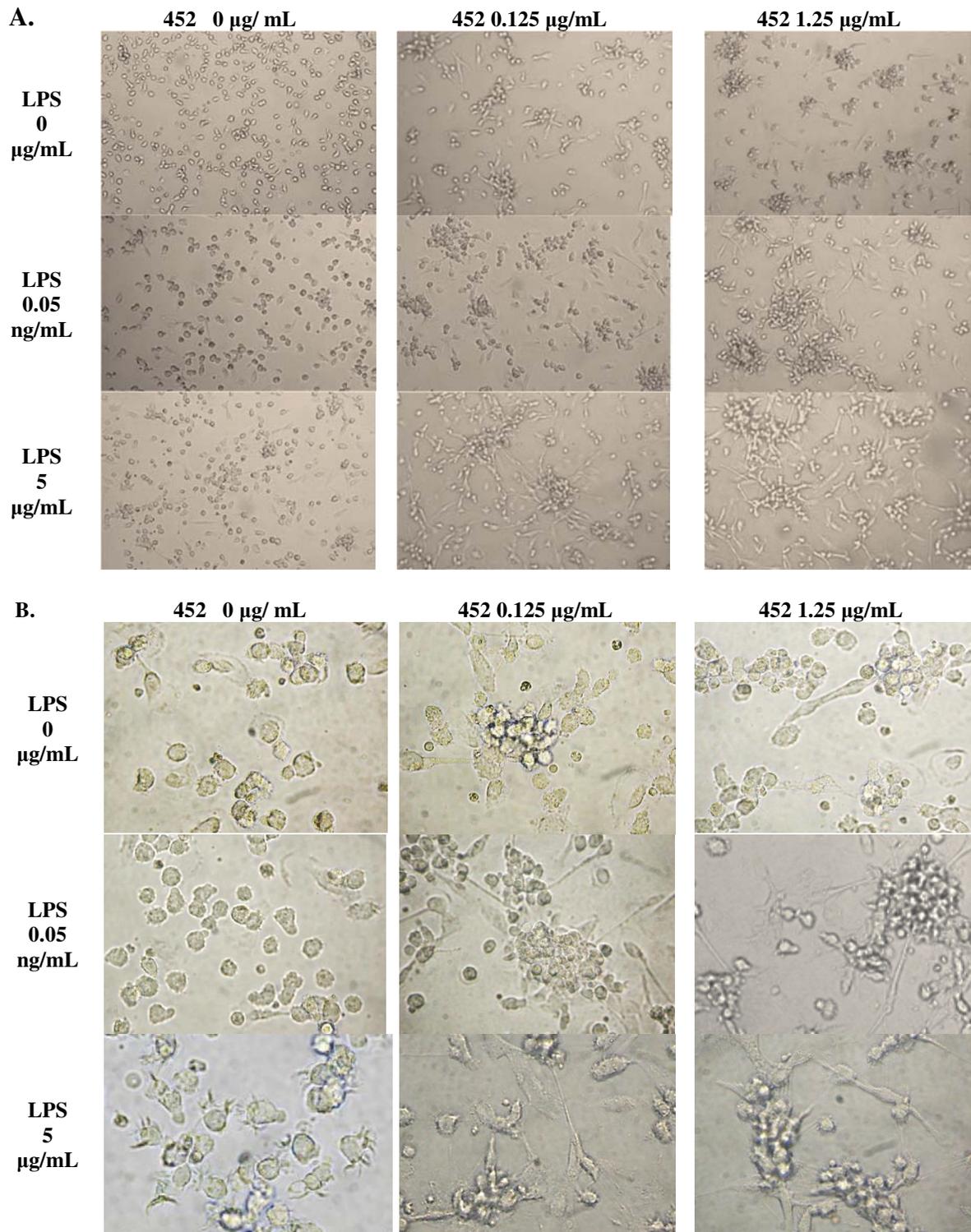
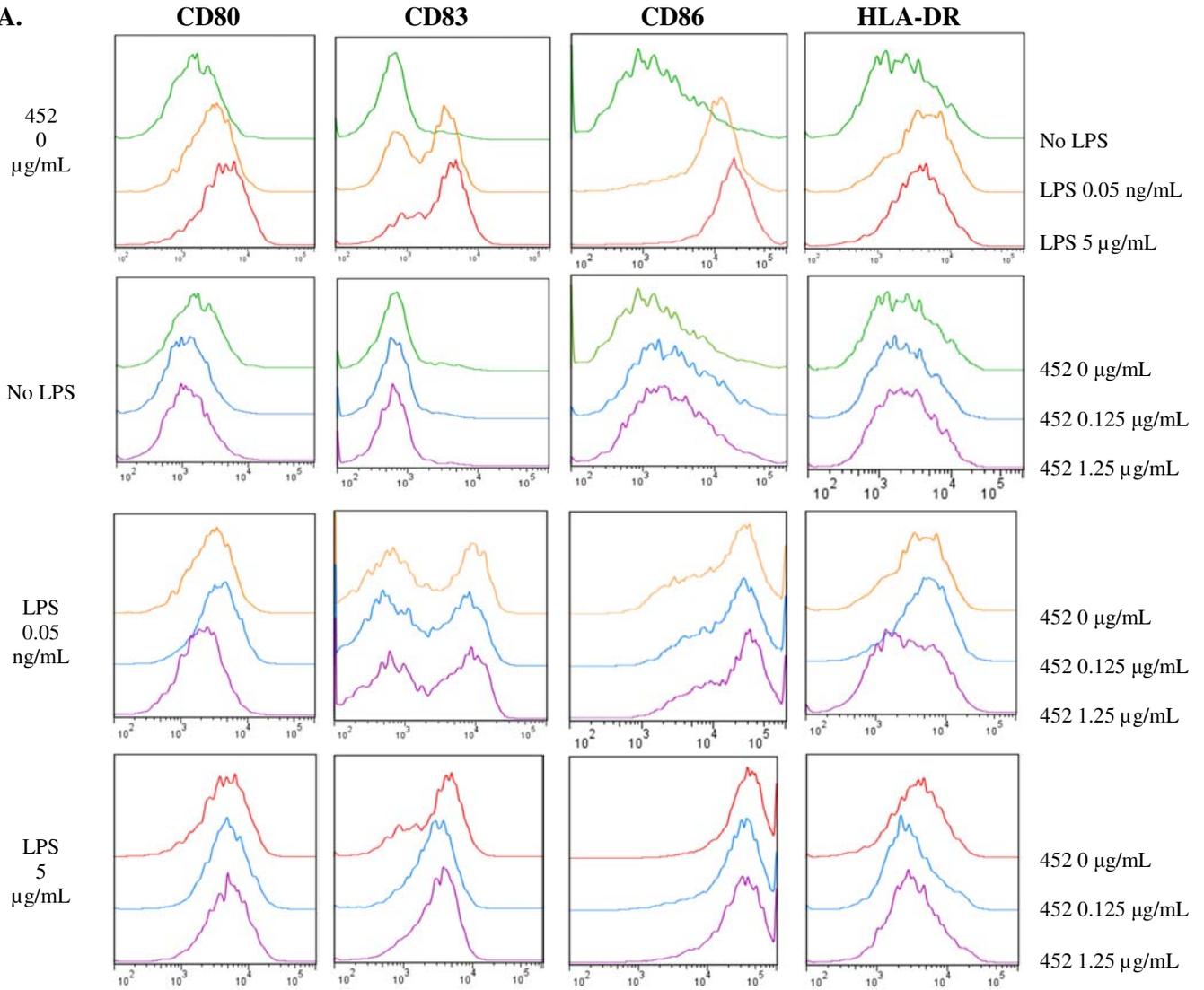


Figura 11. Fotografías representativas de moDCs estimuladas a través de CD13. Objetivos 10x (A) y 100x (B). moDCs se estimularon a través de CD13 al incubarse 30 minutos a 4 °C con el mAb anti-CD13 452. Como control se usó una IgG1, en vez del mAb 452 (no mostrado). Posteriormente, para favorecer el entrecruzamiento de CD13, a las células se les adicionó un anticuerpo de conejo anti-IgG murina, capaz de reconocer el mAb 452, al tiempo que se agregó LPS (0.05 ng/mL o 5 $\mu\text{g/mL}$) donde así se indica. Adicionados estos estímulos, las células se cultivaron durante 48 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO_2 .

A.



B.

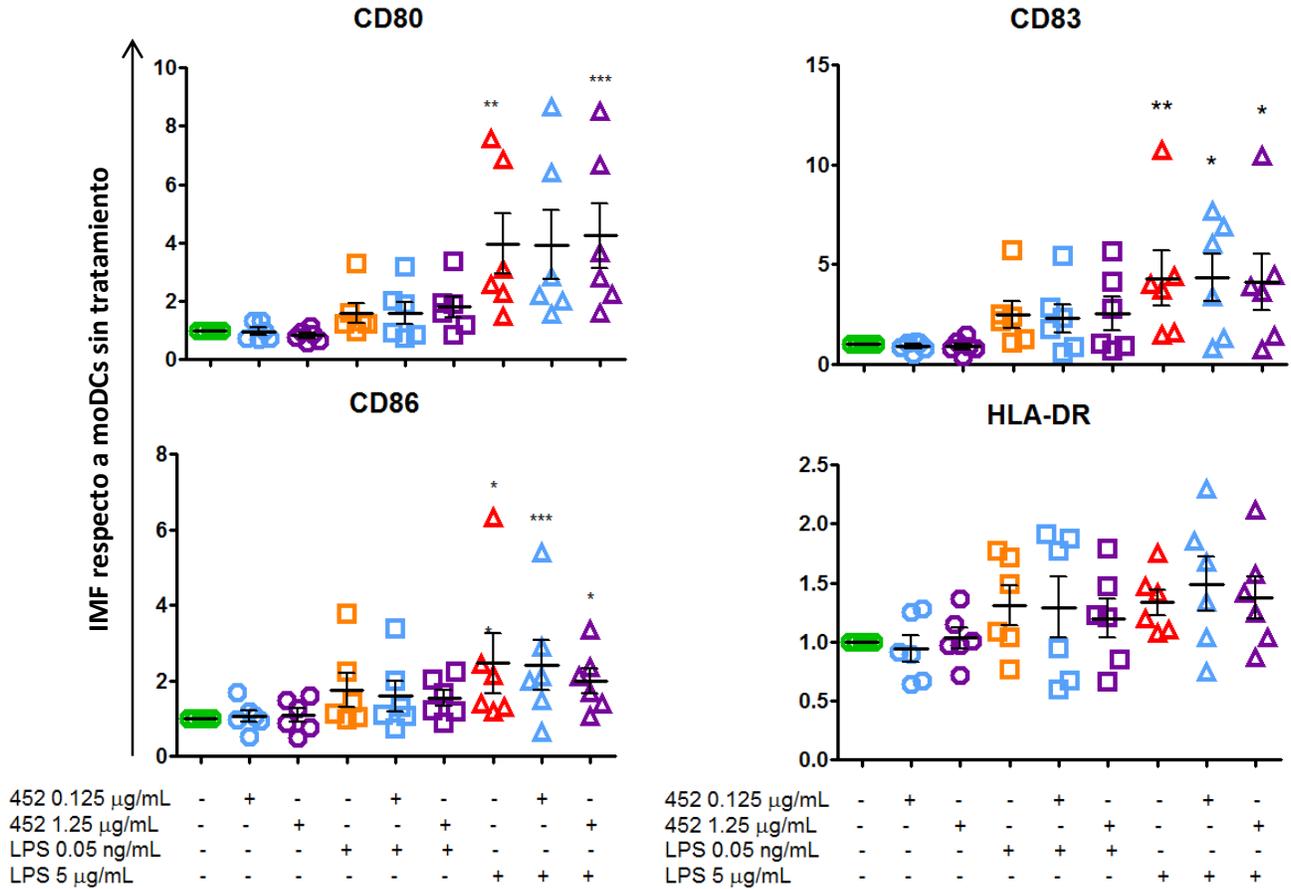
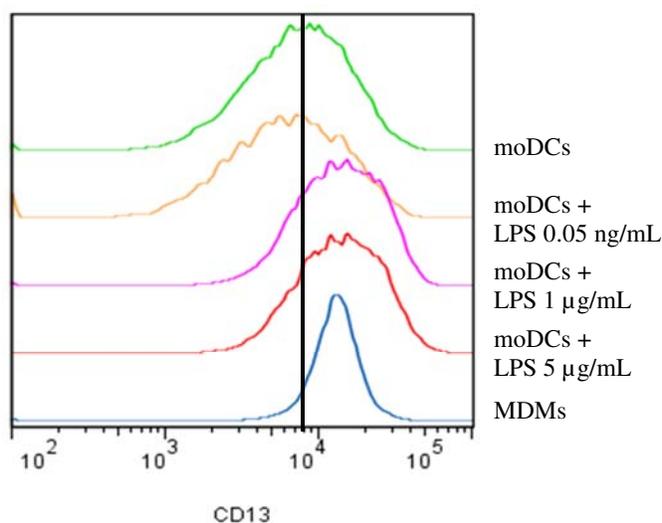


Figura 12. La estimulación de CD13 en moDCs no modifica la expresión de marcadores de superficie. La expresión de CD80, CD83, CD86 y de HLA-DR en la superficie de moDCs, se analizó luego de que las células fueran estimuladas con el mAb 452 (0.125 $\mu\text{g/mL}$ o 1.25 $\mu\text{g/mL}$) y un anticuerpo secundario (0.125 $\mu\text{g/mL}$), en presencia o ausencia de un estímulo de maduración (LPS 0.05 ng/mL o 5 $\mu\text{g/mL}$) durante 48 horas. **A.** Histogramas representativos de la expresión de cada una de las moléculas evaluadas, en moDCs de un donador. **B.** Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de marcadores de superficie en moDCs, relativa a la IMF de moDCs que permanecieron sin estimular. Las barras horizontales corresponden al valor promedio de la IMF de moDCs de 6 donadores distintos (graficados con diferentes símbolos en cada tratamiento) y las barras de error indican la desviación estándar. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$, respecto a moDCs sin estimulación.

LA ESTIMULACIÓN DE moDCS CON LPS INCREMENTA LA EXPRESIÓN DE CD13

Mientras se realizaba la inmunofenotipificación de moDCs estimuladas a través de CD13, se encontró que la estimulación de las células con cualquiera de las dos concentraciones de LPS inducía un incremento en la expresión de CD13; por ello, decidió emplearse una tercera concentración de LPS para estimular a las moDCS—1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ — y posteriormente determinar el efecto de tal estimulación sobre la expresión de CD13.

A



B

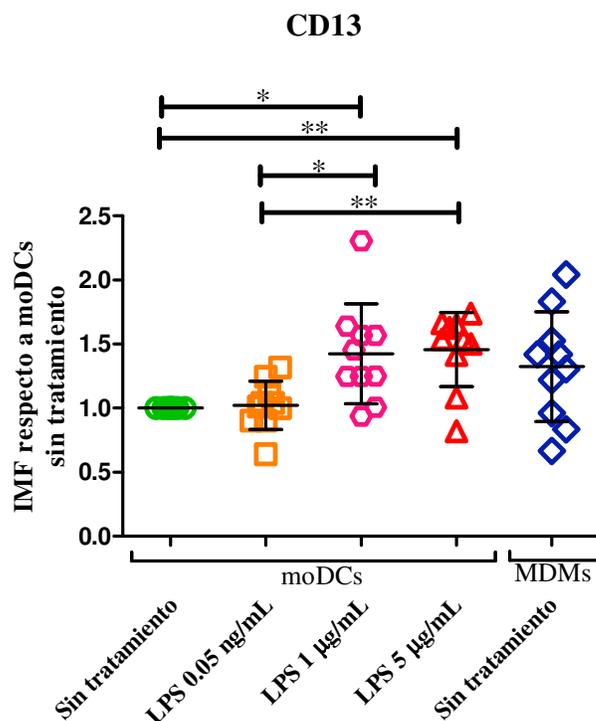


Figura 13. LPS incrementa la expresión de CD13 en moDCs. moDCs se incubaron durante 48 horas con diferentes concentraciones de LPS al término de lo cual se evaluó la expresión membranar de CD13 mediante citofluorometría. **A.** Histograma representativo de la expresión de CD13 en moDCs no estimuladas (línea verde), moDCs estimuladas con LPS —0.05 ng/mL (línea anaranjada), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (línea rosa) o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (línea roja)— y MDMs (línea azul) autólogos. **B.** Intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de CD13 relativa a la IMF de moDCs que permanecieron sin estimular. Las barras horizontales indican el valor promedio de las IMF correspondientes a las células obtenidas de 10 donadores distintos; las barras de error señalan la desviación estándar. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$, respecto a moDCs no estimuladas.

En moDCs estimuladas con cada una de las tres distintas concentraciones de LPS, se evaluó la expresión de CD13 por citofluorometría, así como en moDCs no estimuladas y en MDMs autólogos (Fig. 13A). De esta manera, se pudo observar que la estimulación con LPS provoca un aumento

significativo en la expresión membranal de CD13 (Fig. 13B). En el caso de los MDMs, la expresión de CD13 fue muy variable para cada donador.

LA ESTIMULACIÓN DE CD13 EN moDCs NO MODULA LA SECRECIÓN DE CITOCINAS INDUCIDA POR LA ESTIMULACIÓN CON LPS

Una de las respuestas de las DCs a la estimulación con LPS, es la producción de citocinas proinflamatorias [116-118], de modo que también se evaluó el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre esta respuesta. En este punto, se observó un incremento significativo, respecto a moDCs sin estimular, en la producción de las citocinas proinflamatorias TNF, IL-12p70, IL-1 β , IL-8 e IL-6, sólo en las células estimuladas con la cantidad más alta de LPS; sin embargo, la secreción de estas citocinas no se vio afectada con el entrecruzamiento de CD13, ni solo, ni en presencia de LPS. La citocina antiinflamatoria IL-10, no se modificó de manera estadísticamente significativa bajo ninguno de los estímulos empleados (Fig. 14). Esto indica que la estimulación a través de CD13 no modula la producción de citocinas inflamatorias en moDCs. Por otro lado, tal como se esperaba, la IgG1 control, tampoco afectó la producción de las citocinas (ANEXOS Fig. 18).

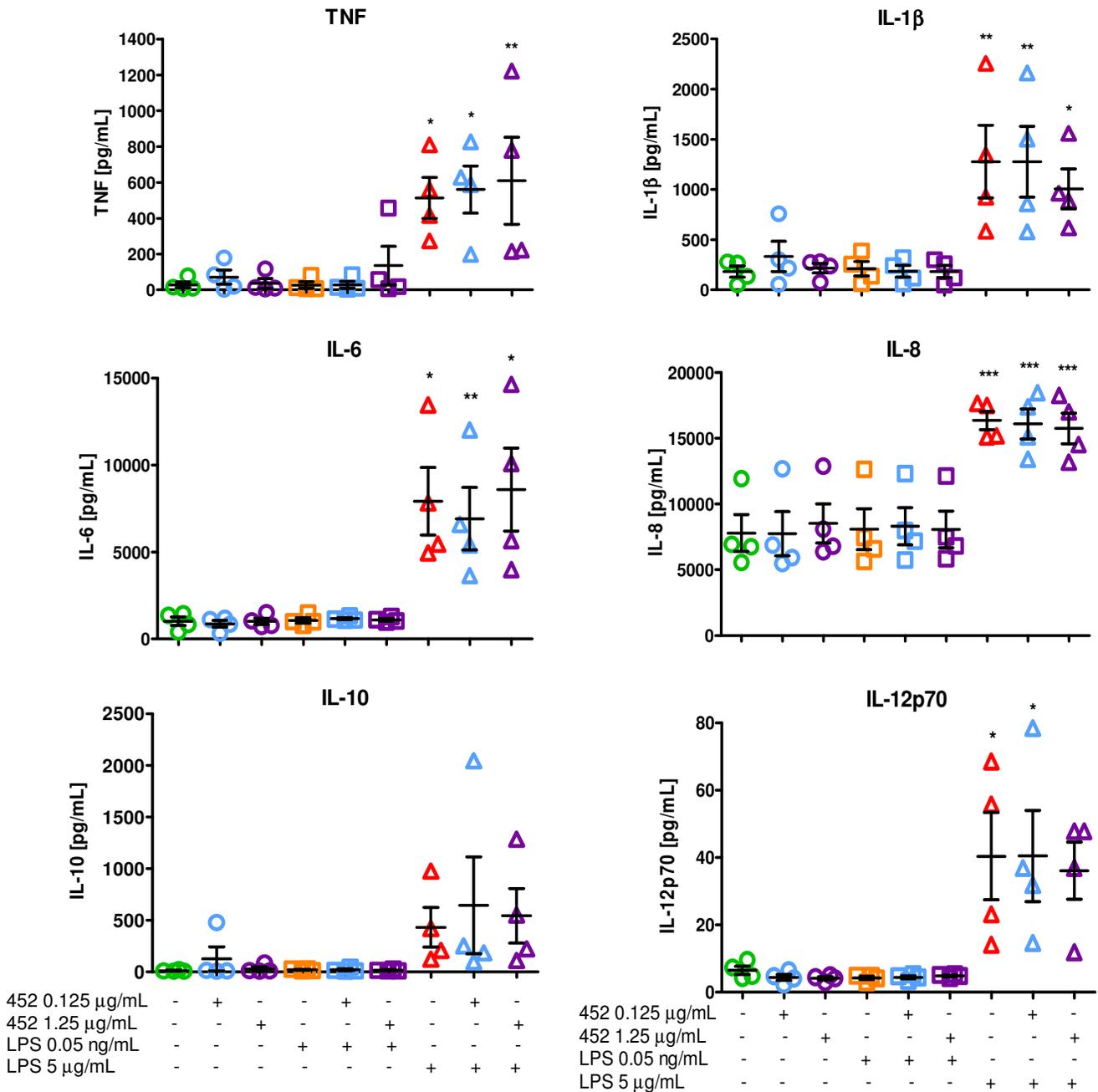


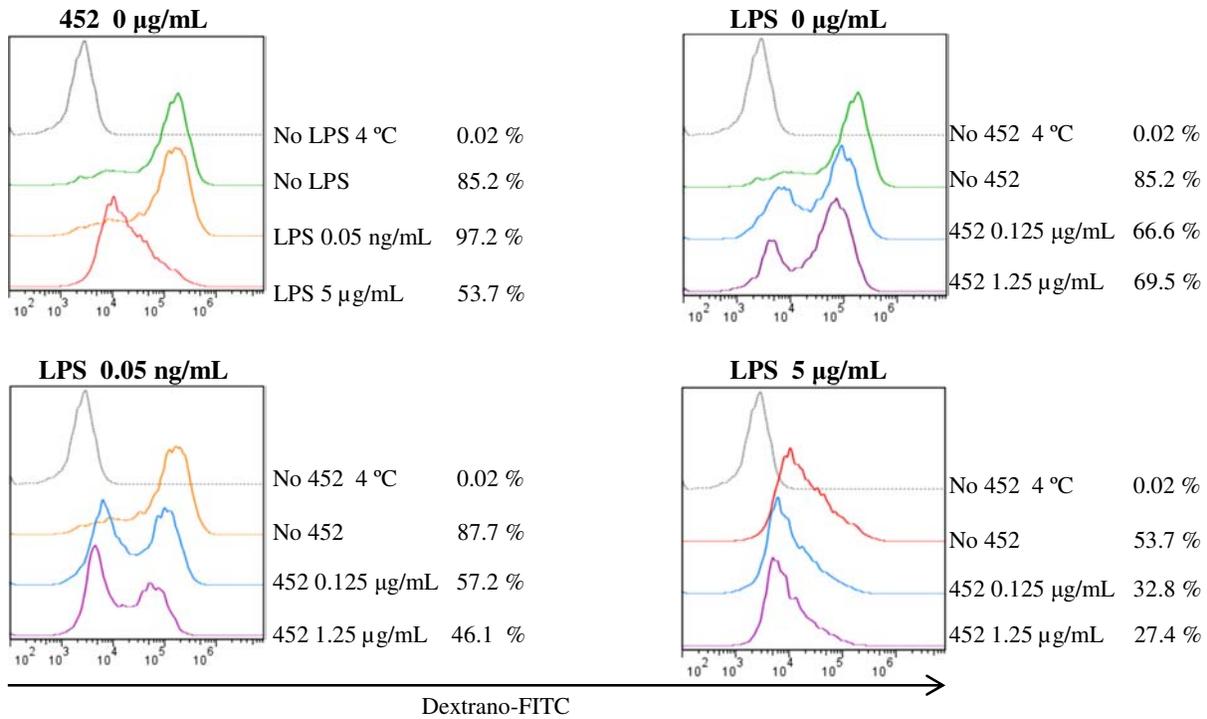
Figura 14. El entrecruzamiento de CD13 en moDCs no modula la secreción de citocinas. El sobrenadante de moDCs estimuladas con el mAb 452 (0.125 µg/mL o 1.25 µg/mL) y un anticuerpo secundario (0.125 µg/mL), en presencia o ausencia de LPS 0.05 ng/mL o 5 µg/mL durante 48 horas se analizó por perlas para determinar concentración de citocinas mediante citometría de flujo. Se muestra la concentración de diferentes citocinas (TNF, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12p70) encontradas en los sobrenadantes de moDCs provenientes de 4 donadores distintos calculadas por interpolación en una curva estándar. El promedio de las cuatro concentraciones determinadas se muestra en forma de barras horizontales, las barras de error corresponden a la desviación estándar. * = p ≤ 0.05; ** = p ≤ 0.01; *** = p ≤ 0.001 respecto a moDCs sin estimular.

LA ESTIMULACIÓN SIMULTÁNEA DE CD13 Y TLR4 DISMINUYE LA CAPACIDAD ENDOCÍTICA DE moDCs

En múltiples ocasiones, se ha reportado la disminución en la capacidad de DCs para internalizar dextrano luego de su estimulación con LPS [119, 120] y puesto que se ha identificado la participación de CD13 en eventos de internalización celular [93, 94, 105], se consideró importante determinar el efecto del entrecruzamiento de CD13 sobre la capacidad de las moDCs para llevar a cabo procesos de endocitosis. Para ello, las moDCs previamente estimuladas, se pusieron en contacto con una solución de dextrano marcado con FITC, de tal forma que se permitiera la endocitosis de dextrano.

De conformidad con lo reportado en la literatura [119, 120], en comparación con las moDCs no estimuladas, el tratamiento con LPS, propició un decremento en la endocitosis de dextrano, aunque sólo la concentración más alta de LPS ocasionó que tal decremento fuera estadísticamente significativo (Figs. 15A y 15B). Las moDCs a las que se les entrecruzó CD13 empleando cualquiera de las dos concentraciones del mAb 452, en presencia de LPS, exhibieron una capacidad disminuida para llevar a cabo la internalización de dextrano y aunque este descenso resulta bastante evidente (Fig. 15A), sólo en el caso de las moDCs que se estimularon con la concentración más elevada del mAb 452 en simultaneidad con la menor cantidad de LPS, mostraron capacidad endocítica significativamente menor en comparación con las moDCs sin estimular (Fig. 15B). El tratamiento con la IgG1 control, no modificó la capacidad endocítica de las moDCs (ANEXOS. Fig. 19).

A.



B.

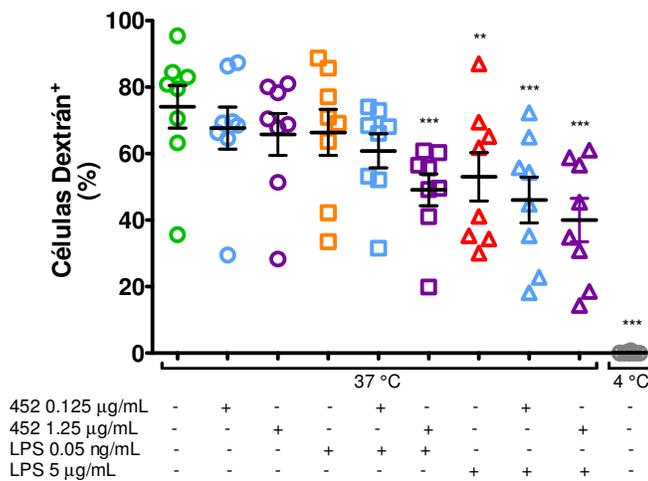
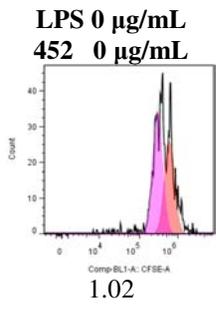


Figura 15. La estimulación de CD13 en presencia de bajas concentraciones de LPS disminuye la endocitosis de dextrano en moDCs. La capacidad endocítica de moDCs, previo tratamiento de éstas con el mAb 452 (0.125 $\mu\text{g/mL}$ o 1.25 $\mu\text{g/mL}$), un anticuerpo secundario (0.125 $\mu\text{g/mL}$) en ausencia o presencia de LPS 0.05 ng/mL o 5 $\mu\text{g/mL}$, se evaluó mediante la internalización de dextrano-FITC por citofluorimetría. **A.** Histogramas representativos correspondientes a un experimento de internalización de dextrano a 37 $^{\circ}\text{C}$ realizado con células de un mismo donador. Las líneas grises corresponden a moDCs que no se estimularon durante las 48 horas previas al ensayo de endocitosis y que se incubaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ en presencia del dextrano-FITC para evitar la internalización del mismo; los porcentajes a la derecha de cada histograma, corresponden a las células que internalizaron dextrano (Dextrano-FITC⁺). **B.** Porcentaje de moDCs que internalizaron dextrano-FITC obtenidas de 8 donadores distintos y estimuladas con el mAb 452 y/o LPS. Las circunferencias grises corresponden a los porcentajes de moDCs dextrano-FITC⁺ que no se estimularon previamente y que se mantuvieron a 4 $^{\circ}\text{C}$ mientras permanecieron en contacto con el dextrano marcado. El promedio de moDCs dextrano-FITC⁺ de ocho experimentos se señala con barras horizontales, mientras que la desviación estándar se indica con las barras de error. ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$ respecto a moDCs sin estímulo.

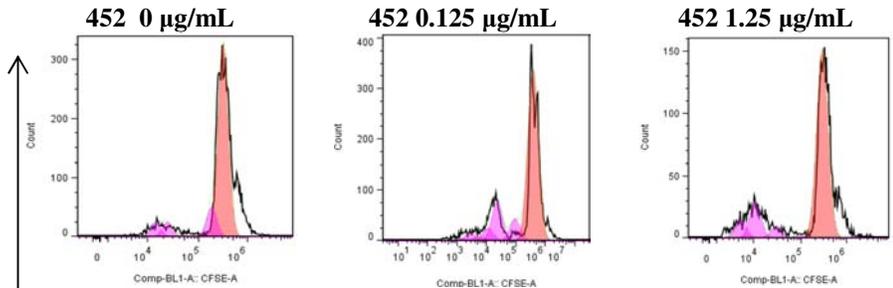
LA ESTIMULACIÓN DE CD13 NO AFECTA LA CAPACIDAD DE moDCs PARA ESTIMULAR LINFOCITOS T CD4⁺

Finalmente, para determinar la influencia del entrecruzamiento de CD13 sobre la capacidad de moDCs para estimular linfocitos T, se MLRs, utilizando como células estimuladoras moDCs previamente tratadas con el mAb 452 en presencia o ausencia de LPS. En estos ensayos, tal como se esperaba, se observó que la proliferación de linfocitos T CD4⁺, evaluada mediante el índice de proliferación —aumento del número de células durante el transcurso del ensayo [121, 122]— de las células CD4⁺ de la población respondedora, fue mayor cuando las células estimuladoras habían sido cultivadas por 48 horas en presencia de LPS (Fig. 16A) en comparación a cuando se emplearon moDCs sin tratamiento previo para estimular a los linfocitos. Sin embargo, solamente con la concentración de 5 µg/mL de LPS para estimular moDCs, consiguió que la proliferación de linfocitos fuera significativamente mayor (Fig. 16B). En cuanto al entrecruzamiento de CD13 en la superficie de células estimuladoras, no modificó significativamente, el potencial de éstas para inducir proliferación alogénica de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 16B). Igualmente, la capacidad de inducir proliferación permaneció inalterada al adicionar la IgG1 control a las moDCs (ANEXOS. Fig. 20).

A.

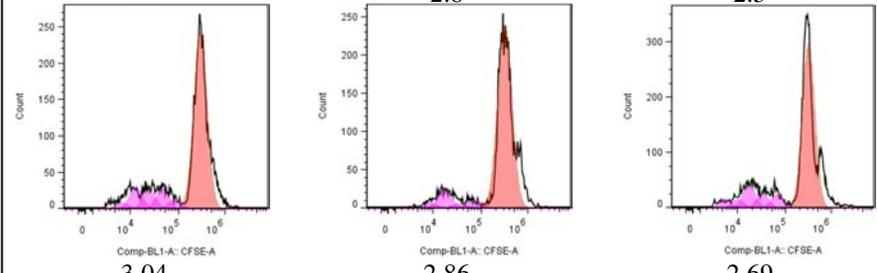


LPS
0 $\mu\text{g/mL}$

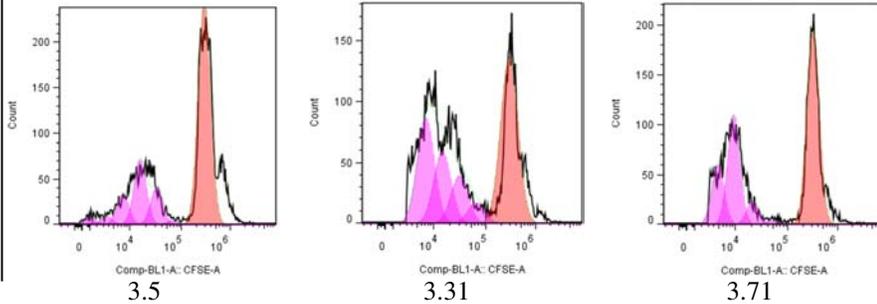


LPS
0.05 $\mu\text{g/mL}$

Número de eventos



LPS
5 $\mu\text{g/mL}$



CFSE

B.

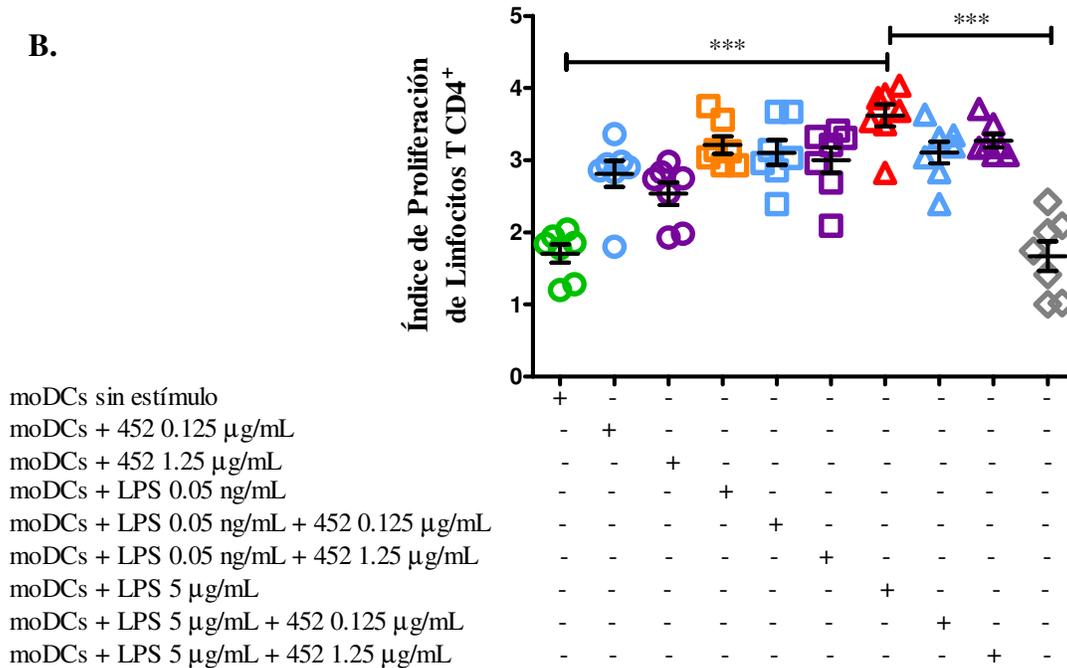


Figura 16. moDCs estimuladas con LPS o sin estimular no modifican su capacidad para activar células T CD4⁺ luego de su estimulación a través de CD13. moDCs estimuladas por 48 horas con el mAb 452 (0.125 µg/mL o 1.25 µg/mL), un anticuerpo secundario (0.125 µg/mL) y/o LPS 0.05 ng/mL o 5 µg/mL, se utilizaron como células activadoras en MLRs. La proliferación de células T CD4⁺ presentes en las células respondedoras se analizó mediante la dilución del colorante carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE). **A.** Histogramas representativos de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados por 3 días con moDCs cultivadas durante 48 horas previas con los estímulos indicados en la parte superior y en el eje vertical izquierdo de los histogramas. Como control negativo de la proliferación, se cultivaron células sin moDCs alogénicas (histograma superior izquierdo). Los valores en la parte inferior de cada histograma, corresponde al índice de proliferación. **B.** Índices de proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con moDCs tratadas con los estímulos que se indican. Resultados de 7 experimentos independientes. Los rombos grises corresponden a los índices de proliferación de células que se cultivaron en ausencia de moDCs. Las barras horizontales indican el valor promedio del índice de proliferación y las barras de error corresponden a la desviación estándar. * = p ≤ 0.05; ** = p ≤ 0.01; *** = p ≤ 0.001 respecto a linfocitos T CD4⁺ cultivados con moDCs, éstas sin estimular.

DISCUSIÓN

CD13 ha sido estudiada en el contexto de diferentes funciones celulares en las que participa [78, 84, 93, 101, 104, 105]. Si bien no se ha identificado ninguna función celular para la que la presencia o actividad enzimática de CD13 sean estrictamente necesarias [104, 107], la estimulación, falta de esta molécula o el bloqueo de su actividad enzimática, conducen a modificaciones en la eficiencia para llevar a cabo diferentes funciones [78], algunas de ellas con plena relevancia inmunológica [83, 93, 94, 96, 97, 105]. En el ámbito inmunológico, CD13 se expresa en altos niveles en células mieloides [81]. Concretamente para DCs, el estudio de CD13 se ha limitado a su importancia en el desarrollo de estas células [102], funciones como fagocitosis [105] e hidrólisis de péptidos potencialmente inmunogénicos [109]. Hasta la fecha, no se había puesto atención en la participación de CD13 durante el proceso de maduración de las DCs. En este trabajo se evaluó la posible participación de CD13 como modulador de la maduración de DCs, con base en su capacidad de modular otros procesos celulares.

Con el desarrollo de la obtención *in vitro* de DCs a partir de monocitos humanos de sangre periférica [111], se pudieron conseguir suficientes DCs para realizar investigación experimental; por eso mismo, las DCs empleadas en este trabajo fueron moDCs obtenidas a partir de monocitos cultivados con IL-4 y GM-CSF. Tomando en cuenta que la maduración de DCs, se consigue mediante la estimulación de las mismas a través de estímulo percibidos por TLRs [34], para llevar a cabo la maduración de las moDCs se empleó LPS, estímulo representativo de maduración en DCs, que induce señalización a través de TLR4 [58], aún en ausencia de CD14 de membrana [123, 124]. Esta señalización continúa con la participación de vías como las de MAPKs y JNK y culmina con la activación de NFκB [58].

Las vías de señalización involucradas en la maduración de DC interactúan entre sí cuando múltiples receptores son estimulados a un tiempo en la superficie de la DC. Esto resulta en modulación de la maduración, viéndose reflejado en modificación de la expresión de marcadores de superficie, del tipo y cantidad de citocinas secretadas y modificación de la capacidad de migración de las DCs; finalmente, esto resulta en la mayor o menor capacidad de las DCs para estimular linfocitos, favoreciendo o inhibiendo algún tipo de respuesta inmunológica.

La coestimulación de TLRs junto con otros receptores de superficie resulta en la modulación de cambios celulares que ocurren durante la maduración. Lectinas de tipo C, a través de la activación de vías de señalización de las MAPKs (con participación de ERK1/2, AKT, Lyn y Syk) han mostrado capacidad para modular efectos del LPS sobre DCs [52, 125].

Considerando que CD13 es capaz de participar en eventos de internalización celular [94, 105], así como de inducir señalización a través de la Tyr⁶ [91] con la subsecuente activación de ERK1/2, JNK, p38MAPK, PI3K, Src y Syk [91, 94, 101], eventos que se consiguen durante la estimulación a través de lectinas de tipo C y que han mostrado efecto modulador en la maduración; se sugirió que CD13 fuera partícipe de la modulación de la maduración de DCs.

Ligandos naturales de CD13, diferentes de virus, no se han identificado; sin embargo, algunas evidencias colocan a galectina 3 como un buen candidato a ser ligando de CD13. Galectina 3 es una lectina de tipo C que se libera por células activadas en condiciones de inflamación, pudiendo actuar como DAMP y como PRR y dada su capacidad para oligomerizarse [126], al ser reconocida por receptores de la superficie celular, podría inducir el entrecruzamiento de los mismos. Por ello, para inducir estimulación a través de CD13 se empleó un anticuerpo anti-CD13, cuya unión resulta en señalización [78]. Se empleó además, un anticuerpo secundario para favorecer el entrecruzamiento de CD13, simulando la consecuencia que podría tener la unión de un ligando natural. Además se sabe que algunos de los efectos obtenidos mediante el uso de anticuerpos anti-CD13 se obtienen sólo cuando se usa un anticuerpo secundario para entrecruzar [101].

Para evaluar el efecto de la estimulación de CD13 sobre la maduración de DCs, una vez realizada la coestimulación de TLR4 y de CD13, se evaluaron características y procesos que se modifican con la estimulación de moDCs con LPS. Luego de la estimulación con LPS, las DCs, incrementan la expresión de las moléculas de superficie CD40, CD80, CD86, CD83 y MHC-II, así como de las citocinas proinflamatorias IL-12, IL-6, IL-8, TNF- α e interferones de tipo I [124] y disminuyen la expresión de MR y la endocitosis a través de éste, lo mismo que la macropinocitosis [127]. En general, estos cambios en las DCs les confieren elevada capacidad para estimular y polarizar linfocitos [30]. Las características que se evaluaron, fueron la morfología de las células (Fig. 11), la expresión de marcadores de superficie (Fig. 12), la secreción de citocinas (Fig. 14), la capacidad para endocitar dextrano (Fig. 15) y la capacidad de inducir proliferación de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 16). La mera estimulación de CD13 en moDCs no provocó que ninguna de estas características se modificara, lo que lo descarta como receptor capaz de inducir maduración en moDCs, sin embargo como el objetivo de este trabajo fue determinar su papel como modulador de la maduración, se evaluaron las consecuencias de la estimulación de CD13 sobre la maduración inducida por LPS.

En vista de que los efectos que se inducen por LPS en DCs, son dosis dependientes [124], en el presente trabajo, se emplearon dos concentraciones distintas de esta endotoxina para activar a las

moDCs: una de ellas subóptima (0.05 ng/mL) —emulando condiciones fisiológicas, donde es más probable encontrar bajas concentraciones de ligandos bacterianos [128]—que permitiera detectar modulación positiva en las funciones evaluadas y una óptima (5 µg/mL), que a la vez que sirvió como control positivo para comprobar la capacidad de las moDCs para activarse, podría permitir la identificación de modulación negativa de la maduración por CD13.

La estimulación de moDCs mediante LPS, como cabría esperar, provocó cambios en la morfología de las células, siendo más prolongadas las dendritas de las células estimuladas con esta molécula (Fig. 11), incrementó la expresión de marcadores de superficie (CD80, CD83, CD86 y HLA-DR) (Fig. 12), indujo la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF) (Fig. 14), disminuyó la endocitosis (Fig. 15) e incrementó su capacidad para inducir proliferación de linfocitos T CD4⁺ (Fig. 16). Estos efectos sólo fueron estadísticamente significativos en las células activadas con 5 µg/mL de LPS (excepto para la expresión de MHC-II y la producción de IL-10).

Otro cambio inducido por LPS, en cuanto a la expresión de moléculas de superficie se refiere, fue el incremento significativo en la expresión de CD13 en moDCs (Fig. 13). Este efecto sobre la expresión de CD13 ya había sido reportado previamente en monocitos humanos [129] y mucho más recientemente se reportó en Mφs murinos derivados de médula ósea [130]. Estos reportes proponen a CD13 como un modulador de la respuesta inflamatoria, por mecanismos independientes de su actividad enzimática. Por otro lado, grupos de trabajo que han correlacionado la expresión y actividad enzimática de CD13 con la presencia de linfocitos en ambientes inflamatorios como articulaciones de pacientes con artritis y lavados bronqueoalveolares de pacientes con sarcoidosis, sugieren que CD13 tiene un papel proinflamatorio en estas condiciones [84, 85], es decir que, aún no se esclarece si CD13 tiene funciones proinflamatorias o inmunomoduladoras.

De manera semejante a lo encontrado en este trabajo, en células de la línea J774 se observó incremento en la expresión de CD13, acompañado del aumento en la expresión de MHC-II y CD86, aunque en el caso de células J774, luego de la estimulación con IFNγ [96]. En el presente trabajo, estos tres marcadores se incrementaron luego del tratamiento de moDCs con LPS, aunque en el caso de HLA-DR, dicho incremento no fue significativo. Esto sugiere que la regulación de la expresión estos marcadores se ve afectada por los mismos estímulos y no descarta la participación de CD13 en la presentación antigénica.

La relación entre CD13 y la modulación en la expresión de marcadores de superficie causada por la estimulación con LPS, sólo había sido estudiada en ratones CD13^{-/-} sin que se encontrara diferencia significativa en la expresión de moléculas MHC-I, MHC-II, CD86, CD80 ni CD40 en BMDCs CD13^{-/-} en comparación con BMDCs WT [107] En el presente trabajo, no se encontró que el entrecruzamiento de CD13 modificara la expresión de HLA-DR CD80, CD86—moléculas involucradas en la presentación de antígenos (señales 1 y 2 para la activación de linfocitos [30])— ni de CD83 —molécula involucrada en la activación de linfocitos, de la que aún se desconoce el mecanismo de acción[131,132]—que se vio incrementada por el empleo de LPS (Fig. 12). En otras palabras, la estimulación de CD13 no modula expresión estos marcadores en moDCs. Considerando que no todas las características y funciones celulares, se regulan de la misma forma, a pesar de no haber observado efecto sobre la expresión de marcadores, aún podría esperarse que CD13 tuviera efecto modulador sobre algunos otros procesos de las moDCs. Por ello, se continuó estudiando la participación de CD13 en otras funciones celulares.

Tomando en cuenta que la estimulación con LPS induce secreción de citocinas proinflamatorias en DCs [124] y teniendo en cuenta que la estimulación de CD13 en monocitos conduce al incremento en el mRNA de IL-8 [101], se optó evaluar el efecto del entrecruzamiento de CD13 en la producción de citocinas. Con excepción de la IL-10, el resto de las citocinas analizadas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y TNF) se vieron incrementadas por la estimulación con LPS. Sin embargo, la estimulación de CD13 no indujo cambios en la secreción de estas citocinas (Fig. 14), a pesar de que vías de señalización que se han demostrado activadas tras la estimulación de CD13 [91, 94, 101, 130] como MAPKs, PI3K, están involucradas en la producción de citocinas por DCs [125, 133] y de que la estimulación de TLR4 en conjunto con la estimulación de otros receptores que activan MAPKs, PI3K y STAT resulta en incremento de la secreción de citocinas [52]. Lo anterior puede deberse a que la estimulación de diferentes receptores, a pesar de tener señalización por algunas vías en común no tienen los mismos efectos funcionales en las células.

Las citocinas que se vieron incrementadas de manera significativa con la presencia de 5 μ g/mL de LPS, están involucradas en procesos inflamatorios. Se sabe que la IL-1 β se encuentra involucrada en la activación primaria de linfocitos T *naïve* y la proliferación de éstos; además puede inducir activación y migración de DCs y en nódulos linfáticos favorece la agregación de linfocitos y DCs [134]. En tanto que la IL-6 actúa como factor de crecimiento y diferenciación de células B, mientras que en linfocitos

T funge como molécula coestimuladora accesoria [124]; además, junto con TGF β e IL-23 permite el desarrollo de respuestas tipo Th17 [135].

De manera notable, la citocina más abundante en los sobrenadantes de las moDCs evaluadas en este trabajo, fue la IL-8, tanto en condiciones basales como en las moDCs que se estimularon. La IL-8 es una molécula miembro de la familia de las quimiocinas α (quimiocinas CXCL), que induce migración de neutrófilos [134]. A diferencia de lo reportado por Riemann [101], en el presente trabajo no se encontró que la estimulación de CD13 mediante un mAb, incrementara los niveles de IL-8, esta diferencia posiblemente se debe a que el grupo de Riemann, identificó solamente mRNA de IL-8 y no se descartan modificaciones post transcripcionales que interfieran con la presencia de la proteína. Otra diferencia radica en las células y el anticuerpo utilizados para llevar a cabo la estimulación de CD13; mientras ellos utilizaron el mAb WM15 (que interfiere con la actividad enzimática de CD13) en la línea celular U937, mientras que para desarrollar el presente trabajo, se estimuló CD13 con el mAb 452 (que sólo ligeramente disminuye la actividad enzimática de CD13) en moDCs.

El TNF secretado por DCs es capaz de actuar de manera autócrina, incrementando los niveles de expresión de moléculas MHC y coestimuladoras, lo cual resulta en una mayor capacidad de activación de linfocitos T [136], además de incrementar el tiempo de vida útil de las DCs [137].

Es importante mencionar que, aunque el tratamiento con LPS a una concentración de 5 μ g/mL provocó un incremento significativo en la secreción de IL-12p70 (forma bioactiva), la concentración de esta citocina fue la menor de las citocinas evaluadas. Punnonen y colaboradores encontraron que moDCs con baja expresión de CD1a luego de su obtención a partir de monocitos, al estimularse con LPS producían bajas cantidades de IL-12 y eran incapaces de dirigir linfocitos T *naïve* hacia efectores Th1 [138]. De forma similar, las moDCs obtenidas durante el desarrollo del presente trabajo, no muestran una elevada expresión de CD1a (Fig. 10), sin embargo, con los experimentos realizados al momento, no puede especularse sobre la suficiencia de estos niveles de IL-12 para inducir polarización de linfocitos T *naïve*.

Aunque DCs maduras son capaces de continuar realizando endocitosis mediada por algunos receptores como lectinas [29], la endocitosis mediada por MR disminuye en moDCs luego del tratamiento de éstas con LPS [127], además de que CD13 se ha visto implicado en procesos de internalización celular [78, 94, 105]. Se consideró importante evaluar la participación de CD13 en la endocitosis de dextrano; este polisacárido que puede internalizarse tanto por macropinocitosis así como

a través de endocitosis mediada por el MR [127]. El tratamiento con LPS, provocó una disminución en la endocitosis de este polisacárido, aunque este efecto sólo fue significativo cuando la estimulación de las células se realizó con la mayor cantidad de LPS.

De forma importante, se encontró que en entrecruzamiento de CD13 provocó una notable tendencia a la baja de la capacidad de moDCs para realizar endocitosis. Aunque la concentración subóptima de LPS no provocó una disminución estadísticamente significativa en la endocitosis de dextrano, el entrecruzamiento de CD13 con la concentración mayor del mAb 452, en presencia de esta concentración subóptima de LPS, provocó que la disminución en la capacidad endocítica de las células fuera estadísticamente significativa respecto a la capacidad endocítica de moDCs sin estimular. Lo anterior consolida la importancia de CD13 como modulador de procesos celulares de internalización, los resultados aquí mostrados sugieren que de manera importante en casos de endocitosis mediada por receptor. Previamente se había demostrado la colocalización membranal de CD13 y MR y su posterior cointernalización es respuesta ligandos de MR en la línea celular J774 [96].

El objetivo de la maduración en las DCs es adquirir las características que les permitan llevar a cabo su principal función que consiste en la presentación de antígenos y de esta manera interactuar con linfocitos, para activarlos o inducir su diferenciación hacia Th1, Th2 o Th17, según se requiera; por lo que durante el desarrollo de este trabajo, se consideró importante determinar si la capacidad de moDCs para inducir proliferación en linfocitos T CD4⁺, se veía modificada por el entrecruzamiento de CD13.

Durante las MLRs, las DCs son las principales responsables de la estimulación alogénica, debido tanto a la expresión de moléculas MHC, como a los niveles de moléculas coestimuladoras en su superficie; aunque no se descarta que algunas quimiocinas también contribuyan, de forma que el reconocimiento por parte de linfocitos T de péptidos en MHC alogénicos, resulta en respuestas proliferativas durante las MLRs [139]. En el presente trabajo, se evaluó si la estimulación a través de CD13 modifica la capacidad de moDCs para inducir activación en linfocitos T CD4⁺. No se encontró que dicha capacidad se modificara durante la estimulación de CD13. Aunque como se esperaban las moDCs estimuladas con LPS mostraron mayor capacidad para inducir proliferación en linfocitos T CD4⁺ alogénicos; efecto que fue significativamente mayor sólo en moDCs estimuladas con 5 µg/mL de LPS.

Los resultados aquí presentados sobre la proliferación alogénica inducida por moDCs, correlacionan con la expresión de marcadores en estas células, así como con el perfil de secreción de citocinas, en cuyos casos, también el incremento sólo fue significativo cuando se empleó LPS a 5 µg/mL.

Todo lo anterior muestra que la estimulación de CD13, llevada a cabo a través de su entrecruzamiento con el mAb 452 y un anticuerpo secundario, no es suficiente para modular la maduración de moDCs inducida por uno de los ligandos de TLR4 (el LPS). Sin embargo, estos resultados también sugieren que CD13 participa como modulador de procesos celulares específicos, como la internalización de moléculas; en este caso se encontró que la estimulación a través de CD13 puede disminuir la capacidad endocítica de dextrano en moDCs en presencia de niveles muy bajos de LPS.

RESUMEN DE LOS HALLAZGOS REALIZADOS

- ★ La expresión de CD13 en moDCs se incrementa al estimular dichas células con LPS, lo anterior sugiere que CD13 podría participar como modulador de alguno o varios de los procesos celulares que se desencadenan al inducir maduración de moDCs a través TLR4.
- ★ El entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo monoclonal 452, no cambia la expresión de los marcadores de superficie analizados, así como tampoco la secreción de citocinas durante la estimulación de las moDCs con LPS. Estas dos características son indicativas de la madurez de la DC y al no verse modificadas por la activación de CD13, concluimos que CD13 no participa de la maduración a este nivel.
- ★ El entrecruzamiento de CD13 con el anticuerpo monoclonal 452 en moDCs, no modifica la proliferación de linfocitos T CD4⁺ alogénicos al ser estimulados con estas células, indicando que CD13 no es necesaria para la activación eficaz de estos linfocitos.
- ★ La estimulación simultánea de CD13 y de TLR4 disminuye la endocitosis en moDCs, lo que indica disminución en la capacidad de las células para capturar antígenos; por ello se sugiere que CD13 pudiera estar participando en la optimización del procesamiento y presentación antigénica.

CONCLUSIÓN

- ★ **La estimulación de CD13 no modifica la maduración de moDCs a nivel de expresión de marcadores de superficie ni a nivel de producción de citocinas, no obstante, modula procesos específicos como la endocitosis. Lo anterior sugiere que CD13 pudiera tener un papel relevante en procesos de internalización celular durante la maduración de las DCs.**

PERSPECTIVAS

Con el fin de obtener mayor información respecto al efecto del entrecruzamiento de CD13 en el modelo utilizado durante esta investigación, se sugiere evaluar la producción de otras citocinas (IL-23, IL-27, IL-35) por moDCs estimuladas a través de CD13, ya que pudieran estarse modulando citocinas implicadas en el desarrollo de respuestas diferentes a respuestas inflamatorias tipo Th1.

Como ya se ha descrito, CD13 está implicada en procesos de motilidad celular y quimiotaxis [78, 85], de forma que también se propone evaluar el efecto del entrecruzamiento de CD13 en moDCs, luego de la estimulación de éstas con LPS, sobre la capacidad de migración en respuesta a quimiocinas como CCL19 y CCL21, pues en el caso de algunas líneas celulares, el tratamiento de ellas con anticuerpos anti-CD13 ha disminuido su capacidad de migración [78]. Otro posible escenario para la participación de CD13 en la modulación de la migración celular, podría ser la modulación de la expresión de receptores de quimiocinas como CCR7, de forma similar a lo que se ha observado durante la coestimulación de TLRs y otros receptores que inducen activación de las vías de las MAPKs [110], vías que se activan con la estimulación de CD13 [93, 94, 101].

Se sugiere evaluar los efectos del entrecruzamiento de CD13 sobre la capacidad de moDCs para estimular linfocitos T CD8⁺, y en el caso de los linfocitos T CD4⁺, evaluar el perfil efector de los mismos.

En vista de que el único proceso que se vio modificado por el entrecruzamiento de CD13 en moDCs fue la endocitosis de dextrano, se propone que se estudien los mecanismos a través de los cuáles CD13 está modulando dicho proceso. Al respecto se sugiere que busquen las vías de señalización implicadas en el proceso de endocitosis. Como moléculas candidatas partícipes en dicha señalización se sugieren MAPKs como p38. La propuesta del estudio de las vías de señalización en las que participa esta molécula se hace con base en que la p38MAPK participa en la señalización desencadenada al estimular DCs con LPS (lo que resulta en la disminución de la internalización de dextrano) [140] y en que es una de las moléculas que señala luego de que es estimulada CD13 [91]. Es importante que el estudio de la señalización se realice sin dejar de lado la posible contribución de la actividad enzimática de CD13 en este proceso.

Puesto que el sinergismo o antagonismo de los efectos de la coestimulación de diversos receptores de superficie, dependen del tipo de receptores involucrados [52], no se descarta que CD13 pudiera estar

modulando los efectos de la señalización iniciada por otros receptores. Por ejemplo, se ha visto que en moDCs, la lectina 2 de tipo C asociada a células dendríticas (DCAL-2) —capaz de inducir señalización a través de MAPKs—, al ser estimulada mediante anticuerpos anti-DCAL-2, modula la producción de citocinas y la expresión de CCR7, pero lo hace de manera distinta dependiendo del receptor con el que se estimule simultáneamente (TLR4, dectina-1 o CD40) [110]. Debido a lo anterior, se propone realizar un estudio sobre los efectos del entrecruzamiento de CD13 con la estimulación simultánea de otros receptores, principalmente TLRs y CLR, expresados en la superficie de moDCs.

REFERENCIAS

1. Reis e Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*. 16: 21-25.
2. Sato, K. y Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergology International*. 56 (3): 183-191.
3. Haniffa, M., Collin, M. y Ginhoux, F. (2013). Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse. *Advances in Immunology*. 120:1-49.
4. Steinman, R. M. y Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75(10):5132.
5. Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*. 6(6):476-83.
6. Kushwah, R. y Hu, J. (2011). Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology*. 133(4):409-19.
7. Schlitzer, A. y Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology*. 26:90-9.
8. Seillet, C. y Beltz, G. T. (2013). Terminal differentiation of dendritic cells. *Advances in Immunology*. 120:185-210.
9. Miloud, T., Hämmerling, G. J. y Garbi, N. (2010). Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods in Molecular Biology*. 595:21-42.
10. Mildner, A. y Jung, S. (2014). Development and Function of Dendritic Cell Subsets. *Immunity*. 40(5):642-56.
11. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. y Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*. 31:563-604.
12. Liu, K. y Nussenzweig, M. C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*. 234(1):45-54.
13. Domínguez, P. M. y Ardavín, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological Reviews*. 234(1):90-104.

14. Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*. 179:1109–18.
15. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. y Muller, W. A. (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. 11:753–61.
16. León, B., López-Bravo, M. y Ardavín, C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Seminars in Immunology*. 17(4):313–318.
17. Varol, C., Landsman, L., Fogg, D. K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R, Kalchenko, V., Geissmann, F. y Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 204(1):171-80.
18. Collin, M., McGovern, N. y Haniffa, M. (2013). Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 140(1):22-30.
19. Verdijk, P., Dijkman, R., Plasmeijer, E. I., Mulder, A. A., Zoutman, W. H., Mieke Mommaas, A. y Tensen, C. P. (2005). A lack of Birbeck granules in Langerhans cells is associated with a naturally occurring point mutation in the human Langerin gene. *Journal of Investigative Dermatology*. 124(4):714-7.
20. Bieber, K. y Autenrieth, S. E. (2015). Insights how monocytes and dendritic cells contribute and regulate immune defense against microbial pathogens. *Immunobiology*. 220(2):215-26.
21. Shortman, K. y Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*. 2(3):151-61.
22. Lewis, K. L. y Reizis, B. (2012). Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1;4(8):a007401.
23. Howard, C. J., Charleston, B., Stephens, S. A., Sopp, P. y Hope, J. C. (2004.) The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Animal Health Research Reviews*. 5(2); 191–195.
24. Del Prete, G. (2008). The complexity of the CD4 T-cell responses: old and new T-cell subsets. *Parassitologia*. 50(1-2):9-16
25. Mehta-Damani, A., Markowicz, S. y Engleman, E. G. (1994). Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *The Journal of Immunology*. 153(3):996-1003.

26. Wieder, E. y Anderson, M. D. (2003). Dendritic Cells: A Basic Review. *International Society for Cellular Therapy*. 1-6.
27. Thompson, A. G. y Thomas, R. (2002). Induction of immune tolerance by dendritic cells: Implications for preventative and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease. *Immunology and Cell Biology*. 80: 509–519
28. Gutcher, I. y Becher, B. (2007). APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*. 117(5): 1119–1127.
29. Platt, C. D., Ma, J. K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R. A., Mellman, I. y Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(9):4287-92.
30. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. y Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 18:767–811.
31. Sato, K. y Fujita, S. (2007). Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergology International*. 56 (3): 183-191.
32. Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Puccino, T., Connolly, J., Fay, J., Pascual, V., Palucka, A y Bancherau, J. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*. 219: 118-142.
33. Lichtman, A. H. (2012). T cell costimulatory and coinhibitory pathways in vascular inflammatory diseases. *Frontiers in Physiology*.16;3:18.
34. Joffre, O., Nolte, M. A., Spörri, R. y Reis e Sousa, C. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Review*. 227(1):234-47.
35. Kaliński, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A. y Kapsenberg, M. L. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today*. 20(12):561-7.
36. Li, D. Y., Gu, C., Min, J., Chu, Z. H. y Ou, Q. J. (2012). Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 4(1):131-134.
37. Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. y Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent

- immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*. 27(12):3135-42.
38. Lutz, M. B. y Schuler, G.(2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*. 23(9):445–449.
 39. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C. y Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual Review of Immunology*. 20:621-67.
 40. Spörri, R. y Reis e Sousa, C. (2005). Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nature Immunology*. 6(2):163-70.
 41. Kaisho, T. (2012). Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine*. 30(52):7652-7
 42. Fritz, J. H., Girardin, S. E. , Fitting, C., Werts, C., Mengin-Lecreulx, D., Caroff, M., Cavillon, J. M., Philpott, D. J. y Adib-Conquy, M. (2005). Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *European Journal of Immunology*. 35(8):2459-70.
 43. van Kooyk, Y. (2008). C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochemical Society Transactions*. 36(6):1478-81
 44. Schroeder, J. T., Bieneman, A. P., Xiao, H., Chichester, K. L., Vasagar, K., Saini, S. y Liu, M.C. (2005). TLR9- and FcεpsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. *The Journal of Immunology*. 175(9):5724-31
 45. Geissmann, F., Launay, P., Pasquier, B., Lepelletier, Y., Leborgne, M., Lehuen, A., Brousse, N. y Monteiro, R. C. (2001). A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon crosslinking by IgA complexes. *The Journal of Immunology*. 166:346–52.
 46. Jurgens, M., Wollenberg, A., Hanau, D., de la Salle, H. y Bieber, T. (1995). Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, Fc εpsilon RI. *The Journal of Immunology*. 155:5184–89
 47. Sedlik, C., Orbach, D., Veron, P., Schweighoffer, E., Colucci, F., Gamberale, R., Ioan-Facsinay, A., Verbeek, S., Ricciardi-Castagnoli, P., Bonnerot, C., Tybulewicz, V. L., Di Santo, J. y Amigorena, S. (2003). A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc

- receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *The Journal of Immunology*. 170(2):846-52.
48. Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Théry, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. y Amigorena, S. J. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *The Journal of Experimental Medicine*. 189(2):371-80.
 49. Bakema, J. E., Tuk, C. W., van Vliet, S. J., Bruijns, S. C., Vos, J. B., Letsiou, S., Dijkstra, C. D., van Kooyk, Y., Brenkman, A. B. y van Egmond, M. (2015). Antibody-opsonized bacteria evoke an inflammatory dendritic cell phenotype and polyfunctional Th cells by cross-talk between TLRs and FcRs. *The Journal of Immunology*. 194(4):1856-66.
 50. Gallucci, S., Lolkema, M. y Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nature Medicine*. 5: 1249–55.
 51. Desc Kratky, W., Reis e Sousa, C., Oxenius, A. y Spörri, R. (2011). Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(42):17414-9.
 52. Dzopalic, T., Rajkovic, I., Dragicevic, A. y Colic, M. (2012). The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunologic Research*. 52(1-2):20-33.
 53. Loures, F. V., Araújo, E. F., Feriotti, C., Bazan, S. B. y Calich, V. L. (2015). TLR-4 cooperates with Dectin-1 and mannose receptor to expand Th17 and Tc17 cells induced by *Paracoccidioides brasiliensis* stimulated dendritic cells. *Frontiers in Microbiology*. 6:261.
 54. van Vliet, S. J., den Dunnen, J., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B. y van Kooyk, Y. (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Current Opinion in Immunology*. 19(4):435-40.
 55. Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F. M., Krensky, A. M. y Stroncek, D. F. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 60(4):457-466
 56. Uchi, H., Arrighi, J. F., Aubry, J. P., Furue, M. y Hauser, C. (2002). The sesquiterpene lactone parthenolide inhibits LPS- but not TNF-α-induced maturation of human

- monocyte-derived dendritic cells by inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 110 (2). 269-276.
57. Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C. L., Gold, M. R y Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Dendritic Cell Survival and Maturation Are Regulated by Different Signaling Pathways. *The Journal of Experimental Medicine*. 188(11): 2175–2180.
 58. Noh, K. T., Cha, G. S., Kim, H. C., Lee, J. H., Ahn, S. C., Kim, D. K. y Park, Y. M. (2014). Ellagic acid modulates LPS-induced maturation of dendritic cells through the regulation of JNK activity. *Journal of Medicinal Food*. 17(9):996-1002.
 59. West, M. A., Wallin, R. P., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H. G, Prescott, A. R. y Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 305(5687):1153-7.
 60. Lapteva, N., Seethammagari, M. R., Hanks, B. A., Jiang, J., Levitt, J. M., Slawin, K. M. y Spencer, D. M. (2007). Enhanced activation of human dendritic cells by inducible CD40 and Toll-like receptor-4 ligation. *Cancer Research*. 67(21):10528-37.
 61. Kaisho, T. y Akira, S. (2001). Dendritic cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends in Immunology*. 22:78–83.
 62. Patil, S., Pincas, H., Seto, J., Nudelman, G., Nudelman, I. y Sealfon, S.C. (2010). Signaling network of dendritic cells in response to pathogens: a community-input supported knowledgebase. *BMC Systems Biology*. 4:137.
 63. Ardeshtna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S. y Khwaja, A. (2000). The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 96(3):1039-46.
 64. Pathak, S. K., Sköld, A. E., Mohanram, V., Persson, C., Johansson, U. y Spetz, A. L. (2012). Activated apoptotic cells induce dendritic cell maturation via engagement of Toll-like receptor 4 (TLR4), dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN), and β 2 integrins. *The Journal of Biological Chemistry*. 20;287(17):13731-42.
 65. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*. 6(8):769-76.

66. Bohnenkamp, H. R., Papazisis, K. T., Burchell, J. M. y Taylor-Papadimitriou, J. (2007). Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses. *Cellular Immunology*. 247:72–84.
67. Warger, T., Osterloh, P., Rechtsteiner, G., Fassbender, M., Heib, V., Schmid, B., Schmitt, E., Schild, H. y Radsak, M. P. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*. 108, 544–550
68. Trinchieri, G. y Sher, A. (2007) Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nature Reviews Immunology*. 7(3):179-90.
69. Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R. T., Consolaro, M. R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R. A., Carra, G. y Trinchieri, G. (2008). Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 205(6):1447-61.
70. Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtemberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O. y Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous iC3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates DR and CD86, and up-regulates CC chemokine receptor 7. *The Journal of Experimental Medicine*. 196(12):1553-61.
71. Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T. y Luster, A. D. (2005). Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *The Journal of Clinical Investigation*. 115(2):407-17.
72. Vogelpoel, L. T., Hansen, I. S., Visser, M. W., Nagelkerke, S. Q., Kuijpers, T. W., Kapsenberg, M. L., de Jong, E. C. y den Dunnen, J. (2015). FcγRIIIa cross-talk with TLRs, IL-1R, and IFNγR selectively modulates cytokine production in human myeloid cells. *Immunobiology*. 220(2):193-9.
73. den Dunnen, J., Vogelpoel, L. T., Wypych, T., Muller, F. J., de Boer, L., Kuijpers, T. W., Zaat, S. A., Kapsenberg, M. L. y de Jong, E. C. (2012). IgG opsonization of bacteria promotes Th17 responses via synergy between TLRs and FcγRIIIa in human dendritic cells. *Blood*. 120(1):112-21.
74. Buschow, S. I., Lasonder, E., van Deutekom, H. W., Oud, M. M., Beltrame, L., Huynen, M. A., de Vries, I. J., Figdor, C. G. y Cavalieri, D. (2010). Dominant processes during human

- dendritic cell maturation revealed by integration of proteome and transcriptome at the pathway level. *Journal of Proteome Research*. 9(4):1727-37.
75. Pfeiffer, I. A., Hoyer, S., Gerer, K. F., Voll, R. E., Knippertz, I., Gückel, E., Schuler, G., Schaft, N. y Dörrie, J. (2014). Triggering of NF- κ B in cytokine-matured human DCs generates superior DCs for T-cell priming in cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*. 44(11):3413-28.
 76. Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T. A., Schadendorf, D. y Kalinski, P. (2010). PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*. 116(9):1454-9.
 77. Pilichowska, M. E., Pinkus, J. L. y Pinkus, G. S. (2009). Histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto disease): lesional cells exhibit an immature dendritic cell phenotype. *American Journal of Clinical Pathology*. 131(2):174-82.
 78. Mina-Osorio P. (2008). The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. *Trends in Molecular Medicine*. 14(8):361-71.
 79. Sjöström, H., Ove, N. y Olsen, J. (2000). Structure and Function of Aminopeptidase N. Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 477. 25-34
 80. Wong, A. H., Zhou, D. y Rini, J. M. (2012). The X-ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for peptide processing. *The Journal of Biological Chemistry*. 287(44):36804-13.
 81. Riemann, D., Kehlen, A. y Langner, J. (1999). CD13—not just a marker in leukemia typing. *Immunology Today*. 20:83–8.
 82. Shipp, M. A. y Look, A. T. (1993). Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood*. 82:1052–1070.
 83. Reinhold, D., Biton, A., Gohl, A., Pieper, S., Lendeckel, U., Faust, J., Neubert, K., Bank, U., Täger, M., Ansorge, S., Brocke, S. (2007). Dual inhibition of dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase N suppresses inflammatory immune responses. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1110:402-9.
 84. Tani, K., Ogushi, F., Huang, L., Kawano, T., Tada, H., Hariguchi, N. y Sone, S. (2000). CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 161(5):1636-42.

85. Shimizu, T., Tani, K., Hase, K., Ogawa, H., Huang, L., Shinomiya, F. y Sone, S. (2002). CD13/aminopeptidase N-induced lymphocyte involvement in inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 46(9):2330-8.
86. Chang, Y. W., Chen, S. C., Cheng, E. C., Ko, Y. P., Lin, Y. C., Kao, Y. R., Tsay, Y. G., Yang, P. C., Wu, C. W. y Roffler, S. R. (2005). CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *International Journal of Cancer*. 116(2):243-52.
87. Menrad, A., Speicher, D., Wacker, J. y Herlyn, M. (1993). Biochemical and functional characterization of aminopeptidase N expressed by human melanoma cells. *Cancer Research*. 53(6):1450-5.
88. Mina-Osorio, P., Shapiro, L. H. y Ortega, E. (2006). CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 79(4):719-30
89. Mina-Osorio, P., Soto-Cruz, I. y Ortega, E. (2007). A role for galectin-3 in CD13-mediated homotypic aggregation of monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353(3):605-10.
90. Mina-Osorio, P., Winnicka, B., O'Connor, C., Grant, C. L., Vogel, L. K., Rodriguez-Pinto, D., Holmes, K. V., Ortega, E. y Shapiro, L. H. (2008). CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion. *Journal of Leukocyte Biology*. 84(2):448-59.
91. Subramani, J., Ghosh, M., Rahman, M. M., Caromile, L. A., Gerber, C., Rezaul, K., Han, D. K. y Shapiro, L. H. (2013). Tyrosine phosphorylation of CD13 regulates inflammatory cell-cell adhesion and monocyte trafficking. *The Journal of Immunology*. 191(7):3905-12.
92. Tokuda, N. y Levy, R. B. (1996). 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates phagocytosis but suppresses HLA-DR and CD13 antigen expression in human mononuclear phagocytes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 211:244-50
93. Mina-Osorio, P. y Ortega, E. (2005). Aminopeptidase N (CD13) functionally interacts with FcγR3 in human monocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 77(6):1008-17.
94. Licona-Limón, I., Garay-Canales, C. A., Muñoz-Paletta, O. y Ortega, E. (2015). CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*. pii: jlb.2A0914-458R

95. Rivera Fuentes, A. D. (2011). Papel de la aminopeptidasa N (CD13) en la Inducción del Estallido Respiratorio en Macrófagos Derivados de Monocitos Humanos. Tesis de Licenciatura de Química Farmacéutico Bióloga. Facultad de Química, UNAM.
96. Gabrilovac, J., Cupić, B., Zivković, E., Horvat, L. y Majhen, D. (2011). Expression, regulation and functional activities of aminopeptidase N (EC 3.4.11.2; APN; CD13) on murine macrophage J774 cell line. *Immunobiology*. 216(1-2):132-44.
97. Melkebeek, V., Rasschaert, K., Bellot, P., Tilleman, K., Favoreel, H., Deforce, D., De Geest, B. G., Goddeeris, B. M. y Cox, E. (2012). Targeting aminopeptidase N, a newly identified receptor for F4ac fimbriae, enhances the intestinal mucosal immune response. *Mucosal Immunology*. 5(6):635-645.
98. van Hal, P.T., Hopstaken-Broos, J. P., Prins, A., Favaloro, E. J., Huijbens, R. J., Hilvering, C., Figdor, C. G. y Hoogsteden, H. C. (1994). Potential indirect anti-inflammatory effects of IL-4. Stimulation of human monocytes, macrophages, and endothelial cells by IL-4 increases aminopeptidase-N activity (CD13; EC 3.4.11.2). *The Journal of Immunology*. 153(6):2718-28.
99. Zhang, K., Chen, W., Zhang, Y., Ge, Y., Ju, S., Yang, P., Tan, Y., Ge, Z., Cao, Z., Zhao, Y., Wu, H. y Ju, S. (2013). An anti-human CD13 monoclonal antibody that suppresses the suppressive function of Treg cells. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*. 32(1):16-20.
100. Bank, U., Tadge, J., Täger, M., Wolke, C., Bukowska, A., Ittenson, A., Reinhold, D., Helmuth, M., Ansorge, S., Shakespeare, A., Vieth, M., Malfertheiner, P., Naumann, M. y Lendeckel, U. (2007). Inhibition of alanyl-aminopeptidase on CD4+CD25+ regulatory T-cells enhances expression of FoxP3 and TGF-beta1 and ameliorates acute colitis in mice. *International Journal of Molecular Medicine*. 20(4):483-92.
101. Santos, A. N., Langner, J., Herrmann, M. y Riemann, D. (2000). Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. *Cellular Immunology*. 201(1):22-32.
102. Rosenzweig, M., Tailleux, L. y Gluckman, J. (2000). CD13/N-aminopeptidase is involved in the development of dendritic cells and macrophages from cord blood CD34+ cells. *Blood*. 95: 453-460.
103. Van der Velden, V., Leenen, P. y Drexhage, H. (2001). CD13/aminopeptidase N involvement in dendritic cell maturation. *Leukemia*. 15 (1): 190-191.

104. Winnicka, B., O'Connor, C., Schacke, W., Vernier, K., Grant, C., Fenteany, F., Pereira, F., Liang, B., Kaur, A., Zhao, R., Montrose, D., Rosenberg, D., Aguila, H. y Shapiro, L. (2010). CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *Journal of Leukocyte Biology*. 88: 347-359.
105. Villaseñor-Cardoso, M. I., Frausto-Del-Río, D. A. y Ortega, E. (2013). Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic processes in human dendritic cells and macrophages. *BioMed Research International*. 562984.
106. Woodhead, V. E., Stonehouse, T. J., Binks, M. H., Speidel, K., Fox, D. A., Gaya, A., Hardie, D., Henniker, A. J., Horejsi, V., Sagawa, K., Skubitz, K. M., Taskov, H., Todd, R. F. 3rd, van Agthoven, A., Katz, D. R. y Chain, B. M. (2000). Novel molecular mechanisms of dendritic cell-induced T cell activation. *International Immunology*. 12(7):1051-61.
107. Ghosh, M., McAuliffe, B., Subramani, J., Basu, S. y Shapiro, L. H. (2012). CD13 regulates dendritic cell cross-presentation and T cell responses by inhibiting receptor-mediated antigen uptake. *The Journal of Immunology*. 88(11):5489-99.
108. Larsen, S. L., Pedersen, L. O., Buus, S. y Stryhn, A. (1996). T cell responses affected by aminopeptidase N (CD13)-mediated trimming of major histocompatibility complex class II-bound peptides. *The Journal of Experimental Medicine*. 184(1):183-9.
109. Dong, X., An, B., Salvucci Kierstead, L., Storkus, W. J., Amoscato, A. A. y Salter, R. D. (2000). Modification of the amino terminus of a class II epitope confers resistance to degradation by CD13 on dendritic cells and enhances presentation to T cells. *The Journal of Immunology*. 164(1):129-35.
110. Chen, C. H., Floyd, H., Olson, N. E., Magaletti, D., Li, C., Draves, K. y Clark, E. A. (2006). Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DCAL-2) alters dendritic-cell maturation and cytokine production. *Blood*. 107(4):1459-67.
111. Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. y Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *The Journal of Experimental Medicine*. 180(1):83-93.
112. Syme, R., Bajwa, R., Robertson, L., Stewart, D. y Glück, S. (2005). Comparison of CD34 and Monocyte-Derived Dendritic Cells from Mobilized Peripheral Blood from Cancer Patients. *Stem Cells*. 23:74-81.
113. Jersmann, H. P. (2005). Time to abandon dogma: CD14 is expressed by non-myeloid lineage cells. *Immunology & Cell Biology*. 83(5):462-7.

114. Yoshino, H., Takahashi, K., Monzen, S. y Kashiwakura, I. (2010). Proteoglycans Regulate the Chemotaxis of Dendritic Cells Derived from Human Peripheral Blood Monocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 33 (6): 938-944.
115. García Patiño, M. G. Papel de la aminopeptidasa N (CD13) en la Maduración de Células Dendríticas Humanas. (2013). Tesis de Licenciatura de Química Farmacéutico Bióloga. Facultad de Química, UNAM.
116. Yoshida, M. y Babensee, J. E. (2004). Poly(lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 71(1):45-54.
117. Meijerink, M., Ulluwishewa, D., Anderson, R. C. y Wells, J. M. (2011). Cryopreservation of monocytes or differentiated immature DCs leads to an altered cytokine response to TLR agonists and microbial stimulation. *Journal of Immunological Methods*. 373(1-2):136-42.
118. Polancec, D. S., Munic Kos, V., Banjanac, M., Vrancic, M., Cuzic, S., Belamaric, D., Parnham, M. J., Polancec y D., Erakovic Haber, V. (2012). Azithromycin drives in vitro GM-CSF/IL-4-induced differentiation of human blood monocytes toward dendritic-like cells with regulatory properties. *Journal of Leukocyte Biology*. 91(2):229-43.
119. Appel, S., Rupf, A., Weck, M. M., Schoor, O., Brümmendorf, T. H., Weinschenk, T., Grünebach, F. y Brossart, P. (2005). Effects of imatinib on monocyte-derived dendritic cells are mediated by inhibition of nuclear factor-kappaB and Akt signaling pathways. *Clinical Cancer Research*. (5):1928-40.
120. von Euw, E. M., Barrio, M. M., Furman, D., Bianchini, M., Levy, E. M., Yee, C., Li, Y., Wainstok, R. y Mordoh, J. (2007). Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8(+) T lymphocytes. *Journal of Translational Medicine*. 5:19.
121. Wallace, P. K., Tario, J. D. Jr., Fisher, J. L., Wallace, S. S., Ernstoff, M. S. y Muirhead, K. A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry: monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry Part A*. 73(11):1019-34.
122. Munson, M. E. (2010). An improved technique for calculating relative response in cellular proliferation experiments. *Cytometry Part A*. 77(10):909-910.
123. Dumitru, C. D., Ceci, J. D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J. H., Patriotis, C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kollias, G., Tsihchis, P. N. (2000). TNF-alpha

- induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell*. 103(7):1071-83.
124. Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N. y Goldman, M. (1997). Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *The Journal of Immunology*. 158(6):2919-25.
 125. Caparrós, E., Munoz, P., Sierra-Filardi, E., Serrano-Gómez, D., Puig-Kröger, A., Rodríguez-Fernández, J. L., Mellado, M., Sancho, J., Zubiaur, M., Corbí, A. L. (2006). DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 107(10):3950-8.
 126. Sato, S., St-Pierre, C., Bhaumik, P. y Nieminen, J. (2009). Galectins in innate immunity: dual functions of host soluble beta-galactoside-binding lectins as damage-associated molecular patterns (DAMPs) and as receptors for pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *Immunological Reviews*. 230(1):172-87.
 127. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. y Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*. 182(2):389-400.
 128. Bracci, L., Vukcevic, M., Spagnoli, G., Ducreux, S., Zorzato, F. y Treves, S. (2007). Ca²⁺ signaling through ryanodine receptor 1 enhances maturation and activation of human dendritic cells. *Journal of Cell Science*. 120(13):2232-40.
 129. Huschak, G., Zur Nieden, K., Stuttmann, R. y Riemann, D. (2003). Changes in monocytic expression of aminopeptidase N/CD13 after major trauma. *Clinical & Experimental Immunology*. 134(3):491-6.
 130. Ghosh, M., Subramani, J., Rahman, M. M. y Shapiro, L. H. (2015). CD13 restricts TLR4 endocytic signal transduction in inflammation. *The Journal of Immunology*. 194(9):4466-76.
 131. Aerts-Toegaert, C., Heirman, C., Tuyaearts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K., Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *European Journal of Immunology*. 37(3):686-95.
 132. Breloer, M. y Fleischer, B. (2008). CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis. *Trends in Immunology*. 29 (4): 186-194.

133. Jackson, A. M., Mulcahy, L. A., Porte, J., Franks, H. A., El Refaee, M., Wang, Q., Shah, S., Zhu, X. y Patel, P. M. (2010). Role of mitogen-activated protein kinase and PI3K pathways in the regulation of IL-12-family cytokines in dendritic cells and the generation of T H-responses. *European Cytokine Network*. 21(4):319-28.
134. Loré, K., Sönnernborg, A., Spetz, A. L., Andersson, U. y Andersson, J. (1998). Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*. 214(1-2):97-111.
135. Jensen, S. S. y Gad, M. (2010). Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *Journal of Inflammation (London, England)*. 7:37.
136. Ding, X., Yang, W., Shi, X., Du, P., Su, L., Qin, Z., Chen, J. y Deng, H. (2011). TNF Receptor 1 Mediates Dendritic Cell Maturation and CD8 T Cell Response through Two Distinct Mechanisms. *The Journal of Immunology*. 187: 1184-1191.
137. Lehner, M., Kellert, B., Proff, J., Schmid, M. A., Diessenbacher, P., Ensser, A., Dörrie, J., Schaf, N., Leverkus, M., Kämpgen, E. y Holter, W. (2012). Autocrine TNF Is Critical for the Survival of Human Dendritic Cells by Regulating BAK, BCL-2, and FLIPL. *The Journal of Immunology*. 188: 4810-4818.
138. Chang, C. C., Wright, A. y Punnonen, J. (2000). Monocyte-derived CD1a+ and CD1a-dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *The Journal of Immunology*. 65(7):3584-91.
139. Bedford, P., Garner, K. y Knight, S. C. (1999). MHC class II molecules transferred between allogeneic dendritic cells stimulate primary mixed leukocyte reactions. *International Immunology*. 11(11):1739-44.
140. Arrighi, J. F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. y Hauser, C. (2001). A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *The Journal of Immunology*. 166(6):3837-45.

ANEXOS

ANEXO A.

EFFECTOS DE LA ADICIÓN DE IgG1 MURINA CONTROL SOBRE EL FENOTIPO Y FUNCIONES DE moDCs

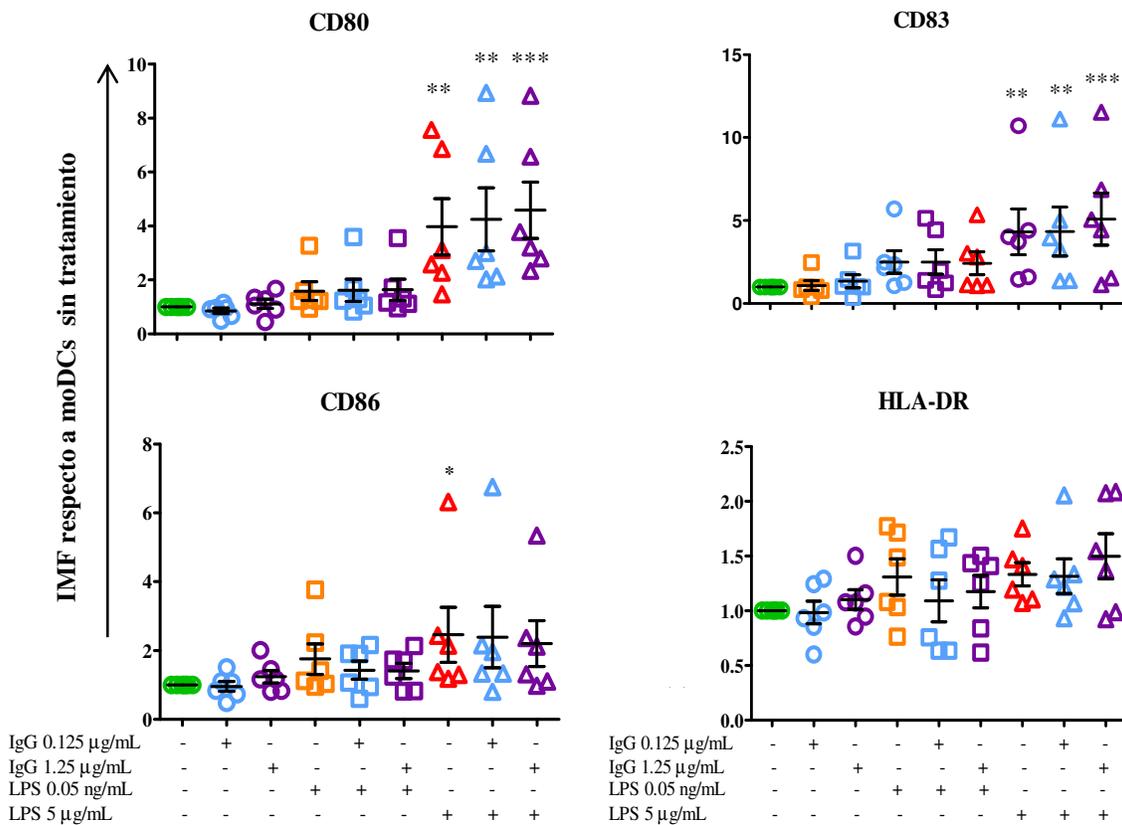


Figura 17. Uso de IgG control no afecta la expresión de marcadores de superficie. La expresión de CD80, CD83, CD86 y de HLA-DR en la superficie de moDCs, se analizó luego de que las células fueran estimuladas con la IgG1 murina control (0.125 µg/mL o 1.25 µg/mL) y un anticuerpo secundario (0.125 µg/mL), en presencia o ausencia de un estímulo de maduración (LPS 0.05 ng/mL o 5 µg/mL) durante 48 horas. Se muestra la intensidad media de fluorescencia (IMF) correspondiente a la expresión de marcadores de superficie en moDCs. Las barras horizontales señalan el valor promedio de la IMF de moDCs de 6 donadores distintos (graficados con diferentes símbolos en cada tratamiento) y las barras de error indican la desviación estándar. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$, respecto a moDCs sin estimulación.

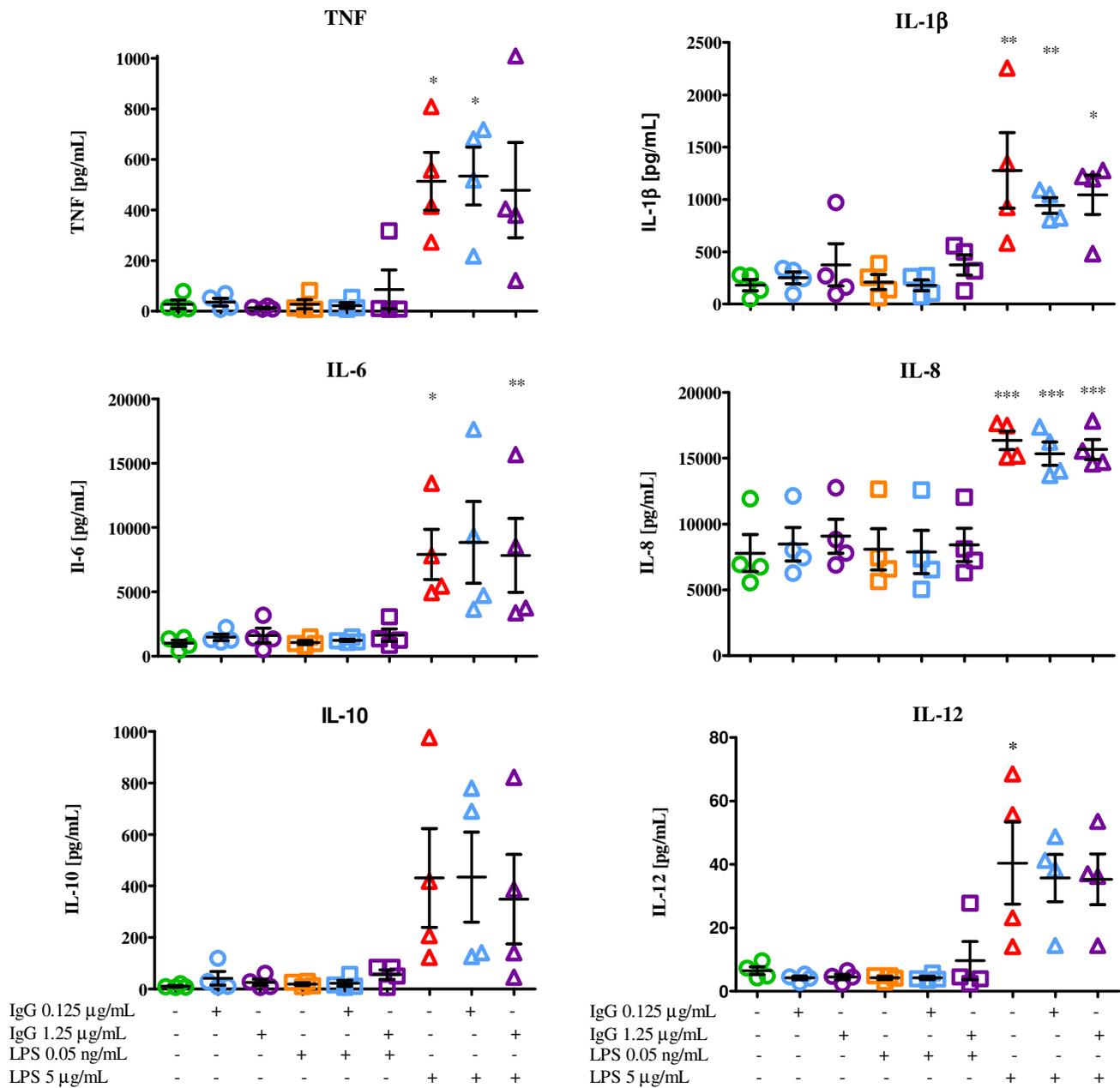


Figura 18. IgG control no afecta la secreción de citocinas. Se colectó el sobrenadante de moDCs estimuladas con una IgG utilizada como control (0.125 μ g/mL o 1.25 μ g/mL) y un anticuerpo secundario (0.125 μ g/mL), con o sin LPS 0.05 ng/mL o 5 μ g/mL durante 48 horas. El sobrenadante se analizó con perlas para determinar la concentración de citocinas mediante citometría de flujo. Se muestra la concentración de diferentes citocinas (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12) encontradas en los sobrenadantes de moDCs pertenecientes a 4 donadores distintos. El promedio de las cuatro concentraciones se señala con barras horizontales, las barras de error indican la desviación estándar. * = p \leq 0.05; ** = p \leq 0.01; *** = p \leq 0.001 respecto a moDCs sin estimular.

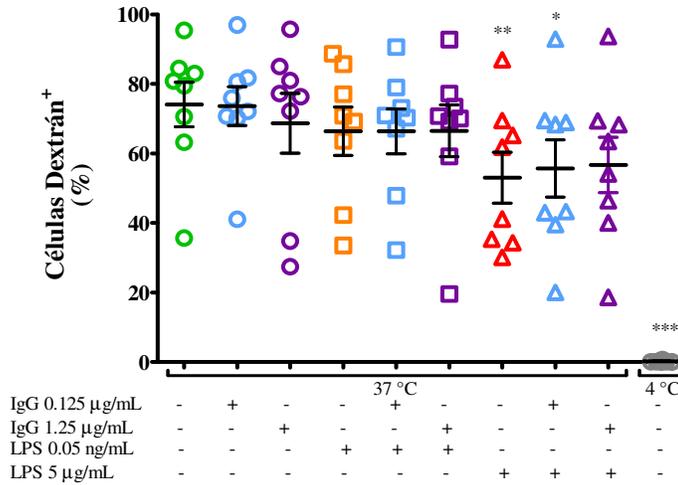


Figura 19. IgG murina control no afecta la endocitosis de dextrano en moDCs. moDCs, previo tratamiento de con una IgG murina no específica (0.125 µg/mL o 1.25 µg/mL), un anticuerpo secundario (0.125 µg/mL) en presencia de LPS 0.05 ng/mL o 5 µg/mL, o ausencia de éste, se estudiaron en el contexto de capacidad endocítica, misma que se evaluó por la internalización de dextrano-FITC. Se muestra el porcentaje de moDCs dextrano-FITC⁺ de 8 donadores. Como control negativo del proceso de internalización, se usaron moDCs sin estimular, que se mantuvieron a 4 °C durante el ensayo de endocitosis. El porcentaje promedio de moDCS dextrano-FITC⁺ se muestra con barras horizontales, mientras que la desviación estándar se indica con las barras de error* = p ≤ 0.05; ** = p ≤ 0.01 respecto a moDCs sin estímulo.

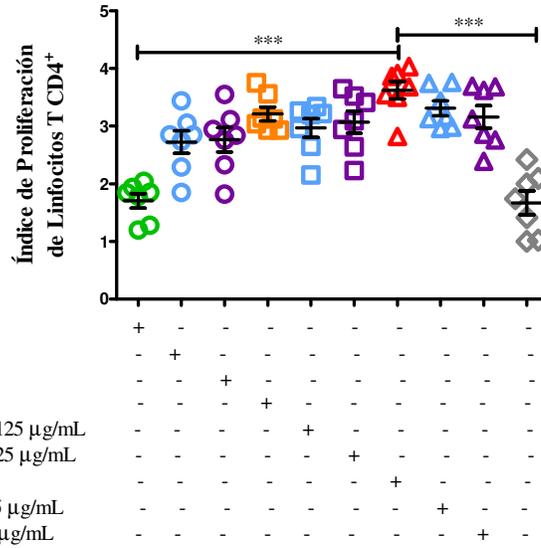


Figura 20. IgG control no interfiere con capacidad para activar células T CD4⁺. moDCs estimuladas durante 48 horas con la IgG murina control (0.125 µg/mL o 1.25 µg/mL), un anticuerpo secundario (0.125 µg/mL) en ausencia o presencia de LPS 0.05 ng/mL o 5 µg/mL, se emplearon para activar células T CD4⁺. Se muestran los índices de proliferación de linfocitos T CD4⁺ estimulados con moDCs tratadas con tratamientos señalados. Se muestran los índices de proliferación correspondientes a 7 experimentos. Los rombos grises corresponden a la proliferación de células que se cultivaron sin moDCs. Las barras horizontales indican el valor promedio del índice de proliferación y las barras de error la desviación estándar. * = $p \leq 0.05$; ** = $p \leq 0.01$; *** = $p \leq 0.001$ respecto a linfocitos T CD4⁺ cultivados con moDCs sin previa estimulación.

ANEXO B.

SOLUCIONES EMPLEADAS

Medio de cultivo RPMI 1640 complementado al 10% de SFB

- RPMI 1640 (Gibco), 1 sobre para preparar 1 L de medio
- NaHCO₃ (Baker), 2.2 g
- HEPES (Sigma) 25 mM, 5.9575 g
- β-mercaptoetanol (dilución en agua ultrapura, 1:100), 7.8 µL

Ajustar el pH entre 7.2 y 7.4 y llevar a un volumen final de 1 L con agua ultrapura (Easypure UF). Esterilizar filtrando a través de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro. Conservar al menos 3 días a temperatura ambiente antes de complementar.

Para complementar:

- RPMI 1640 (Gibco) reconstituido como se indicó anteriormente, 500 mL.
- Penicilina (Sigma), 50 000 U
- Estreptomina (Sigma), 5 mg
- Glutamina 0.2 M, 5 mL
- Aminoácidos no esenciales 100x (Gibco), 5 mL
- Piruvato de sodio 100x (Gibco), 5 mL
- SFB (Gibco), 50 mL

Mezclar y conservar a 4 °C protegiendo de la luz.

PBS

- NaH₂PO₄•H₂O (Baker), 0.13 mM
- Na₂HPO₄ (Baker), 0.387 mM
- NaCl (Baker), 8 µM

Disolver las sales en agua ultrapura, ajustar el pH a 7.5 con NaOH y filtrar a través de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro.

Solución para lisis eritrocitaria

- NH₄Cl 3 mM, 5 mL
- NaHCO₃ 100 mM, 2 mL
- EDTA 0.5 mM, 1 mL
- Agua ultrapura, 2 mL

Justo antes de realizar la lisis, mezclar el agua y cada una de las soluciones que deberán estar estériles y preparadas con agua ultrapura.

Solución amortiguadora de lavados para citofluorometría

- PBS, 100 mL
- SFB, 5 mL
- Azida de sodio (Sigma), 0.1 g

Disolver la azida de sodio en el PBS, agregar el SFB y filtrar a través de membrana de 0.45 µm de diámetro de poro. Conservar a 4 °C.

Solución de fijación para citofluorometría

- PBS, 100 mL
- Paraformaldehído, 1 g

Calentar el PBS a una temperatura máxima de 45 °C. Disolver el paraformaldehído, de requerirse, emplear NaOH para disolver. Llevar a temperatura ambiente y ajustar el pH a 7.5 con HCl. Filtrar a través de membrana de 0.45 µm de diámetro de poro y conservar a 4 °C protegiendo de la luz.

PBS 5 % de SFB

- PBS estéril, 475 mL
- SFB estéril, 25 mL

Mezclar y mantener en esterilidad.