

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

**PRODUCCIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS**

Memoria de Título presentada como parte
de los requisitos para optar al **TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO.**

ALEJANDRA LISETTE MANZANARES LEMARCHAND

VALDIVIA – CHILE
2003

INDICE

	PÁGINA
1. - RESUMEN.....	1
2. - SUMMARY.....	2
3. - INTRODUCCIÓN.....	3
4. - MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
5. - RESULTADOS.....	14
6. - DISCUSIÓN.....	19
7. - BIBLIOGRAFÍA.....	23
8. - AGRADECIMIENTOS.....	33

“PRODUCCIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS”

1. RESUMEN

En los últimos cinco años se han desarrollado una serie de protocolos para generar células dendríticas en altas cantidades. Con el objeto de utilizarlas con fines terapéuticos, en nuestro país se ha comenzado a investigar en esta área de la inmunología, desarrollando protocolos experimentales para inmunoterapia contra el cáncer. Estos estudios requieren ser validados y profundizados en modelos experimentales, utilizándose para esto el modelo murino.

En el presente trabajo, se procedió, como primer objetivo, a la generación de células dendríticas murinas derivadas de células progenitoras de médula ósea, utilizando para este fin un protocolo estandarizado por Lutz y col. (1999) el cual en este estudio ha sido modificado. Luego, para la caracterización fenotípica de las células dendríticas se utilizaron marcadores de superficie tales como; CD11c, CD86 y H2K^b los que se visualizaron mediante citometría de flujo. El objetivo final de este trabajo fue estandarizar un método de obtención de células dendríticas murinas con características fenotípicas estables, para posteriormente, fuera del contexto de esta memoria, utilizar estas células en la inmunización de ratones con péptidos antigénicos para el estudio de mecanismos de inmunología tumoral.

Los resultados obtenidos a distintos días de cultivo (6, 8 y 10 días), muestran una alta presencia de la molécula integrina CD11c y de la molécula coestimuladora de linfocitos T (CD86), a los 10 días de cultivo, lo que estaría indicando un estado de madurez fenotípica de las células dendríticas analizadas. Además, se observó una alta expresión de la molécula de histocompatibilidad clase I (H2K^b), en las células dendríticas analizadas, lo que indica que potencialmente serían capaces de presentar antígenos e inducir una respuesta de linfocitos T específicos *in vivo*.

Finalmente, se realizó una doble tinción celular para detectar la población que co-expresara CD11c y CD86. El resultado fue de un 55,27%, que correspondería a células dendríticas maduras. Estos estudios permitirán profundizar en la investigación de la inducción de respuestas mediadas por linfocitos T a través de la inmunización con células dendríticas establecidas *in vitro*.

Palabras clave: células dendríticas, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I, presentación antigénica.

“PRODUCTION *IN VITRO* AND CHARACTERIZATION OF MURINE DENDRITIC CELLS”

2 SUMMARY

In the last five years a series of protocols has been developed to generate dendritic cells in high quantities. In our country, research in this area of the immunology has been initiated with the intention of using them in therapeutic approaches, in particular in developing experimental protocols for immune therapy against cancer. These studies require to be validated and deeply studied using experimental models, particularly, the murine model.

In the present work, the primary goal was to generate murine dendritic cells derived from stem cells of bone marrow, using for this issue an experimental protocol standardized by Lutz and col. (1999) and modified in this study. Then, for the phenotypic characterization of dendritic cells, surface markers such as; CD11c, CD86 and H2K^b were analyzed, through quantification by flow cytometry. The final goal of this work was to standardize a method for obtaining murine dendritic cells with stable phenotypic characteristics, with the intention of, outside the context of this thesis, use these cells in the immunization of mice with antigenic peptides for the study of biological mechanisms in tumor immunology.

The results obtained at different days of cell culture (6, 8 and 10 days), showed a high presence of molecule integrin CD11c and the coestimulatory molecule of T lymphocytes (CD86), at day 10 of culture, which would indicate a state of phenotypic maturity of analyzed dendritic cells. In addition, it observed a high expression of major histocompatibility complex class I molecules (H2K^b), in analyzed dendritic cells, indicating that those cells may be able to present antigen and induce a specific T lymphocytes response *in vivo*.

Finally, a double cellular staining was performed to detect the population that co-expressed the molecules CD11c and CD86 and which we defined as dendritic cells. The result showed that 55.27% of produced cells should correspond to mature dendritic cells. These studies will allow the initiation of a project about T lymphocytes *in vivo* induction through the immunization with *in vitro* established dendritic cells.

Keywords: dendritic cells, major histocompatibility complex class I molecules, antigen-presentation,

3. INTRODUCCIÓN

Las células dendríticas (DC) son llamadas células presentadoras de antígeno profesionales, ya que son capaces de inducir una respuesta inmune primaria mediada por linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ y además permiten el establecimiento de memoria inmunológica (Banchereau y col., 2000). Esta función la realizan mediante la captura de antígenos, estableciendo un nexo entre el ambiente extracelular a las células del sistema inmune adaptativo. Sin embargo el conocimiento acerca de la biología de estas células no está completo, es por eso que la investigación en el área, especialmente enfocada al uso de protocolos basados en DC para inmunoterapia, ya sea para un tratamiento alternativo del cáncer o enfermedades infecciosas; resulta muy interesante.

3.1. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones precoces de la inmunidad innata y por las reacciones posteriores de la inmunidad adaptativa. Una importante característica del sistema inmune innato de los mamíferos, incluye la habilidad para reconocer rápidamente microorganismos o las sustancias producidas en las infecciones y de alertar mediante señales a las células del sistema inmune adaptativo (Matzinger, 1994). Los principales componentes de la inmunidad innata son: i) barreras físicas y químicas, tales como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales; ii) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos) y células citotóxicas naturales (NK); iii) proteínas sanguíneas, entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación; y iv) proteínas denominadas citoquinas, que regulan y coordinan muchas de las acciones de las células que intervienen en la inmunidad celular (Delves y Roitt, 2000a). Los mecanismos de inmunidad innata son estimulados por estructuras comunes a grupos de microorganismos relacionados y pueden no distinguir diferencias sutiles entre las sustancias extrañas. Representa la primera línea de defensa, no genera memoria y no necesita de una exposición previa al antígeno para reconocer y efectuar una respuesta completa (Fearon y Locksley, 1996; Medzhitov y Janeway, 1997; Hoffmann y col., 1999).

La segunda unidad funcional del sistema inmune es el sistema inmune adaptativo. La evolución lo ha dotado de varias características, como la habilidad de crear clones antígeno-específicos y también poseer una memoria inmunológica. La respuesta puede ser humoral, si es mediada por células B que producen inmunoglobulinas (Ig) o celular, si es llevada a cabo por células T que son capaces de reconocer antígenos a través de sus receptores específicos de células T (TCR) (Delves y Roitt, 2000a).

En la inmunidad humoral participan moléculas presentes en la sangre, denominadas anticuerpos, que son producidos por linfocitos B, los cuales pueden ser activados por antígenos o indirectamente por células T colaboradoras (Th) CD4⁺ las cuales deben reconocer primero antígenos procesados por las células presentadoras de antígeno profesionales (APC), como las células dendríticas (DC), para ser capaces de estimular a los

linfocitos B mediante moléculas de superficie y citoquinas (Dubois, 1997). La inmunidad humoral es el principal mecanismo de defensa frente a microorganismos extracelulares y sus toxinas, ya que los anticuerpos secretados pueden unirse a estos microorganismos y toxinas, facilitando su eliminación. Los microorganismos intracelulares, tales como virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan al interior de los fagocitos y otras células del hospedador, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes. La defensa frente a este tipo de infecciones depende de la inmunidad celular, que induce la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos o las células infectadas. Así, en la inmunidad mediada por células participan las células llamadas linfocitos T, cuyos precursores se encuentran en la médula ósea y más tarde maduran en el timo. Estas células T están divididas en dos subtipos celulares: células Th las cuales expresan en su superficie marcadores $CD4^+$ y reconocen antígenos en asociación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y los CTL los cuales presentan en su superficie marcadores $CD8^+$ y reconocen antígenos en asociación con moléculas del MHC clase I (Delves y Roitt, 2000b).

El sistema inmune adaptativo es altamente sofisticado y potente sin embargo, necesita ser instruido y regulado por APC (Banchereau y col., 2000). Por ejemplo, las células $CD8^+$ vírgenes requieren de una actividad coestimuladora mayor que las células $CD4^+$ (Liu y Janeway, 1992) para alcanzar su diferenciación a CTL. Esta función es realizada por las APC, las cuales tiene una intrínseca actividad coestimuladora a través de B7(CD86) u otras moléculas co-estimuladoras que inducen a las células $CD8^+$ a sintetizar interleuquina-2 (IL-2), un factor de crecimiento de células T, que las conduce hacia su proliferación y diferenciación a células Th y CTL efectoras. Esto ocurre en los órganos y tejidos linfáticos a través de los cuales las células T vírgenes están constantemente circulando (Lenschow y col., 1996). Sin embargo en algunas respuestas a virus o tejidos transplantados, se ha visto que las células $CD8^+$ necesitan de la presencia de células $CD4^+$ para ser estimuladas. Esto puede ocurrir de dos maneras: una célula efectora $CD4^+$ puede reconocer un antígeno sobre la superficie de una APC y gatillar factores estimuladores que activan la APC y esta a su vez estimular al linfocito $CD8^+$ a sintetizar su propia IL-2 (Banchereau y col., 2000). Por otro lado, una célula T $CD4^+$ activada, puede sintetizar IL-2 lo que lleva a la proliferación y diferenciación de células T $CD8^+$ (Azuma y col., 1992). En los linfocitos que han reconocido un antígeno en ausencia de señales coestimuladoras, decae la producción de IL-2, produciéndose anergia o apoptosis celular (Schwartz, 1996).

3.2. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

La primera identificación de las DC en la epidermis se produjo en 1868, y les llamaron células de Langerhans (LG). Sólo hace 30 años atrás, Steinman y Cohn (1973), encontraron la presencia de DC en otros tejidos.

Su inusual forma da origen al nombre de DC, ya que poseen una forma irregular con una variedad de prolongaciones de la membrana tipo “dendritas”, en forma de espinas y pseudópodos (Hart, 1997). Poseen un núcleo con forma oval que es pulsátil. El citoplasma posee muchas mitocondrias con una fase densa de forma también oval, presentan además autofagolisosomas y un retículo endoplásmico liso bien desarrollado. Todas esas características contribuyen a su función (Banchereau y Steinman, 1998).

Las DC son capaces de sensibilizar a los linfocitos T vírgenes a través de la presentación de antígenos proteicos reconocidos por los receptores de células T (TCR). Los linfocitos T necesitan que estos antígenos sean procesados y les sean presentados unidos a moléculas del MHC sobre la superficie de las APC (Germain, 1994).

Este rol de las DC de iniciación o “priming” de las respuestas inmunes *in vivo* frente a antígenos virales y bacterianos ha sido bien establecido previamente (Hengel y col., 1987; Kast y col., 1988; Nonacs y col., 1992).

3.3. DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las DC son por lo general poco frecuentes, por lo que su expansión y estudio se debe realizar principalmente *ex vivo* a partir de distintos precursores. Existen varias maneras de generar células dendríticas *in vitro*. Una forma es producirlas a partir de monocitos de la sangre periférica utilizando interleuquina-4 (IL-4) y GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas y macrofágicas) (Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Reddy y col., 1997; Puledran y col., 2001). Por otra parte, los progenitores de las DC están presentes también en la médula ósea, en donde una pequeña subpoblación (CD34⁺) de los precursores hematopoyéticos da origen a todas las células sanguíneas, incluyendo a las DC. Esta progenie de DC está probablemente colonizando la mayor cantidad de tejidos *in vivo* como células inmaduras no divididas. Existen muchas citoquinas que contribuyen al crecimiento y diferenciación de las DC, por ejemplo el ligando de c-Kit y el de Flt3 que corresponden proteínas transmembrana, que están sobre el estroma celular y que se unen a receptores de tirosina-kinasa y ayudan a mantener a los progenitores (Young y col., 1995). La administración del ligando de Flt3 *in vivo* también estimula el crecimiento de DC funcionales (Maraskovsky y col., 1996; Puledran y col., 2001).

Al menos dos vías de desarrollo de las DC han sido identificadas en el ratón, mieloide y linfoide; las que difieren en su fenotipo, localización y función. Ambas subpoblaciones expresan altos niveles de CD11c, moléculas del MHC clase II y moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 (Wu y Shortman, 1996; Pulendran y col., 1997; Vremec y Shortman, 1997). Un marcador que sirve para distinguir entre las dos poblaciones es CD8 α el cual es expresado como un homodímero sobre las DC linfoides, no así en la subpoblación mieloide (Wu y Shortman, 1996; Pulendran y col., 1997; Vremec y Shortman, 1997). Las DC de origen linfoide se localizan frecuentemente en áreas ricas en células T de la vaina periarteriolar linfática (PALS) en el bazo y en la paracorteza de los nódulos linfáticos (Steinman y col., 1997; Pulendran y col., 1997; Leenen y col., 1998). En contraste, las DC mieloides se encuentran en la zona marginal en el bazo (Steinman y col., 1997; Pulendran y col., 1997; Leenen y col., 1998), pero pueden ser inducidas a migrar a las PALS bajo la influencia de señales proinflamatorias tales como lipopolisacáridos (LPS) (De Smedt y col., 1996) o extractos parasitarios (Reis e Sousa y col., 1997). Las DCs linfoides sintetizan altos niveles de IL-12 (Pulendran y col., 1997; Reis e Sousa y col., 1997; Ohteki y col., 1999) y son menos fagocíticas que las DC mieloides (Ohteki y col., 1999). *In vitro*, DC linfoides son capaces de efectuar la sensibilización o “priming” a linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ alogénicos más eficientemente que DC mieloides (Kronin y col., 1996; Suss y Shortman, 1996). Sin embargo, *in vivo*, tanto DC linfoides como mieloides realizan el priming de células T CD4⁺ antígeno-específica (Ohteki y col., 1999).

3.4. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INMADURAS : CAPTURA DEL ANTÍGENO

Las DC recién generadas, presumiblemente migran a través del torrente sanguíneo desde la médula ósea hacia los tejidos periféricos donde se tornan células residentes en un estado de inmadurez, con alta capacidad fagocítica y endocítica (Reis e Sousa y col., 1993; Sallusto y col., 1995). Aunque estas DC carecen de requisitos para estimular a las células T, tales como CD40, CD54 y CD86, están extremadamente bien equipadas para capturar antígenos, un evento clave en la inducción de la maduración de las DC. Para estos efectos pueden ser utilizadas diferentes vías tales como: i) macropinocitosis, ii) endocitosis mediada por receptores vía lectina C (receptores de manosa) (Mommaas y col., 1999) o receptor Fc γ tipo I (CD64) y II (CD32) (tomados de complejos inmunes o partículas opsonizadas) (Fanger y col., 1996), iii) fagocitosis de fragmentos celulares apoptóticos y necróticos (incluido CD36 y las integrinas $\alpha\beta 3$ y $\alpha\beta 5$) (Albert y col., 1998a), virus y bacterias; incluyendo mycobacterias (Rescigno y col., 1999) y también parásitos. Las DC también pueden cargar antígenos en proteínas de shock térmico como gp96 y Hps70 a través de mecanismos de presentación aún desconocidos (Arnold-Schild y col., 1999).

3.4.1. Procesamiento del antígeno y su presentación en el contexto de la molécula de histocompatibilidad clase II

Cuando el antígeno es de origen exógeno, su presentación será a través de la molécula del MHC clase II. Tras su internalización, los antígenos proteicos, quedarán localizados en vesículas intracelulares limitadas por membranas denominadas endosomas. Los endosomas son vesículas con pH ácido que contienen enzimas proteolíticas que degradan los antígenos proteicos, generando polipéptidos, que se asocian a las moléculas del MHC clase II (Geuze, 1998).

Los péptidos generados son transportados hasta compartimentos ricos en moléculas del MHC del clase II (MIIC), los que tienen una estructura multivesicular y multilaminar (Kleijmeer y col., 1995; Nijman y col., 1995). Estos MIIC son estructuras de tipo endosomal, que además de moléculas del MHC clase II, contienen productos HLA-DM (humano) o H-2M (murino), los cuales actúan como elementos de intercambio de péptidos (Cella y col., 1997a; Pierre y col., 1997), facilitando la remoción de un péptido de 24 aminoácidos, llamado péptido de cadena invariable (CLIP) el cual está asociado a la nueva cadena de la molécula del MHC clase II, y que ocupa las hendiduras de unión al péptido y por lo tanto, para que los péptidos de proteínas extracelulares puedan tener acceso a la hendidura es necesaria su eliminación (Seliger y col., 2000). La degradación proteolítica de esta cadena invariable (I_i) es regulada por la razón entre catepsina S y un inhibidor endógeno la cistatina C. Después de la maduración, disminuye la regulación de la cistatina C y por ende se activa la catepsina S, promoviendo la degradación de la I_i , lo que permite que los péptidos generados (10 a 30 aminoácidos) a partir de antígenos proteicos internalizados, puedan unirse a la molécula del MHC clase II, estabilizando la molécula para ser transportados hasta la superficie de la célula (Pierre y col., 1997; Driesen y col., 1999).

3.4.2. Procesamiento del antígeno y su presentación en el contexto de la molécula de histocompatibilidad clase I

Para generar CTL, con capacidad de eliminar células infectadas o células tumorales, las DC tienen que presentar los péptidos antigénicos en moléculas del MHC

clase I, los que pueden ser cargados en esa molécula a través de una vía endógena, en donde los péptidos cargados corresponden a péptidos propios o de patógenos intracelulares y una exógena en donde los péptidos provienen de partículas fagocitadas o complejos inmunes, lo que se conoce como “cross-priming” (Pamer y Cresswell, 1998; Rock y Goldberg, 1999).

La vía endógena de la molécula del MHC clase I opera a través de la degradación de proteínas citosólicas y la carga de los péptidos sobre nuevas moléculas del MHC clase I sintetizadas dentro del retículo endoplásmico (RE). El procesamiento antigénico ocurre primero en el citosol a través de un sistema proteolítico dependiente de ATP el cual comienza la conjugación de ubiquitinas, las cuales se dirigen directamente al proteasoma, un extenso complejo proteico multienzimático que posee una amplia gama de actividad proteolítica y que está presente en el citoplasma de la mayoría de las células. Aquí se cortan eficientemente las proteínas produciendo péptidos (Bates y col., 1997). Los péptidos son posteriormente llevados desde el citosol al RE vía los transportadores transmembrana asociados al procesamiento del antígeno, TAP1/2 dependientes de ATP y son llevados recortados en productos de 8-10 aminoácidos, los que calzan en la molécula del MHC clase I (Momburg y Hämmerling, 1998). Sin embargo, la síntesis y ensamblaje de las moléculas del MHC clase I es un proceso de varias etapas, en la que la unión del péptido juega un rol fundamental. En el RE, los dímeros de clase I “vacíos” recién formados permanecen unidos al complejo TAP por medio de la tapasina, una proteína chaperona, pero cuando el péptido entra en el RE por medio de las TAP, uniéndose a la hendidura de la molécula del MHC, el complejo péptido-molécula de clase I se vuelve estable, es liberado de la tapasina, y puede ser llevado hasta la superficie para ser presentado (Sadasivan, 1996).

3.4.3. Presentación cruzada

Por otro lado, las DC son las únicas capaces de realizar una presentación cruzada (cross-presentation) (Delamarre y col., 2003). Aquí antígenos exógenos pueden ser presentados en el contexto de la molécula del MHC clase I a través de dos rutas descritas; una independiente de TAP, en la cual los antígenos son probablemente hidrolizados en el endosoma (Pfeifer y col., 1993) y una vía fagosoma-citosol, que es dependiente de TAP (Kovacsovics-Bankowski y col., 1993; Kovacsovics-Bankowski y Rock, 1995). Este proceso permite respuestas inmunes contra antígenos transplantados, antígenos particulados, tumores, virus y también es operativo en el desarrollo de tolerancia. Así la captura y procesamiento de cuerpos celulares por DC, representa un posible camino para cargar antígenos exógenos en moléculas de clase I (Albert y col., 1998b) y además, permite desarrollar inmunidad protectora sensibilizando células T con antígenos y rechazo tumoral, tanto en modelos murinos como humanos.

3.5. MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS *IN VIVO* HACIA LOS ÓRGANOS LINFÁTICOS Y SU MADURACIÓN

Un importante atributo de las DC en varios estados de diferenciación es su movilidad (Austyn, 1987). Las DC se acumulan rápidamente, en el lugar donde se deposita el antígeno, lo que se ha comprobado después de la inhalación de un antígeno en el epitelio bronquial (McWilliam, 1996).

Una vez capturado el antígeno, las DC migran a los órganos linfoides secundarios como nódulos linfáticos y bazo, donde completan su maduración y se convierten en APC profesionales capaces de seleccionar y activar linfocitos antígeno-específico desde un conjunto de células T circulantes. Esto permite la diversificación de la respuesta y la activación de efectores antígeno-específico como CTL, células B y también efectores no-específicos como células NK, macrófagos y eosinófilos (Lambrecht y col., 1998). Además, enseñan a las células efectoras a arraigarse en el sitio donde está la injuria del tejido (Banchereau y col., 2000).

Este proceso de maduración es un evento continuo que se inicia en la periferia cuando se produce el encuentro con el antígeno, la producción de citoquinas inflamatorias y se completa con la interacción de las células T con las DC. Existen numerosos factores que inducen y/o regulan la maduración, incluyendo moléculas relacionadas con el patógeno como LPS, DNA bacterial, también el balance entre las señales proinflamatorias e inflamatorias en el microambiente local, las que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-10 (IL-10), factor de crecimiento transformante (TGF- β), prostaglandinas y señales derivadas de células T. Por otra parte, el proceso de maduración está asociado con una serie de eventos coordinados tales como la pérdida de receptores fagocíticos y endocíticos, una sobreproducción de moléculas coestimuladoras como CD40, CD58, CD80 y CD86, cambios en la morfología como pérdida de estructuras adhesivas, modificaciones en los compartimentos lisosomales y MHC y la adquisición de una alta motilidad celular (Winzler y col., 1997).

3.6. ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T POR LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Dependiendo de las condiciones, las DC pueden estimular el mayor crecimiento y activación de una variedad de linfocitos T, los cuales afectan la respuesta inmune diferentemente. La habilidad para sensibilizar células T CD4⁺ vírgenes constituye la principal función de las DC, tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque igualmente importante es la sensibilización o “priming” de las células T CD8⁺. *In vitro*, las DC pueden estimular la proliferación alogénica de células T CD8⁺ directamente (Inaba y col., 1987), en la ausencia de células Th (McCoy y col., 1999) y también pueden generar CTL desde células T precursoras (Mehta-Damani y col., 1994).

Queda por establecer si la única función de las DC es activar a las células T y si esto resulta de la expresión de moléculas que están involucradas en esta interacción. Las moléculas del MHC o complejos de las moléculas del MHC-péptido son 10 a 100 veces más altos en DC que en otras APC como células B o monocitos (Inaba y col., 1997). El reconocimiento de los complejos de las moléculas del MHC-péptido por TCR antígeno-específicos constituye la primera señal en la interacción de las DC y las células T.

Las DC también se caracterizan por la presencia sobre su superficie de una gran cantidad de moléculas del MHC clase I y clase II (Hart, 1997). Además, debido a sus funciones como presentadoras de antígeno, ellas expresan varias moléculas de adhesión, dentro de las que se incluyen: CD11a (LFA-1), CD11c, CD50 (ICAM-2), CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3) y CD102 (ICAM-3) (Hart y Prickett, 1993).

El factor crucial, que representa la segunda señal para la activación, es la interacción entre estas moléculas coestimuladoras expresadas por las DC y sus ligandos expresados por las células T. Las moléculas coestimuladoras tales como CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) y moléculas reguladoras de la coestimulación como CD40 son expresadas en DC maduras de origen mielóide (Banchereau y col., 1994; Fagnoni y col., 1995). Las moléculas de adhesión como las coestimuladoras tienden a aumentar con la maduración. (McLellan y col., 1995), lo que se ha comprobado en DC derivadas de sangre periférica en humanos. Sin embargo, Caux y col. (1994) e Inaba y col. (1994) demostraron que sin duda CD86 es la molécula más importante en la amplificación de la respuesta de las células T.

Por su parte, las células T pueden activarse vía el ligando de CD40 (CD40-L) y así aumentar en las DC la expresión de las moléculas coestimuladoras anteriormente mencionadas y la liberación de citoquinas como IL-1, TNF, quimoquinas e IL-12 (Caux y col., 1994; Salluto y Lanzavecchia, 1994; Bennet y col., 1998; Schoenberger y col., 1998). Así la comunicación entre las DC y las células T muestra ser más bien un diálogo que un monólogo, en el cual, las DC responden también a los linfocitos T.

Finalmente, el sensibilizar al sistema inmune contra antígenos específicos parece ser el único propósito de las DC hasta ahora confirmado tanto en modelos *in vitro*, como *in vivo* (Mehta-Damani y col., 1994, Mehta-Damani y col., 1995; Hsu y col., 1996; Nestle y col., 1998).

3.7. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LA INMUNOLOGÍA TUMORAL

La inmunología tumoral está basada sobre la premisa de que el sistema inmune es capaz de realizar una respuesta efectiva contra células tumorales autólogas. Se cree que las células tumorales expresan antígenos asociados al tumor o antígenos de rechazo (TAA) que pueden ser reconocidos como blanco por una célula T efectora (Boon y Van der Bruggen, 1996; Musiani y col., 1997).

Dado que las DC tiene un rol protagónico en el control de la inmunidad, ellas son utilizadas en varias aproximaciones clínicas en que están involucradas las células T: trasplantes, alergias, enfermedades autoinmunes, resistencia a las infecciones y a los tumores. La inducción de inmunidad tumoral puede ser iniciada por efectores de la inmunidad innata y más adelante por el desarrollo de la inmunidad adaptativa, en la cual las DC juegan un papel fundamental. Muchos elementos están involucrados para una efectiva respuesta de estas células tales como i) reconocimiento de moléculas del tumor por los precursores de las DC, ii) captura y presentación cruzada de antígenos liberados o asociados al tumor por DC inmaduras, iii) selección y activación de células T antígeno-tumor-específicas, así como de efectores no específicos como macrófagos y eosinófilos y iv) "homing" o asentamiento de células T antígeno específicas para el tumor en el sitio del tumor, además de reconocer elementos que permitan la eliminación de células tumorales. Se sabe que los tumores pueden escapar a la inmunovigilancia debido a alteraciones en cada una de estas etapas (Bell y col., 1999). También por liberación de citoquinas como IL-6, IL-10, factor estimulante de colonias macrófágicas (M-CSF), y el factor de crecimiento endotelial vascular, estos pueden impedir la diferenciación y función de las DC. De hecho, las DC asociadas a un tumor presentan una pobre capacidad aloestimuladora, particularmente si son aisladas desde metástasis de melanoma maligno. Más

aún la acción de la IL-10 sobre las DC es capaz de inducir anergia en las células T CD8⁺, provocando un estado de tolerancia al tejido tumoral (Steinbrink y col., 1999).

La habilidad de las DC para generar una respuesta inmune antitumoral *in vivo* ha sido documentado en varios modelos animales; en estos experimentos se generaron DC *in vitro* que luego fueron cargadas con antígenos tumorales con las cuales se inmunizan animales singénicos (Field y col., 1998).

Por otro lado, los ensayos clínicos en humanos demuestran la posibilidad de administrar DC cargadas con péptidos para inducir una respuesta de células T péptido-específicas en pacientes con linfoma, melanoma maligno y carcinoma prostático (Mukherjib y col., 1995; Tjoa y col., 1998). Muchos protocolos para cargar DC con péptidos han sido probados los cuales incluyen: i) péptidos de secuencias conocidas (Mayordomo y col., 1995; Celluzzi y col., 1996), ii) elusión ácida de péptidos desde tumores autólogos (Zitvogel y col., 1996) iii) tumores enteros lisados (Field y col., 1998), iv) vectores adenovirales y retrovirales (Song y col., 1997; Specht y col., 1997), v) RNA derivado de células tumorales (Boczkowski y col., 1996), vi) fusión de DC con células tumorales (Gong y col., 1998). A través, de todas estas instancias se ha podido presenciar la inducción de células T y un efecto antitumoral considerable, a pesar de no estar claro cual de los péptidos definidos son TAA *in vivo* (Nouri-Shirazi y col., 2000).

La inmunoterapia se ha transformado en una de las terapias más alentadoras, sobre todo para el caso de enfermedades como melanoma maligno avanzado, que posee una baja respuesta a tratamientos convencionales. La terapia con DC se ha utilizado en muchas partes del mundo, y recientemente se han iniciado protocolos en Chile. Por todas estas razones, investigar sobre nuevas formas de combatir el cáncer permitirá ir adquiriendo alta tecnología, y el modelo murino es un excelente instrumento para avanzar más en este campo. Por lo que resulta interesante generar células DC murinas (CD11c⁺, CD86⁺, H2K^b), producidas a partir de precursores de médula ósea, para ser utilizadas en la inmunización de ratones contra antígenos virales y/o tumorales.

Como resultado de todos los antecedentes entregados se postula la siguiente hipótesis:

3.8. HIPÓTESIS

“A partir de precursores de médula ósea pueden ser producidas *in vitro* células dendríticas murinas CD11c⁺, CD86^{high}, H2K^{bhigh}, características fenotípicas que pueden permitirles actuar como células presentadoras de antígeno”

Para confirmar o rechazar la hipótesis se plantearon los siguientes objetivos

3.9. OBJETIVOS

3.9.1. Objetivo general

El objetivo general es estandarizar un protocolo de producción de DC murinas derivadas de médula ósea y proceder a su caracterización por citometría de flujo.

3.9.2. Objetivos específicos

Establecer cultivos de DC derivadas de médula ósea de ratón utilizando protocolos alternativos.

Caracterizar el fenotipo de las células obtenidas mediante la observación morfológica y el análisis mediante citometría de flujo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1. Material biológico

- Ratonos cepa C57BL/6 de 4-12 semanas (Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

4.1.2. Equipo de laboratorio

- Estufa a 37° C (Nuair, Minneapolis, U.S.A).
- Campana de flujo laminar (Nuair clase II/AB, Minneapolis, U.S.A).

4.1.3. Material de laboratorio

- Jeringa con aguja de 0,45 mm
- Placas de cultivo bacteriológico 100 mm (Falcon nº 1029, Bedford, U.S.A.).
- Placas de cultivo celular 100 mm (Falcon nº 3003, Bedford, U.S.A)
- Pipetas 5 ml y 10 ml (Falcon).
- Tubos de 15 ml y 50 ml (Falcon).
- Micropipetas 0,5-10 µl y 20-200 µl (Eppendorf).
- Tabla de disección.

4.1.4. Reactivos.

- RPMI-1640 (GIBCO BRL, Carlsbad, California) suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO BRL, Carlsbad, California), 1% L-glutamina (GIBCO BRL, Carlsbad, California) y 1% Penicilina-estreptomicina (GIBCO BRL, Carlsbad, California), gentamicina 80 mg/ml (Laboratorio Chile).
- PBS (Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)
- Etanol al 70 %.
- GM-CSF recombinante murino (PHARMIGEN San Diego, CA, USA).
- TNF recombinante humano (R&D Systems, Minneapolis, U.S.A.).

4.2. MÉTODOS

Las tibias y fémures fueron extraídos de ratones C57BL/6 hembras de 4-12 semanas. Se procedió a sacar la musculatura y posteriormente fueron sumergidos en etanol al 70% durante 2 a 5 minutos para su desinfección y lavados con PBS. Se cortaron con tijera a la altura de las epífisis y se extrajo la médula ósea con PBS o RPMI con una jeringa con aguja de 0,45 mm. Los “clusters” o agrupaciones de células que se encontraron en la médula ósea obtenida, fueron desintegrados por pipeteo vigoroso. Finalmente se realizó un lavado con PBS obteniéndose aproximadamente de $2,8 \times 10^7$ de leucocitos por ratón.

4.2.1. Cultivo de médula ósea con GM-CSF:

El principal método para generar DC de médula ósea (BM-DCs) con GM-CSF fue adaptado de varias publicaciones previas (Inaba y col., 1992a, Inaba y col., 1992b; Scheicher y col., 1992). Las modificaciones fueron las siguientes: se usaron placas de 100

mm N° 1029 Falcon de tipo bacteriológico en reemplazo de las placas de cultivo celular, el medio de cultivo usado fue RPMI suplementado con Penicilina 100U/ml, streptomycinina 100µg/ml, L-glutamina 2mM, gentamicina 1µl/ml y Suero Fetal Bovino al 10%.

- **Día 0:**

Los leucocitos de médula ósea fueron sembrados en cantidad de 2×10^6 en placas de 100 mm en 10 ml de RPMI que contiene 200 U/ml (20 ng/ml) de rmGM-CSF.

- **Día 3:**

Se agregaron 10 ml de medio por placa conteniendo 200 U/ml de GM-CSF.

- **Día 6 y 8:**

Se recuperó la mitad del sobrenadante del cultivo, se centrifugó, y el pellet se resuspendió en 10 ml de medio fresco que contiene 200 U/ml de GM-CSF, lo cual es devuelto a las placas originales. Para completar la maduración, el día 8, las células no adherentes fueron recolectadas por pipeteo suave, centrifugadas a $300 \times g$ por 5 minutos y resuspendidas en 10 ml de medio RPMI fresco en placas de 100 mm Falcon N° 3003 conteniendo 100 U/ml de rmGM-CSF y TNF a 500 U/ml y cultivadas por 1 o 2 días más hasta ser fijadas para realizar la citometría de flujo.

- **Día 10:**

Las células pueden ser usadas inmediatamente o puede continuarse el protocolo para disminuir la contaminación por granulocitos.

4.2.2. Citometría de flujo:

Para detectar marcadores celulares de membrana se fijaron un total de $1,5 \times 10^6$ células con 0,5 % formaldehído en PBS durante 10 min a 37°C. Después de un lavado con PBS, se colocaron 5 µl de anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoroceina (FITC) y ficoeritrina (PE) (PHARMINGEN, San Diego, CA, USA.). También se preparó una muestra sólo con la presencia de un anticuerpo irrelevante conjugado con FitC y otro con PE como control negativo. La incubación fue de 30 minutos a 4°C. Se almacenó en 100 µl de PBS con 1% formaldehído y 0,5% de SFB a 4°C en un tubo bien cerrado, además protegido de la luz hasta su lectura en el citómetro de flujo FACscan (BECTON DICKINSON, San Diego, CA, USA.) el cual se encuentra en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

5. RESULTADOS

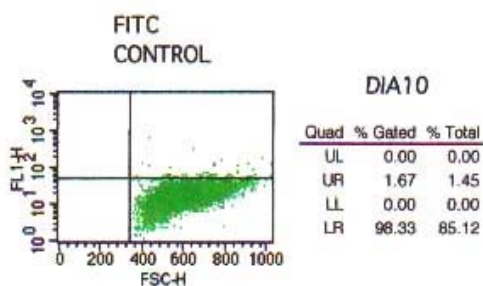
5.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se analizaron las DC provenientes de precursores de médula ósea y estimuladas con rGM-CSF por citometría de flujo, tal como lo indica el material y métodos. Se determinó su grado de diferenciación a DC y la maduración mediante la tinción con diversos marcadores de superficie. Se ubicó la población con mayor tamaño y granulosidad, lo cual indica la presencia de un mayor número de células vivas.

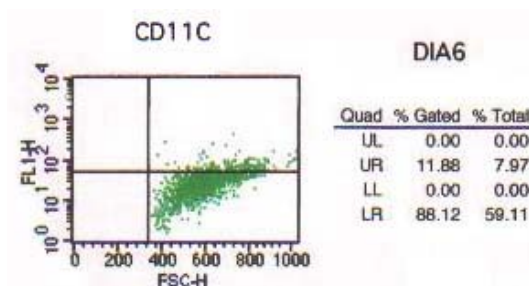
Las células fueron fijadas a los 6, 8 y 10 días del protocolo para verificar su estado de madurez, a través de la expresión de moléculas como CD11c, CD86 (B7-2), y la molécula del MHC clase I (H2K^b). Se realizaron controles sólo con la presencia de un anticuerpo irrelevante conjugado con FitC y otro con PE.

En la figura 1 se realizó la caracterización para el marcador CD11c, la cual es una integrina característica de las DC, aquí se observa un aumento gradual en el número de células positivas, obteniéndose un 48,22% al día 10 de cultivo en comparación al 11,88% del día 6 de cultivo.

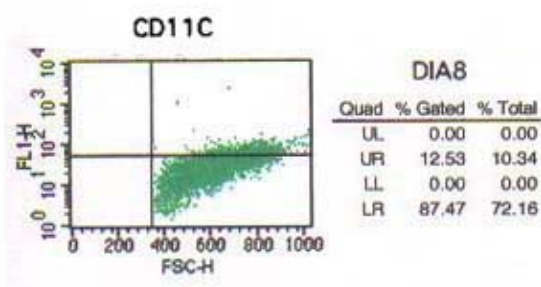
A)



B)



C)



D)

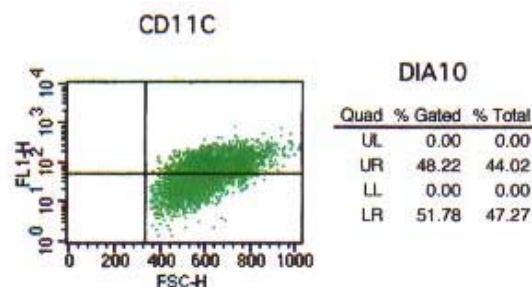


Figura 1: Citometría de flujo que muestra el porcentaje de la integrina CD11c en las DC. A) Control de células sin anticuerpos para FITC B) Células marcadas con

anticuerpo anti-CD11c el día 6 de cultivo C) Células marcadas con el anticuerpo anti-CD11c el día 8 de cultivo. D) Células marcadas con el anticuerpo anti-CD11c el día 10 de cultivo.

En la figura 2 se analizó la expresión de la molécula de presentación antigénica clase-I H2K^b en dos diferentes días de cultivo. La presencia de esta molécula en las DC indica que estas células podrían actuar como presentadoras de antígeno, ya que serían capaces de entregar la primera señal para la activación de linfocitos vírgenes (MHC-péptido-TCR). Así se puede observar que al día 6 de cultivo existe un alto porcentaje de células positivas para este marcador (66,12%), el cual aumenta notoriamente al día 10 de cultivo (98,27%).

A)

B)

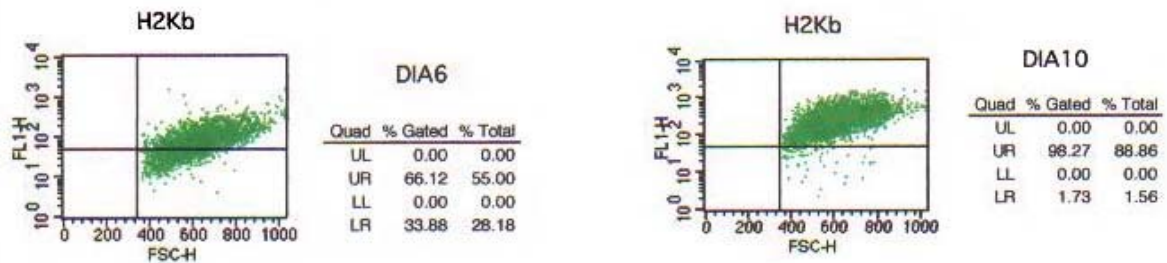
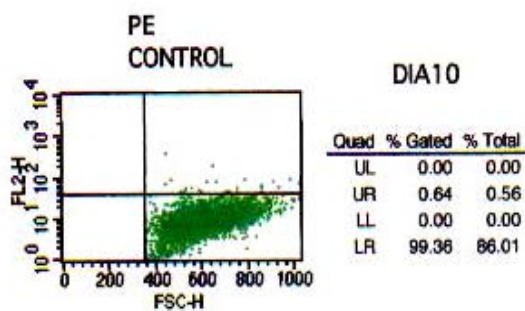


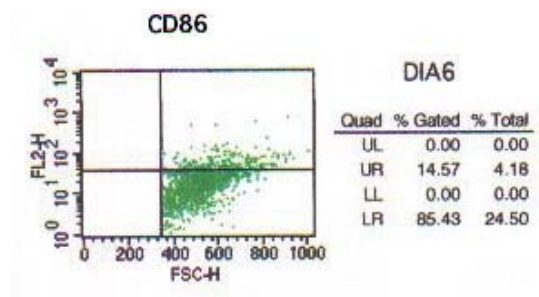
Figura 2: A) Células marcadas con anticuerpo anti-H2K^b el día 6 de cultivo, B) Células marcadas con anticuerpo anti-H2K^b el día 10 de cultivo.

En la figura 3 se analizó la expresión de la molécula de coestimuladora CD86, usando un control negativo teñido con un anticuerpo irrelevante conjugado con PE y a los días 6, 8 y 10. La presencia de esta molécula en las DC indica que estas células serían capaces de entregar la segunda señal para la activación de linfocitos vírgenes (CD86-CD28). Así se puede observar que al día 6 de cultivo existe un porcentaje de células positivas para este marcador de 14,57%, el cual aumenta dramáticamente al día 8 y 10 (85,03% y 86,33% respectivamente).

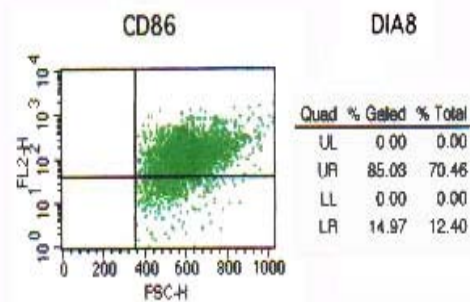
A)



B)



C)



D)

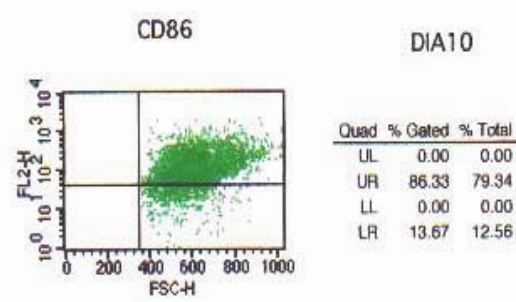
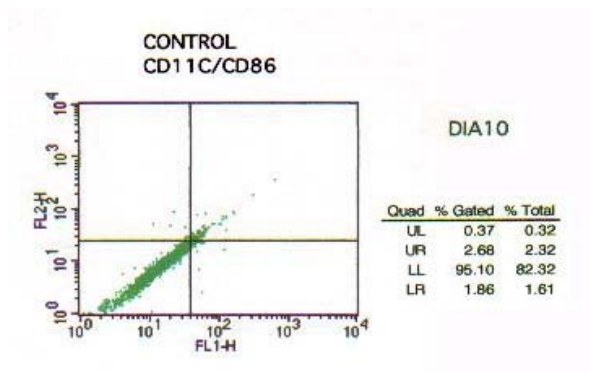


Figura 3: A) Control de células sin anticuerpos para PE, B) Células marcadas con anticuerpo anti-CD86 el día 6 de cultivo, C) Células marcadas con anticuerpo anti-CD86 el día 8 de cultivo, D) Células marcadas con anticuerpo anti-CD86 el día 10 de cultivo.

En la figura 4 se realizó una doble tinción celular con CD11c/CD86, para determinar el porcentaje de DC con capacidad coestimuladora, en donde se puede ver que al menos un 55,27% al día 10 de cultivo presentan las características de DC maduras.

A)



B)

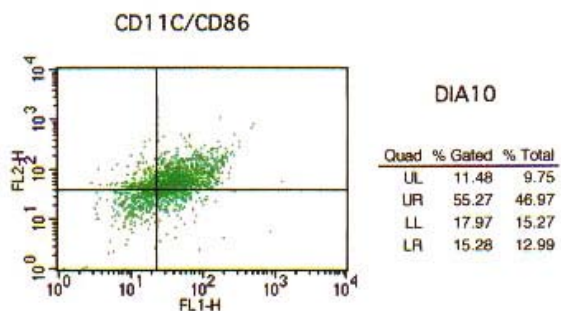


Figura 4: A) Control de células con doble tinción con anticuerpos para FITC y PE, B) Células con doble tinción para CD11c/CD86.

En la figura 5 y 6 se muestra las células al día 6 de cultivo, observándose a este tiempo la presencia de algunas células con morfología de DC.

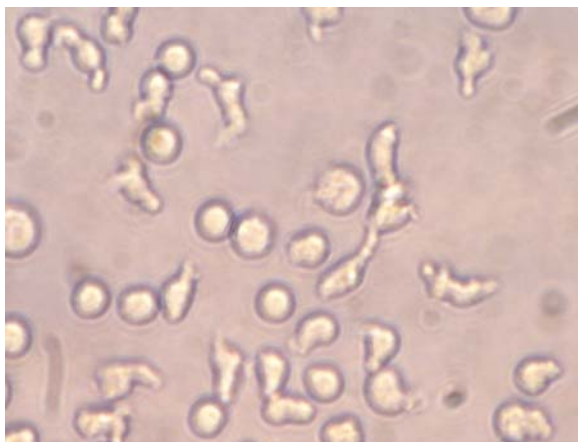


Figura 5: DC al sexto día de cultivo (40 X).

También se pudieron visualizar presencia de “Clusters” o agrupaciones de células a partir del segundo día y claramente al día 6 de cultivo con citoquina.

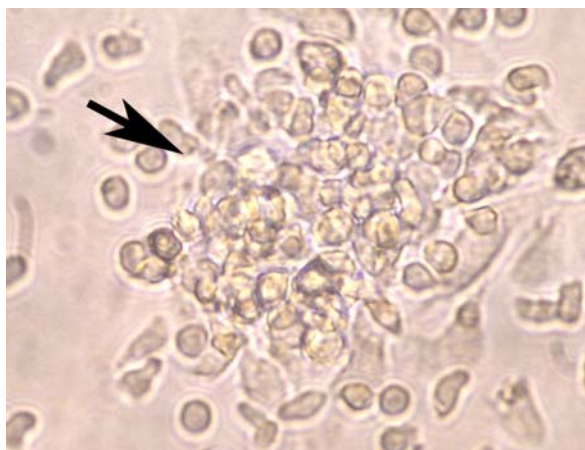


Figura 6: “Cluster” al día 6 de cultivo con rGM-CSF (40 X).

6. DISCUSIÓN

En este estudio se logró estandarizar la producción de DC murinas a partir de precursores derivados de médula ósea, mediante un protocolo basado en Lutz y col. (1999), el cual ha sido modificado en este trabajo. Este protocolo nos permitió producir DC con un fenotipo adecuado de madurez, en cantidades suficientes para permitir su utilización en la inmunización de ratones singénicos y con una reproductibilidad del método adecuada para estos fines.

Desde el descubrimiento de las DC como una herramienta para estimular al sistema inmune y el estudio de distintas alternativas terapéuticas se han generado diversos protocolos. Los estudios anteriores de generación de DC con GM-CSF (Inaba y col., 1992b, 1993) emplean diversos tratamientos para alcanzar una máxima pureza de células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea en murinos. En este protocolo se descartaron procedimientos como la lisis tanto de precursores de eritrocitos como de eritrocitos, la depleción de granulocitos por pipeteo y de linfocitos T y B usando anticuerpos específicos y lisis a través de la fijación del complemento (Inaba y col., 1992b). Con el protocolo de Lutz y col. (1999), se mantienen los precursores de médula ósea en placas Petri bacteriológicas, ya que se comprobó que un número mucho mayor de células puede ser cosechadas que en placas de cultivo celular. La menor adherencia en placas de cultivo bacteriológico parece impedir el desarrollo de macrófagos, por lo que el cultivo de las DC en suspensión favorece su maduración y su proliferación (Yamaguchi y col., 1997).

El periodo de cultivo óptimo para generar DC desde precursores de médula ósea ha sido establecido en 7-8 días (Inaba y col., 1992b; Scheicher y col., 1992). Sin embargo, Lutz y col. (1999) ha prolongado los protocolos originales hasta 10-12 días de cultivo lo que aumentaría la cantidad y la pureza de los cultivos al ser puestas en baja densidad (2×10^6 por placa). No obstante, hay que destacar que bajo las condiciones de este trabajo se pudo detectar que el óptimo eran los 8 días de cultivo con un alto grado de diferenciación y madurez. Por lo que en el protocolo desarrollado en esta investigación, se han modificado algunos pasos utilizados por Lutz y col. (1999).

Otro punto destacable en el protocolo realizado es el uso de un número mínimo de animales, obteniendo una cantidad adecuada, tanto de precursores (alrededor de 4×10^7 por ratón) como de DC para ser inoculadas posteriormente (4×10^6). Esto no es posible con otros protocolos ya que se necesita una mayor cantidad de precursores, debido a que estos se pierden con los diversos tratamientos a que son sometidas las células antes de ser puestas en cultivo.

En el protocolo empleado en este estudio, se emplea una dosis de 200 U/ml de GM-CSF, que es similar a las dosis empleadas por otros autores para generar una mezcla de células inmaduras y maduras (Inaba y col., 1992b; Heuffler y col., 1996), y que no ha mostrado tener resistencia a la maduración. Posteriormente, Lutz y col. (2000) investigó el

uso de bajas dosis de GM-CSF, y observó que de las DC no maduraban lo que induce células T no respondedoras tanto *in vitro* como *in vivo*.

La mayor contaminación en los cultivos de DC derivadas de médula ósea son los granulocitos, que también se estimulan con el GM-CSF y son claramente visibles como agrupaciones o “clusters” a partir del día 2 en adelante. Por eso es necesario remover estos “clusters” por pipeteo suave al día 2 y 4. Sin embargo, esta remoción nunca es totalmente efectiva como se ha demostrado en estudios anteriores donde las poblaciones de DC de médula ósea al día 7 siempre presentan contaminación por granulocitos (Inaba, 1992b).

Las células fueron fijadas al día 6, 8 y 10 de cultivo para comprobar su estado de maduración, siendo positivas levemente el día 6 y 8 para CD11c lo que aumenta considerablemente al día 10 con un 48, 22%. En el estudio realizado por Lutz y col. (1999), se encontró que esta molécula era expresada tanto sobre las DC maduras como inmaduras, lo que se corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo.

Cuando suspensiones de médula ósea de ratón son cultivadas en presencia de GM-CSF, tres tipos celulares de tipo mieloides se expanden: i) los neutrófilos, los cuales no se adhieren a la superficie de cultivo y presentan características morfológicas nucleares como la expresión de antígeno RB-6 y una pobre presencia de productos del MHC clase-II, ii) los macrófagos que son altamente adherentes con substanciales niveles del antígeno F4/80 y una baja expresión de moléculas del MHC clase-II, iii) y las DC, las cuales, se originan desde agregados celulares que están unidos al estroma óseo, que más tarde son distinguidas por características de forma y motilidad, además de los altos niveles de moléculas del MHC clase II (Inaba y col., 1992b). Las DC inmaduras presentan una alta actividad endocítica y fagocítica (Inaba y col., 1993; Reis e Sousa y col., 1993; Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Sallusto y col., 1995; Pierre y col., 1997) y una baja expresión de señales accesorias para la activación de células T (Inaba y col., 1994; Banchereau y Steinman, 1998).

Por otro lado, las DC maduras se caracterizan por su enorme capacidad de presentación antigénica y por la gran cantidad de moléculas co-estimuladoras que expresan y que son capaces de activar linfocitos T. Esta señal co-estimuladora no es antígeno-específica, y está dada por moléculas como CD28 y CTLA4 que se encuentran sobre los linfocitos T y que interactúan con ligandos como B7-1 (CD80) o B7-2 (CD86) sobre las APC (Thompson, 1995). El rol de esta co-estimulación ha sido claramente demostrado, por lo que se sabe que la estimulación antigénica de linfocitos T *in vitro* en ausencia de co-estimulación deja células T que no proliferan, no respondedoras o con anergia clonal (Schwartz, 1996). Así la molécula B7-2 (CD86), resulta ser sólo un pre-requisito para sensibilizar linfocitos T eficientemente (Cella y col., 1997b; Banchereau y col., 1998).

La expresión de B7-2 (CD86) es inducida sobre células B por LPS o por anti-Ig y en macrófagos por LPS o IFN. Inaba y col. (1994), encontraron que la molécula B7-2 es difícil de detectar en aislados frescos de DC, pero cuando es puesta en cultivo, aumenta de forma dramática, mucho más que en otras formas leucocitarias.

Los niveles de B7-2 en DC, son altos o aún más altos que otros marcadores de superficie de las mismas DC. Los factores que regulan B7-2 sobre las DC aún no son

identificados. Inaba y col. (1994) en este mismo estudio lograron sólo una disminución parcial de esta molécula al aplicar anticuerpo anti-GM-CSF en cultivos de piel, por lo que creen que la citoquina necesaria pudo ser liberada desde la misma preparación de las células de piel. La aplicación de LPS sin embargo, no parece aumentar la expresión de B7-2 como ocurre con macrófagos y células B. Además, el control de la expresión de B7-2 en DC parece diferir del control en otras APC. Productos bacterianos como LPS si parecen inducir la migración y maduración de las DC *in vivo*, con la subsecuente pérdida de DC una vez activadas, lo que resulta ser un mecanismo de retroalimentación negativo para controlar *in vivo* las respuestas inflamatorias que pueden causar severos daños a los tejidos. Las DC generadas en este estudio presentaron una diferencia notable en la expresión de la molécula CD86, al comparar el día 6 de cultivo con un 14,57% y el día 8 con un altísimo 85,03%.

Debido al hecho de que las DC parecieron disminuir a partir del día 6, se decidió fijarlas y contarlas a distintos días de cultivo, para poder establecer su estado y cuál era el día óptimo para ser maduras. Hay que destacar, que el día 8, se fijaron células recién sacadas de cultivo como también células a las cuales se les adicionó LPS para inducir su maduración, las que tras 24 horas murieron. Más tarde tras efectuar la citometría de flujo, se pudo determinar que las células no estimuladas con LPS ya presentaban un alto porcentaje a de CD86, por lo que estaban maduras (Figura 3). Se ha observado en protocolos desarrollados anteriormente, que la maduración muchas veces puede ser producida espontáneamente *in vitro* durante el proceso de manipulación o incluso debido al aumento de densidad celular (Lutz y col., 1999).

Por otro lado, las DC son consideradas indispensables en una inducción péptido-específica, y el mejoramiento de la concentración de estas células implica un aumento en las posibilidades de éxito. Además DC cargadas en forma exógena con un antígeno inducen una respuesta específica tanto humoral como celular al ser inyectadas a animales singénicos (Castelmur y col., 1993; Bachmann y Kundig, 1994).

Se puede decir que las DC generadas mediante este protocolo cumplen efectivamente esta característica, ya que al día 6 tienen un alto porcentaje de expresión de la molécula presentadora de antígeno clase I (H2K^b) con un 66,12%, aumentando casi a la totalidad de las células marcadas con anticuerpo el día 10 (98,27%). En esta caracterización se originaron un total de 55,27% de células doble positivas para los marcadores CD11c/CD86, de la población de células analizadas.

A pesar que la molécula del MHC clase II es la que más se utiliza para caracterizar DC (Sallusto y col., 1995), no se ha incorporado en este trabajo, tomando relevancia la molécula de presentación antigénica del MHC clase I (H2K^b), que es capaz de presentar antígenos virales, tumores y antígenos propios a linfocitos T CD8⁺, y también la molécula co-estimuladora B7-2 (CD86).

Los estudios aquí descritos avalan la utilización de DC generadas *in vitro* para la inmunización de ratones singénicos con antígenos virales y/o tumorales lo que permitiría tener ratones inmunizados contra diferentes clases de tumores, lo que podría repercutir a corto y mediano plazo en la posibilidad de adquisición de nuevas herramientas experimentales para realizar estudios de mecanismos de escape de los tumores a la

inmunovigilancia del sistema inmune, inmunomodulación con péptidos y estrategias de inmunoterapia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT, M.L., S.F. PEARCE, L.M. FRANCISCO, B. SAUTER, P. ROY, R.L. SILVERSTEIN, N. BHARDWAJ. 1998a. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188: 1359 - 1368.
- ALBERT, M.L., B. SAUTER, N. BHARDWAJ. 1998b. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392: 86 - 89.
- ARNOLD-SCHILD, D., D. HANAU, D. SPEHNER, C. SCHMID. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 162: 3757 - 3760.
- AUSTYN, J.M. 1987. Lymphoid dendritic cells. *Immunology* 62: 161 - 170.
- AZUMA, M., M. CAYABYAB, D. BUCK, J.H. PHILLIPS, L.L. LANIER. 1992. CD28 interaction with B7 co-stimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 175: 353 - 360.
- BACHMANN, M.F., T.M. KUNDIG. 1994. *In vivo* versus *in vitro* assays for assessment of T- and B-cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 320 - 326.
- BANCHEREAU, J., F. BAZAN, D. BLANCHARD, F. BRIERE, J.P. GALIZZI, C. VAN KOOTEN, Y.J. LIU, F. ROUSSET, S. SAELAND. 1994. The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 881 - 922.
- BANCHEREAU, J., R.M. STEINMAN. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245 - 252.
- BANCHEREAU, J., F. BRIERE, C. CAUX, J. DAVOUST, S. LEBECQUE, Y.J. LIU, B. PULENDRAN, K. PALUCKA. 2000. Immunology of dendritic cells. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 767 - 811.
- BATES, E.E., O. RAVEL, M.C. DIEU, S. HO, C. GURET, J.M. BRIDON, S. AIT-YAHIA, F. BRIERE, C. CAUX, J. BANCHEREAU, S. LEBECQUE. 1997. Identification and analysis of a novel member of the ubiquitin family expressed in dendritic cells and mature B cells. *Eur. J. Immunol.* 27: 2471 - 2477.
- BELL, D., J.W. YOUNG, J. BANCHEREAU. 1999. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72: 255 - 324.
- BENNETT, S.R., F.R. CARBONE, F. KARAMALIS, R.A. FLAVELL, J.F. MILLER, W.R. HEATH. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393: 478 - 480.

- BOCZKOWSKI, D., S.K. NAIR, D. SNYDER, E. GILBOA. 1996. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184: 465 - 472.
- BOON, T., P. VAN DER BRUGGEN. 1996. Human tumor antigen recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 725 - 729.
- CASTELMUR, I., C. DIPAOLO, M.F. BACHMANN, H. HENGARTNER, R.M. ZINKERNAGEL, T.M. KUNDIG. 1993. Comparison of the sensitivity of *in vivo* and *in vitro* assays for detection of antiviral cytotoxic T cell activity. *Cell. Immunol.* 151: 460 - 466.
- CAUX, C., B. VANBERVLIET, C. MASSACRIER, M. AZUMA, K. OKUMURA, L.L. LANIER, J. BANCHEREAU. 1994. B70/B7-2 is identical to CD 86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 180: 1841 - 1847.
- CELLA, M., A. ENGERING, V. PINET, J. PIETERS, A. LANZAVECCHIA. 1997a. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782 - 787.
- CELLA, M., F. SALLUSTO, A. LANZAVECCHIA. 1997b. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 10 - 16.
- CELLUZZI, C.M., J.I. MAYORDOMO, W.J. STORKUS, M.T. LOTZE, L.D. FALO JR. 1996. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J. Exp. Med.* 183: 283 - 287.
- DE SMEDT, T., B. PAJAK, E. MURAILLE, L. LESPAGNARD, E. HEINEN, P. DE BAETSELIER, J. URBAIN, O. LEO, M. MOSER. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184: 1413 - 1424.
- DELAMARRE L, H. HOLCOMBE, I. MELLMAN. 2003. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J. Exp. Med.* 198: 111 - 122.
- DELVES, P.J., I.M. ROITT. 2000a. Advances in immunology. *New Eng. J. Med.* 343: 37 - 49.
- DELVES, P.J., I.M. ROITT. 2000b. Advances in immunology. *New Eng. J. Med.* 343: 108 - 117.
- DRIESSEN, C., R.A. BRYANT, A.M. LENNON-DUMÉNIL, J.A. VILLADANGOS, P. WOLF BRYANT, G.P. SHI, H.A. CHAPMAN, H.L. PLOEGH. 1999. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J. Cell Biol.* 147: 775 - 790.

- DUBOIS, B. 1997. Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 185: 941 - 951.
- FAGNONI, F.F., W.A. TAKAMIZA, W.R. GODFREY, A. RIVAS, M. AZUMA, K. OKUMURA, E.G. ENGLEMAN. 1995. Role of B70/B7-2 in CD4 T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology* 85: 467 - 474.
- FANGER, N.A., K. WARDWELL, L. SHEN, T.F. TEDDER, P.M. GUYRE. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc γ receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157: 541 - 548.
- FEARON, D.T., R.M. LOCKSLEY. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50 - 53.
- FIELD, R.C., K. SHIMIZU, J.J. MULE. 1998. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysate mediated potent antitumor immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 9482 - 9487.
- GERMAIN, R.N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76: 287 - 299.
- GEUZE, H.J. 1998. The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol. Today* 19: 282 - 287.
- GONG, J., D. CHEN, M. KASHIWABA, Y. LI, L. CHEN, H. TAKEUCHI, H. QU, G.J. ROWSE, S.J. GENDLER, D. KUFE. 1998. Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6279 - 6283.
- HART, D.N., T.C. PRICKETT. 1993. Adhesion molecules in tonsil DC-T cell interactions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 329: 65 - 69.
- HART, D. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune responses. *Blood* 90: 3245 - 3287.
- HENGEL, H., M. LINDNER, H. WAGNER, K. HEEG. 1987. Frequency of herpes simplex virus-specific murine cytotoxic T lymphocyte precursors in mitogen and antigen-driven primary *in vitro* T cell responses. *J. Immunol.* 139: 4196 - 4202.
- HEUFLER, C., F. KOCH, U. STANZI, G. TOPAR, M. WYSOCKA, G. TRINCHIERI, A. ENK, R.M. STEINMAN, N. ROMANI, G. SCHULER. 1996. Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 659 - 668.
- HOFFMANN, J.A., F.C. KAFATOS, C.A. JANEWAY, R.A. EZEKOWITZ. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313 - 1318.

- HSU, F.J., C. BENIKE, F. FAGNONI, T.M. LILES, D. CZERWINSKI, B. TAIDI, E.G. ENGLEMAN, R. LEVY. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2: 52 - 58.
- INABA, K., J.W. YOUNG, R.M. STEINMAN. 1987. Direct activation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 166: 182 - 194.
- INABA, K., R.M. STEINMAN, M.W. PACK, H. AYA, M. INABA, T. SUDO, S. WOLPE, G. SCHULER. 1992a. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175: 1157 - 1167.
- INABA, K., M. INABA, N. ROMANI, H. AYA, M. DEGUCHI, S. IKEHARA, S. MURAMATSU, R.M. STEINMAN. 1992b. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693 - 1702.
- INABA, K., M. INABA, M. DEGUCHI, K. HAGI, R. YASUMIZU, S. IKEHARA, S. MURAMATSU, R.M. STEINMAN. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells, arise from a common major histocompatibility complex class-II negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 3038 - 3042.
- INABA, K., M. WITMER-PACK, M. INABA, K.S. HATHCOCK, H. SAKUTA, M. AZUMA, H. YAGITA, K. OKUMURA, P.S. LINSLEY, S. IKEHARA, S. MURAMATSU, R.J. HODES, R.M. STEINMAN. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J. Exp. Med.* 180: 1849 - 1860.
- INABA, K., M. PACK, M. INABA, H. SAKUTA, F. ISDELL, R.M. STEINMAN. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 186 : 665 – 672.
- KAST, W.M., C.J. BOOG, B.O. ROEP, A.C. VOOR-DOUW, C.J. MELIEF. 1988. Failure or success in the restoration of virus-specific cytotoxic T lymphocyte response defects by dendritic cells. *J. Immunol.*, 140 : 3186 - 3193.
- KLEIJMEER, M.J., M.A. OSSEVOORT, C.J. VAN VEEN, J.J. VAN HELLEMOND, J.J. NEEFJES, W.M. KAST, C.J. MELIEF, H.J. GEUZE. 1995. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J. Immunol.* 154: 5715 - 5724.
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., K. CLARK, B. BENACERRAF, K.L. ROCK. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4942 - 4946.
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., K.L. ROCK. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267: 243 - 246.

- KRONIN, V., K.WINKEL, G. SUSS, A. KELSO, W. HEATH, J. KIRBERG, H. VON BOEHMER, K. SHORTMAN. 1996. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J. Immunol.* 157: 3819 - 3827.
- LAMBRECHT, B.N., B. SALOMON, D. KLATZMANN, R.A. PAUWELS. 1998. Dendritic cells chronic eosinophilic airway inflammation are required for the development of in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J. Immunol.* 160: 4090 - 4097.
- LEENEN, P.J., K. RADOSEVIC, J.S. VOERMAN, B. SALOMON, N. VAN ROOIJEN, D. KLATZMANN, W. VAN EWIK. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: *in vivo* phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J. Immunol.* 160: 2166 - 2173.
- LENSCHOW, D.J., T.L. WALUNAS, J.A. BLUESTONE. 1996. The CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 233 - 258.
- LIU, Y., C.A. JANEWAY. 1992. Cells that present both specific ligand and co-stimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cell. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 3845 - 3949.
- LUTZ, M.B., N. KUKUTSCH, A. OGILVIE, S. RÖßNER, F. KOCH, N. ROMANI, G. SCHULER. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Meth.* 223: 77 - 92.
- LUTZ, M.B., M. R.M. SURI, M. NIIMI, A.L.J. OGILVIE, N.A. KUKUTSCH, S. RÖßNER, G. SCHULER, J.M. AUSTYN. 2000. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* 30: 1813 - 1822.
- MARASKOVSKY, E., K. BRASEL, M. TEEPE, E.R. ROUX, S.D. LYMAN, K. SHORTMAN, H.J. MCKENNA. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184: 1953 - 1962.
- MATZINGER, P. 1994. Tolerance, danger and the extended family. *Ann. Rev. Immunol.* 12 : 991 - 1045.
- MAYORDOMO, J.I., T. ZORINA, W.J. STORKUS, L. ZITVOGEL, C. CELLUZZI, L.D. FALO, C.J. MELIEF, S.T. ILDSTAD, W.M. KAST, A.B. DELEO. 1995. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat. Med.* 1: 1297 - 1302.
- McCOY, K.D., I.F. HERMANS, J.H. FRASER, G. Le GROS, F RONCHESE. 1999. Cytotoxic T lymphocytes-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulated dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cell help. *J. Exp. Med.* 189: 1157 - 1162.

- McLELLAN, A.D., G.C. STARLING, L.A. WILLIAMS, B.D. HOCK, D.N. HART. 1995. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* 25: 2064 - 2068.
- McWILLIAMS, A.S. 1996. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* 184: 2429 - 2432.
- MEDZHITOV, R., C.A. JANEWAY, JR. 1997. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. *Cell* 91: 295 - 98.
- MEHTA-DAMANI, A., S. MARKOWICZ, E.G. ENGLEMAN. 1994. Generation of antigen-specific CD8⁺ CTLs from naive precursors. *J. Immunol.* 153: 996 - 1003.
- MEHTA-DAMANI, A., S. MARKOWICZ, E.G. ENGLEMAN. 1995. Generation of antigen-specific CD4⁺ T cell lines from naive precursors. *Eur. J. Immunol.* 25: 1206 - 1211.
- MOMBURG, F., H.G. HÄMMERLING. 1998. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv. Immunol.* 68: 191 - 256.
- MOMMAAS, A.M., A.A. MULDER, R. JORDENS, C. OUT, M.C. TAN, P. CRESSWELL, P.M. KLUIN, F.KONING. 1999. Human epidermal Langerhans cells lack functional mannose receptor and a fully developed endosomal/lysosomal compartment for loading of HLA class II molecules. *Eur. J. Immunol.* 29: 571 - 580
- MUKHERJIB, N.G. CHAKRABORRY, S. YAMASAKI, T. OKINO, H. YAMASE, J.R. SPOM, S.K. KURTZMAN, M.T. ERGIN, J. OZOLS, J. MEEHAN. 1995. Induction of antigen-specific cytolytic T cells *in situ* in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8078 - 8082.
- MUSIANI, P., A. MODESTI, M. GIOVARELLI. 1997. Cytokines, tumour-cell death, and immunogenicity: a question of choice. *Immunol. Today* 18: 32 - 36.
- NESTLE, F.O., S. ALIJAGIC, M. GILLIET, Y. SUN, S. GRABBE, R. DUMMER, G. BURG, D. SCHADENDORF. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4: 328 - 332.
- NIJMAN, H.W., M.J. KLEIJMEER, M.A. OSSEVOORT, V.M. OORSCHOT, M.P. VIERBOOM, M. VAN DE KEUR, P. KENEMANS, W.M. KAST, H.J. GEUZE, C.J. MELIEF. 1995. Antigen capture and major histocompatibility class II compartment of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J. Exp. Med.* 182: 163 - 174.

- NONACS, R., C. HUMBORG, J.P. TAM, R.M. STEINMAN. 1992. Mechanisms of mouse spleen dendritic cell function in the generation of influenza-specific, cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 176: 519 - 529.
- NOURI-SCHIRAZI, M., J. BANCHEREAU, D. BELL, S. BURKEHOLDER, E.T. KRAUS, J. DAVOUST, K.A. PALUCKA. 2000. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J. Immunol.* 165: 3797 - 3803.
- OHTEKI, T., T. FUKAO, K. SUZUE, C. MAKI, M. ITO, M. NAKAMURA, S. KOYASU. 1999. Interleukin 12-dependent interferon γ production by CD8 α^+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189: 1981 - 1986.
- PAMER, E., P. CRESSWELL. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Ann. Rev. Immunol.* 16: 323 - 358.
- PFEIFER, J.D., M.J. WICK, R.L. ROBERTS, K. FINDLAY, S.J. NORMARK, C.V. HARDING. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to cells. *Nature* 361: 359 - 362.
- PIERRE, P., S.J. TURLEY, E. GATTI, M. HULL, J. MELTZER, A. MIRZA, K. INABA, R.M. STEINMAN, I. MELLMAN. 1997. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388: 787 - 792.
- PULENDRAN, B., J. LINGAPPA, M.K. KENNEDY, J. SMITH, M. TEEPE, A. RUDENSKY, C.R. MALISZEWSKI, E. MARASKOVSKY. 1997. Developmental pathways of dendritic cells *in vivo*: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in Flt3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* 159: 2222 - 2231.
- PULENDRAN, B., E. MARASKOVSKY, J. BANCHEREAU, C.R. MALISZEWSKI. 2001. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol.* 22: 41 - 47.
- REDDY, A., M. SAPP, M. FELDMAN, M. SUBKLEWE, N. BHARDWAJ. 1997. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 90: 3640 - 3646.
- REIS E SOUSA, C., P.D. STAHL, J.M. AUSTYN. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J. Exp. Med.* 178: 509 - 519.
- REIS E SOUSA, C.R., S. HIENY, T. SCHARTON-KERSTEN, D. JANKOVIC, H. CHAREST, R.N. GERMAIN, A. SHER. 1997. *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186: 1819 - 1829.

- RESCIGNO, M., F. GRANUCCI, S. CITTERIO, M. FOTI, P. RICCIARDI-CASTAGNOL. 1999. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today* 20: 200 - 203.
- ROCK, K.L., A.L. GOLDBERG. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Ann. Rev. Immunol.* 17: 739 - 779.
- SADASIVAN, B. 1996. Role for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity.* 5: 103 - 114.
- SALLUSTO, F., A. LANZAVECCHIA. 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 α . *J. Exp. Med.* 179: 1109 - 1118.
- SALLUSTO, F., M. CELLA, C. DANIELI, A. LANZAVECCHIA. 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. *J. Exp. Med.* 182: 389 - 400.
- SCHEICHER, C., M. MEHLIG, R. ZECHER, K. RESKE. 1992. Dendritic cells from bone marrow: *in vitro* differentiation using low doses of recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Meth.* 154: 253 - 264.
- SCHOENBERGER, S.P., R.E. TOES, E.I. VAN DER VOORT, R. OFFRINGA, C.J. MELIEF. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393: 480 - 483.
- SCHWARTZ, R.H. 1996. Models of T cell anergy: Is there a common mechanism?. *J. Exp. Med.* 184: 1 - 4.
- SELIGER, B., M. J. MAEURER, S. FERRONE. 2000. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol. Today* 21: 455 - 464.
- SONG, W., H.L. KONG, H. CARPENTER, H. TORII, R. GRANSTEIN, S. RAFII, M.A. MOORE, R.G. CRYSTAL. 1997. Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Exp. Med.* 186: 1247 - 1256.
- SPECHT, J.M., G. WANG, M.T. DO, J.S. LAM, R.E. ROYAL, M.E. REEVES, S.A. ROSENBERG, P. HWU. 1997. Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J. Exp. Med.* 186: 1213 - 1221.
- STEINBRICK, K., H. JONULEIT, G. MULLER, G. SCHULER, J. KNOP, A.H. ENK. 1999. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8⁺ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93: 1634 - 1642.

- STEINMAN, R.M., Z.A. COHN. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice II. Functional properties *in vitro*. *J. Exp. Med.* 137: 1142 - 1162.
- STEINMAN, R.M., M. PACK, K. INABA. 1997. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* 156: 25 - 37.
- SUSS G., K. SHORTMAN. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183: 1789 - 1796.
- THOMPSON, C.B. 1995. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation?. *Cell* 8: 979 - 982.
- TJOA, B.A., S.J. SIMMONS, V.A. BOWES, H. RAGDE, M. ROGERS, A. ELGAMAL, G.M. KENNY, O.E. COBB, R.C. IRETON, M.J TROYCHAK. 1998. Evaluation of phase I/II clinical trials in prostate cancer with dendritic cells and PSMA peptides. *Prostate* 36: 39 - 44. Citado por: Nouri-Schirazi, M., J. Bancherau, D. Bell, S. Burkeholder, E.T. Kraus, J. Davoust, K.A. Palucka. 2000. Dendritic cells capture killed tumors cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J. Immunol.* 165: 3797 - 3803.
- VREMEC, D., K. SHORTMAN. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J. Immunol.* 159: 565 - 573.
- WINZLER, C., P. ROVERE, M. RESCIGNO, F. GRANUCCI, G. PENNA, L. ADORINI, V.S. ZIMMERMANN, J. DAVOUST, P. RICCIARDI-CASTAGNOLI. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.*, 185: 317- 328.
- WU, L., C.L. LI, K. SHORTMAN. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J. Exp. Med.* 184 : 903 - 911.
- YAMAGUCHI, Y., H. TSUMURA, M. MITSURU, K. INABA. 1997. Contrasting effects of TGF- β and TNF- α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* 15: 144 - 153.
- YOUNG, J.W., P. SZABOLCS, M.A.S. MOORE. 1995. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal CD4⁺ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 182: 1111 - 1120.

ZITVOGEL, L., J.I. MAYORDOMO, T. TJANDRAWAN, A.B. DELEO, MR. CLARKE, M.T. LOTZE, W.J. STORKUS. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 87 - 97.

8. AGRADECIMIENTOS

Es de mi consideración manifestar mi gratitud a todos quienes hicieron posible la realización de esta tarea, en especial a:

Dr. Flavio Salazar Onfray, por compartir sus conocimientos, tiempo y confianza.

Dr. Alejandro Escobar por su tiempo y su colaboración en el trabajo de laboratorio.

A todos los integrantes del laboratorio por su colaboración incondicional y la amistad generada.