



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C.**

**EXPRESIÓN DEL RECEPTOR CLEC12A EN CÉLULAS
PRESENTADORAS DE ANTÍGENO DE DIFERENTES
TEJIDOS DE CERDO**

Por

ANA VIRGINIA RODRÍGUEZ LAFARGA

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRIA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Diciembre, 2015.

APROBACIÓN

Los miembros del comité designados para revisar la tesis de Ana Virginia Rodríguez Lafarga, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dr. Jesús Hernández López
Director de Tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Asesora

Dra. Maricela Montalvo Corral
Asesora



Dr. Alexel Burgara Estrella
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por el apoyo económico otorgado para la realización del presente trabajo de investigación y la obtención del grado de Maestra en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), especialmente a mis asesores: Dra. Verónica Mata, Dra. Maricela Montalvo y Dr. Alexel Burgara por su disponibilidad y experiencia.

Al Dr. Jesús Hernández por su paciencia y por compartir su experiencia y conocimientos conmigo.

A mis compañeros de laboratorio: Héctor, Mónica, Edgar y Lucy.

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que me motivan a seguir adelante.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., bajo la dirección del Dr. Jesús Hernández y con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a través del fondo C0008-2011-01 ANR Francia-CONACYT (Convocatoria Conjunta de Proyectos de Investigación, Desarrollo Tecnológico e Innovación Bilaterales México-Francia) proyecto No. 160315.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTEDECENTES	3
2.1 Generalidades del Sistema Inmune.....	3
2.2 Características de las Células Presentadoras de Antígeno.....	3
2.2.1 Células Dendríticas	4
2.2.2 Macrófagos.....	5
2.2.3 Linfocitos B.....	5
2.3 Receptores de Superficie de las Células Presentadoras de Antígeno.....	6
2.4 Estructura y Función de los Receptores Lectina Tipo C	6
2.5 Inmunoreceptor Lectina Tipo C Clec12a (MICL).....	9
III. HIPÓTESIS.....	13
IV. OBJETIVO GENERAL.....	14
5.1 Objetivos específicos.....	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1 Animales.....	15
5.2 Obtención de Células de Piel	15
5.3 Obtención de Células de Ganglios	16
5.4 Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica	17
5.5 Anticuerpos y Citometría de Flujo.....	18
VI. RESULTADOS	19
VII. DISCUSIÓN.....	26
VIII. CONCLUSIÓN.....	29
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del dominio lectina tipo C.....	7
Figura 2. Esquema correspondiente a la familia de las lectinas	9
Figura 3. Selección de la población en ganglios y piel.....	19
Figura 4. Selección de la población en PBMCs	20
Figura 5. Expresión de Clec12a en ganglio mediastinal, ganglio mesentérico, bazo y amígdala de cerdo	21
Figura 6. Expresión de Clec12a en piel de cerdo	22
Figura 7. Expresión de Clec12a en PBMCs de cerdo.....	22
Figura 8. Expresión de Clec12a en poblaciones de APCs en piel	23
Figura 9. Comparación de medias de la expresión de Clec12a en los diferentes tejidos.....	24
Figura 10. Subpoblaciones Clec12A ⁺ y Clec12A ⁻ de piel.....	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Expresión de Clec12A y controles en los diferentes tejidos.....	24
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: Células presentadoras de antígeno

CLR: Receptores lectina tipo C

CMN: Células mononucleares

CTLD: Dominio lectina tipo C

DC: Células dendríticas

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSC: Dispersión de luz frontal

ITIM: Inmunoreceptor con motivo inhibidor basado en tirosina

LPS: Lipopolisacáridos

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Buffer de fosfatos salinos

PE: Ficoeritrina

SFB: Suero Fetal Bovino

SSC: Dispersión de luz lateral

TLR: Receptores tipo toll

RESUMEN

Las células presentadoras de antígeno (APCs) son un conjunto celular esencial del sistema inmune que se caracterizan por su capacidad de capturar antígenos, lo cuales son procesados y posteriormente presentados mediante el complejo mayor de histocompatibilidad a los linfocitos. Su función como “guardianes” del sistema inmune hace que su presencia en cada órgano y tejido sea indispensable para establecer una adecuada inmunidad innata y adaptativa. Dichas células expresan en su superficie receptores que le confieren diversas funciones biológicas, entre ellos se encuentra la familia de receptores lectina tipo C. Un receptor que forma parte de esta familia es Clec12A, el cual se expresa diferencialmente en células dendríticas CD8⁺ de bazo de ratón. Esto permitió emplear la técnica de direccionamiento de antígeno hacia Clec12A obteniendo como resultado una mejor respuesta humoral. Además se ha demostrado que la expresión de Clec12A en sangre de humano se restringe a células mieloides. Actualmente los estudios realizados en este receptor se han hecho en ratón y humano, sin embargo, se cuenta con la secuencia de Clec12A en otras especies, una de ellas es el cerdo. En estudios preliminares se observó que hay transcritos de Clec12A en diversos tejidos de cerdo, pero la expresión de dicho receptor no ha sido evaluada a nivel de proteína en esta especie. El objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión de Clec12A en células de diferentes tejidos de cerdo. Se sacrificaron 8 cerdos sanos de acuerdo a la NOM-033-ZOO-1995 para la obtención de los tejidos. Mediante digestión enzimática y maceración se logró la liberación celular en piel y ganglios respectivamente. En el caso de la sangre se tomaron solo las células mononucleares obtenidas por gradiente de densidad. Las células de los diversos tejidos fueron marcadas con el anticuerpo primario anti-Clec12A para su posterior lectura mediante citometría de flujo. Los resultados de los marcajes sencillos en los diferentes tejidos revelaron que las

células mononucleares de sangre de cerdo, así como las de ganglios son negativas (Clec12A⁻), mientras que las células de la piel son positivas (Clec12A⁺), por lo que se realizó un marcaje triple con los anticuerpos anti-MHC II y anti-CD172a a partir del cual se observó que el receptor de interés se expresa principalmente en células cuyo fenotipo no pertenece a APCs (Clec12A⁺, MHC II⁻ CD172A⁻). Por ello se concluye que Clec12A se expresa en piel de cerdo, sin embargo no tiene una expresión diferencial en APCs.

Palabras clave: Células presentadoras de antígeno, tejidos, cerdo, lectina tipo C, Clec12A.

ABSTRACT

Antigen presenting cells (APCs) are a key immune cell group characterized by its ability to capture antigens, which are processed and then presented by the major histocompatibility complex to lymphocytes. Their role as “guardians” of the immune system makes its presence in every organ and tissue is essential to carry out the innate and adaptive immunity. These cells express surface receptors which confer various biological functions, including the family of C-type lectin receptors. The Clec12A receptor is part of this family and is differentially expressed in CD8⁺ dendritic cells from mouse spleen. This allowed employ the technique of targeting antigens to Clec12a, which resulted in improved humoral response. It has also been shown that Clec12A expression in human blood is restricted to myeloid cells. Current studies in this receptor have been made in mouse and human, however, the Clec12A sequence is available for other species such as for pig. In preliminary studies was found that there are Clec12A transcripts in various tissues of pig, but the expression of this receptor has not been evaluated at the protein level in this specie. The objective of this study was to characterize the Clec12A expression in different pig tissues. 8 healthy pigs were sacrificed according to NOM-033-ZOO-1995 to obtain tissues. The cell release from skin and lymph nodes was achieved by enzymatic digestion and maceration. In the case of blood were taken only mononuclear cells obtained by density gradient. Cells from various tissues were stained with primary antibody anti-Clec12A for later analysis by flow cytometry. The results of simple staining in different tissues revealed that the blood mononuclear cells and the lymph are negative (Clec12A⁻), while skin cells are positive (Clec12A⁺), whereby a triple staining with the anti-MHC II and anti-CD172a antibodies was performed from which It found that the receptor of interest is expressed mainly in cells which does not belong to APCs phenotype (Clec12A⁺, MHC II⁻ CD172A⁻). Therefore it is con-

cluded that Clec12a is expressed in skin, however it is not differentially expressed in APCs.

Key words: antigen presenting cells, tissues, pig, C-type lectin, Clec12A.

I. INTRODUCCIÓN

Las células presentadoras de antígeno (APCs) son células del sistema inmunitario que tienen la habilidad de captar, procesar y presentar antígenos presentes en el organismo hospedero. Juegan un papel fundamental tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa. Las APCs expresan en su superficie diferentes clases de receptores, de entre los cuales se destacan los receptores tipo Toll y los receptores Lectina Tipo C (CLRs) (Pasare y Medzhitov, 2004; Cambi y Figdor, 2003).

Los CLRs tienen importantes funciones, como la regulación de la activación e inhibición celular, de tal manera que pueden regular la producción de citocinas y controlar la citotoxicidad (Marshall et al., 2006). Además reconocen e internalizan antígenos, lo cual le permite a la célula procesarlos y convertirlos a péptidos que posteriormente serán presentados mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Cambi y Figdor, 2003). Por lo tanto tienen un papel importante en el control de la homeostasis y la inmunidad (Pyz et al., 2008). Por ello la caracterización de la conformación de los receptores y el nivel de expresión que estos tienen en células presentadoras provenientes de diversos tejidos tiene un papel fundamental en el desarrollo de nuevas tecnologías que mejoren el sistema inmune.

Particularmente Clec12A es un receptor Lectina tipo C de aproximadamente 45 kDa que ha sido previamente caracterizado en ratón y humano, conservando entre ambas especies un 65% de similitud en la secuencia de aminoácidos (Pyz et al., 2008). Se ha demostrado que dicho receptor tiene diversas funciones, una

de ellas está relacionada con el control de las respuestas inflamatorias, además se considera un buen marcador para la detección de leucemia mieloide (Larsen, et al., 2012; Neumann et al., 2014). Asimismo se ha demostrado que Clec12A tiene una alta expresión en células dendríticas (DC) CD8⁺ de bazo de ratón y en DC plasmocitoides. Debido a que el receptor se expresa principalmente en DC se utilizó para la técnica de direccionamiento de antígenos, con lo cual se observó que hay una mayor activación de la inmunidad humoral del ratón (Larsen, et al., 2012; Lahoud et al., 2014).

La técnica del direccionamiento de antígenos ha demostrado tener un uso potencial en el mejoramiento de las vacunas convencionales ya que el antígeno llega directamente a receptores presentes casi exclusivamente en las APCs de interés (Shortman et al, 2009). Por ello se considera interesante caracterizar la expresión de Clec12a en tejidos que son la principal vía de entrada de antígenos o bien en aquellos donde se da la presentación de antígeno en especies consideradas de importancia por su valor comercial o por su uso como modelo de estudio como lo es el cerdo. Por lo que en este trabajo se buscó caracterizar la expresión del receptor Clec12A en APCs de diferentes tejidos de cerdo.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Generalidades del Sistema Inmune

El sistema inmune es un conjunto de células, moléculas y procesos biológicos cuya principal tarea es la defensa del organismo hospedero frente a cualquier agente infeccioso o extraño. Éste se compone de la inmunidad innata y la adquirida. La inmunidad innata es inespecífica, sin embargo le proporciona al hospedero la defensa temprana contra virus, hongos y bacterias mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Una vez llevado a cabo el reconocimiento de PAMPs se promueve la fagocitosis y la destrucción de los microbios, así como también la inflamación, que permite el reclutamiento de más células fagocíticas y la reparación de los tejidos dañados. Por otra parte la inmunidad adaptativa o adquirida, la cual se considera tardía, implica un reconocimiento específico del antígeno. La participación de células capaces de presentar antígenos da lugar a la activación de la inmunidad celular llevada a cabo por los linfocitos T y/o la inmunidad humoral a cargo de los linfocitos B, lo cual permite la proliferación de los linfocitos y la producción de células efectoras y de memoria (Fainmboim L. y Geffner J., 2014; Abbas et al, 2004).

2.2 Características de las Células Presentadoras de Antígeno

Las células presentadoras de antígeno representan un conjunto celular del sistema inmune compuesto por macrófagos, linfocitos B y células dendríticas, que tienen en común la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) mediante el cual presentan el péptido antigénico a los linfocitos T. En términos generales las APCs tienen la capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de diferente naturaleza (Sanz et al., 2013). Aunado a esto proveen moléculas coestimuladoras que son esenciales para la activación y proliferación de linfocitos T (Sprent, 1995).

2.2.1 Células Dendríticas

Las células dendríticas (DC) son una población heterogénea de origen hematopoyético. Se les conoce como centinelas ya que se encuentran por todo el organismo y se distinguen por ser las células presentadoras de antígeno más potentes, que dan lugar al inicio de las respuestas inmunes (Segura y Amigorena, 2014). Las DC pueden ser identificadas por su morfología típica que consiste en largas, proyecciones citoplásmicas llamadas dendritas. Las DC pueden encontrarse en órganos linfoides y no linfoides y también circulantes en linfa aferente y sangre periférica, con diferentes nombres según su ubicación, pero manteniendo características y funciones similares entre sí (Coronato et al., 1998).

El fenotipo de las DC varía debido a la expresión de receptores de membrana, así como de moléculas asociadas al reconocimiento de estructuras patógenas y receptores específicos como los tipo Toll, lectinas, receptores

intracelulares, receptores scavengers, entre otros (Iwasaki y Medzhitov, 2004). Esta diversidad de subpoblaciones de DC es la clave para obtener la respuesta inmunológica apropiada a los diferentes antígenos.

Las DC se encuentran en su estado inmaduro cuando no hay un proceso inflamatorio (Banchereau et al., 2000), en cuyo caso su función principal es la captura de antígenos. Posterior al reconocimiento de una señal de peligro exógena o endógena, las DC inmaduras dejan de sentir el microambiente y comienzan el proceso de diferenciación denominado “maduración” (Skoberne et al., 2004). Durante el proceso de maduración liberan factores proinflamatorios que regulan la activación y el reclutamiento de otras células inflamatorias dando lugar a la inmunidad innata (Chen et al., 2006). Además pierden su capacidad fagocítica y hay un aumento en la producción de moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de linfocitos T vírgenes (Iruetagoiena et al., 2005). A su vez, migran hacia los órganos linfoides secundarios donde presentarán los antígenos a los linfocitos T. Este proceso da inicio a la respuesta inmune adaptativa antígeno-específica mediada por linfocitos T (Kalergis et al., 2004).

2.2.2 Macrófagos

Los macrófagos son células con la capacidad de ingerir y destruir antígenos, además tienen un papel importante en la presentación de antígenos para la activación de linfocitos T. La activación de los macrófagos es necesaria para que desempeñen cada una de las funciones en las que participan (Matarese y Gotschlich, 2004). Al ser estimulados secretan citocinas que promueven la respuesta innata y adquirida, contribuyen a la reparación de los tejidos dañados debido a su gran capacidad fagocítica y controlan la inflamación. En su estado inmaduro circulan por la sangre y se denominan monocitos. Cuando hay una

señal de daño los monocitos migran a los tejidos y se diferencian a macrófagos (Tizard, 2009).

2.2.3 Linfocitos B

Son células del sistema inmune adaptativo responsables de la respuesta humoral. Su función principal es secretar anticuerpos que reconocen moléculas antigénicas esto permite defender al hospedero contra los gérmenes. La unión del antígeno a la inmunoglobulina de membrana causa la activación celular que lleva a la proliferación celular y a la diferenciación hacia linfocitos B de memoria o células plasmáticas (Micheli, 2002). También tienen otras funciones como la presentación de antígenos a los linfocitos T, la regulación de las respuestas frente a autoantígenos y asimismo la regulación negativa de las respuestas inflamatorias (Prieto et al., 2013).

2.3 Receptores de Superficie de las Células Presentadoras de Antígenos

Las APC utilizan diferentes receptores expresados en su superficie para llevar a cabo la endocitosis, mecanismo que les permite capturar antígenos. Los linfocitos B utilizan el receptor Ig, mientras que macrófagos y DC cuentan con una mayor variedad de receptores. Los receptores de mayor importancia para los macrófagos son los Scavenger, que además de favorecer la captura de antígenos también realizan el transporte de lípidos, los receptores de manosa, que pertenecen a la familia de las lectinas, los receptores Fc que reconocen a aquellos anticuerpos que se han unido a células infectadas o microorganismos patógenos y receptores tipo Toll (TLRs), los cuales inducen la producción de citosinas inflamatorias (Mora y Rosales, 2009; Canton et al, 2013). En las DC al

igual que en los macrófagos destaca la expresión heterogénea de receptores tipo lectina, TLRs y Fc (Gutiérrez, 2010).

2.4 Estructura y Función de los Receptores Lectina Tipo C

Los receptores lectina tipo C (CLR) representan una gran familia de receptores entre los cuales se encuentran selectinas, colectinas, proteoglicanos y lectinas de linfocitos. Se expresan principalmente en macrófagos y células dendríticas y se caracterizan por la presencia de uno o más dominios lectina tipo C conocidos también como CTLD por sus siglas en inglés (Lepenies et al., 2013). La estructura de este dominio consiste en dos bucles que son estabilizados por puentes de hidrógeno que provienen de residuos de cisteína altamente conservados y se encuentran en las bases de los bucles (Zelensky y Gready, 2005) (Figura 1). El CTLD tiene la habilidad de reconocer una gran diversidad de ligandos asociados a patógenos bacterianos, virales, de parásitos y hongos; así como antígenos propios derivados de tejidos dañados y células muertas (Sancho y Reis, 2013). Además, utiliza mecanismos alternativos para el reconocimiento de carbohidratos y proteínas (Redelinghuys y Brown, 2012).

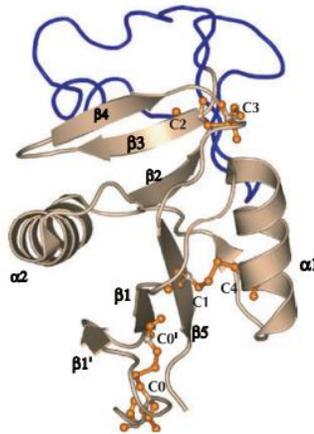


Figura 1. Estructura del dominio lectina tipo C. α y β forman los bucles y las C representan las cisteínas que dan lugar a los puentes disulfuro (Lepenies et al, 2013).

La capacidad de este dominio para unirse a estructuras de carbohidratos depende del Ca^{2+} . Las interacciones entre lectinas y carbohidratos son débiles por lo que se está trabajando en el diseño de estrategias en las que ligandos multivalentes sean dirigidos a esta clase de receptores para aumentar la afinidad de la unión (Lepenies et al, 2013).

Los CLR están clasificados en dos grupos: Los CLR tipo I y CLR tipo II. Los CLR tipo I son de la familia de receptores de manosa y cuentan con múltiples CTLDs que facilitan la unión e internalización de antígenos glicosilados (Redelinghuys y Brown, 2012). En este grupo se encuentran los receptores de manosa a los cuales actualmente se está tratando de dirigir compuestos de interés. También se encuentra dentro de este grupo el receptor DEC205 que es expresado por células dendríticas y facilita la presentación de antígenos (Ring S., et al 2013).

El segundo grupo denominado CLR tipo II pertenece a la familia de receptores de asialoglicoproteínas (ASGPR) que comprende el grupo de proteínas transmembranales con un solo dominio de reconocimiento de carbohidratos (CDR). Este grupo de lectinas cuenta con características especiales que lo hace atractivo para ser utilizado en inmunoterapia o como vehículo para el direccionamiento de antígenos, herramienta que es utilizada para el desarrollo de vacunas. Esto se debe a que se expresan principalmente en APCs, además pueden funcionar como receptores endocíticos y modulan la respuesta inmune cuando se utilizan conjuntamente con otros estímulos (Chen et al, 2006).

Los receptores que forman parte de este grupo son los macrófagos tipo galactosa lectina (MGL) los cuales se ha reportado que reconocen gangliósidos propios y helmintos parásitos (Van Vliet et al., 2005). También comprende a los receptores langerina, DC-SIGN y a los miembros de la familia de lectinas DCIR que incluye a los receptores DCIR (Clec4A), DCAR (Clec4B), dectin-2 (Clec6A), Mincle (Clec4E), MCL (Clec4D) BDCA-2 (Clec4C). Finalmente también se

encuentran dentro de los CLR tipo 2 la familia dectin-1 conformada por dectin-1 (CLEC7A), CLEC-1 (Clec1A), CLEC-2 (Clec1B), LOX-1(Clec8A), MICL (Clec12A), UNQ5782 (Clec12B) y UNQ9341 (Clec9A) (Kanazawa, 2007).

Actualmente dirigir antígenos y fármacos a receptores específicos es un nuevo enfoque para la creación de vacunas. Esto requiere de un profundo conocimiento de todas las partes que conforman al receptor, su expresión en los diferentes tejidos y sus interacciones con los epítipes. En la medida en que se tenga más conocimiento será más fácil manipularlas con la finalidad de regular las funciones celulares, ya que a través de sus receptores llevan a cabo la endocitosis, tienen influencia en las rutas de señalización intracelular y en la activación celular.

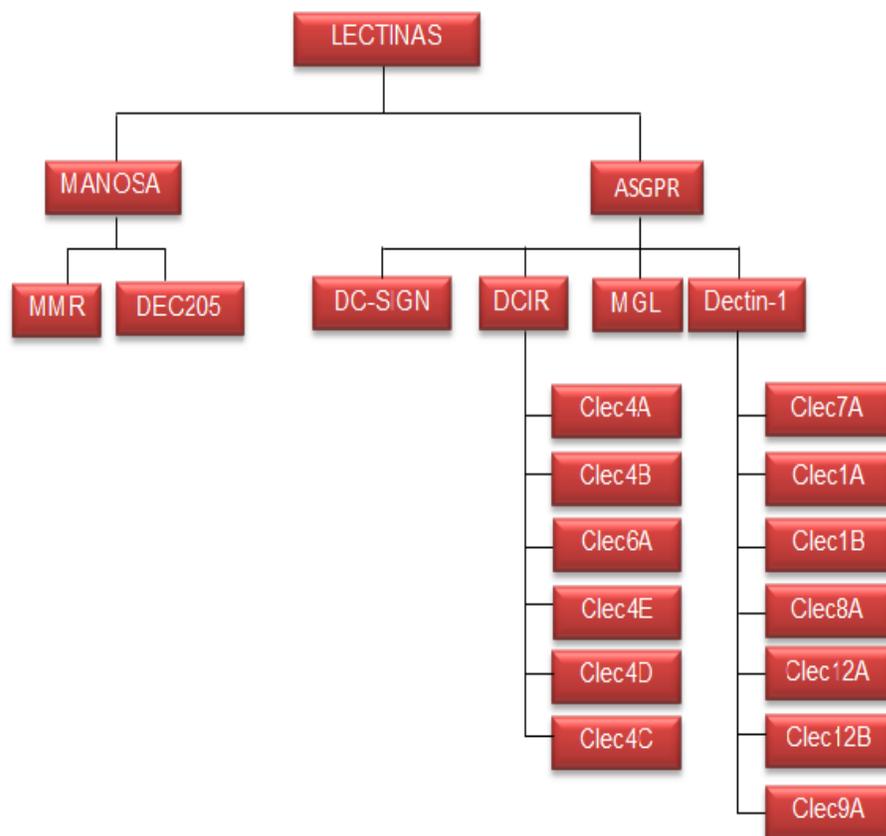


Figura 2. Esquema correspondiente a la familia de las lectinas.

2.5 Inmunoreceptor Lectina Tipo C Clec12A (MICL)

El inmunoreceptor lectina Tipo C Clec12A es una glicoproteína transmembranal que al ser parte de los CLR tipo II cuenta con sólo un CDR (Kanazawa, 2007). Ha sido previamente caracterizado en ratón y en humanos, en ambas especies tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa y genómicamente se ubica dentro del cluster Dectin-1 (Sobanov et al., 2001). Pyz y colaboradores (2008) caracterizaron Clec12A en ratón, el cual es expresado como un dímero poco glicosilado. A diferencia del ratón en humanos se encuentra altamente glicosilado y presenta variantes generadas por *splicing* (Marshall et al., 2004). Sin embargo existe un 65% de similitud entre las secuencias de aminoácidos de ratón y humanos (Pyz et al., 2008) que constan de 267 y 265 aminoácidos respectivamente (números de acceso en GenBank: NP_612210 y NP_808354). A pesar de que solo se ha caracterizado en dos especies se cuenta con la secuenciación del gen Clec12a de diversas especies, por ejemplo de cerdo, perro, chimpancé, camello, entre otros.

Se ha descrito que Clec12A posee un inmunoreceptor con motivo inhibidor basado en tirosina (ITIM) en su cola citoplásmica. La señalización de esta clase de receptores generalmente suprime la activación celular, sin embargo bajo ciertas circunstancias pueden llegar a potenciar respuestas celulares. Tal es el caso del receptor TLT1 que contiene dos ITIMs en su cola citoplásmica con los cuales reclutan fosfatasas SHP-2 mejorando la señalización de calcio (Barrow et al., 2004; Han et al., 2004; Redelinghuys y Brown, 2011).

Con respecto a las características funcionales del receptor se ha reportado que Clec12A de ratón reconoce ligandos endógenos, sin embargo no se ha reportado su interacción con ligandos microbianos (Pyz et al., 2008), lo cual puede ser ocasionado por la falta de residuos conservados que se requieren para el enlace con carbohidratos (Marshall et al., 2004).

Recientemente se demostró que Clec12A reconoce ligandos expuestos sobre células muertas, por lo tanto tiene similitud con los receptores Clec9A y Mincle. Tanto en ratón como en humanos Clec12A es capaz de reconocer cristales de ácido úrico los cuales son señales de peligro generadas por células muertas. El sistema inmune innato genera respuestas inflamatorias cuando se da el reconocimiento de dichas señales, sin embargo en ensayos *in vitro* se ha visto que Clec12A en contacto con los cristales puede inhibir este tipo de respuesta. Asimismo se observó que ratones con deficiencias en este receptor presentaron respuestas hiperinflamatorias al ser inyectados con células muertas de riñón o al ser sometidos a radiación para generar muerte celular. Hasta la fecha básicamente es nulo el conocimiento que se tiene sobre la cascada de señales que se generan cuando este receptor entra en contacto con los cristales (Neumann et al., 2014).

Otros estudios publicados revelan que la expresión de Clec12A en humanos es un marcador altamente confiable para el diagnóstico y seguimiento de la leucemia mieloide aguda ya que el 92% de los pacientes que padecen esta enfermedad resultaron positivos a la expresión del receptor. La expresión de Clec12A de los pacientes se comparó con la de donadores sanos, resultando ser significativamente más alta ($P=0.01$) en pacientes. Además se mostró un patrón de expresión estable durante el curso de la enfermedad (Larsen, et al., 2012). Posteriormente se demostró que Clec12A y el marcador CD123 en combinación con CD45/CD37/CD117 es capaz de detectar un menor número de células que permitan el diagnóstico de la enfermedad (Rough et al., 2014).

En un novedoso estudio se ha utilizado a Clec12A para dirigir antígenos a las células dendríticas que expresan el receptor en su superficie esto aunado a pequeñas cantidades de lipopolisacárido (LPS) o CpG que en sinergia con el anticuerpo produjeron una mayor activación de la respuesta inmune humoral. Estos resultados se atribuyen a que el receptor tiene una alta expresión en DC plasmocitoides y en DC CD8⁺ del bazo. Aunque cabe mencionar que una proporción de DCs CD8⁻, células B, monocitos y macrófagos expresan bajos niveles de Clec12A (Lahoud et al., 2014). Por otra parte en humanos también se ha reportado la expresión de este receptor, en células como monocitos y DC de la sangre, DC derivadas de monocitos y en líneas celulares de macrófagos (Marshall et al., 2006).

Aunque los estudios de este receptor se han realizado principalmente en ratón y humano, recientemente se ha buscado su caracterización en otras especies, como el cerdo. Actualmente en el cerdo se cuenta con la secuencia del gen Clec12A que consta de 13873 pb (número de acceso en GenBank: NC_010447). Además se tienen estudios preliminares obtenidos en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. en los cuales se detectó la expresión de Clec12a a nivel de mRNA en diferentes tejidos linfoides, sin embargo no se conoce su expresión a nivel de proteína.

Por los antecedentes previamente descritos se cree que si el receptor Clec12A se expresa diferencialmente en APCs de los tejidos de cerdo, este receptor pudiera ser empleado para dirigir hacia él antígenos acoplados a anticuerpos, lo que posteriormente conllevaría a mejorar la inmunidad de esta especie. Por lo cual la caracterización de la expresión de dicho receptor es un paso clave para lograr avances posteriores en sanidad porcina.

III. HIPÓTESIS

El receptor Clec12A se expresa diferencialmente en células presentadoras de antígeno de diferentes tejidos de cerdo.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión de Clec12A en células presentadoras de antígeno de piel, sangre periférica y ganglios linfáticos de cerdo.

4.1 Objetivos Específicos

1.-Caracterizar la expresión de Clec12A en células de piel, sangre periférica, ganglio mediastinal, ganglio mesentérico, tonsila y bazo de cerdo, mediante citometría de flujo.

2.-Determinar subpoblaciones de células presentadoras de antígeno que expresan Clec12A en piel, sangre periférica, ganglio mediastinal, ganglio mesentérico, tonsila y bazo de cerdo, mediante citometría de flujo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron un total de 8 cerdos sanos de 4 a 8 semanas de edad. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. con acceso a alimento y agua, y se sacrificaron de acuerdo a lo establecido en la norma NOM-033-ZOO-1995 mediante insensibilización con electricidad seguido por exsanguinación.

5.2 Obtención de Células de Piel

Las células de la piel se obtuvieron siguiendo el protocolo desarrollado por Marquet y colaboradores (2011) con algunas modificaciones. Después del sacrificio se lavó la espalda del cerdo con agua y jabón, posteriormente se rasuró y desinfectó con alcohol al 70% y yodo (Isodine, Boehringer Ingelheim). Los cortes de piel se hicieron manualmente utilizando un sacabocados y bisturí. Se obtuvieron biopsias de 8 mm de diámetro y de 3 a 5 mm de grosor que fueron colectadas en tubos que contenían 10 mL de buffer de fosfato salinos (PBS)

(Gibco Laboratories, USA) frío suplementado con 100 IU de gentamicina (Gibco Laboratories, USA) para su transporte a un ambiente estéril.

Las biopsias se lavaron dos veces con PBS estéril y se cultivaron durante un periodo de 12 a 16 horas en placas Petri. Cada placa contenía 30 biopsias y 15 mL de medio X-VIVO (Lonza, USA) suplementado con 3 mg/mL de dispasa (Gibco, USA), 1 mg/mL de colagenasa tipo 1 (Worthington Biochemical Corp, USA), 100 µg de desoxirribonucleasa I (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), además de antibióticos (1mg/mL de penicilina, 1mg/mL de anfotericina y 1mg/mL de gentamicina). Las muestras se incubaron a 37 °C en una cámara con 5% de CO₂. Una vez cumplido el tiempo de incubación se filtró el medio con una malla de nylon con tamaño de poro de 100µm (Thermo Fisher Scientific, USA) para coleccionar las células, y se lavó cada placa utilizando 15 mL de medio DMEM por placa. Por último se centrifugó la muestra a 1200 rpm a 25 °C durante 10 minutos y se resuspendió en PBS con suero fetal bovino (SFB) al 0.01% hasta llegar a un volumen de 5 mL. La viabilidad de las células fue evaluada mediante tinción con azul de tripán (Sigma-Aldrich, USA) en la cámara de Neubauer. Se contabilizó el número de células vivas y el total de células para calcular el porcentaje de células viables.

5.3 Obtención de Células de Ganglios Linfáticos

Para el procesamiento de los ganglios se siguió un protocolo previamente reportado (Flores-Mendoza et al, 2012) al cual se le hicieron pequeñas modificaciones. Después del sacrificio se coleccionaron los diferentes ganglios (mesentérico, mediastinal, tonsila y bazo el cual también es considerado como ganglio) en tubos por separado que contenían 5 mL de PBS con 25 µg/mL de desoxirribonucleasa I (Sigma-Aldrich, USA) para transportarlos a un ambiente

estéril. Se tomó otro tubo Falcon de 50 mL al que se le agregó 1 mL de PBS con 25 µg/mL de desoxirribonucleasa I y se le colocó una malla de nylon con tamaño de poro de 100µm (Becton-Dickinson, USA) en la parte superior, ahí se depositó el ganglio para ser macerado con el émbolo de una jeringa. Se agregó la misma solución hasta alcanzar un volumen de 5 mL para finalmente evaluar la viabilidad.

5.4 Obtención de Células Mononucleares de Sangre Periférica

Se colectó sangre en un tubo con EDTA (Becton-Dickinson, USA). Las células mononucleares (CMN) fueron separadas por gradiente de densidad utilizando Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences) densidad 1,0773 siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. La muestra se sometió a centrifugación durante 30 minutos a 4°C y 1600 rpm. Se utilizó una pipeta Pasteur para colectarlas en un tubo Falcon de 15 mL. Inmediatamente se aforó a 10 mL con PBS para centrifugar la muestra a 1200 rpm a 25°C durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y después de resuspender el botón celular se le agregaron 5 mL de NH₄Cl a las células y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, esto para eliminar la mayor cantidad de eritrocitos. Posteriormente se dio un lavado aforando a 10 mL con PBS y centrifugando a 1200 rpm a 25°C durante 10 minutos. La muestra se resuspendió en PBS con albumina al 0.01% hasta llegar a un volumen de 10 mL y se evaluó la viabilidad.

5.5 Anticuerpos y Citometría de Flujo

Para el marcaje se utilizaron 1×10^6 células por tubo. Se realizó un bloqueo agregando 200 μ L de PBS con 10% de suero de cerdo inactivado. Posteriormente se hizo un lavado con PBS y el marcaje celular, para lo cual se utilizó el anticuerpo anti-Clec12a (clona: 1C4H9) el cual fue previamente producido en nuestro laboratorio y para el marcaje triple en piel se utilizaron los anticuerpos anti-MHC II conjugado con PE 1:100 (clona: H42A, VMRD, Inc.) y anti-CD172a 1:100 (clona: 74-22-12, VMRD, Inc.). Las células fueron incubadas con los anticuerpos a temperatura ambiente por 15 minutos y se lavaron dos veces añadiendo 2 mL de PBS con 0.01% de SFB a 1200 rpm y 25 °C durante 10 minutos. Para finalizar se llevó a cabo una segunda incubación con los anticuerpos secundarios de isotipo específico FITC conjugated goat anti-mouse IgG2a 1:200 (VMRD, Inc.) y Alexa Fluor 647 conjugated goat anti-mouse IgG2b 1:200 (VMRD, Inc.) y dos lavados con las mismas condiciones anteriores. La lectura de las muestras se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto II y los datos se analizaron en el FACSDiva software (BD/Pharmingen, USA).

VI. RESULTADOS

Los resultados fueron analizados en base a los perfiles de detección de dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC). Primero se descartaron los detritos, clasificados así en base a su tamaño. Posteriormente se eliminaron los dobletes, que consisten en dos células unidas las cuales son leídas en el citómetro como una sola célula, llegando a generar falsos positivos (Fig. 3). Las células seleccionadas fueron evaluadas en base a la expresión de Clec12a en marcajes sencillos, esto se hizo en las células provenientes de los diversos tejidos. Los controles negativos utilizados consistieron en células con el anticuerpo secundario, esto último para confirmar que no hay pegado inespecífico. Como controles positivos fueron utilizadas células teñidas con el marcador MHC II en el caso de ganglios y piel (Figs. 5 y 6). Para las células obtenidas de la sangre el análisis tuvo algunas variaciones, puesto que se seleccionó directamente la población de interés y se utilizó como control positivo el marcador CD4 (Figs.4 y 7).

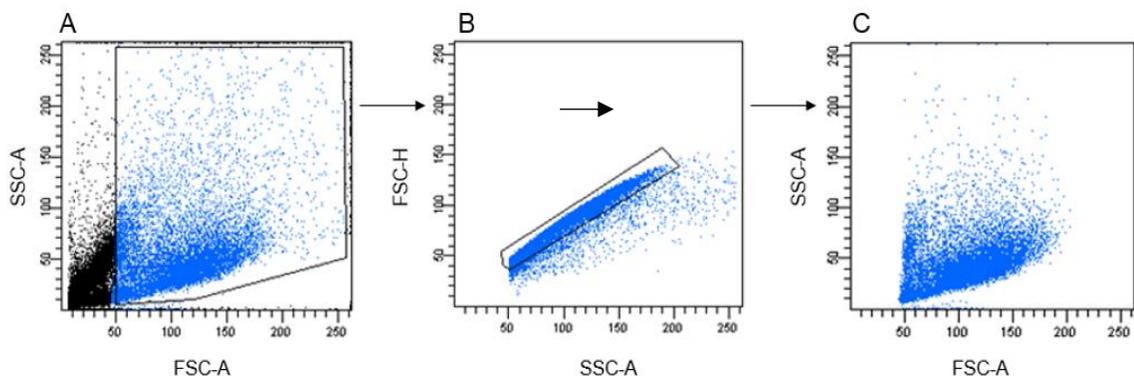


Figura 3. Selección de la población de interés en ganglios y piel. Procedimiento utilizado en ganglios y piel para llevar a cabo el análisis. (A) Eliminación de detritos (B) Eliminación de dobletes (C) Población en base a SSC y FSC.

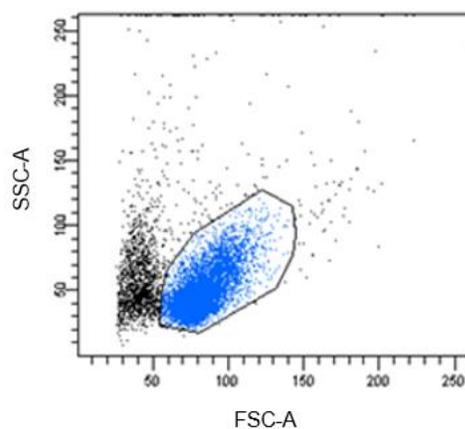


Figura 4. Selección de la región de análisis en CMN. La población de CMN de interés fue seleccionada en base a su FSC y SSC.

A partir del análisis se observó que el porcentaje de células positivas a Clec12A es similar al que aparece en el control negativo, que consiste en células marcadas solamente con el anticuerpo secundario, por ello se considera que es pegado inespecífico y por ende puede decirse que el receptor Clec12A no se expresa en ganglio mesentérico, ganglio mediastinal, tonsila, bazo y CMN de cerdo (Figs. 5, 6 y 7).

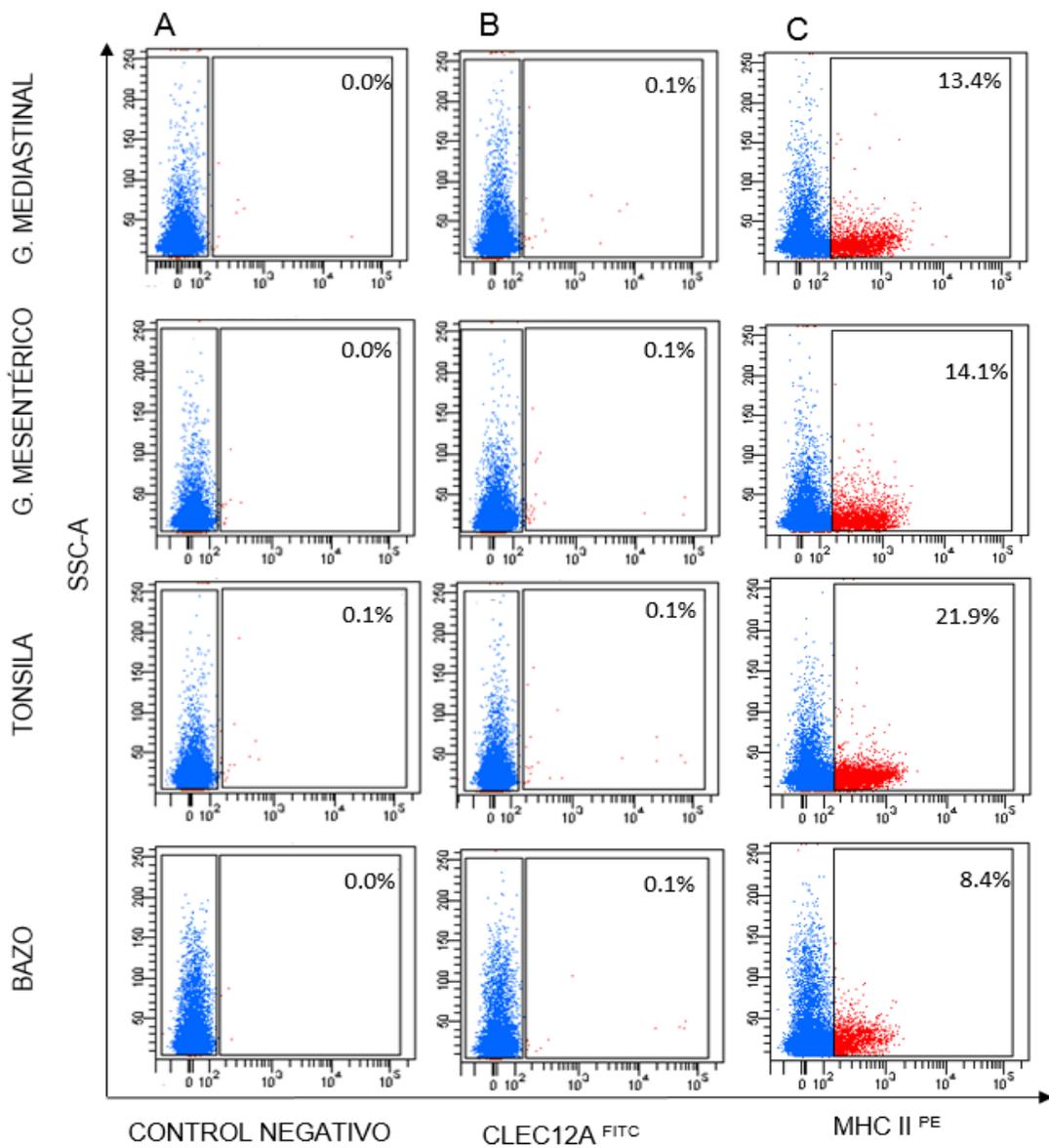


Figura 5. Expresión de Clec12A en ganglio mediastinal, ganglio mesentérico, bazo y tonsila de cerdo. Resultados obtenidos mediante citometría utilizando (A) células marcadas con anticuerpo secundario (FITC) como control negativo, (B) el marcador Clec12A y (C) MHC II como control positivo, cada uno de ellos fue evaluado contra la complejidad. Cada gráfica es representativa de tres experimentos independientes de ganglio mediastinal (n=3), ganglio mesentérico (n=3), tonsila (n=3), bazo (n=3).

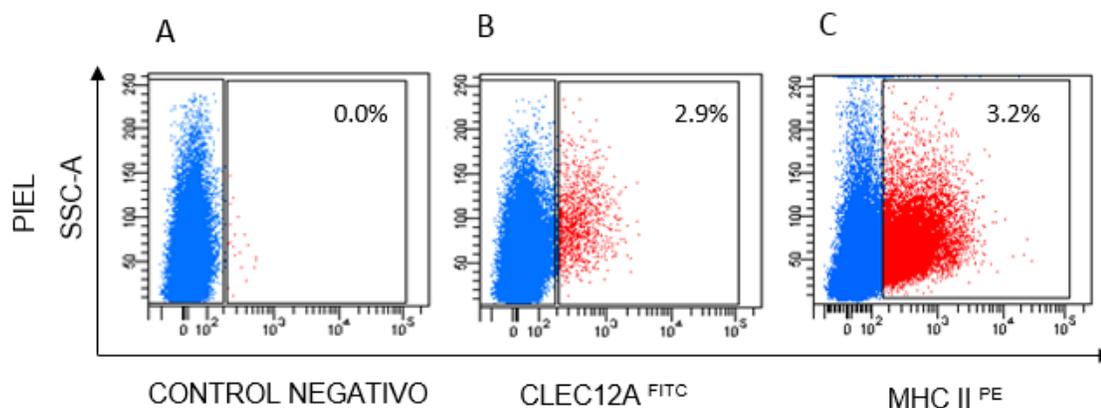


Figura 6. Expresión de Clec12A en piel de cerdo. Resultados obtenidos mediante citometría utilizando (A) células marcadas con anticuerpo secundario (FITC) como control negativo, (B) el marcador Clec12A y (C) MHC II como control positivo, cada uno de ellos fue evaluado contra la complejidad. Cada gráfica es representativa de al menos tres experimentos independientes de piel (n=3).

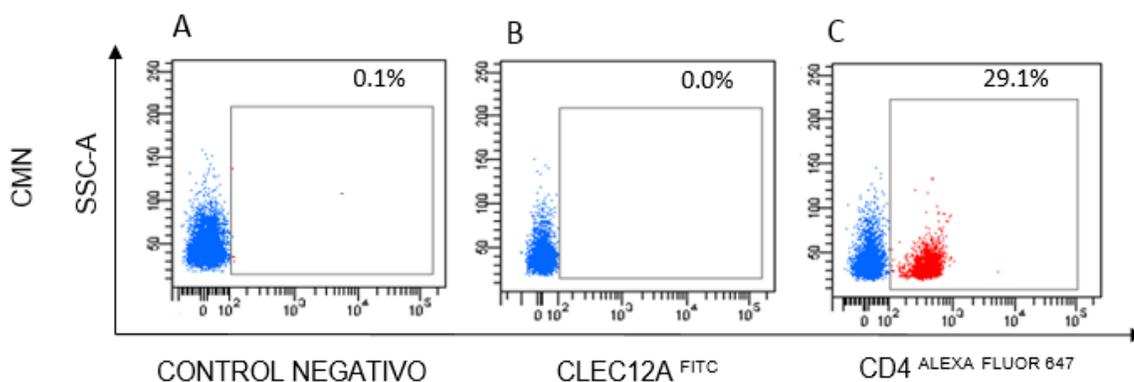


Figura 7. Expresión de Clec12A en CMN de cerdo. Resultados obtenidos mediante citometría utilizando (A) células marcadas con anticuerpo secundario (FITC) como control negativo, (B) el marcador Clec12A y (C) CD4 como control positivo, cada uno de ellos fue evaluado contra la complejidad. Cada gráfica es representativa de tres experimentos independientes de CMN (n=3).

Las células obtenidas de piel fueron las únicas que resultaron positivas a Clec12A, es por eso que solo en ese tejido se realizaron marcajes triples para la identificación de APCs. Se utilizaron los marcadores MHC II y CD172a, los cuales han sido previamente utilizados para la fenotipificación de APCs (López et al., 2015), además del marcador de interés Clec12A. El análisis de la

expresión de MHC II y CD172a se hizo a partir de las células Clec12A⁺ y Clec12A⁻ (Fig. 8).

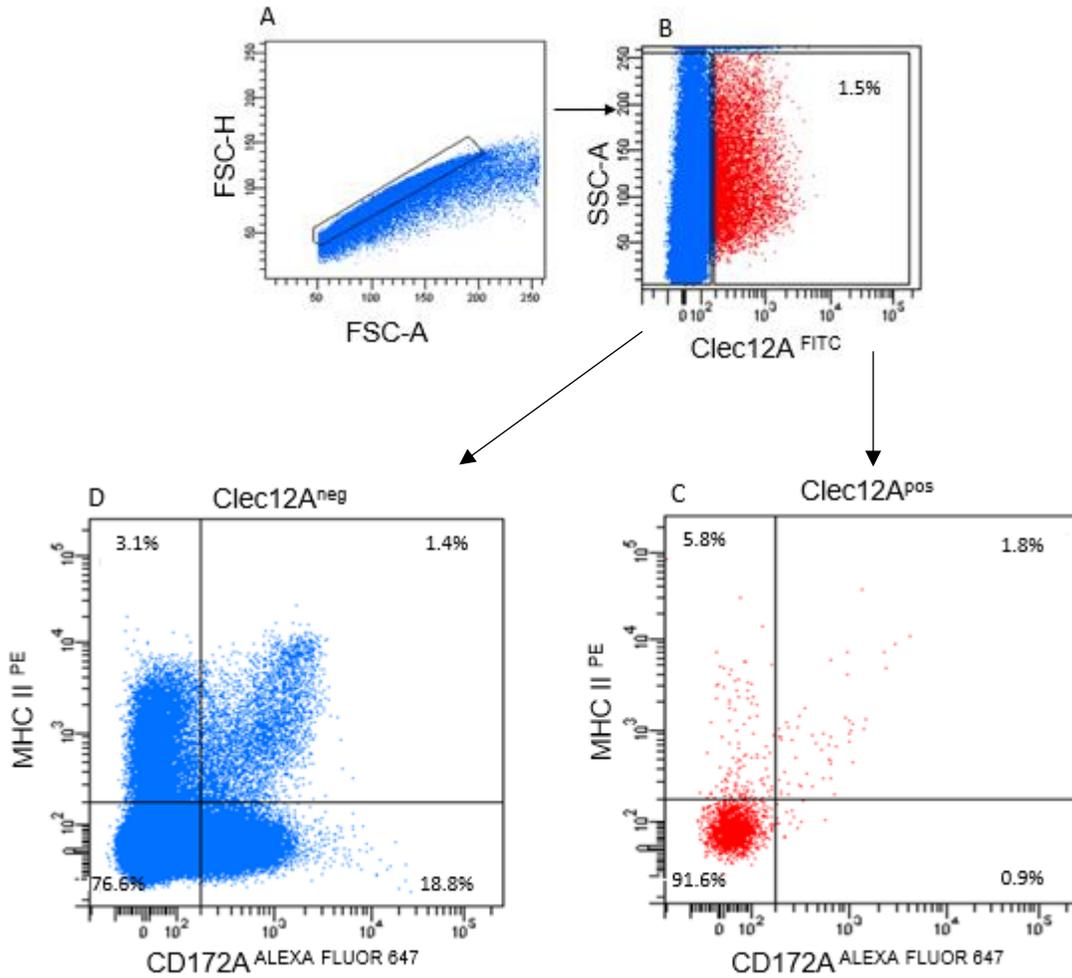


Figura 8. Expresión de Clec12A en poblaciones de APCs en piel. Las gráficas representan un experimento independiente de un total de tres experimentos con resultados similares (n=3). (A) Eliminación de dobletes, (B) determinación de células Clec12A⁺ y Clec12A⁻, (C) Expresión de MHC-II y CD172a a partir de las células Clec12A⁺ y (D) Expresión de MHC-II y CD172a a partir de las células Clec12A⁻.

Tabla 1. Expresión de Clec12A y controles en los diferentes tejidos

TEJIDO	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO	CLEC12A
PIEL	0.03±0.05	3.56±0.55	2.43±0.4
G. MEDIASTINAL	0.03±0.05	10.16±2.85	0.06±0.05
G. MESENTERICO	0±0	19.5±11.03	0.1±0
TONSILA	0.1±0.1	23.56±0.11	0.16±0.11
BAZO	0.06±0.05	14.76±12.61	0.06±0.05
CMN	0.13±.05	28.13±9.0	0.13±0.05

*Cada resultado representa la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

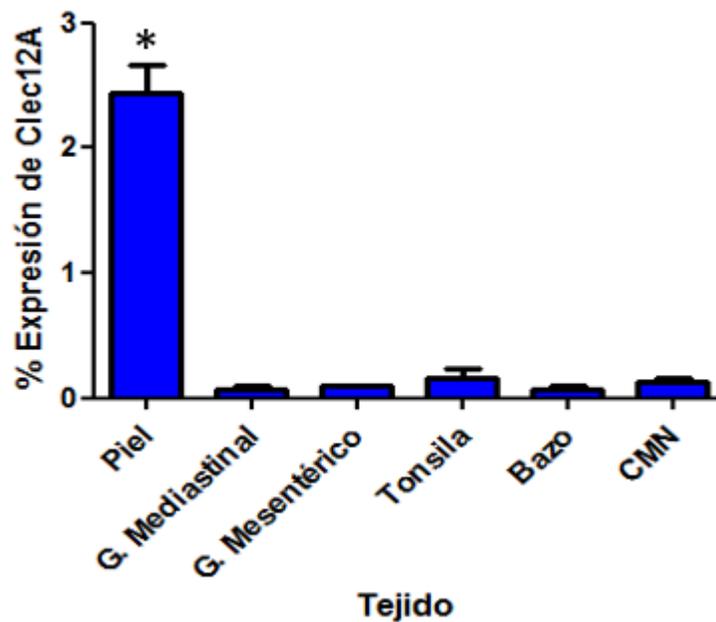


Figura 9. Comparación de medias de la expresión de Clec12A en los diferentes tejidos. Se realizó un ANOVA de una vía, en el cual se determinó que la expresión de Clec12A en las células de la piel es estadísticamente diferente ($P < 0.05$) a la de ganglios y CMN.

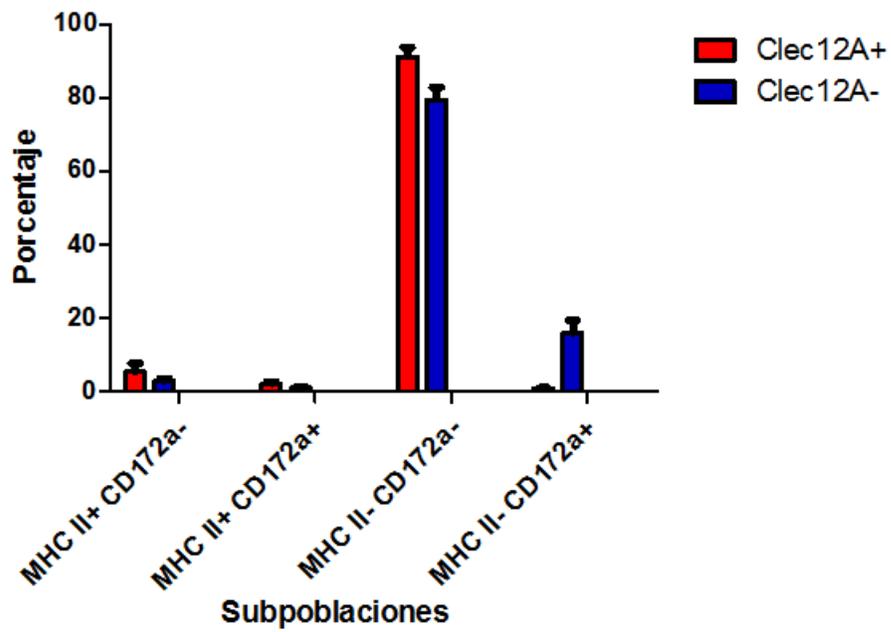


Figura 10. Subpoblaciones Clec12A⁺ y Clec12A⁻ de piel. La gráfica representa las medias obtenidas a partir de 3 repeticiones (n=3) y sus respectivas desviaciones estándar.

VII. DISCUSIÓN

La expresión de Clec12A se ha descrito previamente en sangre periférica de humanos y se ha demostrado que se restringe a células mieloides como granulocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (Marshall et al, 2004; Chen et al, 2006; Pyz et al, 2008; Lahoud et al, 2014). Por otra parte un estudio realizado en ratón se observaron altos niveles de Clec12A en células dendríticas CD8⁺ y células dendríticas plasmocitoides de bazo de ratón. Asimismo este receptor tiene bajos niveles de expresión en monocitos, macrófagos y células B de bazo de ratón (Lahoud et al, 2014). Los resultados obtenidos en el cerdo difieren a lo reportado en las especies anteriormente mencionadas, ya que tanto en CMN como en bazo de cerdo la expresión de Clec12A es negativa. Por otra parte en el resto de los ganglios la expresión de Clec12A también fue negativa, sin embargo no existen reportes previos en los que se haya caracterizado la expresión del receptor en ganglios.

En lo que respecta a la piel, tampoco se ha caracterizado la expresión de este receptor, pero cabe señalar que este es el único tejido en el cual se obtuvo un $2.4 \pm 0.4\%$ de células positivas a Clec12A. La expresión de Clec12A se evaluó con un marcaje sencillo y también triple utilizando los marcadores MHC-II y CD172a. El análisis se realizó partiendo de las células Clec12A⁺ y Clec12A⁻, y posteriormente a partir de cada grupo se evaluó la expresión de MHC-II y CD172a para la identificación de APCs. En las células Clec12A⁻ se observaron 4 subpoblaciones diferentes (Figura 8).

A partir de las células Clec12A⁺ se definió una subpoblación CD172a⁻ MHC II⁻ la cual está constituida por una mayor cantidad de células ($91.46 \pm 2.6\%$). Se asume que esta subpoblación está integrada principalmente por queratinocitos ya que son células muy abundantes en la piel y representan en

ella la primera línea de defensa frente a lesiones e infecciones. Dichas células pueden expresar en su superficie receptores tipo toll y lectinas tipo C como lo es Clec12A (Di Meglio et al., 2011; Szolnoky et al., 2001).

Los queratinocitos además de expresar una amplia gama de TLR, son capaces de secretar enzimas proinflamatorias y péptidos antimicrobianos como las catelicidinas, las cuales juegan un papel muy importante en la protección contra infecciones bacterianas en la piel (Summerfield et al, 2014). A pesar de que las funciones esenciales de los queratinocitos se centran en el desarrollo de la respuesta inmune innata, bajo ciertas condiciones estos pueden llevar a cabo la presentación de antígeno, en ambos casos Clec12A podría tener alguna función biológica importante (Bal et al., 1990). O bien también podría tratarse de linfocitos los cuales no expresan CD172a debido a su origen linfoide y a que no tienen una expresión constitutiva de MHC II.

Por otra parte se observó una expresión baja de Clec12A en las tres subpoblaciones restantes. Una de ellas es la subpoblación CD172a⁺ MHC II⁻ (0.96±0.11%), también se identificaron las subpoblaciones CD172a⁻ MHC II⁺ (5.46±2.31%) y CD172a⁺ MHC II⁺ (2.16±0.55%) que de acuerdo a Summerfield y colaboradores (2015) podría tratarse de células dendríticas mieloides cDC2 y cDC1 respectivamente. Para confirmar lo anterior se requiere un marcaje más complejo que incluya marcadores como CD1a y CADM1 que permita distinguir de manera específica estas subpoblaciones. Sin embargo, es notable que Clec12A no se expresa primordialmente en APCs por lo tanto en cerdo no sería considerado un receptor candidato para la técnica del direccionamiento de antígenos.

El hecho de que Clec12A solo se exprese en piel y no esté presente en los ganglios analizados puede deberse a que en su mayoría se expresa en queratinocitos, células residentes de la piel. Aunado a esto, en el caso de las APCs que expresan Clec12a, una vez que este receptor entra en contacto con

su ligando, este se podría internalizar y a su vez regular positivamente la expresión de CCR7 (receptor que favorece la migración celular) tal como sucede en las células Clec12A⁺ de humanos (Chen et al., 2006). Es por eso que una vez que las células llegan a los ganglios no es posible detectar la expresión de Clec12A. Esto podría confirmarse con estudios posteriores en los que se haga una tinción intracelular de Clec12A. Por otra parte, de acuerdo a los hallazgos realizados por Marshall y colaboradores (2006) Clec12A es un receptor que se regula negativamente bajo condiciones inflamatorias y de activación celular, lo cual fue probado en modelos *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que la función de Clec12A en el cerdo puede estar relacionada con el control de la activación de células mieloides durante la inflamación.

Existe la posibilidad de que el receptor se encuentre en CMN, bazo y ganglios linfáticos de cerdo solo a nivel de mRNA, ya que en humanos se detectaron transcritos de este receptor en diferentes tejidos como bazo, ganglios linfáticos, hígado fetal, corazón, colon, placenta y pulmón, también en sangre y médula ósea (Marshall et al., 2004). Además existen datos preliminares obtenidos mediante RT-PCR en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) donde se observó que hay transcritos de Clec12A en diferentes ganglios de cerdo (submaxilar, inguinal, tonsila, bazo, mesentérico y retrofaríngeo).

La expresión de Clec12A en CMN o en cualquier tejido a nivel de transcrito pero no de proteínas, podría deberse a que el transcrito maduro de este receptor tiene un tiempo de vida muy corto, por lo que en lugar de traducirse este tiende a ser degradado. El tiempo de vida de aquellas proteínas que están presentes en concentraciones bajas o cuyos niveles deben cambiar en respuesta a señales, normalmente son sintetizadas a partir de mRNA de vida media corta, lo cual afecta directamente la cantidad de proteína producida ya que las variaciones en la vida media de los distintos mRNA es un mecanismo que

ayuda a la célula a especificar el nivel de cada proteína que se sintetiza (Alberts et al, 2006).

VIII. CONCLUSIÓN

El receptor lectina tipo C Clec12a se expresa únicamente en piel de cerdo. Al evaluar la expresión de Clec12a se observó que se encuentra principalmente en células con el fenotipo CD172a⁻ MHC II⁻, lo que sugiere que se encuentra presente en queratinocitos, cuyas células son muy abundantes en dicho tejido, así como también existe la posibilidad de que se exprese en linfocitos, sin embargo se requieren más estudios que confirmen lo anterior. Clec12a no se expresa diferencialmente en células presentadoras de antígeno de ninguno de los tejidos analizados en cerdo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A., Lichtman A., Pillai S. 2004. Inmunología celular y molecular. Editorial Sanunders-Elsevier. Quinta edición. Madrid, España. 563pp.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. 2006. Editorial Panamericana. Segunda edición. Bueno Aires, Argentina. 864pp.

Bal V., McIndoe A., Denton G., Hudson D., Lombardi G., Lamb J., Lechler R. 1990. Antigen presentation by keratinocytes induces tolerances to T cells. *European Journal of Immunology*. 20(9):1893-1897.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S, Liu Y., Pulendran B., Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*.18:767-811.

Barrow A. D., Astoul E., Floto A., Brooke G., Relou I. A., Jennings N. S., Smith K. G., Ouwehand W., Farndale R. W., Alexander D. R. y Trowsdale J. 2004. Cutting edge: TREM-like transcript-1, a platelet immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif encoding costimulatory immunoreceptor that enhances, rather than inhibits, calcium signaling via SHP-2. *Journal of Immunology*. 172(10):5838-2.

Canton J., Neculai D. y Grinstein S. 2013. Scavenger receptors in homeostasis and immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13:621-634.

Cambi A. y Figdor C.G. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Current Opinion in Cellular Biology*. 2003(15): 539-546.

Chen C., Floyd H., Olson N., Magaletti D., Li C., Draves K. y Clarck E. 2006. Dendritic-cell-associated C-type lectin 2 (DECAL2) alters dendritic cell maturation and cytokine production. *Immunobiology*. 107(4): 1459-1467.

Coronato S., Laguens G., Spinelli O., Salas M., Di Girolamo W. 1998. Células dendríticas y su papel en patología. *Medicina*. 58:209-218.

Di Meglio P., Perera, G.K., Nestle, F.O., 2011. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity*. 35, 857–869.

Fainboim L. y Geffner J. 2011. Introducción a la inmunología humana. Editorial Médica Panamericana. Sexta edición. México, D.F. 584 pp.

Flores-Mendoza L., Velazquez C., Bray J., Njongmeta L., Mwangi W., Hernández J. 2012. Development and characterization of a monoclonal antibody against porcine CD205. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 146: 74-80.

Gutiérrez J.A. 2010. Inmunología veterinaria. Editorial El Manual Moderno. Primera edición. México, D.F. 343pp.

Han Y., Zhang M., Li N., Chen T., Zhang Y., Whan T., Cao X. 2004. KLRL1, a novel killer cell lectin like receptor, inhibits natural killer cell cytotoxicity. *Blood*. 104(9):2858-66.

Iruretagoyena M., Tobar J., González P., Sepúlveda S., Figueroa C., Burgos R., Hancke J., Kalergis A. 2005. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 312(1):366-362.

Iwasaki, A. y Medzhitov R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*. 5:987-95.

Kanazawa N. 2007. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *Journal of Dermatological Science*. 45:77-86.

Kalergis A., Fierro A., Figueroa C., González P., Tobar J. 2004. Clinical applications of antigen-specific detection of T lymphocytes. *Revista Médica de Chile*. 132(3):371-380.

Lahoud M., Proietto A., Ahmet F., Kitsoulis S., Eidsmo L., Wu L., Sathe P., Pietersz S., Chang H., Walker I., Maraskovsky E., Braley H., Lew AM, Wright M, Heath W, Shortman K, Caminschi I. 2014. The C-type lectin Clec12A present on mouse and human dendritic cells can serve as a target for antigen delivery and enhancement of antibody responses. *Journal of Immunology*. 182:7587–7594.

Larsen, H., Roug A., Just T., Brown G., Hokland P. 2012. Expression of the hMICL in Acute Myeloid Leukemia—A Highly Reliable Disease Marker at Diagnosis and During Follow-Up. *Clinical Cytometry*. 82B:3–8.

Lepenies B., Lee J. y Sonkaria S. 2013. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(9):1271–1281.

López G., Silva E., Burgara A. y Hernández J. 2015. Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system. *Research in Veterinary Science*. 100: 80-87.

Marquet F., Bonneau M., Pascale F., Urien C., Kang C., Schwatz I., Bertho N. 2011. Characterization of dendritic cells subpopulations in skin and afferent lymph in the swine model. PLoS One 6:e16320.

Marshall, A., Willment J, Lin H, Williams D, Gordon S, Brown G. 2004. Identification and characterization of a novel human myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor (MICL) that is predominantly expressed on granulocytes and monocytes. The Journal of Biological Chemistry. 279:14792–14802.

Marshall A., Willment J., Pyz E., Dennehy K., Reid D., Dri P., Gordon S., Wong S. y Brown G. 2006. Human MICL (CLEC12A) is differentially glycosylated and is down regulated following cellular activation. European Journal of Immunology. 36 (8): 2159-2169.

Matarese L. y Gottschlich M. 2004. Nutrición clínica práctica. Elsevier. España. 832pp.

Micheli F. 2002. Tratado de neurología clínica. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 1606pp.

Mora N. y Rosales C. 2009. Funciones de receptores Fc en mecanismos de defensa y regulación inmunológica. Revista de Investigación Clínica. 61(4):313-326.

Neumann K., Castiñeiras M, Höckendorf U, Hanneschläger N, Lemeer S, Kupka D, Meyermann S, Lech M, Anders H, Kuster B, Busch D, Gewies A, Naumann R, Groß O, Ruland J. 2014. Clec12a Is an Inhibitory Receptor for Uric Acid Crystals that Regulates Inflammation in Response to Cell Death. Immunity. 40(3):389-99.

Pasare C. y Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes and Infection*. 2004(6): 1382-1387.

Prieto A., Barbarroja E., Barcenilla H., Díaz D. 2013. Enfermedades del Sistema Inmune. *Medicine*. 11(28):1752-1759.

Pyz E, Huysamen C, Marshall A, Gordon S, Taylor P, Brown G. 2008. Characterization of murine MICL (CLEC12A) and evidence for an endogenous ligand. *European Journal of Immunology*. 38(4):1157-63.

Redelinghuys P. y Brown G. 2011. Inhibitory C-type lectin receptors in myeloid cells. *Immunology Letters*. 136(1):1–12.

Ring S., Maas M, Nettelbeck D, Enk A, Mahnke K. 2013. Targeting of autoantigens to DEC205⁺ dendritic cells in vivo suppresses experimental allergic encephalomyelitis in mice. *Journal of Immunology*. 191(6):2938-47.

Roug A., Larsen H, Nederby L, Just T, Brown G, Nyvold C, Ommen H, Hokland P. 2014. hMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone – a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *British Journal of Hematology*. 164:212–222.

Sancho D. y Reis e Sousa D. 2013. Sensing of cell death by myeloid C-type lectin receptors. *Current Opinion in Immunology*. 25:46–52.

Sanz M., Martín M., Reyes E. y Prieto A. 2013. Células Presentadoras de Antígeno. *Medicine*. 11(28):1720-1727.

Segura E. y Amigorena S. 2014. Inflammatory dendritic cells. *Medical Science*. 30(1):64-68.

Shortman K., Lahoud M. y Caminschi I. 2009. Improving vaccines by targeting antigens to dendritic cells. *Experimental & Molecular Medicine*. 41(2):61-66.

Skoberne M., Beignon A. y Bhardwaj N. 2004. Danger signals: a time and space continuum. *Trends in Molecular Medicine*. 10:251-7.

Sobanov Y, Bernreiter A, Derdak S, Mechtcheriakova D, Schweighofer B, Duchler M, Kalthoff F, Hofer E. 2001. A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *European Journal of Immunology*. 31:3493–3503.

Summerfield A, Auray G. y Ricklyn M. 2014. Comparative Dendritic Cell Biology of Veterinary Mammals. *Annual Review Animal Bioscience*. 2015. 3:7.1–7.25.

Summerfield A., Meurens F. y Ricklyn M. 2015. The immunology of porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular immunology*. 66 (2015):14-21.

Tizard I. 2009. *Introducción a la inmunología veterinaria*. Elsevier. España. 592pp.

Van Vliet, S. van Liempt E., Saeland E., Aarnoudse C., Appelmelk B., Irimura T., Geijtenbeek T., Blixt O., Alvarez R., van Die I., van Kooyk Y. 2005. Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *International Immunology*. 17:661-9.

Zelensky A. y Gready J. 2005. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*. 272:6179–6217.

