



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
PORCINAS CD205⁺ EN TEJIDOS LINFÁTICOS Y PIEL**

Por:

Héctor Daniel Parra Sánchez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

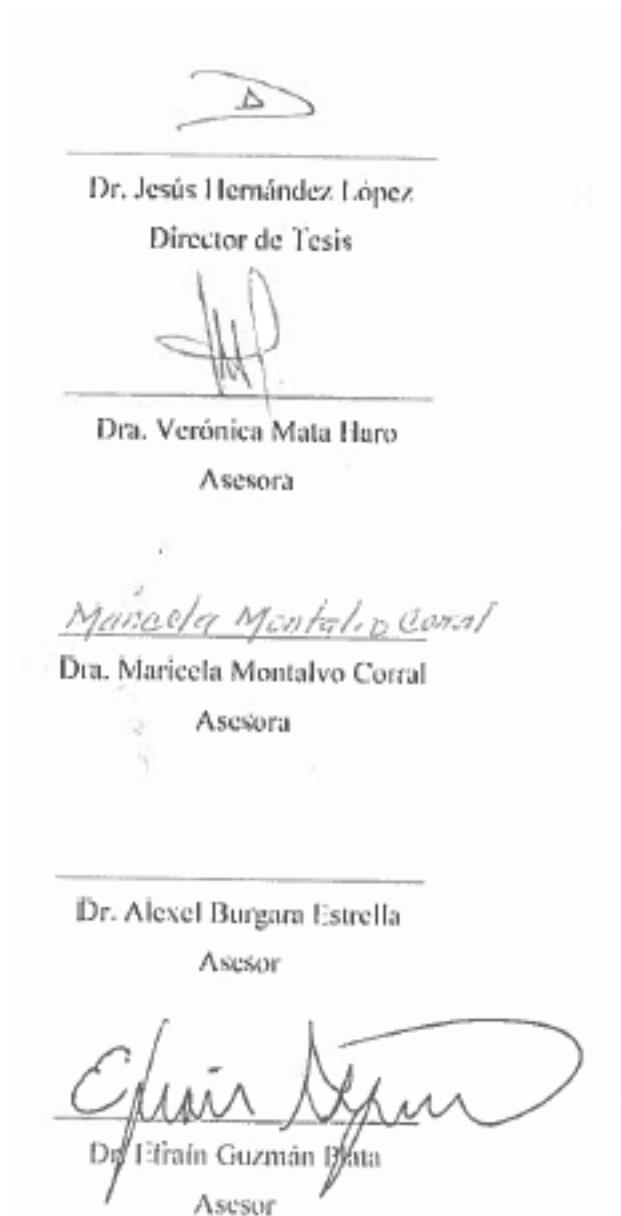
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora.

Agosto 2015.

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Héctor Daniel Parra Sánchez, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



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.

Firmado



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

A mis compañeros de laboratorio: Mónica, Ana, Edgar, Alexel

A mis hermanos por apoyarme

A mis ti@s y abuela, por siempre acompañarme y apoyarme en mis logros

A mis padres, por su enorme apoyo incondicional en las buenas y en las malas

A mí prometida por su paciencia, comprensión y gran apoyo.

DEDICATORIA

**A mis padres
Y a Shivis
... Gracias por todo!**

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), Fondo Ciencias Básica 2013 proyecto No. 222973.

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES	3
2.1.	Generalidades Del Sistema Inmune	3
2.2.	Células Presentadoras de Antígeno	3
2.3.	Complejo Principal de Histocompatibilidad	4
2.4.	Células Dendríticas	6
2.4.1.	Células Dendríticas de Tipo Mieloide.....	7
2.4.2.	Células Dendríticas de Tipo Plasmocitoide.....	8
2.5.	Principales Receptores de Patrones Asociados a Patógenos Presentes en Células Dendríticas	8
2.6.	Receptor CD205.....	9
2.7.	Estudios del Receptor CD205 en Cerdo	12
2.8.	Caracterización de Células Dendríticas en Cerdo.....	13
III.	HIPÓTESIS.....	17
IV.	OBJETIVO GENERAL	18
4.1.	Objetivos específicos.....	18
V.	MATERIALES Y METODOS	19
5.1.	Animales.....	19
5.2.	Obtención de Piel y Recolección de Células.....	19
5.3.	Obtención de Ganglios Linfáticos y Recolección de Células.....	20
5.4.	Obtención de Células Mononucleares de Sangre	21
5.5.	Caracterización Fenotípica de DC Mediante Citometría de Flujo	21
5.6.	Expresión de CD205 en Linfocitos B, Linfocitos T y Macrófagos	22
VI.	RESULTADOS.....	24
6.1.	Caracterización Fenotípica de DCs Mediante Citometría de Flujo	24
6.2.	Receptor CD205 en Linfocitos T y Linfocitos B.....	31
VII.	DISCUSIÓN	33
VIII.	CONCLUSIÓN	40

IX. BIBLIOGRAFÍA41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ruta antigénica por el complejo principal de histocompatibilidad clase I y II ...	5
Figura 2. Esquema de la estructura del receptor CD205 porcino	13
Figura 3. Propuesta modificada de Summerfield y colaboradores (2014a).	16
Figura 4. Selección de la población.	24
Figura 5. Imagen representativa de la expresión de CADM1 y CD172a en células de ganglios medistino.	25
Figura 6. Imagen representativa de la expresión de CADM1 con CD4, CD21 y CD14.	26
Figura 7. Esquema para la identificación de subpoblaciones de DCs.	26
Figura 8. Imagen representativa de las subpoblaciones de DCs de diferentes tejidos.	28
Figura 9. Expresión CD205 en diferentes subpoblaciones de DCs (DC1,DC2 y DC1/Mφ).....	30
Figura 10. Marcaje sencillo de células de piel de cerdo con anti-CD21, CD4 y CD14. (A) células sin marcar con anticuerpos, (B) células marcadas con anti-CD21, (C) células marcadas con anti-CD4 y (D) células marcadas con anti-CD14.....	31
Figura 11. Expresión de CD205 en linfocitos B y linfocitos T CD4+	32

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de las subpoblaciones de DCs en diferentes tejidos linfoides.....	28
Tabla 2. Expresión de CD205 en subpoblaciones de DCs (DC2, DC1 y DC1/Mφ) de piel, ganglios linfáticos y bazo.....	30
Tabla 3: Expresión de CD205 en linfocitos B y T CD4 ⁺	32

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC:** Células presentadoras de antígeno
- cDC:** Células dendríticas convencionales
- CLR:** Receptores lectina tipo C
- DC:** Células dendríticas
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- FSC:** Dispersión de luz frontal
- IFN:** Interferón
- mAbCD205:** Anticuerpo monoclonal CD205
- MHC:** Complejo principal de histocompatibilidad
- Mφ:** Macrófagos
- PAMPs:** Patrones moleculares asociados a patógenos
- PBA:** Buffer de fosfatos salinos con suero fetal bovino
- PBS:** Buffer de fosfatos salinos
- pDC:** Célula dendrítica plasmocitoide
- PE:** Ficoeritrina
- PRRS:** Receptores de reconocimiento a patógenos
- Th:** Célula T cooperadora
- TLR:** Receptores tipo toll

RESUMEN

Las células dendríticas (DC), son consideradas las principales células presentadoras de antígeno (APCs) debido a su extraordinaria capacidad de estimular a los linfocitos T. Dichas células expresan receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs) como los tipo Toll (TLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR), entre ellos el receptor CD205. El receptor CD205 juega un papel importante en la captación e internalización de antígenos por la vía endocítica y es capaz de incrementar la presentación de antígenos a linfocitos T. La secuencia genética de este receptor se caracterizó recientemente en el cerdo, la cual se utilizó para producir un anticuerpo monoclonal que permitió determinar la expresión del receptor en células de piel y ganglios linfáticos del cerdo. Sin embargo, se desconoce si la distribución del receptor es exclusivamente en DCs. El objetivo de este estudio fue caracterizar la expresión de CD205 en subpoblaciones de DCs en ganglios linfáticos, bazo y piel. Se utilizó un triple marcaje que incluyó anti-CD172a, la molécula de adhesión celular 1 (anti-CADM1) y CD205 en diferentes ganglios linfáticos y piel del cerdo. Los resultados muestran la expresión de los receptores CD172a y CADM1 lo que permitió identificar las subpoblaciones DC1, DC2 y DC1/M ϕ , con base en la propuesta de Summerfield para la caracterización de DCs en cerdo. Una vez establecidas estas subpoblaciones se determinó la expresión de CD205. Los resultados indican una expresión de CD205 en los diferentes ganglios linfáticos, bazo y piel. Para determinar si el CD205 se expresaba en otro tipo de células, se realizó un marcaje doble con los anticuerpos anti-CD21 o anti-CD4. De esta manera se pudo comprobar que el 100% de linfocitos B expresan CD205 y solo una tercera parte de la población total de linfocitos T CD4⁺. En conclusión se logró caracterizar de manera preliminar las subpoblaciones de DCs (DC1, DC2y DC1/M ϕ), además de determinar la expresión de CD205 en las mismas y conocer la expresión de este receptor en linfocitos B y T CD4⁺.

Palabras clave: Células presentadoras de antígeno, células dendríticas, lectina tipo C, CD205, CADM1, CD172a, cerdo.

ABSTRACT

Dendritic cells (DC), are considered the major antigen presenting cells (APCs) due to extraordinary ability to stimulate T lymphocytes. DCs express pathogen recognition receptors (PRRs) such as C-type lectin receptors (CLRs) among them CD205, and toll like receptors (TLR). CD205 plays an important role in antigen capture and delivery to endocytic pathway and it is able to increase the antigen presentation to T lymphocytes. In swine, CD205 was recently characterized and an anti-CD205 (mAbCD205) was obtained and the expression of this receptor in skin and lymph nodes was determined. Nevertheless it has not yet been elucidated the expression of this receptor on DCs. The aim of this study was to characterize the expression of CD205 in DCs subpopulations in lymph nodes, spleen and skin. For this, a triple staining was realized with anti-CD172a receptor, the cell adhesion molecule 1 (anti-CADM1) and anti-CD205 receptor in different lymph nodes, spleen and skin were used. The results show the differential expression of the CD172a and CADM1 receptors which allowed the evaluation of the DC1, DC2 and DC1/M ϕ based on the proposal suggested by Summerfield for the characterization of DCs in swine. Once these subpopulations were established the CD205 expression was determined, showing a heterogeneous expression in the different lymph nodes, spleen and skin. To determine if CD205 was expressed in other cell types, a staining with antibodies anti-CD21 and anti-CD4 was performed to evaluate its presence in B lymphocytes and CD4⁺ T lymphocytes. To this manner it was found that 100 % of B lymphocytes express CD205 and only a third part of the total population of CD4⁺ T lymphocytes. In conclusion it was possible to characterize preliminarily the DCs subpopulation (DC1, DC2 and DC1/ M ϕ) and its expression of CD205 was determined and the expression of this receptor in B lymphocytes and T CD4⁺ lymphocytes was evaluated.

Keywords: Antigen presenting cells, dendritic cells, C-type lectin receptors, CD205,CADM1,CD172a

I. INTRODUCCION

Las células dendríticas (DCs) son un grupo heterogéneo de células distribuidas por todo el organismo donde actúan como centinelas. Estas células forman parte del grupo de células presentadoras de antígeno (APC), las cuales poseen la capacidad de presentar antígenos vía complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II a linfocitos T CD4⁺ y MHC de clase I a linfocitos T CD8⁺ para iniciar una respuesta inmune en contra de estos (Avalos y Ploegh, 2014; Summerfield y McCullough 2009; Yao y cols., 2007; Moll y cols., 2003). Las DCs poseen la particularidad de expresar gran cantidad de receptores, entre ellos los receptores tipo Toll (TLRs) y receptores lectina tipo C (CLRs) (Chan y cols., 2012). Mientras que los TLRs inducen señales intracelulares que promueven la maduración de las DCs, los CLRs reconocen e internalizan antígenos para procesarlos y generar péptidos que posteriormente son presentados por vía MHC de clase I o MHC de clase II (Drickamer, 1999; Figdor y cols., 2002).

El receptor CD205 es un CLR que se expresa en DCs y se ha determinado que posee mayor capacidad de incrementar la presentación de antígenos por las vías de MHC clase I y clase II en comparación con otros CLRs (Bozzacco y cols., 2007; Do y cols., 2012). Previamente, se caracterizó la secuencia nucleotídica del gen que codifica al receptor CD205 del cerdo, y se elaboró un anticuerpo monoclonal (mAbCD205) y se determinó su expresión en diferentes tejidos (Flores-Mendoza y cols., 2010; Flores-Mendoza y cols., 2012). Sin embargo no se conoce en cuales células se expresa.

La caracterización de las DCs es compleja, ya que no existe un grupo de marcadores que las definan debido a las diferencias fenotípicas y de funcionalidad que éstas presentan entre sí (Merad y cols., 2013). En el caso del cerdo se han caracterizado subpoblaciones de APC con marcadores de superficie, morfología y rasgos de funcionalidad similar al de las de DCs en diferentes tejidos como piel, pulmones y ganglios linfáticos (Marquet y cols., 2011; Bautista y cols., 2002; Bimczok y cols., 2005; Jamin y cols., 2006; López-Robles y cols., 2015). Sin embargo, se ha propuesto una nueva combinación de anticuerpos (CD172a, CADM1, CD1a, CD163) para la caracterización de las subpoblaciones de DCs (DC1 y DC2) en piel, sangre y linfa aferente del cerdo (Summerfield y cols., 2014a; Marquet y cols., 2011). Esta propuesta fue diseñada en base a caracterizaciones previas de subpoblaciones de DCs en diversas especies como el ratón y el humano, en las cuales se demostró la expresión variable del receptor CADM1 y probada en células mononucleares de cerdo a partir de sangre (Summerfield y cols., 2014a).

Con estos resultados, concluyen que existe la posible homología entre las subpoblaciones de DCs de humano (CD141c) con las de ratón (CD103) y cerdo (DC2). Mientras que las DC1 pudieran ser homólogas a las DCs CD1c del humano y CD11b del ratón. En este trabajo se caracterizan las DCs en el cerdo y se determina la expresión del receptor CD205, ya que es información esencial para futuras aplicaciones como la elaboración de vacunas utilizando como base el direccionamiento de antígenos al receptor CD205.

II. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del Sistema Inmune

El sistema inmune es una organización de células y moléculas especializadas para generar una respuesta en contra de agentes que son reconocidos como extraños. Existen dos tipos de inmunidad: innata y adaptativa, la principal característica que hace diferente a la inmunidad innata de la adaptativa es la velocidad y la especificidad que brindan en contra de un patógeno. La inmunidad innata se considera rápida, inespecífica e incapaz de generar memoria inmunológica, la cual es compuesta por células como neutrófilos, monocitos, macrófagos, linfocitos natural killer (NK), moléculas del complemento, citocinas, entre otras. En cuanto a la inmunidad adaptativa, es de gran importancia el papel desempeñado por las APCs para realizar la activación de linfocitos T y desencadenar una respuesta inmune en contra del patógeno. La inmunidad adaptativa está compuesta principalmente por linfocitos B (producción de anticuerpos) y linfocitos T (linfocitos citotóxicos o cooperadores) (Avalos y Ploegh., 2014; Mair y cols., 2014).

2.2. Células Presentadoras de Antígeno

Las APCs son células del sistema inmune que poseen capacidad de capturar y procesar antígenos por diferentes vías, como fagocitosis, macropinocitosis y endocitosis, para posteriormente presentarlos a linfocitos T y despertar una respuesta en contra de ellos (Vázquez y cols., 2012) Las principales APC son

macrófagos, linfocitos B y DCs (Hume, 2008). Anteriormente se pensaba en los macrófagos como las principales APC hasta el descubrimiento de las DCs (Vázquez y cols., 2012). Sin embargo, cabe destacar que los macrófagos poseen funciones esenciales como la producción de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y la eliminación de microorganismos vía fagocitosis (Owen y Mohamadzadeh., 2013). En cuanto a linfocitos B, destaca su función de producción de anticuerpos que son claves en la inmunidad humoral, sin embargo esta célula es capaz de presentar antígenos (Avalos y Ploegh., 2014).

Por último están las DCs, que destacan de las APC mencionadas anteriormente ya que activan linfocitos T vírgenes CD4⁺ mediante el MHC de clase II y T CD8⁺ por la vía de MHC clase I. Las DCs se localizan en todos los tejidos desempeñando funciones como, activación y regulación de células T, secreción de interferón (IFN) tipo I y la particular capacidad de presentación cruzada (Hopp y cols., 2014; Nierkens y cols., 2013).

2.3. Complejo Principal de Histocompatibilidad

Las APC expresan MHC de clase II, mientras que en otras células nucleadas predomina el MHC de clase I (Breathnach y cols., 2008). En el caso de las DCs, la expresión de MHC de clase I y clase II les confiere la particularidad de presentar antígenos exógenos a linfocitos T y diferenciarlos a linfocitos T CD4⁺ (cooperadores) por medio del MHC clase II y T CD8⁺ (citotóxicos) por el de clase I. Las DCs expresan MHC de clase II para la activación de linfocitos T CD4⁺, los cuales a su vez tienen la capacidad de diferenciarse a Th1 (eliminación de antígenos intracelulares), Th2 (activación de la inmunidad humoral) o Th17 (actividad pro-inflamatoria) (Truckenmiller y cols., 2006; Vázquez y cols., 2012; Waite y Skokos., 2012).

Existen diferencias en la forma en que las moléculas MHC I y MHC II se cargan con los péptidos antigénicos para la presentación. Para la asociación de los péptidos con los MHC clase I, éstos se producen por medio de la degradación citosólica del antígeno y del proteosoma, después son transportados al retículo endoplásmico por medio de moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico (TAP). Una vez en el retículo endoplásmico, los péptidos, se unen al MHC clase I para finalmente ser expresados en la membrana. En cuanto a las MHC clase II son acumuladas en vesículas citoplasmáticas. El antígeno una vez que es capturado e internalizado se da la unión del péptido antigénico al MHC II y así puede ser expresado en la superficie de la membrana celular (Figura1) (Banchereau y cols., 2000; Vázquez y cols., 2012).

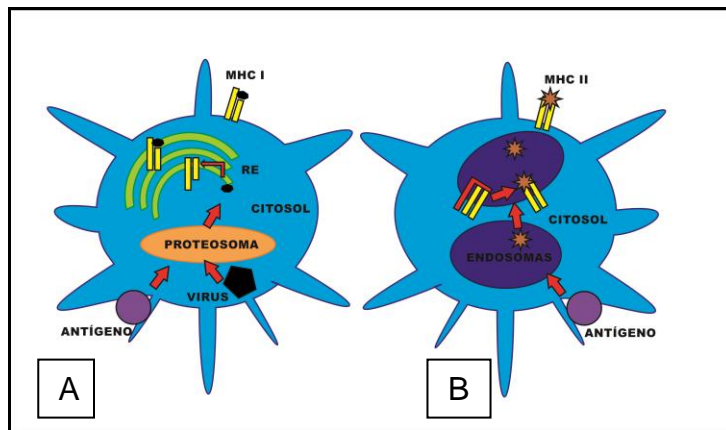


Figura 1: Ruta antigénica por el complejo principal de histocompatibilidad clase I y II
 En (A) se puede observar el mecanismo para la presentación de un virus intracelular y un antígeno que conlleva a la presentación cruzada. En (B) se observa el esquema para el procesamiento para la presentación vía MHC II. Modificado de Banchereau y cols., 2000.

Las DCs poseen una característica particular que las hace únicas. Esta es, la capacidad de presentar antígenos extracelulares que son captados por los CLR y son presentados mediante el MHC de clase I. Es decir, son capaces de la generación de inmunidad celular para antígenos que normalmente son presentados por la vía MHC de clase II y por consiguiente una generación de inmunidad humoral. De esta manera se obtiene una inmunidad más completa en contra de un patógeno. Se han reportado dos vías de presentación cruzada realizada por las DCs: la primera consiste en la captación e internalización del

antígeno que se transporta mediante endosomas al citosol donde es procesado por el proteosoma y posteriormente cargado en MHC de clase I. La segunda ruta, que es independiente del citosol y el proteosoma para presentar mediante MHC de clase I, una vez captado el antígeno y transportados por endosomas donde directamente es cargado por los MHC de clase I (figura1) (Nierkens y cols., 2013).

2.4. Células Dendríticas

Las DCs fueron descubiertas aproximadamente en los años 70 (Steinman y Cohn, 1973), a lo largo del tiempo ha incrementado el interés en su aplicación para la generación de vacunas inmunoterapéuticas. Además de ser las principales APCs, las DCs, juegan un papel importante en la activación de otro tipo de células como linfocitos B, macrófagos y eosinófilos (Vázquez y cols., 2012; Merad y cols., 2013).

Las DCs poseen una mayor eficiencia en la captura del antígeno para después presentarlo a células T. La capacidad de extender su membrana en forma de dendritas le facilita a la DC pasar a través de las uniones celulares estrechas de las células intraepiteliales, lo que conlleva a una mayor eficiencia en la captura de antígeno (Vázquez y cols., 2012).

Una vez capturado el antígeno, la DC pasa por un proceso de maduración para activar a los linfocitos T. Dicho proceso consiste en una serie de eventos donde la DC disminuye su capacidad para fagocitar y a su vez presenta una serie de péptidos ya procesados en moléculas de MHC de clase II. En esta fase se da el incremento de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 para tener una activación exitosa del linfocito T. Este punto es clave ya que de lo contrario la ausencia de una buena coestimulación acorta la vida de estas células pues no son capaces de producir interleucina 2 (IL2), la cual es fundamental para su

sobrevivencia y expansión (Linsley y cols., 1991). Por último, la pérdida de algunas moléculas de adhesión es esencial para migrar a los órganos linfoides secundarios y poder presentar a los linfocitos T vírgenes. En los órganos linfoides se inicia la presentación de antígeno y secreción de interleucinas para llevar a cabo la diferenciación celular de linfocitos T (Tan y O' Neil, 2005). Hasta ahora, se conocen dos grandes grupos de DCs: las mieloides (mDCs) y las plasmocitoides (pDCs). Las primeras, poseen gran capacidad de captura de antígenos para después estimular a linfocitos T (inmunidad adaptativa). Las pDCs, se encuentran en circulación y su función principal radica en la producción de IFN tipo I (inmunidad innata) (Schmidt y cols., 2012) y se describirán con más detalle a continuación.

2.4.1. Células Dendríticas de Tipo Mieloide

Las mDc se clasifican así debido al parecido fenotípico con los monocitos, por lo que también se les conoce como DCs monocitoides, además tienen la particularidad de expresar gran cantidad de moléculas de MHC clase II (Radford y cols., 2014).

Existe una clasificación de mDC según su localización y función: intersticiales y migratorias. Las primeras residen en órganos linfoides secundarios principalmente, pero también se les nombra así a aquellas que se encuentran distribuidas en los diferentes órganos. Por otra parte están las migratorias, de las cuales, las de la piel (DCs Langerhans) son las más estudiadas. Una vez que se captura el antígeno, las DCs migran a los tejidos linfoides para la presentación a linfocitos T o bien compartir el antígeno con DCs intersticiales y despertar una respuesta inmune más eficaz (Agrawal y Gupta cols., 2011; Schmidt y cols., 2012; Vázquez y cols., 2012; Barchet y cols., 2005).

Las mDCs juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune. Esto es debido a que pueden presentar antígenos no patógenos generando linfocitos T tolerantes. En el caso de un agente extraño se monta una respuesta inmune eficaz para eliminarlo rápidamente. Para el caso de generación de tolerancia, las DCs están “aptas” para reconocer toda una serie de microorganismos comensales (no patógenos), antígenos dietarios, entre otras, que diariamente están en contacto con células del sistema inmune y no requiere de una respuesta inmune (Chan y cols., 2012; Manicassamy y Pulendran., 2011).

2.4.2. Células Dendríticas de Tipo Plasmocitoide

Las pDC, poseen una menor capacidad de presentar antígeno en comparación con las mDCs debido a la poca expresión de MHC II, así como las moléculas coestimuladoras presentadas por las mDCs maduras. La principal función de este tipo de DC radica en migrar a los nódulos linfáticos donde secretan gran cantidad de interferón α , β , ϵ , etc. (Merad y cols., 2013; Sucháněk y cols., 2010; Tan y O' Neil, 2005)

2.5. Principales Receptores de Patrones Asociados a Patógenos Presentes en Células Dendríticas

Con el objetivo de realizar sus múltiples funciones, las DCs cuentan principalmente con dos grupos de receptores, CLR que facilitan la captura y endocitosis del antígeno y los TLR. En el grupo de CLR se encuentran el DC SIGN (CD209), el receptor de manosa (MMR), la lectina de unión a galactosa del macrófago (mGL), y CD205. El receptor CD205 ha demostrado ser un buen captador de antígeno para DCs, donde una vez internalizado el antígeno, se

procesa y presenta vía MHC II a linfocitos T (Badiee y cols., 2007; Guo y cols., 2000; Butler y cols. 2006).

Los receptores TLRs, son los encargados de producir señales intracelulares posteriores a la captura del antígeno y así despertar una respuesta contra este, es importante destacar que no todas las DCs expresan los mismos TLRs. Las pDCs expresan en su interior gran cantidad de TLR7 y TLR9, jugando un papel fundamental en la inmunidad innata y la respuesta a virus produciendo hasta 10 pg/cel de IFN tipo I. Las mDC, por su parte expresan TLR1/2 y TLR2/6, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR8, lo que les brinda una amplia gama de reconocimiento antigénico para despertar una respuesta en contra del antígeno (Barchet y cols., 2005; Benwell y cols., 2010; Flores-Mendoza y cols., 2012; Mäkelä y cols., 2011).

En el caso de los CLRs, reconocen diversas estructuras (manosa, fucosa, N-acetilglucosamina, entre otros) con las que interactúan para captar el antígeno y procesarlo. El DC SIGN ha sido reconocido como uno de los más importantes en las DCs inmaduras debido a la capacidad de unión que posee a las moléculas de adhesión intracelular (ICAM) 2 e ICAM 3 facilitando su migración, además de poder reconocer diversos patógenos. Otros receptores mencionados anteriormente como el MMR y MGL reconocen glicoproteínas y lípidos que contienen fracciones GalNac (Vliet y cols., 2006).

2.6. Receptor CD205

El receptor CD205 es una proteína transmembranal tipo I perteneciente a la familia de receptores endocíticos CLR. En cuanto a su estructura, posee un dominio N-terminal rico en cisteínas, un dominio de fibronectina tipo II, dominios de lectina tipo C, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático pequeño (Petzold y cols., 2012). Este receptor se ha

caracterizado en diversas especies animales como: humano, ratón, bovino y cerdo.

En cuanto a la expresión de este receptor en ratón, se ha reportado que predomina en células del área tímica y DCs de Langerhans; a diferencia del humano donde CD205 se expresa principalmente en las mDCs, linfocitos B, linfocitos T y pDCs. En los bovinos se reporta la expresión de CD205 en DCs de linfa aferente y poca expresión en linfocitos B. Por último, en el cerdo la expresión de CD205 se ha reportado en células de piel y nódulos linfáticos como el mesentérico e inguinal (Flores-Mendoza y cols., 2012; Badiee y cols., 2007).

Se ha catalogado al receptor CD205 en DCs como candidato para la elaboración de vacunas debido a las propiedades que posee, tales como: favorecer la presentación cruzada, excelente eficiencia para internalización y presentación vía MHC clase II, entre otras. Sin embargo el ligando específico de CD205 se desconoce, por lo que se han empleado técnicas para direccionar antígenos a este receptor con el objetivo de incrementar la presentación de estos en las DCs (Butler y cols. 2006; Bonifaz y cols., 2002; Jenkinson y cols., 2012; Shrimpton y cols., 2009).

Una de las técnicas más empleadas para el direccionamiento de antígeno al receptor CD205 es mediante anticuerpos anti-CD205 (mAbCD205) fusionados a péptidos antigénicos, los cuales interactúan directamente con el receptor logrando una internalización de dichos péptidos. Los mAbCD205 se han utilizado en diversas investigaciones obteniendo resultados prometedores (Bozzaco y cols., 2007; Do y cols., 2012; Coconi-Linares y cols., 2013).

Tal es el caso de un estudio que revela que CD205 es mejor captador de antígeno y es capaz de incrementar la respuesta inmune en comparación con otros receptores como DC-SIGN y MMR. Se dirigieron anticuerpos específicos a

los receptores mencionados con antígeno de la proteína p24gag del VIH. Los resultados mostraron la capacidad de CD205 como captador de antígeno en comparación de los otros receptores ya que con menor concentración de anticuerpos específicos, incrementó la producción de IFN γ por los linfocitos T CD8 $^{+}$ y DCs en sangre periférica (Bozzacco y cols., 2007).

El trabajo realizado por Do y colaboradores (2012), con el receptor CD205 tuvo como objetivo la elaboración de vacunas capaces de incrementar la inmunidad innata como adaptativa en mucosas de pulmón. El experimento consistió en la administración de mAbCD205 fusionado a péptidos antigénicos de *Yersinia pestis* a ratones. Como resultado se obtuvo linfocitos T CD4 $^{+}$ secretores de IFN γ /IL2 y anticuerpos específicos principalmente de tipo IgG1 e IgG2. Además se evaluó y comparó la eficiencia del anticuerpo con los péptidos y se demostró que la vía de internalización del receptor CD205 era más eficiente en el incremento de la respuesta inmune en comparación con la proteína soluble.

Coconi-Linares, (2013), utilizó el mAbCD205 más el adyuvante ácido polinosínico (poly IC) para la elaboración de un estudio de incremento de respuesta en el sistema inmune de ratones. La investigación utilizó como antígeno el dominio III de la proteína EDIII del virus del dengue. En la primera inmunización se encontró que el mAbCD205 con el antígeno resultó ser más inmunogénico en comparación con la proteína de interés del virus. Por otro lado, el mAbCD205 con poly IC no mostró diferencia alguna en el incremento de la respuesta inmune como se esperaba en comparación con el mAbCD205 por sí solo. En conclusión se generó una buena inmunidad celular y humoral efectiva para la proteína.

2.7. Estudios del Receptor CD205 en Cerdo

Como se ha mencionado anteriormente el receptor CD205 es capaz de incrementar la presentación de antígenos y respuesta inmune. Las diversas investigaciones que han obtenido estos resultados, han dirigido antígenos de interés al receptor CD205 para evaluar la presentación antigénica vía DCs y la estimulación que ocasiona ésta en los linfocitos T.

Previamente por medio de técnicas moleculares se logró caracterizar el receptor CD205 en las DCs del cerdo. Los resultados mostraron que la secuencia de dicho receptor está conformada por un total de 5172 pb, dando un total de 1723 aminoácidos distribuidos en 12 dominios extracelulares, uno transmembranal y uno citoplasmático (Figura 2). Estos dominios corresponden a ricina tipo beta trefoil, fibronectina tipo 2 y 10 dominios de lectina tipo C (LTC), resultando la estructura característica de los CD205 y receptores de manosa. Se ha comparado la similitud en diferentes especies (humano, mono, bovino, caballo, ratón) ya caracterizadas teniendo como resultado una identidad superior al 80% con cada una de las especies mencionadas.

En cuanto a las regiones conservadas expresadas por CD205 de diferentes especies, destaca el fragmento 1703-1708 de los aminoácidos FSSVRY, responsable del inicio de endocitosis. La triada de aminoácidos pertenecientes a la sección 1713-1715 (EDE) esencial para dirigir antígenos a endosomas, también se expresa en diferentes especies incluyendo al cerdo (Flores-Mendoza y cols., 2010).

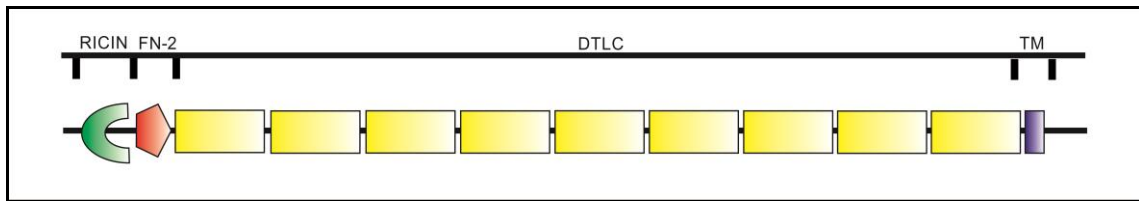


Figura 2. Esquema de la estructura del receptor CD205 porcino

Esquema del receptor CD205 porcino donde se pueden observar los respectivos dominios, ricina (ricin), fibronectina tipo II (FN-2), tipo lectina C (DTLC) y el transmembranal (TM).

A partir de la secuencia de aminoácidos del CD205, se produjo una proteína recombinante que fue inoculada en ratones con el objetivo de producir un anticuerpo anti-CD205. Se evaluó la expresión del receptor CD205 en diferentes tejidos (timo, nódulos linfáticos y piel) del cerdo y se encontró que el timo expresa 6.5%, en nódulos linfáticos mesentéricos e inguinales 27.9% y en la piel 70%. (Flores-Mendoza y cols. 2012). Sin embargo, este resultado no determina la expresión de este receptor específicamente en DCs u otros tipos celulares. Esta información es esencial para futuras aplicaciones como la elaboración de vacunas utilizando como base el direccionamiento de antígenos al receptor CD205 en DC

2.8. Caracterización de Células Dendríticas en Cerdo

La caracterización de las DCs es compleja debido a la expresión de sus marcadores, según el tejido en el que se encuentren. Además en las DCs no existe un grupo de marcadores que definan con precisión sus características fenotípicas y funcionales (Merad y cols., 2013; Nierkens y cols., 2013).

Existen diversos receptores que se expresan en la superficie de las DCs, los cuales han sido de gran utilidad para su caracterización. El CD172a (SWC3, SIRP α) es conocido por su expresión en células mieloides (macrófagos, DCs, monocitos, etc). Este receptor tiene diversas funciones destacando la del reconocimiento con CD47 de células del huésped para evitar la fagocitosis de

las mismas. Otro receptor que ha destacado en la caracterización de DCs, es el CD163, del cual se ha demostrado su expresión en diversos estudios y ha permitido diferenciar subpoblaciones de DCs en conjunto con otro grupo de receptores. El CD163 es un receptor tipo “scavenger”, que tiene como función principal la unión con haptoglobina/hemoglobina. El CD1a es otro receptor que se ha definido como blanco para la diferenciación de DCs, donde su principal función consiste la presentación de antígenos lipídicos. CADM1 que su función radica en la adhesión célula con célula, se ha reportado su expresión en DCs de humano, ratón y recientemente descrito en cerdos, ha sido de gran utilidad para la caracterización de DCs (Summerfield y cols., 2014a; Marquet y cols., 2011; Marquet y cols., 2014; Bautista y cols., 2002; Kristiansen y cols., 2001).

Bautista y colaboradores en el 2002 realizaron un estudio que fue parteaguas en la caracterización de DCs en piel de cerdo basándose en la expresión de los receptores CD1a y CD172a como base para la identificación de éstas. Aunado a este marcaje midieron la expresión de MHCII reportando alta expresión del mismo en dichas subpoblaciones.

La caracterización por Summerfield y colaboradores (2003), se basó en la expresión de CD172a y determinó las subpoblaciones de células dendríticas convencionales (cDC) en sangre realizando diversas combinaciones con los receptores CD4 y CD14. Sus resultados mostraron poblaciones $CD172a^+CD4^-CD14^-$. Es importante destacar que este fenotipo presentaba alta expresión de MHC de clase II, así como moléculas coestimuladoras $CD80/86^+$ y otras como $CD1^{+/-}CD16^{+/-}$. En 2006, Jamin y colaboradores, caracterizaron cDCs del cerdo en tonsila, bazo y nódulos linfáticos. Los resultados evidenciaron dos poblaciones compuestas por $CD172a^+ CD11R1^+ CD1^{+/-} CD80/86^{+/-}$ que corresponderían a DCs convencionales. En el caso de las pDCs plasmocitoides se reporta el fenotipo $CD172a^+ CD4^{high} CD14^- CD80/86^{low} MHCII^{low}$ que a diferencia de las cDCs estas expresan gran cantidad de CD4 en su superficie.

Marquet y colaboradores (2011) propusieron la caracterización de DCs de piel (dermales y epidermales) y linfa aferente en el cerdo. Se tomó como criterio la alta expresión de MHC de clase II y la combinación de anticuerpos CD172a y CD163. Una vez determinada la base CD172a, CD163, MHCII^{high}, se identificaron las 4 diferentes subpoblaciones de DCs: CD163⁻CD172a⁻, CD163^{high}CD172⁺, CD163⁺CD172a⁺ y CD163⁻CD172a⁺. Sin embargo la alta expresión de estos receptores en Mφ dejan en duda si son una población homogénea de DCs o pudiera ser una combinación de DCs con Mφ. Basando su estudio en el reportado por Marquet y cols., (2011), López-Robles y colaboradores (2015) realizaron la caracterización de APC en pulmón de cerdo y la funcionalidad de estas en el sistema inmune. Sin embargo al utilizar una base de marcadores de superficie (Marquet y cols., 2011) no específica para DCs, dejan en claro que su caracterización no es exclusiva de DCs si no que pudieran encontrarse otro tipo de APC.

Recientemente se ha propuesto (Figura 3) una nueva combinación de anticuerpos para la identificación de DCs en cerdo (Summerfield y cols., 2014b). Esta propuesta tiene como base estudios previos en diferentes tejidos de cerdo (Marquet y cols., 2011) y su relación con subpoblaciones de DCs reportadas en ratón (CD103⁺ y CD11b⁺) y humano (CD141⁺ y CD1c⁺) (Schlitzer y cols., 2014). Las DCs CD103⁺ se caracterizan por su capacidad de estimular linfocitos T CD8 siendo homólogas a las CD141⁺ del humano (DCs de tipo 2 o DC2). Por otra parte las CD11b son homologas a las CD1c y se caracterizan por activar linfocitos T CD4⁺ y TCD8⁺ (DCs del tipo 1 o DC1). Teniendo como base lo mencionado anteriormente, Summerfield y colaboradores (2014b) ha propuesto analizar la expresión de CADM1, CD1a, CD163, CD172a para identificar las subpoblaciones DC1 (CADM1⁻, CD172a⁺, CD1a⁺, CD163^{low}) y DC2 (CADM1⁺, CD172a^{-/low}, CD1a⁻, CD163⁻) en piel de cerdo. Sin embargo se desconoce si estas subpoblaciones reportadas en piel de cerdo expresan el receptor CD205 y si es posible encontrar dichas subpoblaciones en ganglios linfáticos y bazo.

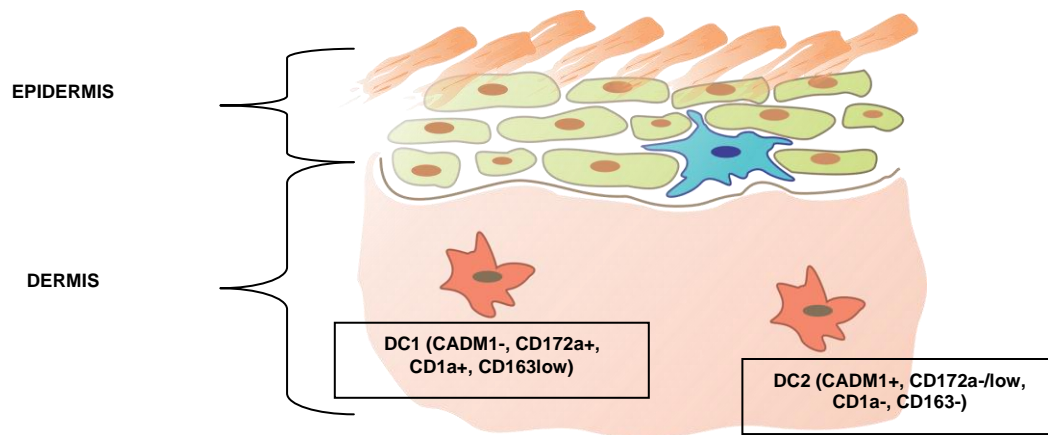


Figura 3. Propuesta modificada de Summerfield y colaboradores (2014a).

DC1 (CADM1-, CD172a+, CD1a+, CD163low) y DC2 (CADM1+, CD172a-/low, CD1a-, CD163-) en la epidermis del cerdo.

III. HIPÓTESIS

El receptor CD205 se expresa diferencialmente en células dendríticas porcinas DC1, DC2 y DC1/Mφ de piel, bazo y ganglios linfáticos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de CD205 en células dendríticas de piel, ganglios linfáticos de cerdo y bazo

4.1. Objetivos específicos

Analizar la distribución de DCs en piel, ganglios linfáticos y bazo en base a la expresión de CADM1 y CD172a.

Determinar el porcentaje de células dendríticas porcinas CD205⁺ en piel.

Evaluar la expresión de células dendríticas porcinas CD205⁺ en ganglios linfáticos y bazo.

Determinar la expresión de CD205 en linfocitos B y linfocitos T CD4⁺.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Animales

Se utilizaron cerdos sanos (n=8) de 4 a 6 semanas de edad provenientes de granjas libres de PRRSV y Aujeszky. Los animales fueron mantenidos en la granja experimental de las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. con acceso a libre demanda al alimento y agua. Los animales se sacrificaron de acuerdo a la norma NOM-033-ZOO-1995.

5.2. Obtención de Piel y Recolección de Células

Después del sacrificio, el cerdo fue lavado con agua convencional y jabón para limpiar para posteriormente rasurar el área de interés. Una vez rasurada el área se siguió la metodología publicada por Marquet y colaboradores (2011) para la obtención de piel con algunas modificaciones. El cerdo se desinfectó con etanol al 70% y yodo (Isodine), la piel se obtuvo mediante un sacabocado (Premier, India) de 8 mm de circunferencia, las biopsias fueron recolectadas en buffer de fosfatos salino (PBS) frío y suplementado con 1mg/mL de gentamicina (Norvet, DF, Mexico).

Se realizaron tres lavados con PBS estéril suplementado con 1 mg/mL de gentamicina (Norvet, Mexico) para las biopsias. En la campana de flujo laminar (Labconco Clase II tipo A2), la piel se cultivó en placas Petri (30 biopsias por placa) con 15 mL de medio Xvivo (Lonza, Walkersville, USA) suplementado con

colagenasa tipo 1 (Worthington Biochemical Corp, NJ, USA) 1 mg/mL, dispasa (Gibco, USA) 3 mg/mL, además de antibióticos: 1 mg/mL de penicilina (Sigma-Aldrich, MO, USA), 1 mg/mL de anfotericina B (Gibco Laboratories, Grand Island Biological Co., NY, USA) y 1 mg/mL de gentamicina. Las condiciones de incubación fueron 37°C con 5% de CO₂ en un periodo de 12 a 16 horas

Posterior a las 16 horas de incubación, las células que migraron al medio se colectaron en tubos Falcon de 50 mL con disociador de nylon (Becton-Dickinson, BD, NJ, USA). Se realizaron tres lavados de 5 mL con medio DMEM (Sigma-Aldrich, MO, USA) para las biopsias y así recolectar mayor número de células. Los lavados se realizaron en una centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R a una velocidad de 328 g por 10 minutos a 25°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante del tubo y las células fueron resuspendidas en buffer de fosfatos salinos con suero fetal bovino (Equitech-Bio, Inc., Texas, USA) (PBA). Se determinó el número y viabilidad de células empleando la cámara de Neubauer y azul de tripán (Sigma-Aldrich, USA).

5.3. Obtención de Ganglios Linfáticos y Recolección de Células

La obtención de los ganglios se realizó mediante la técnica reportada por Flores-Mendoza y colaboradores (2010). Los ganglios extraídos del cerdo (tonsila, retrofaríngeo, mediastinal, mesentérico) y el bazo fueron recolectados en PBS frío y suplementado con 1mg/mL de gentamicina como medio de transporte de los mismos hacia la campana de flujo laminar. Una vez en condiciones de esterilidad los ganglios fueron macerados con el embolo de una jeringa y lavados con DMEM (Sigma-Aldrich, MO, USA) suplementado con 1 mg/mL de gentamicina, para retener los restos de tejidos se utilizó un disociador de células. Posteriormente las células se resuspendieron en PBA para ser centrifugadas a 328 g por 10 minutos a 25°C en la centrifuga

Se decantó el medio excedente y las células fueron resuspendidas en PBA para determinar el número y viabilidad de células empleando la cámara de Neubauer y azul de tripán.

5.4. Obtención de Células Mononucleares de Sangre

Se recolectaron 10mL de sangre por punción en tubos con EDTA (BD Vacutainer, NJ, USA) para evitar la coagulación. Una vez obtenida la sangre se depositó en un tubo estéril Falcon de 50 mL, el cual previamente se le agregó Ficoll-Paque densidad 1.077 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) a una relación 1:3. Para evitar romper el gradiente entre Ficoll y la sangre, éste se agregó al tubo por medio de sus paredes con ayuda de una pipeta Pasteur. Se centrifugó a 382g a 4°C por 30 minutos sin freno. Al término de la centrifugación se procedió a retirar la capa de células mononucleares con pipeta Pasteur y se depositó en un tubo Falcon. Una vez obtenida la muestra, se incubó con 5mL de NH₄Cl por 7 minutos a temperatura ambiente para lisar eritrocitos presentes. Posteriormente se eliminó el excedente de NH₄Cl con 2 lavados de 2 mL cada uno de PBA y se centrifugó por 10 min a 328 g y 25°C. Se decantó el PBA excedente y las células fueron resuspendidas nuevamente en PBA para determinar el número y viabilidad de células empleando la cámara de Neubauer y azul de tripán.

5.5. Caracterización Fenotípica de DC Mediante Citometría de Flujo

Para la evaluación de las DCs de cerdo se utilizaron 5×10^4 células por tubo en los marcajes sencillos, 5×10^5 en los dobles y 1×10^6 en los marcajes triples, las cuales fueron resuspendidas en 100 μ L de PBA. El PBA también fue

utilizado como reactivo para la realización de los pertinentes lavados entre cada incubación de anticuerpos (2 mL por tubo).

Se realizaron marcajes triples con un marcaje en tres pasos; en todo los casos se agregó un anticuerpo a una dilución de 10 µg/mL y las condiciones de incubación fueron de 15 min a 25°C con dos lavados entre cada adición de anticuerpo. Los anticuerpos utilizados fueron los propuestos por Marquet y colaboradores (2011) y Summerfield (2014b) para la identificación de DCs en piel. En primer lugar se incubaron con el anticuerpo anti-CADM1 (CM004-3, IgY, MBL,); posteriormente con anti-IgY con biotina y un anti-CD172a (74-22-15A, IgG2b, Monoclonal Antibody Center) para tener la base CD172a/CADM1. A su vez CADM1 se le añadió estreptavidin con ficoeritrina (PE) (Southern Biotech,71000904) para la biotina y anti-IgG2b Alexa Fluor 647 (Southern Biotech, 1090-31). El tercer anticuerpo de interés fue el anti-CD205 (9H2F7, IgG1) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Southern Biotech, 107002). Las células fueron resuspendidas en 100 µL de PBA y se adquirieron 50 mil eventos para los marcajes sencillos, 200 mil para los dobles y 200 mil para los triples. El análisis se realizó por citometría de flujo con el equipo BD FACSCanto II y con el software FACSDiva (BD/Pharmingen, CA, USA).

5.6. Expresión de CD205 en Linfocitos B, Linfocitos T y Macrófagos

Para determinar la expresión de CD205 en otro tipo de células, se realizó una serie de marcajes dobles para ver la posible expresión de este receptor en linfocitos B, linfocitos T y macrófagos. Se tomaron 5×10^5 células de cada tejido y sangre para la evaluación. Los anticuerpos utilizados fueron el anti-CD21 (abcam, BB6 11C9.6) conjugado con FITC para determinar linfocitos B y el anti-CD4 (74124, IgG2b, VMRD Inc.,) con Alexa Fluor 647 (Southern Biotech, 1090-31) para linfocitos T. Todos los anticuerpos mencionados anteriormente se

evaluaron de manera sencilla y doble. Para el caso del marcaje doble se utilizó anti-CD205 con PE en cada marcaje. El análisis se realizó en el citómetro de flujo BD FACSCanto II con el software FACSDiva software (BD/Pharmingen, CA, USA).

VI. RESULTADOS

6.1. Caracterización Fenotípica de DCs Mediante Citometría de Flujo

Las células obtenidas de los ganglios linfáticos, piel y sangre, fueron analizadas en base a su perfil de dispersión de luz frontal (FSC) y lateral (SSC). Posteriormente se eliminaron los dobletes (Figura 4 A). Se utilizó el anticuerpo secundario utilizado para los marcajes (Alexa Fluor 647, PE y FITC) como control y determinar el pegado inespecífico del mismo (Figura 4 B)

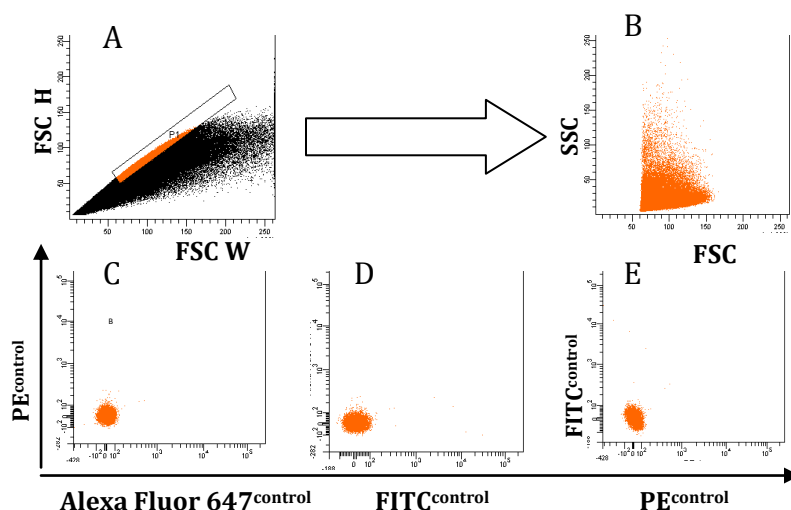


Figura 4. Selección de la población.

Representación de todos los tejidos a analizar y anticuerpos secundarios. (A) eliminación de los dobletes, (B) población en base a su SSC y FSC, (C, D y E) controles para determinar pegado inespecífico de los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647, FITC y PE respectivamente.

Una vez seleccionada la población, se procedió a evaluar la expresión de los marcadores CD172a (Figura 5B) y CADM1 (Figura 5 C) como control en todos los tejidos. Esto con el objetivo de localizar las zonas de las

subpoblaciones DC1 y DC2 previamente propuestas por Summerfield y colaboradores (2014a). Una vez obtenida la expresión de estos marcadores, se determinó el área positiva tanto para CADM1 y CD172a y poder realizar análisis de cada ganglio.

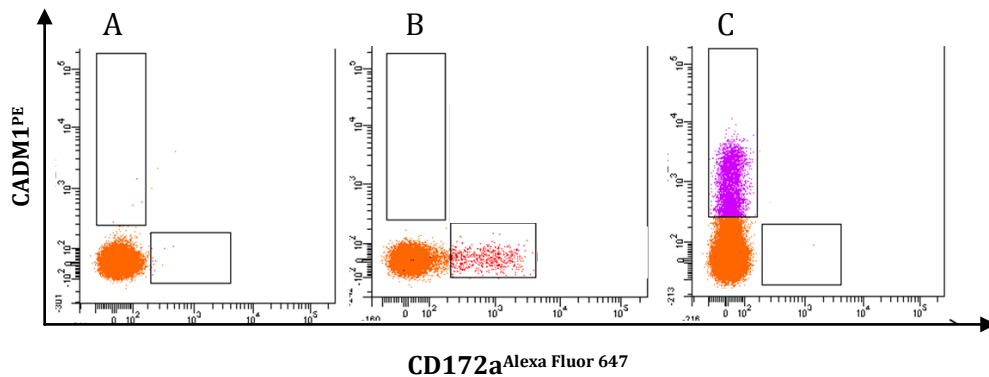


Figura 5. Imagen representativa de la expresión de CADM1 y CD172a en células de ganglios medistino.

Marcaje celular representativo de la localización de subpoblaciones según la propuesta de Summerfield y colaboradores (2014). (A) células sin marcar, (B) células marcadas con anti-CD172a, (C) células marcadas con anti-CADM1. Este marcaje representa un experimento independiente de un total de 3 con resultados similares.

La propuesta de Summerfield y colaboradores (2014a) para la clasificación de DCs en piel menciona la expresión de diversos receptores (CD172a, CADM1, CD163, CD1a, entre otros). Por otro lado, Marquet y colaboradores (2011) previamente habían demostrado la expresión de los mismos a excepción de CD1a. Ambos autores definen a las DCs como $CD172a^{pos} CADM1^{neg/low}$ para el caso de las DC1. Las DC2 se caracterizan por su fenotipo $CD172a^{neg} CADM1^{pos}$. El área de las células $CD172a^{+} CADM1^{-}$ (Figura 5 B), no es exclusivo de DCs ya que se ha reportado que los M ϕ expresan el receptor CD172a al igual que las DCs por ser de origen mieloides. Para validar que CADM1 no estaba presente en macrófagos, se marcaron macrófagos alveolares con la base CADM1 y CD14 (el cual se conoce su alta expresión en M ϕ).

De esta manera se comprobó que las células $CD14^+$ no expresan $CADM1^+$, lo que indica que las células $CD172a^+CADM1^+$ no son macrófagos (Figura 6 C). Por otra parte se marcaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) $CADM1$ con $CD4$ y $CADM1$ con $CD21$ para determinar si la población DC2 ($CD172a^-CADM1^+$) incluía linfocitos T $CD4^+$ o linfocitos B (Figura 6 A y B). Debido a lo anterior se realizó la siguiente propuesta para ganglios linfáticos, basándose en la expresión de los receptores $CADM1$ y $CD172a$ como base para la detección de las subpoblaciones de DCs en el cerdo (Figura 7).

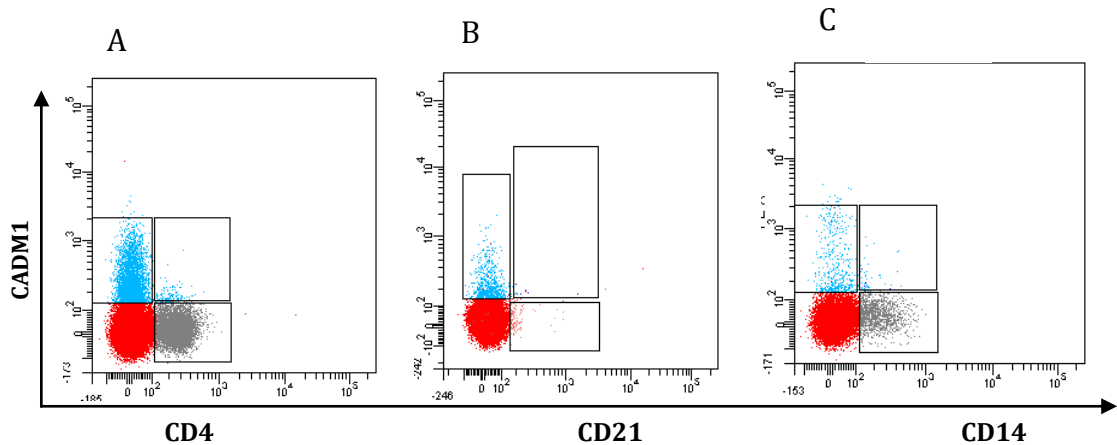


Figura 6. Imagen representativa de la expresión de $CADM1$ con $CD4$, $CD21$ y $CD14$. Para determinar si $CADM1$ está presente en otras células, se realizó un marcaje doble. (A) y (B) marcaje de PBMCs, (C) marcaje realizado en macrófagos alveolares. Este marcaje representa un experimento independiente de un total de 3 con resultados similares.

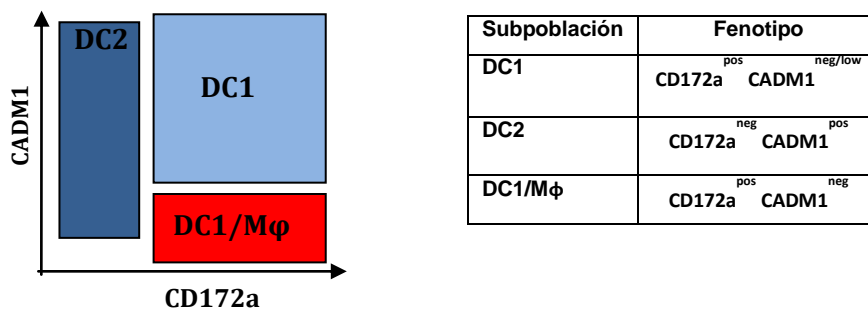


Figura 7. Esquema para la identificación de subpoblaciones de DCs. Con los resultados previos de caracterización de DCs en piel de cerdo (Marquet y cols., 2011; Marquet y cols., 2014; Summerfield y cols., 2014b) se propone la siguiente distribución para la población de células obtenidas de los ganglios linfáticos y piel de interés con la base de anticuerpos $CD172a$ y $CADM1$.

En la Figura 8 se muestra un experimento representativo de la expresión de los receptores de interés (CD172a y CADM1) en cada población de células de los diversos tejidos que fueron analizados. En la Tabla 1 se muestran las medias obtenidas y desviación estándar de los porcentajes obtenidos de cada tejido analizado.

Los ganglios mediastinal y retrofaríngeo mostraron una distribución y un porcentaje muy similar de las subpoblaciones DC1, DC2 y DC1/M ϕ ($P > 0.05$). En cuanto a la distribución de las subpoblaciones se puede observar una densa población en DC1 que está presente en ambos ganglios. La similitud de las poblaciones de ambos ganglios puede estar relacionada a la proximidad de los mismos, además del tránsito de antígenos por la misma área. En el caso del ganglio mesentérico, éste de igual manera muestra una distribución similar ($P > 0.05$) a los ganglios mencionados anteriormente. Sin embargo podemos notar la expresión de una subpoblación CD172a⁺ CADM1⁻ que no aparece en mediastinal y retrofaríngeo. En cuanto a la tonsila y el bazo, fueron los tejidos con mayor expresión y porcentajes en comparación con los otros tejidos, sin embargo no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$), las subpoblaciones de bazo se observan de una forma condensada y presentó diferencias significativas ($P < 0.05\%$) con la subpoblación DC2 de tonsila. Este último fue el único tejido donde la expresión de la subpoblación de DC1 fue inferior a 0.5%. Se puede apreciar la heterogeneidad de las subpoblaciones en cada uno de los ganglios analizados.

En el caso de la piel (Figura 8) se encontró una expresión diferencial al de los ganglios ($P < 0.05$) de la subpoblación DC1 en comparación con la DC1/M \emptyset . En cuanto a la distribución de la subpoblación DC1/M ϕ , se puede observar una población más densa en comparación con las CADM1⁺ que a su vez se observa una expresión más heterogénea y dispersa. La subpoblación DC1, presentó menor porcentaje de eventos, de manera similar que la tonsila.

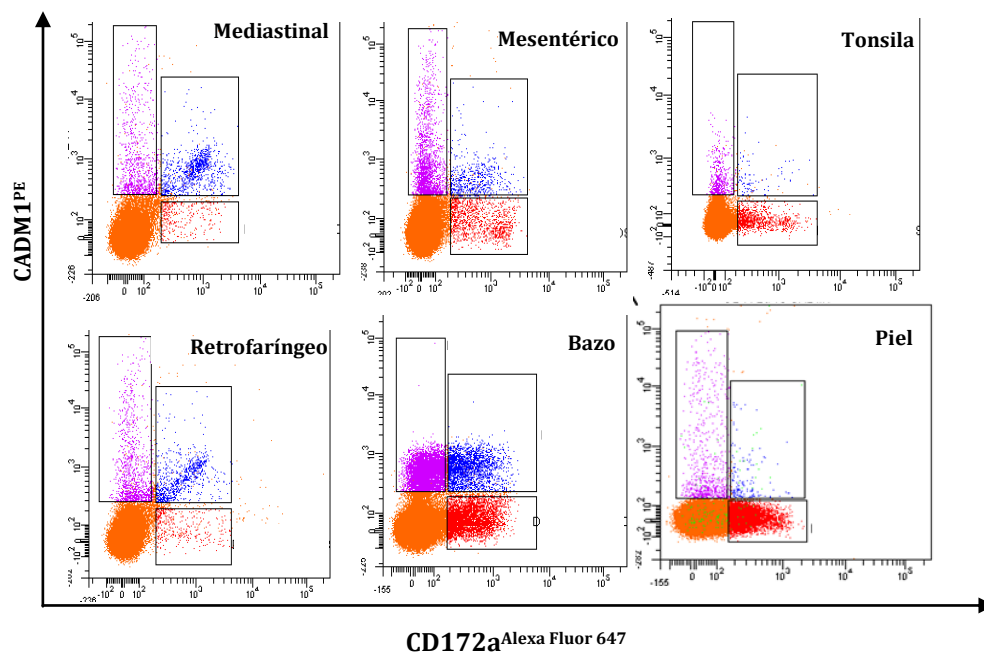


Figura 8. Imagen representativa de las subpoblaciones de DCs de diferentes tejidos. Los tejidos: Mediastinal, mesentérico, tonsila, retrofaríngeo, bazo y piel fueron analizados mediante la expresión de CD172a y CADM1. En ellos se puede observar la expresión de las subpoblaciones DC2, DC1 y DC1/Mφ como se representa en el esquema de la Figura 7. Esta gráfica representa un experimento independiente de 3 resultados similares.

Tabla 1. Frecuencia de las subpoblaciones de DCs en diferentes tejidos linfoides.

	MEDIASTINAL	MESENTÉRICO	TONSILA	RETROFARÍNCEO	BAZO	PIEL
DC1/Mφ	0.96%±0.72	0.67%±0.25	1.03%±0.6	1.45%±1.06	3.65%±4.17	6.85%± 4.0 ^a
DC2	1.4%±0.36	0.95%±0.3	0.36%±0.15	1.0%±0.52	3.1%±1.70 ^b	1.5%± 0.6
DC1	1.93±1.0	1.0±1.28	1.03%±1.61	1.86%±0.28	3.05±2.60	0.23%± 0.2

Los resultados representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, las medias se compararon por Tukey (P<0.05). ^a Diferencias en la subpoblación DC1/Mo con las DC1 de los tejidos, ^b diferencias en la subpoblación DC2 de tonsila y bazo.

Una vez identificadas las subpoblaciones de acuerdo a la clasificación propuesta, se determinó la expresión del receptor CD205 en cada una de ellas. Para esto se estableció un control de la población marcada con CADM1 en relación con la expresión de CD205. En la figura 9 se muestra la expresión de CD205 de cada tejido analizado, y en la tabla 2 sus medias y desviación estándar. Los ganglios mediastinal, retrofaríngeo no mostraron diferencias ($P > 0.05\%$) en la expresión de CD205, el mesentérico presentó diferencias entre subpoblaciones DC1/MØ y DC1 ($P < 0.05$), y DC1 con DC2 ($P < 0.05$) en la expresión de CD205. Los porcentajes en ganglio mediastinal y retrofaríngeo son muy similares y ambas presentaron mayor expresión de CD205 en las DC1 y DC1/Mφ. Mientras que bazo y tonsila presentan las mayores diferencias en la distribución en comparación con los tejidos evaluados. La tonsila fue el tejido que más porcentaje de DC1 presentó, sin embargo no se aprecia la distribución que presentan retrofaríngeo, mediastinal y mesentérico. Por último el bazo fue el tejido que menor expresión tuvo de la población DC1 (0.1%).

Por último, en la misma figura se puede observar que la expresión del receptor CD205 estuvo principalmente en las DC1, mientras que las subpoblaciones DC1/MØ y DC2 mostraron una distribución muy similar. De igual manera que en ganglios linfáticos se realizó un marcaje para ver la presencia de linfocitos B y linfocitos T CD4⁺ y conocer la expresión del receptor CD205 en estas. Como se ha reportado previamente (Marquet y cols., 2011) en piel de cerdo no se observan este tipo de células, lo cual concuerda con nuestros resultados (Figura 10). Además se pudo comprobar que no se encuentran macrófagos en este tejido mediante un marcaje sencillo de piel con un marcaje sencillo con anti-CD14 (Figura 10), lo cual era lo esperado.

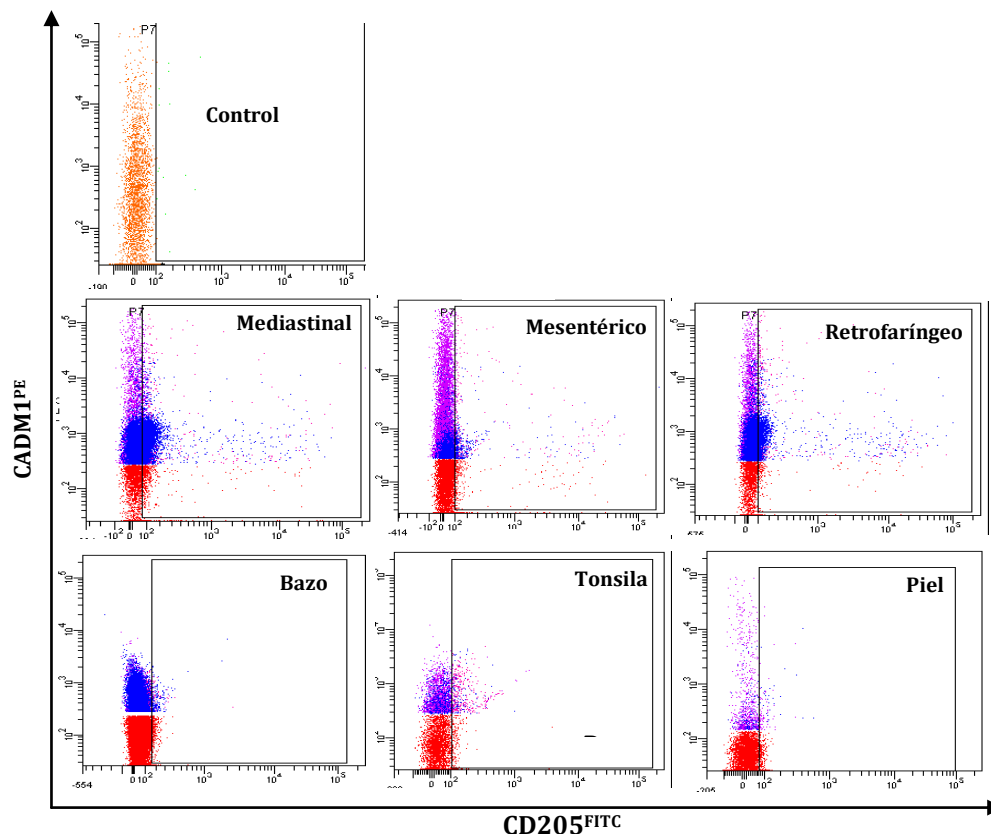


Figura 9. Expresión CD205 en diferentes subpoblaciones de DCs (DC1,DC2 y DC1/Mφ). Los tejidos: Mediastinal, mesentérico, tonsila, retrofaríngeo, bazo y piel fueron analizados mediante la base CADM1 y CD205.

Tabla 2. Expresión de CD205 en subpoblaciones de DCs (DC2, DC1 y DC1/Mφ) de piel, ganglios linfáticos y bazo.

Expresión CD205	MEDIASTINAL	MESENTÉRICO	TONSILA	RETROFARINGEO	BAZO	PIEL
DC1/Mφ	1.9%±2.55	0.77%±0.96 ^a	1.6%±1.91	0.43%±0.40	4.16%±6.87	1.0%± 1.22 ^c
DC2	2.16%±3.07	1.22%±0.85 ^b	2.63%±1.28	2.26%±3.26	5.2%±9.0	2.7%± 1.76 ^d
DC1	4.8%±7.11	7.9±5.16	13.96%±3.72	5.16%±8.51	0.1%±0.0	14.2%± 6.8

*Cada resultado representa la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía, las medias se compararon por Tukey (P<0.05). ^a Diferencias en la expresión de CD205 en las subpoblaciones DC1 y DC1/Mφ. ^b DC1 y DC2 son diferentes en mesentérico. ^c La subpoblación DC1/Mφ expresa CD205 diferente a DC1. ^d DC2 y DC1 son diferentes.

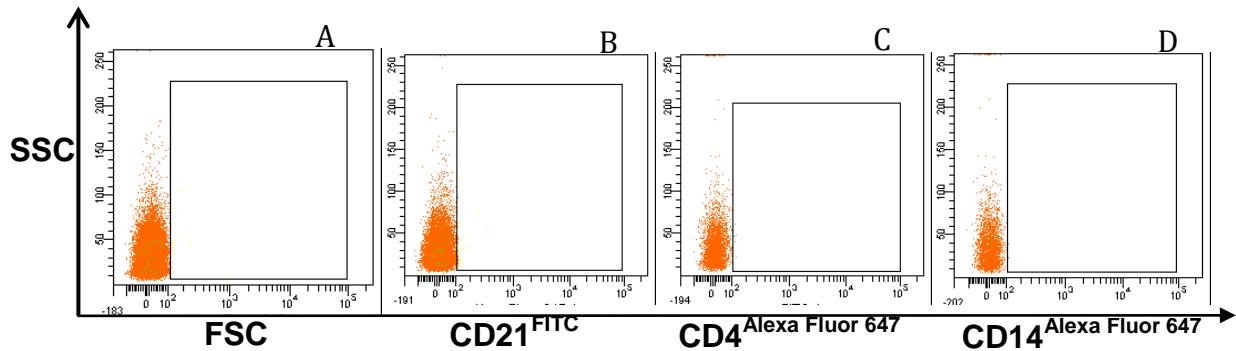


Figura 10. Marcaje sencillo de células de piel de cerdo con anti-CD21, CD4 y CD14. (A) células sin marcar con anticuerpos, (B) células marcadas con anti-CD21, (C) células marcadas con anti-CD4 y (D) células marcadas con anti-CD14.

6.2. Receptor CD205 en Linfocitos T y Linfocitos B

Debido a que CD205 se expresa en otro tipo de células como linfocitos B y linfocitos T (Gliddon y cols., 2004; Kato y cols., 2006), se realizaron marcajes dobles, CD21 con CD205 y CD4 con CD205. Se puede observar la expresión de los marcadores sencillos para linfocitos B (CD21), los cuales fueron utilizados como control (Figura 11 C). El anticuerpo CD4 fue analizado en marcaje para ver su expresión (Figura 11 G) y de igual manera la expresión de CD205 como control (Figura 11 B y 11 F). En la Tabla 3 se pueden apreciar las medias y desviación estándar de la expresión de estos marcadores en cada ganglio analizado. Para el caso de los marcajes dobles CD205 con CD21, podemos observar (Figura 11 D) que todos los linfocitos B expresan CD205. En cuanto a los linfocitos T CD4, en el marcaje sencillo se ve claramente la población positiva a este marcador (Figura 11 G). Mientras que en el marcaje doble CD4 con CD205 (Figura 11 H) vemos como una parte de esta población entra expresa CD205.

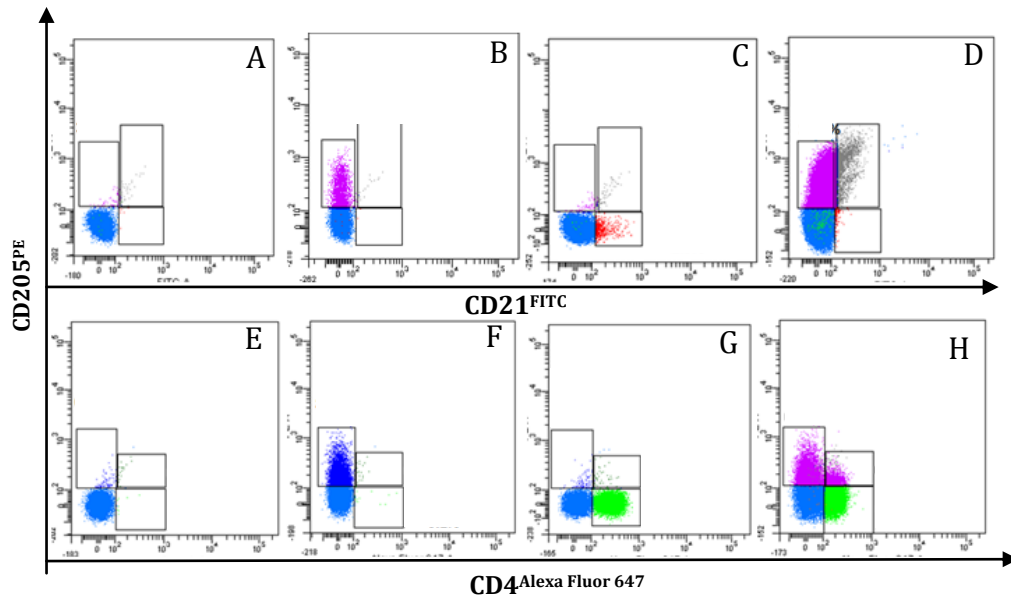


Figura 11. Expresión de CD205 en linfocitos B y linfocitos T CD4+

Se evaluó la expresión del receptor CD205 en linfocitos T CD4+ y linfocitos B mediante el marcaje CD4 con CD205 y CD21 con CD205 respectivamente. (A) Células sin marcar en base a PE y FITC, (B y C) marcaje sencillo de CD205 y CD21 respectivamente como control, (E) células sin marcar en base a PE y Alexa Fluor 647, (F y G) marcajes sencillos de CD205 y CD4 respectivamente y (D y H) marcajes dobles de CD205 con CD21 y CD205 con CD4 respectivamente.

Tabla 3: Expresión de CD205 en linfocitos B y T CD4⁺.

	MEDIASTINAL	MESENTÉRICO	TONSILA	RETROFARINGEO	BAZO
CD4	18.75%±6.7	40.9%±9.33	15.5%±7.49	32.% ±16.50	22.65%±6.29
CD21	3.25%±0.3	2.85%±0.4	1.7%±1.27	3.8%±3.9	2.2%±0.42
CD205	23.85%±2.3	24.9%±2.40	24.0%±2.26	20.4%±5.79	19.85%±6.0
CD4⁺CD205⁺	3.35%±3.2	2.8%±1.2	1.4%±1.3	2.75%±3.18	1.6%±1.97%
CD21⁺CD205⁺	1.1%±0.7	0.6%±0.4	0.8%±0.1	1.6%±1.83	0.6%±0.42

*Cada resultado representa la media ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

VII. DISCUSIÓN

Las DCs poseen diversas funciones que las ha catalogado como APCs profesionales del sistema inmune. Destaca la capacidad que poseen para activar linfocitos T vírgenes para la inducción de una respuesta inmune celular o humoral, además de ser capaces de generar tolerancia. Es por esto que se ha incrementado el interés en estudiarlas y por tal motivo es necesario caracterizarlas de una manera más específica que permita determinar funciones particulares de las diferentes subpoblaciones de DCs. La caracterización de células dendríticas en el cerdo ha permitido conocer el papel que estas juegan en el tejido específico del cual se están obteniendo. Mediante citometría de flujo se han caracterizado DCs de cerdo de piel, sangre, bazo, tonsila, ganglios linfáticos (Bautista y cols., 2002; Summerfield y cols., 2003; Jamin y cols., 2006; Marquet y cols., 2011; Marquet y cols., 2014; Summerfield y cols., 2014a;). Sin embargo, la falta de expresión de moléculas específicas en las DCs ha complicado la caracterización de las mismas y es por eso que aún se siguen proponiendo combinaciones de anticuerpos que sean lo más certeras posibles.

Recientemente se ha descrito la función de las subpoblaciones DC1, DC2 y CD14. Las primeras dos se han estudiado en piel de murino (CD103 y CD11b), humano (CD1 y CD141) y cerdo (Schlitzer y cols., 2014), mientras que la subpoblación CD14 recientemente se caracterizó en el cerdo (Marquet y cols., 2014). Las DC1 se caracterizan por la capacidad de diferenciación de linfocitos T CD4 y T CD8, mientras que las DC2 se caracterizan por realizar presentación cruzada y diferenciación de linfocitos T CD8 (Schlitzer y cols., 2014). En el caso del cerdo la subpoblación CD14 podría ser homóloga a las CD14 del humano (Marquet y cols., 2014).

En los resultados del presente estudio, para evitar resultados falsos positivos: primeramente se bloquearon las células destinadas para el marcaje con suero de cerdo. Posteriormente, se excluyeron los dobletes de la población de células en los marcajes triples para obtener un resultado certero de la expresión de los receptores (Misharin y cols., 2013). Con esto se pudo observar cómo se eliminaban poblaciones que en realidad no formaban parte de nuestros resultados.

Basándose en la principal definición de DCs, caracterizada por la alta expresión de MHC II, Marquet y colaboradores (2011) parten de esta característica para realizar su análisis con los anticuerpos CD172a y CD163. Estos receptores como se mencionó anteriormente han sido útiles para la caracterización parcial de DCs, sin embargo no son receptores exclusivos de estas células, ya que otro tipo de presentadoras como los macrófagos lo expresan. La caracterización de DCs mediante este marcaje, también fue realizado en 2014 para la caracterización de DCs en pulmón (López-Robles y cols., 2014). Sin embargo, en este estudio concluyen que no pueden asegurar que las APCs caracterizadas sean todas DCs debido a la inespecificidad de los anticuerpos para la caracterización de las mismas.

Una vez establecida la combinación CD172a y CADM1 para identificar posibles DCs en ganglios linfáticos pudimos observar la heterogeneidad y variabilidad de los resultados en cada uno de los tejidos analizados. En todos los tejidos analizados se obtuvo la expresión diferencial de las subpoblaciones, así como expresión diferencial de los marcadores. Se obtuvieron 3 subpoblaciones de posibles DCs en ganglios linfáticos las cuales nombramos como: DC1, DC2 y DC1/M ϕ , utilizando como base CD172a y CADM1. Este último propuesto por Summerfield y Marquet (Summerfield y cols., 2014b; Marquet y cols., 2011) debido a su expresión en DCs de ratón y

humano puede ser clave en la caracterización de DCs. Por otro lado la caracterización de DCs en piel y linfa aferente (Marquet y cols., 2011), prueba diversos receptores para la caracterización de las mismas, entre ellos CADM1. La expresión de este receptor es diferencial en las 3 subpoblaciones reportadas en dermis: (1) CD163⁻ CD172a⁻ CADM1⁺, (2) CD163^{high} CD172a⁺ CADM1^{+/-}, (3) CD163^{low} CD172a⁺ CADM1⁻. En nuestro caso, las 3 subpoblaciones reportadas en los diversos ganglios: (DC2) CD172a⁻ CADM1⁺, (DC1) CD172a⁺ CADM1^{low} y CD172a⁺ CADM1⁻ siguen el patrón de expresión de CADM1 pudiendo inferir que las DC2 pudieran estar relacionadas a la subpoblación 1 de Marquet mientras que las DC1 y DC1/Mφ pudieran expresar los mismos receptores que las subpoblaciones 2 y 3 respectivamente.

Para determinar la especificidad del CADM1, se probó con los marcadores CD21, CD14 y CD4 y así descartar que las APC: linfocitos B y macrófagos no expresan CADM1. En el caso del CD4 fue para descartar poblaciones de linfocitos T que pudieran expresar este receptor, sin embargo como se menciona anteriormente existen pDCs que expresan este receptor (Jamin y cols., 2006). En todos los casos CADM1 no fue expresado en ninguna de estas poblaciones. Por lo mismo se tiene una evidencia más que CADM1 pudiera ser un excelente marcador para la identificación de DCs en combinación con CD172a para la diferenciación de las subpoblaciones DC1 y DC2 que se caracterizan por la expresión de CADM1. Para el caso de la población DC1/Mφ que no expresa CADM1 es necesaria la adición de CD1a al marcaje para poder excluir posibles macrófagos (CD1a^{-/low}) de esta subpoblación (Summerfield y cols., 2014b).

En la propuesta realizada por Summerfield el MHC II no es clave en la caracterización de DCs. Mientras que en la caracterización de DCs de piel de cerdo (Marquet y cols., 2011; Marquet y cols., 2014) es el punto de partida. En el caso de los resultados reportados en nuestro trabajo para la caracterización de DCs en ganglios linfáticos, no hay un análisis de MHC II como punto de partida, sin embargo se analizó la expresión de MHCII en cada ganglio, pero siguiendo la propuesta de Summerfield es necesario la adición de otros receptores al marcaje como CD1a o CD163 en vez de MHC II para la caracterización de DCs.

El receptor CD163 (Summerfield y cols., 2014b) se expresa de manera diferencial en las DCs y es propuesto como base en la caracterización de DCs en piel (Marquet y cols., 2011). CD163 es necesario para identificar con mayor precisión las subpoblaciones de DCs en ganglios. Una estrategia de marcaje para citometría que contenga a éste daría una mayor precisión para la caracterización de las DCs con la base CD172a y CADM1. Es importante resaltar que es necesaria la realización de una prueba de funcionalidad una vez que se tengan completamente caracterizadas las DCs propuestas.

En el caso de la piel, como se mencionó anteriormente, se reportan 4 subpoblaciones de DCs (Marquet y cols., 2011) ($CD163^-CD172a^-$, $CD163^{high}CD172^+$, $CD163^+CD172a^+$ y $CD163^-CD172a^+$). En cada una de las subpoblaciones se evaluó CADM1 estando presente de manera heterogénea en las diversas subpoblaciones de la siguiente manera: $CD163^-CD172a^-CADM1^+$, $CD163^{high}CD172^+CADM1^{+/-}$, $CD163^+CD172a^+CADM1^-$ y $CD163^-CD172a^+CADM1^+$.

Para el presente trabajo sólo se evaluaron los anticuerpos CADM1 y CD172a como base, además del receptor CD205 para determinar su expresión en las subpoblaciones DC1, DC2 y DC1/CD14. La subpoblación DC2 se asemeja a los resultados obtenidos por Marquet, una población negativa a

CD172a que expresa el receptor CADM1, sin embargo se desconoce la expresión de CD163 donde se esperaría que fuera negativa. Para la población DC1/CD14 que es negativa a CADM1, se relaciona la subpoblación $CD163^+CD172a^+CADM1^-$, del mismo modo la expresión del receptor CD163 sería la clave para asegurar que se trata de esta subpoblación. En el caso de las otras 2 subpoblaciones ($CD163^{high}CD172^+CADM1^{+/-}$ y $CD163^-CD172a^+CADM1^+$) pudieran encontrarse en el cuadrante de las dobles positivas a CADM1 y CD172a (DC1).

La propuesta realizada por Summerfield (2014a) maneja el mismo fenotipo de Marquet y colaboradores (2011), sin embargo el propone a CADM1 en vez de CD163 para la caracterización de DCs debido a que este último se expresa en mayor cantidad en macrófagos dejando en duda si pertenecen o no a DCs. Las subpoblaciones propuestas por este autor están relacionadas a las de Marquet (2011), sin embargo la expresión de CADM1 difieren entre sí, pues la expresión de CADM1 es casi exclusiva de las DC2 mientras que las DC1 son $CADM1^{-/low}$. Por esta razón es importante realizar más pruebas a las subpoblaciones de células evaluadas donde se adicione al marcaje base (CADM1 y CD172a) el anticuerpo CD163 y pruebas de funcionalidad para la determinación de este grupo de DCs.

Se ha determinado de manera *in vitro* las capacidades que posee el receptor CD205 para el incremento de la presentación de antígenos en las DCs y por tal motivo se ha caracterizado en diversas especies. El receptor CD205 se ha caracterizado en el cerdo (Flores-Mendoza y cols., 2010) y posteriormente se produjo un anticuerpo anti-CD205 (Flores-Mendoza y cols., 2012) con el objetivo de conocer la expresión del receptor en diferentes tejidos del cerdo.

Además se ha reportado la expresión de CD205 en otro tipo de células como linfocitos B en bovinos (Gliddon y cols., 2004) y linfocitos T en humano (Kato y cols., 2006). Por tal motivo se realizaron marcajes para la identificación

de estos grupos de células con CD21 y CD4. Para el caso de las subpoblaciones de DCs en ganglios y bazo DC1, DC2 y DC1/Mφ, la expresión de CD205 fue similar en los ganglios linfáticos mediastinal, mesentérico y retrofaríngeo. Mientras que en la tonsila y bazo no se logró determinar la distribución de los mencionados anteriormente. La subpoblación DC1 fue la que presentó mayor expresión del receptor CD205 en cada uno de los de los tejidos a excepción del bazo donde fue nula, seguido de las DC2 (bazo fue el que más expresó DC2) y por último las DC1/Mφ donde la mayor expresión de CD205 fue en el bazo.

Debido a que los resultados obtenidos parten de una población total, los porcentajes son relativamente pequeños, sin embargo es importante mencionar que una vez definidas las subpoblaciones de DCs estas pueden purificarse con el objetivo de realizar una evaluación más precisa de los porcentajes de DCs y su expresión de CD205.

En el caso de la expresión del receptor CD205 en linfocitos B y T CD4⁺ se pudo observar la distribución de las subpoblaciones, lo cual concuerda con lo reportado para la expresión de linfocitos B (Gliddon y cols., 2004). Sin embargo, no se puede saber con certeza si todos los linfocitos B son CD205+, pues Gliddon y cols.,(2004) utilizan anticuerpos como el MHC-II que no es exclusivo de linfocitos B. En el humano se realizó un estudio para determinar la expresión del receptor CD205 en linfocitos B, donde los linfocitos B expresan en su totalidad dicho receptor al igual que los resultados mostrados en el presente trabajo. Para los linfocitos T CD4⁺ analizados podemos ver como solamente un pequeño porcentaje del total son CD4⁺CD205⁺, lo cual era lo esperado pues en el estudio realizado por Kato y colaboradores (2006), realizan un marcaje CD3 contra CD205 obteniendo células positivas a ambos marcadores y con una distribución muy similar entre sí. Sin embargo en nuestro estudio no se pudo realizar un marcaje más específico como el realizado por Kato para la determinación de la población de linfocitos (Anti-CD3) T en su totalidad y no

solamente los linfocitos T CD4⁺ ya que existe evidencia de pDCs que expresan CD4 (Summerfield y cols., 2000).

Los resultados obtenidos en piel brindan una ventaja en el avance para el direccionamiento de antígenos usando como base el receptor CD205, ya que en el caso de la piel se determinó la expresión de CD205 descartando macrófagos, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos B a diferencia de los ganglios linfáticos donde si están presentes. De este modo el resultado presentado se acerca más a la posible identificación de DCs que expresan CD205 en piel y que estas mismas subpoblaciones se encuentran en ganglios linfáticos. Además la ausencia de linfocitos B y T CD4⁺ positivos CD205 en piel da más probabilidad a que el antígeno sea captado por DCs CD205⁺ mediante una vacuna intradérmica. Aunque no se puede asegurar que las subpoblaciones DC2, DC1 y DC1/CD14 presentadas en este trabajo son exclusivamente dendríticas, es necesario realizar purificación de las subpoblaciones reportadas para analizar su funcionalidad. Los resultados obtenidos en este trabajo son parciales, sin embargo sientan las bases para la caracterización definitiva de las DCs.

VIII. CONCLUSIÓN

Con base en la propuesta de marcadores CD172a y CADM1 para la caracterización de DCs en ganglios linfáticos, bazo y piel, se pudieron diferenciar subpoblaciones de posibles DCs.

Se determinó la expresión del receptor CD205 en las subpoblaciones DC2, DC1 y DC1/Mφ, en las cuales se observó la expresión de CD205 en las mismas. Además se evaluó la expresión del receptor en linfocitos B y T CD4⁺ lo que permite conocer la expresión de este receptor en otro tipo de células, lo cual es un dato esencial para futuras aplicaciones como la elaboración de vacunas utilizando como base el direccionamiento de antígenos al receptor CD205. Sin embargo falta la realización de más estudios que puedan confirmarlo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Agrawal A., Gupta S. 2011. Impact of aging on dendritic cell functions in humans. *Ageing Research Reviews*. 10: 336-345.

Avalos A. M. y Ploegh H. L. 2014. Early BCR events and antigen capture, processing, and loading on MHC class II on B cells. *Frontiers in Immunology*. 5:1-5.

Badiee A., Davies N., McDonald K., Radford K., Michiue H., Hart D., Kato M. 2007. Enhanced delivery of immunoliposomes to human dendritic cells by targeting the multilectin receptor DEC-205. *Vaccine*. 25: 4757-4766.

Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y., Pulendran B. y Palucka K. 2000. Immunology of Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.

Barchet W., Cella M., Colonna M. 2005. Plasmacytoid dendritic cells—virus experts of innate immunity *Seminars in Immunology*. 17:253-261.

Bautista E. M., Gregg D., Golde W. T. 2002. Characterization and functional analysis of skin-derived dendritic cells from swine without a requirement for in vitro propagation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 88: 131-148.

Benwell R. K., Hruska J. E., Fritsche K. L., Lee D.R. 2010. Double stranded RNA- relative to other TLR ligand-activated dendritic cells induce extremely polarized human Th1 responses. *Cellular Immunology*. 264: 119-126.

Bimczok D., Sowa E.N., Faber-Zuschratter H., Pabst R., Rothkötter H.J. 2005. Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *European Journal of Immunology*. 35(5):1418-27.

Breathnach R. M., Fanning S., Mulcahy G., Bassett H. F., Jones B. R. 2008. A study of dendritic cell and MHC class II expression in dogs with immunomodulatory-responsive lymphocytic-plasmacytic pododermatitis. *The Veterinary Journal*. 177: 352-359.

Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M. C. y Steinman R. M. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor dec-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *The rockefeller university press*. 196 (12): 1627-1638.

Bozzacco L., Trumfheller C., Siegal F. P., Mehandru S., Markowitz M., Carrington M., Nussenzweig M. C., Piperno A. G. and Steinman R. M. 2007. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8⁺ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *PNAS*. 104 (4) 1289-1294.

Butler M., Morel A. S., Jordan W. J., Eren E., Hue S., Shrimpton R. E. y Ritter M. A. 2006. Altered expression and endocytic function of CD205 in human dendritic cells, and detection of a CD205–DCL-1 fusion protein upon dendritic cell maturation. *Immunology*. 120: 326-371.

Chan V.S.F., Nie Y.J., Shen N., Yan S., Mok M. Y., Lau C. S. 2012. Distinct roles of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. 11: 890-897.

Coconi-Linares N., Ortega-Dávila E., López-González M., García-Machorro J., García-Cordero J., Steinman R. M., Cedillo-Barrón L., Gómez-Lima M. A. 2013. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine*. 31: 2366-2371.

Drickamer K. 1999. C-Type lectin like domains. *Current Opinion in Structural Biology*. 9(5):585-90.

Do Y., Didierlaurent A. M., Ryu S., Koh H., Park C. G., Park S., Perlin D. S., Powell B. S., Steinman R. M. 2012. Induction of pulmonary mucosal immune responses with a protein vaccine targeted to the DEC-205/CD205 receptor. *Vaccine*. 30: 6359-6367.

Figdor C.G., Van Kooyk Y., Adema G.J. 2002 C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Natural Reviews Immunology*. 2(2):77-84.

Flores-Mendoza L., Sotelo-Mundo R. R., Dawson H., Mwangi W., Hernández J. 2010. Characterization of porcine CD205. *Developmental and Comparative Immunology*. 34:715-721.

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.

Gliddon D. R., Hope J. C., Brooke G. P. y Howard C. J. 2004. DEC-205 expression on migrating dendritic cells in afferent lymph. *Immunology*. 111: 262-272.

Guo M., Gong S., Maric S., Misulovin Z., Pack M., Mahnke K., Nussenzweig M.C. y Steinman R. M. 2000. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Human immunology*. 61:729-738.

Hopp A. K., Rupp A. y Lukacs-Kornek V. 2014. Self-antigen presentation by dendritic cells in autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 5:1-14.

Hume D. A. 2008. Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *The Journal of Immunology*. 181: 5829-5835.

Jamin A., Gorin S., Le Potier M. F., Kuntz-Simon G. 2006. Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114:224-237.

Jenkinson W. E., Nakamura K., White A. J., Jenkinson E. J., Anderson G. 2012. Normal T cell selection occurs in CD205-deficient thymic microenvironments. *Plos One*. 7:1-8.

Kato M., McDonald K. J., Khan S., Ross I. L., Vuckovic S., Chen K., Munster D., MacDonald K. P. A. y Hart D. N. J. 2006. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *International Immunology*. 18 (6): 857-869.

Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K. 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198–201

Linsley P.S., Brady W., Grosmaire L., Aruffo A., Damle N.K., Ledbetter J.A. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *The journal of experimental medicine*. 173(3):721-730

López-Robles G., Silva-Campa E., Burgara-Estrella A., Hernández J. 2015. Characterization of antigen-presenting cells from the porcine respiratory system. *Research in Veterinary Science*. 2-8.

Mair K.H., Sedlak C., Käser T., Pasternak A., Levast B., Gerner W., Saalmüller A. Summerfield A., Gerds V., Wilson H.L., Meurens F. 2014. The porcine innate immune system: An update. *Developmental and Comparative Immunology*. 45:321-343.

Mäkelä S. M., Österlund P., Julkunen I. 2011. TLR ligands induce synergistic interferon- β and interferon- λ 1 gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Molecular Immunology*. 48: 505-515.

Manicassamy S. y Pulendran B. 2011. Dendritic cell control of tolerogenic responses. *National Institutes of Health*. 241 (1):206-227.

Marquet F., Bonneau M., Pascale F., Urien C., Kang C., Schwartz-Cornil S., Bertho N. 2011. Characterization of Dendritic Cells Subpopulations in Skin and Afferent Lymph in the Swine Model. *Plos One*. 6: 1-8.

Marquet F., Thien-Phong Vu Manh, Maisonnasse P., Elh mouzi-Younes J., Urien C., Bouguyon E., Jouneau L., Bourge M., Simon G., Ezquerro A.,

Lecardonnel J., Bonneau M., Dalod M., Schwartz-Cornil I. y Bertho N. 2014. Pig skin includes dendritic cell subsets transcriptomically related to human cd1a and cd14 dendritic cells presenting different migrating behaviors and T Cell Activation Capacities. *The Journal of Immunology*. 1-11.

Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J. y Mortha A. 2013. The Dendritic Cell Lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed. *Setting National Institutes of Health*. 31: 1-48.

Misharin A. V., Morales-Nebreda L., Mutlu G. M., Budinger G. R. S., Perlman H. 2013. flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *american journal of respiratory cell and molecular biology*, 49(4), 503–510.

Moll H. 2003. Dendritic cells and host resistance to infection. *Cellular Microbiology*. 5 (8): 493-500.

Nierkens S., Tel J., Janssen E. y Adema G. J. 2013. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants?. *Trends in Immunology*. 34 (8): 361-367.

NOM-033-ZOO-1995, sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.

Owen J.L y Mohamadzadeh M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Frontiers of physiology*. 4: 159-167.

Petzold C., Schallenberg S., Stern J. N. H., y Kretschmer K. 2012. Targeted Antigen Delivery to DEC-205 + Dendritic Cells for Tolerogenic Vaccination. *The Diabetic Studies*. 9 (4): 305-318.

Radford K.J., Tullett K. M. y Lahoud M. H. 2014. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*. 27: 26-32.

Schlitzer A. y Ginhoux F. 2014. Organization of the mouse and human DC network. *Current opinion in immunology*. 26:90-9

Schmidt S. V., Nino- Castro A. C. y Schultze J. 2012. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune. *Activation. Frontiers in Immunology*. 3 (274): 1-17.

Shrimpton R. E., Butler M., Morel A. S., Eren E., Hue S. S., Ritte M. A. 2009. CD205 (DEC-205): A recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Molecular Immunology*. 46: 1229-1239.

Steinman RM y Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 137: 1142-1162

Suchánek O., Podrazil M., Fischerová B., Bocínská H., Budínský V., Stejskal D. Špíšek R., Bartunková J., Kolář P. 2010. Intensive physical activity increases peripheral blood dendritic cell. *Cellular Immunology*. 266: 40-45.

Summerfield A., Guzylack-Piriou L., Schaub A., Carrasco C.P., Tâche V., Charley B., McCullough K.C. 2003 Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. *Immunology*. 110(4):440-9.

Summerfield A., McCullough K. C. 2009. The porcine dendritic cell family. *Developmental and Comparative Immunology*. 33: 299-309.

Summerfield A., Auray G. y Ricklin M. 2014a. The immunology of the porcine skin and its value as a model for human skin. *Molecular Immunology*. 1-8.

Summerfield A., Meurens F., Ricklin M. E. 2014b. Comparative Dendritic Cell Biology of Veterinary Mammals. *Review In Advance*. 7.1:7.25.

Tan J. K. H. y O'Neil H. C. 2005. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *Journal of Leukocyte*

Truckenmiller M. E., Bonneau R. H., Norbury C. C. 2006. Stress presents a problem for dendritic cells: Corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. *Brain, Behavior, and Immunity*. 20: 210-218.

Vázquez M. B., Sureda M. y Rebollo J. 2012. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*. 31(1):21-30. Vliet S.J., Liempt E., Geijtenbeek T.B.H., Kooyk Y. 2006. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology*. 211:577-585.

Yao, Y., Li, P., Singh, P., Thiele, A. T., Wilkes, D. S., Renukaradhya, G. J., Chang, C.-H. 2007. Vaccinia virus infection induces dendritic cell maturation but inhibits antigen presentation by MHC class II. *Cellular Immunology*. 246(2): 92–102.

Waite J.C., Skokos D. 2012. Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *International Journal of Inflammation. Biology*. 78: 319-324.

