



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR *IN VITRO* DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS OBTENIDAS A PARTIR DE MÉDULA
ÓSEA DE POLLO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

VANESSA DELGADO GUZMÁN

ASESOR:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS MARCOS CAJERO JUÁREZ

CO-ASESOR:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS ROSA ELVIRA NUÑEZ

ANITA

Morelia, Michoacán, enero 2015

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor a mis padres que han hecho todo en la vida para que yo pueda lograr mis sueños, por brindarme todo su apoyo, consejos, comprensión, por sus valores, principios que me han ido formando en la vida, a ustedes por siempre mi corazón y agradecimiento.

Isaías y Evangelina

A mi hermana, por su paciencia y comprensión, por el apoyo brindado durante mi vida, por las experiencias que hemos vivido juntas, por tus consejos, confianza y compañía, con todo mi cariño gracias.

Jenny

A ti, por permitir llegar a tu vida, por todos los momentos que he compartido a tu lado, por todo el apoyo que me has brindado, tus consejos, tu comprensión, con todo mi amor gracias.

Hernán

A mis abuelitos, que siempre me brindaron sus consejos, por compartirme sus experiencias, y apoyarme durante mi vida, de corazón gracias.

Soledad†, Margarita†, Salud, Salvador†, Gelasio†, Luis†

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y a la Facultad de Químico Farmacobiología por permitir aportar a mi vida una etapa más en mi preparación académica, por todos los conocimientos adquiridos durante mi licenciatura, gracias.

A la Dra. Rosa Elvira Nuñez, a quien agradezco su gran apoyo brindado, por su confianza, amabilidad, paciencia, por todos los conocimientos que me ha aportado, su gran amistad y sus consejos que me han ayudado mucho en mi vida, gracias.

Al Dr. Marcos Cajero, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por confiar en mí, por su paciencia, comprensión, por su amistad, por el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio, por todos los conocimientos que ha aportado en mi formación, gracias.

Al Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ y a los integrantes del Cuerpo Académico de Microbiología y Genética Molecular, por ser parte de su equipo de trabajo, por su amistad y apoyo brindado.

A mis revisores de tesis: maestra Rebeca Tinoco y los doctores Rafael Ortiz, Alejandro Bravo, Javier Oviedo y Juan José Valdez, que gracias a ellos pude mejorar este trabajo, por el tiempo brindado durante la revisión, por su paciencia, apoyo y sugerencias.

A mis profesores: Octavio†, Santos, Martha, Teresita, Tomás†, Victor, Diego, José Rubén, Francisco, Macrina, Claudia, Rosalio, Carlos, Sandra, y a cada uno que en este andar por la vida, influyeron con sus enseñanzas y experiencias en mi formación, gracias.

Al Centro de Capacitación y Desarrollo para la Juventud No.1, CECADEJ-1, gracias a la experiencia vivida, enseñanzas, amistades y hermosos recuerdos, que con mucha alegría comparto día a día.

A mi tía Bernardina, por su apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida, por ayudar a mi madre, por siempre mi agradecimiento. A mis tios: Antonio, Sara, Eva, José, Elias, Guadalupe, Sivilino, Juan, Celia, Hiram, Josue, Filiberto†, Ignacio, Graciela, a mis tías las chicas y a cada uno que me han dado consejos durante mi vida y que han estado a mi lado, gracias.

A mis primos: Yadira, Noemi, Iván, Alejandra, Jazmin, Manuel, Angélica, Gema, Sergio, Emiliano, Roberto, Victor, Gabriel, Guillermo, y a todos los que me han dado su apoyo, gracias por su atención, consejos y por su agradable compañía.

A mis amigos: Yaquelin, Jessica, Ma. Guadalupe, Reina, Mónica, Araceli, Adaneli, Edwin, Iván, Andrés, Gerardo, Arturo, Dario, Alfredo, Miguel, Gabriel, Esteban, que siempre me han animado a seguir adelante, que me han brindado su bella amistad durante todas las etapas de mi vida, tanto académica y personal, gracias por todo.

A mis amigos del laboratorio: Raúl, Araceli, Ramón, Irum, Karla, así como compañeros y amigos del módulo 2 y 4, por su ayuda, paciencia, comprensión, amistad durante esta etapa de mi vida, gracias.

A todas las personas que me han brindado su apoyo en la ciudad de Morelia, Uruapan y Tacámbaro Michoacán, gracias.

Gracias a Dios por permitirme llegar a esta etapa tan importante de mi vida, por darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo del camino. A mis padres, hermana y familia que siempre me han apoyado en la realización de mis sueños, consejos, palabras de aliento que me levantan, porque siempre podré contar con ustedes, de corazón gracias por todo...

Vanessa Delgado Guzmán

El presente trabajo fue realizado en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la tutoría del Dr. Marcos Cajero Juárez y la co-tutoría de la Dra. Rosa Elvira Nuñez Anita. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Donativo otorgado por Fondos Mixtos, CONACyT- Gobierno del Estado de Michoacán.

Vanessa Delgado Guzmán fue apoyada por la Beca-Tesis de FOMIX-Michoacán, MICH-2012-CO5-197785 y la Beca de Titulación 2014 del Sistema Único de Beneficios de Educación Superior.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla cueste lo que cueste”.

Marie Curie; Premio Nobel Física y Química

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. EL SISTEMA INMUNE.....	6
1.2. INMUNIDAD INNATA.....	7
1.2.1. Barreras físicas, químicas y péptidos antimicrobianos.....	8
1.2.2. Células fagocíticas.....	8
1.2.3. Proteínas sanguíneas.....	8
1.2.4. Citocinas.....	8
1.2.5. Receptores en la inmunidad innata.....	8
1.3. INMUNIDAD ADAPTATIVA.....	9
1.3.1. Inmunidad humoral.....	10
1.3.1.1. Interacción antígeno-anticuerpo.....	11
1.3.1.2. Estructura de los anticuerpos.....	11
1.3.1.3. Especificidad.....	12
1.3.1.4. Diversidad.....	12
1.3.1.5. Anticuerpos monoclonales y policlonales.....	12
1.3.1.6. Maduración de la afinidad.....	13
1.3.1.7. Funciones de los anticuerpos.....	13
1.3.2. Inmunidad celular.....	14
1.4. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE.....	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Células dendríticas.....	15
2.2. Origen de las células dendríticas.....	16
2.3. Características de las células dendríticas.....	17
2.4. Tipos de células dendríticas.....	21
2.5. Usos y aplicaciones de las células dendríticas.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26

5. OBJETIVO GENERAL	26
6. OBJETIVOS PARTICULARES	26
7. MATERIALES	26
7.1. Material biológico	26
7.1.1. Animales	26
7.2. Citocinas.....	26
7.3. Antígenos	26
7.4. Oligonucleótidos	27
8. METODOLOGÍA	27
8.2. Cultivo celular	28
8.3. Diferenciación y maduración de DCs de pollo	28
8.3.1. Protocolo de 3 días	28
8.3.2. Protocolo de 7 días	29
8.4. Maduración de DCs con diferentes antígenos.....	30
8.5. Proliferación de células precursoras de DCs de pollo.....	30
8.6. Caracterización morfológica de las DCs	30
8.7. Extracción de RNA total de las DCs.....	30
8.8. Obtención del cDNA de las DCs (Retrotranscripción).	30
8.9. Amplificación por PCR de genes de las DCs.....	31
9. RESULTADOS	32
9.1. Aislamiento de las DCs de pollo	32
9.2. Maduración de las DCs con diferentes antígenos	33
9.3. Proliferación de células precursoras de DCs.....	34
9.4. Extracción de RNA de las DCs maduras e inmaduras	35
9.5. Amplificación por PCR de genes de las DCs de pollo.....	36
10. DISCUSIÓN	38
11. CONCLUSIONES	43
12. BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXO	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Origen y diferenciación de subtipos de DCs en humanos.....	17
Fig. 2. Características fenotípicas y funcionales de las DCs durante la maduración.....	19
Tabla.3. Marcadores fenotípicos y funcionales de las células del sistema inmune en humanos....	20
Fig. 4. Diferenciación y maduración <i>in vitro</i> de DCs.....	22
Fig. 5. Estimulación de linfocitos T por DCs en la presentación de antígeno.....	23
Fig. 6. Esquema de diferenciación y maduración de DCs de pollo <i>in vitro</i> basada en dos protocolos.....	29
Fig. 7. Morfología de células de MO de pollo cultivadas.....	32
Fig. 8. Maduración de DCs de pollo usando diferentes antígenos.....	33
Fig. 9. Maduración <i>in vitro</i> de DCs con diferentes antígenos.....	34
Fig. 10. Proliferación de células precursoras de DCs con y sin suplementación de citocinas.....	35
Fig. 11. RNA total de DCs de pollo.....	36
Fig. 12. Amplificación por PCR del gen <i>GAPDH</i> y del factor de transcripción <i>Zbtb46</i>	37

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo (del inglés, Antibody)
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
Ag	Antígeno (Antigen)
APC	Célula presentadora de antígeno (Antigen-presenting cell)
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine serum albumin)
CCR7	Receptor de quimiocina tipo 7 (Chemokine receptor type 7)
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation)
CD40L	Ligando CD40 (CD40 ligand)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDP	Progenitor común de células dendríticas (Common progenitor of dendritic cells)
CTL	Linfocito T citotóxico (Cytotoxic T lymphocyte)
CMF	Progenitor común mielóide (Common myeloid progenitor)
CO ₂	Dióxido de carbono
CpG	Oligodeoxinucleótido
DC	Célula dendrítica (Dendritic cell)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dinucleótidos trifosfatados (Deoxynucleotide triphosphates)
Fc	Fragmento cristalizante del anticuerpo (Fragment crystallizable)
FcR	Receptor de Fc (Fragment crystallizable receptor)
Flt3	Receptor tirosina quinasa tipo 3 (Receptor-type tyrosine-protein kinase 3)
GAPDH	Gliceraldehído 3- fosfato-deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito/monocito (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)

GP5	Proteína viral de PRRSV
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
KCl	Cloruro de potasio
LPS	Lipopolisacárido
M	Molaridad o concentración molar
mAb	Anticuerpo monoclonal (Monoclonal antibody)
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad (Major histocompatibility complex)
M-CSF	Factor estimulante de colonias macrófago (Macrophage colony-stimulating factor)
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Médula ósea
moDC	Célula dendrítica mieloide (Myeloid dendritic cell)
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio dibásico
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
NK	Célula asesina natural (Natural killer cell)
nm	Nanómetro
pAb	Anticuerpo policlonal (Polyclonal antibody)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen associated molecular patterns)
pb	Par de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos (Phosphate buffered saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide (Plasmacytoid dendritic cell)
pH	Potencial de hidrógeno

pM	Picomolar
Pre-moDC	Pre-célula dendrítica mieloide (Pre-myeloid dendritic cell)
Pre-pDC	Pre-célula dendrítica plasmocitoide (Pre-plasmacytoid dendritic cell)
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptor)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SI	Sistema inmune
TBE	Tris/Borato/EDTA
TGF	Factor de crecimiento transformante (Transforming growth factor)
Th	Célula T cooperadora (T helper cell)
TLR	Receptor tipo Toll (Toll-like)
TNF	Factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor)
Treg	Linfocito T regulador
UFC	Unidad formadora de colonias (Colony forming unit)
µg	Microgramo
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
Zbtb46	Factor de transcripción dedos de zinc de DCs de pollo (Transcription factor zinc finger chicken DCs)

RESUMEN

El sistema inmune es una red compleja de moléculas, células, tejidos y órganos que trabajan en conjunto para proteger al organismo de agentes extraños (antígenos): como virus y bacterias, los cuales pueden resultar dañinos para el organismo, generando infecciones virales, microbianas, cáncer o enfermedades autoinmunes.

Los antígenos necesitan ser procesados y presentados por células presentadoras de antígeno (APCs), y finalmente pueden ser reconocidos por células efectoras específicas. Las células dendríticas (DCs, del inglés, Dendritic cells) son APCs profesionales y poseen paralelamente la capacidad de estimular a los linfocitos T. Actualmente hay evidencias de que las DCs también pueden activar a los linfocitos B y a las células NK.

En el presente trabajo se aislaron células precursoras de DCs a partir de médula ósea de pollo, se llevó a cabo su diferenciación *in vitro*, bajo condiciones de cultivo establecidas por 3 y 7 días, con el uso de citocinas GM-CSF e IL-4. El procedimiento consistió en inducir la maduración de las DCs con los antígenos: LPS, bacterias *Escherichia coli* y el péptido viral GP5. Se realizó la caracterización morfológica y molecular de las DCs de pollo, donde se identificó la expresión del factor de transcripción Zbtb46 específico de DCs.

La obtención de DCs *in vitro* se ha vuelto una herramienta de gran utilidad en Inmunología, debido a la función que éstas han demostrado en la respuesta inmune y por ello son un blanco fundamental como herramienta para la generación de vacunas, que en un futuro pueden ser de utilidad en la terapia contra el cáncer, y/o enfermedades infecciosas. Paralelamente las DCs pueden emplearse en la generación de anticuerpos monoclonales recombinantes, mediante el uso de la técnica de Phage Display para obtener anticuerpos específicos de antígeno con alta afinidad.

ABSTRACT

The immune system is a complex network of molecules, cells, tissues and organs that work together to protect the body from foreign agents (antigens) such as viruses and bacteria, which may be harmful to the body and generate viral and microbial infections, cancer or autoimmune diseases.

Antigens must be processed and presented by antigen-presenting cells (APCs) so they can be recognized by specific effector cells. Dendritic cells (DCs) are APCs that are able to stimulate T lymphocytes. Current evidence shows that DCs can also activate B lymphocytes and NK cells.

In the current work DCs precursor cells were isolated from chicken bone marrow and *in vitro* differentiation was carried out with 3 and 7-day cultures using cytokines GM-CSF and IL-4. In this process, LPS, *Escherichia coli* bacteria and viral peptide GP5 were used to induce the maturation of the DCs. Later, morphological and molecular characterizations were performed and identified the expression of transcription factor Zbtb46 specific to DCs.

In vitro obtaining of DCs has become a useful tool in immunology because of their function in the immune response and are therefore a key tool for generating vaccines that may be useful in the future for cancer therapy and/or infectious diseases. DCs can also be employed to generate recombinant monoclonal antibodies using the Phage Display technology to obtain high affinity antigen specific antibodies.

Keywords: Immune system; antigens; APCs; dendritic cells; Zbtb46.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL SISTEMA INMUNE

La Inmunología es el estudio de los mecanismos que los animales superiores usan para defenderse de la invasión de agentes extraños (microorganismos y/o sustancias), denominados en forma general como antígenos (Ags) (Parham, 2009). Esta disciplina surgió cuando se observó que los individuos recuperados de ciertos trastornos infecciosos quedaban protegidos contra la enfermedad. El término latino *immunis*, que significa “exento” es el origen de la palabra inmunidad, que se refiere al estado de protección contra enfermedades infecciosas (Kindt *et al.*, 2007).

El sistema inmune (SI) surge como parte de la evolución para proteger a los organismos multicelulares de diversos agentes, este sistema es muy adaptable además de que reconoce y elimina de manera específica invasores extraños (Kindt *et al.*, 2007). El SI consta de diferentes tipos celulares, tejidos y órganos, así como de productos moleculares que protegen de los patógenos (bacterias, virus y parásitos) que habitan en el medio ambiente externo (Cooper, 2001). El SI también es capaz de defender a los organismos al provocar una respuesta ante una molécula o microorganismo (infeccioso o no). En contraparte, estos mecanismos que normalmente protegen, en algunas circunstancias son capaces de provocar una lesión tisular y/o una enfermedad, lo cual sucede cuando el SI no logra reconocer entre lo propio y lo extraño, puede conducir a enfermedades autoinmunes (Ray, 2013).

El surgimiento de las áreas del conocimiento como la Inmunología y el descubrimiento de las vacunas están estrechamente vinculados. El descubrimiento, desarrollo y uso apropiado de las vacunas sigue siendo un reto para los inmunólogos en la actualidad. Desde los años sesenta, nuestros conocimientos acerca del SI y sus funciones han experimentado una notable transformación. Los avances alcanzados en las técnicas de cultivo celular, la inmunoquímica, los procedimientos de recombinación del DNA, la cristalografía y la creación de animales con alteraciones genéticas, han hecho que la Inmunología dejara de ser una ciencia eminentemente descriptiva para convertirse en otra

capaz de explicar los diversos fenómenos inmunitarios en términos estructurales y bioquímicos. La Inmunología no se limita a las investigaciones sobre el SI de ratones y seres humanos. Históricamente, los estudios sobre otras especies, han contribuido en gran medida al desarrollo de la comprensión inmunológica. Entre estas otras especies, las aves han proporcionado un modelo de un valor incalculable para la investigación de los mecanismos inmunológicos básicos, donde también han desempeñado un papel crucial en el desarrollo de vacunas (Davison *et al.*, 2008).

En 1916 por primera vez se comprobó en modelos aviares el tema del rechazo de los trasplantes en la membrana corioalantoidea de embriones, además de poner en claro el hecho de la existencia de dos poblaciones separadas de linfocitos, los linfocitos B provenientes de la bolsa de Fabricio y los linfocitos T dependientes del Timo. En 1950 se aceptó que existían dos tipos de respuesta inmune: Humoral, mediada por anticuerpos (Abs) y Celular mediada por macrófagos y linfocitos. El desarrollo y maduración de los linfocitos B dentro de la bolsa son esenciales para desarrollar el repertorio de Abs. La conversión génica que es el mecanismo por el cual se genera la diversidad de las inmunoglobulinas fue descubierta en el pollo (Davison *et al.*, 2008).

Los efectos perjudiciales de las infecciones microbianas dirigen a la evolución de una variedad de mecanismos de defensa. En vertebrados, hay dos tipos de defensa: inmunidad innata y la inmunidad adquirida. La principal distinción entre estos, son los tipos de receptores usados para reconocer patógenos (Medzhitov, 2007).

1.2. INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o espontánea) representa la primera línea de defensa frente a patógenos, proporcionando componentes celulares y bioquímicos presentes incluso antes del inicio de la infección y preparados para responder con rapidez una vez que se produce la infección.

Los principales componentes de la inmunidad innata son los siguientes:

1.2.1. Barreras físicas, químicas y péptidos antimicrobianos

Epitelios (la piel, el tracto gastrointestinal y tracto respiratorio), y las sustancias antimicrobianas formadas en sus superficies, enzimas digestivas y el pH. Así como los péptidos antimicrobianos que son moléculas clave en la inmunidad innata; tales como defensinas, catelicidinas, histatinas, etc.

1.2.2. Células fagocíticas

Estos tipos de fagocitos son reclutados hacia los sitios de infección para reconocer microorganismos patógenos mediante algunos tipos de receptores, en la sangre y en los tejidos extravasculares e iniciar la respuesta para destruirlos. Los neutrófilos son las células clave en la contención de la infección. Es importante hacer notar que las células dendríticas responden a patógenos para producir citocinas que reclutan leucocitos e inician la respuesta inmune innata y adaptativa (Beutler, 2004).

1.2.3. Proteínas sanguíneas

Factores del sistema del complemento, donde algunas proteínas están asociadas a la defensa contra patógenos, las cuales opsonizan los microorganismos para la fagocitosis, estimulan la inflamación y finalmente destruyen el patógeno.

1.2.4. Citocinas

La citocinas son glicoproteínas con efecto pleitrópico, por lo que son esenciales para controlar y coordinar las células inmunes en la respuesta inmune innata y adaptativa, así como durante el desarrollo y la homeostasis (Kaiser, 2010). Se debe considerar que no son únicamente producidas por las células del SI, y que el efecto no sólo actúa sobre ellas.

1.2.5. Receptores en la inmunidad innata

Las células del SI expresan varios receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los cuales son considerados un componente esencial para la supervivencia del microorganismo. Hasta la fecha hay varias clases de PRRs como los receptores tipo Toll, (TLRs), éstos están presentes en las células dendríticas. Los PRRs reconocen varios PAMPs en varios compartimentos celulares y desencadenan la liberación de citocinas inflamatorias e interferones tipo I para la defensa del hospedero. Además las respuestas del SI innato son importantes no solo para eliminar patógenos sino también para desarrollar la inmunidad

adaptativa en patógenos específicos, que esta mediada por linfocitos B y T (Kumar *et al.*, 2009).

A diferencia de la inmunidad innata, hay otras respuestas inmunitarias que son estimuladas por la exposición a los microorganismos infecciosos, cuya magnitud y capacidad defensiva crece con cada exposición sucesiva a un microorganismo concreto. Dado que esta forma de inmunidad aparece como respuesta a una infección y se adapta a ella, recibe el nombre de inmunidad adaptativa (Kindt *et al.*, 2008).

1.3. INMUNIDAD ADAPTATIVA

El SI adaptativo tiene la capacidad de reconocer una gran cantidad de sustancias extrañas y las reacciones que ocurren frente a ellas. Además posee dotes extraordinarios para distinguir entre los distintos microorganismos y moléculas, incluso los muy afines entre sí y por esta razón también recibe el nombre de inmunidad específica. A veces se le adjudica el nombre de inmunidad adquirida para poner en manifiesto que las potentes respuestas protectoras se adquieren por la experiencia.

Los principales componentes del SI adaptativo incluyen un tipo de proteínas del suero llamadas inmunoglobulinas (Igs) o anticuerpos (Abs) y un tipo de células de la sangre llamadas linfocitos. En cambio, las sustancias ajenas que suscitan una respuesta inmunitaria específica o que constituyen el blanco de tales respuestas son conocidos como Ags (Abbas, 2008). Los Ags son agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos, parásitos), o sustancias no infecciosas del medio ambiente (polen, abejas, comida) así como drogas, vacunas, transfusiones o trasplante de tejidos (Huether *et al.*, 2011).

La activación de los linfocitos T está comandada por células presentadoras de antígenos, como: macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (DCs). Las DCs son las APCs profesionales, actúan como centinelas en tejidos que se encuentran constantemente expuestos a patógenos, como en piel, mucosas, cumpliendo la función estratégica de captura y presentación de antígenos bacterianos o virales a linfocitos T. Una vez capturado el antígeno, las DCs tienen la propiedad única de activar a los linfocitos T virgen (CD4⁺ y

CD8⁺) necesarios para dar inicio a la inmunidad celular contra el agente patógeno (Iruretagoyena, 2005).

1.3.1. Inmunidad humoral

La inmunidad adaptativa, se divide en inmunidad humoral e inmunidad celular, en las que intervienen componentes diferentes del SI y que sirven para eliminar microorganismos patógenos de distintos tipos (Abbas, 2008). Los Abs reconocen los Ags microbianos, neutralizan a los microorganismos o sus productos (toxinas bacterianas) y los marcan como una diana para su eliminación por diversos mecanismos efectores.

Un Ab o Ig es una glicoproteína del suero producida por las células plasmáticas que maduran de los linfocitos, llamados linfocitos B, en respuesta a un Ag (Huether *et al.*, 2011). Los Abs pueden aparecer en dos formas: los Abs unidos a la membrana sobre la superficie de los linfocitos B, que actúan como receptores para los Ags y los Abs secretados que residen en la circulación, los tejidos y las localizaciones mucosas (Abbas, 2008).

Mientras que los componentes de la inmunidad innata están programados para el reconocimiento de patrones moleculares y por tanto identifican características compartidas por grupos de moléculas extrañas, las moléculas de Ab y las de receptor de linfocito T exhiben un mayor grado de especificidad, al reconocer determinantes antigénicos o epítomos específicos. Un epítomo es una porción de un antígeno a la que reconoce y se une un anticuerpo o los receptores de los linfocitos T y B (Kindt *et al.*, 2007).

En general, la población de Abs producidos en respuesta a un estímulo antigénico específico es heterogénea. La mayoría de los Ags es estructuralmente compleja y contiene muchos epítomos distintos y el SI suele reaccionar produciendo Abs contra varios de los epítomos presentes en el Ag. En otras palabras, varias clonas distintas de linfocitos B son estimuladas y proliferan. La producción de las células plasmáticas de una misma clona de linfocitos B es un mAb que se une de manera específica a un mismo determinante antigénico. Juntos, los productos secretados por todas las clonas de linfocitos B estimuladas; grupo de mAbs, constituyen la respuesta de Abs séricos policlonales y heterogéneos a un Ag inmunizante (Kindt *et al.*, 2007).

1.3.1.1. Interacción antígeno-anticuerpo

La interacción antígeno-anticuerpo es una relación macromolecular parecida a la interacción enzima-sustrato, con una diferencia importante: no conduce a una alteración química irreversible en el Ab ni en el Ag. La relación entre un Ab y un Ag incluye varias interacciones no covalentes entre el determinante antigénico, o epítipo, del Ag y los dominios de región variable (VH/VL) de la molécula del Ab, en particular las regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (RDC). La minuciosa especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo condujo al desarrollo de una diversidad de pruebas inmunológicas, que pueden utilizarse para detectar la presencia de Ab o de Ag. Los inmunoensayos han sido de vital importancia en el diagnóstico de enfermedades, la vigilancia del grado de respuesta inmunitaria humoral y la identificación de moléculas de interés biológico o médico (Kindt *et al.*, 2007).

Las interacciones no covalentes que forman la base de la unión antígeno-anticuerpo incluyen enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e interacciones de van der Waals. Puesto que estas interacciones son débiles a nivel individual (comparadas con un enlace covalente), se necesita un gran número de ellas para formar una interacción Ag-Ab potente. Más aún, cada una de estas interacciones no covalentes opera a una distancia muy corta, por lo general de alrededor de 1×10^{-7} mm (1 angstrom, Å); en consecuencia, una interacción Ag-Ab potente depende de un acomodo estructural entre el Ag y el Ab (Kindt *et al.*, 2007).

1.3.1.2. Estructura de los anticuerpos

Una molécula de Ab tiene una estructura nuclear simétrica compuesta de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las dos cadenas ligeras y las dos cadenas pesadas contienen una serie de unidades repetidas, homólogas, cada una de unos 110 aminoácidos de longitud, que se pliegan independientemente en una estructura globular que se llama dominio de Ig.

Las cadenas pesadas y ligeras constan de regiones amino terminales variables (V) que participan en el reconocimiento del antígeno y de regiones carboxilo terminales constantes (C); las regiones C de las cadenas pesadas median las funciones efectoras. En las cadenas pesadas, la región V está compuesta de un dominio de Ig y la región C está

compuesta de tres o cuatro dominios de Ig. Cada cadena ligera se compone de una región V de dominio de Ig y una región C de dominio de Ig. (Abbas, 2008).

Las moléculas de Abs pueden dividirse en distintas clases y subclases en función de diferencias en la estructura de las regiones C de su cadena pesada. Las clases de moléculas de anticuerpo en humanos se llaman también isotipos y se denominan IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, donde los isotipos IgA e IgG pueden subdividirse, a su vez, en subclases o subtipos más relacionados, llamados IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, en ratón difiere en que el isotipo IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (Janeway *et al.*, 2001). Mientras que en aves existen tres tipos de Abs: IgM, IgA e IgY, donde esté último es homólogo al IgG de mamíferos (Davison *et al.*, 2008).

1.3.1.3. Especificidad

La caracterización de un anticuerpo específico requiere demostrar que los anticuerpos solo se unen a la proteína que contiene el péptido inmunogénico. Cada anticuerpo es producido por métodos inmunocitoquímicos que determinan esta especificidad (Burry, 2000).

1.3.1.4. Diversidad

La presencia de un gran número de Abs que se unen a diferentes Ags se conoce como diversidad, y la totalidad de Ab con diferentes especificidades se denomina repertorio de Abs. Para crear esta diversidad, algunas especies han evolucionado múltiples segmentos génicos V, D y J, que maximizan la diversidad combinatoria (Wang *et al.* 2013).

1.3.1.5. Anticuerpos monoclonales y policlonales

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son una vieja herramienta inmunológica con aplicaciones en los campos de la inmunología, la biotecnología, la bioquímica y la biología aplicada. La producción de mAbs usando tecnología de hibridomas fue descubierto en 1975 por Georges Kohler y Cesar Milstein (Ansar y Ghosh, 2013).

Recientemente, los mAbs se han aplicado ampliamente en la investigación y el diagnóstico. En la actualidad, los mAbs representan herramientas terapéuticas en tratamientos para el cáncer de mama, leucemia, artritis, rechazo de trasplantes, el asma y la psoriasis. Las características esenciales que confieren la aplicación clínica de los mAbs

incluyen su especificidad de unión y la homogeneidad, así como su capacidad para ser producidos en cantidad ilimitada (Ansar y Ghosh, 2013).

Los anticuerpos policlonales (pAbs), son mezclas que contienen diferentes Abs desarrollados en la sangre de animales inmunizados. Como la mayoría de los Ags tienen múltiples epítomos, pueden estimular la proliferación y diferenciación de una variedad de clones de linfocitos B. Así, un conjunto heterogéneo de Abs séricos se pueden producir con especificidad particular para epítomos del Ag (Ansar y Ghosh, 2013). Los pAbs han sido particularmente útiles en dos casos: en primer lugar, porque benefician en más de un epítomo en una molécula diana, y segundo, porque la molécula de interés es altamente conservada (George y Urch, 2000).

Una de las aplicaciones más frecuentes e importantes de pAbs para la detección de múltiples epítomos es como Abs secundarios, conjugados, reactivos para inmunoensayos indirectos: ELISA, Western Blot, inmunohistoquímica, citometría de flujo, donde la unión al Ab policlonal conduce a una considerable amplificación de la señal. (George y Urch, 2000). Se han descrito una variedad de ventajas y desventajas respecto a la utilización de los mAbs y los pAbs.

1.3.1.6. Maduración de la afinidad

Durante la activación antígeno-específica de los linfocitos B, se acumulan generalmente mutaciones puntuales en las regiones variables de los anticuerpos. Este proceso ha sido denominado maduración de la afinidad, porque se cree que el papel de estas mutaciones incrementa la unión específica al antígeno (Cauerhff *et al.*, 2004).

Un SI funcional se caracteriza por la producción de una gama extremadamente amplia de moléculas de Abs a partir de un repertorio genómico limitado. Los genes que codifican para las regiones variables de los Abs se diversifican después del reordenamiento del gen por la hipermutación, un proceso rápido impulsado por la selección para la alta afinidad de unión al antígeno (Cauerhff *et al.*, 2004).

1.3.1.7. Funciones de los anticuerpos

Además de fijar al Ag, los Abs participan en una extensa gama de actividades biológicas. Para que sean eficaces contra los patógenos, los Abs no sólo deben reconocer

Ags, sino también activar reacciones (funciones efectoras) que tienen como resultado la eliminación del Ag y la muerte del patógeno (Kindt *et al.*, 2007), dentro de éstas funciones se encuentra la opsonización, la activación del complemento y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) (Coico y Sunshine, 2009).

1.3.2. Inmunidad celular

La inmunidad celular está a cargo de los linfocitos T. Los patógenos intracelulares, como los virus y algunas bacterias, sobreviven y proliferan en el interior de los fagocitos y de otras células del hospedero, donde los Abs circulantes no cumplen su función efectora. La inmunidad celular fomenta la destrucción de los microorganismos residentes en los fagocitos mediante la eliminación de las células infectadas (Abbas, 2008).

Las DCs juegan un papel importante en este tipo de inmunidad, estas células son útiles en la activación de los linfocitos T vírgenes, en la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas que son esenciales para la diferenciación de los linfocitos T a células efectoras. Además de considerar su función estimuladora de linfocitos B, sin olvidar que éstos últimos también pueden ser activados por macrófagos y células NK.

1.4. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Las células que desempeñan funciones especializadas en la respuesta inmune innata y adaptativa son los fagocitos, las células dendríticas, los linfocitos específicos frente al antígeno y otros diversos leucocitos que actúan eliminando los antígenos.

Los fagocitos, entre los que se cuentan los neutrófilos y los macrófagos, son las células cuya principal función es identificar, ingerir y destruir los patógenos. El sistema fagocítico mononuclear consta de células cuya principal función es la fagocitosis y que desempeñan papeles centrales en la inmunidad innata y adaptativa, en este grupo se encuentran los monocitos. Los mastocitos, basófilos y eosinófilos son tres células adicionales que participan en estas respuestas inmunitarias, comparten la característica común de tener gránulos citoplásmicos que contienen mediadores inflamatorios y

antimicrobianos. Otra característica común de estas células es su implicación en respuestas inmunitarias que protegen contra helmintos y en enfermedades alérgicas (Abbas, 2008).

Las células presentadoras de antígenos (APCs) son poblaciones celulares especializadas en la captura de antígenos microbianos y de otros tipos, que los muestran a los linfocitos y producen señales que estimulan la proliferación y diferenciación de los linfocitos.

La médula ósea es el lugar de generación de la mayoría de las células sanguíneas circulantes maduras, incluidos los eritrocitos, los granulocitos y los monocitos, y el lugar donde tienen lugar los primeros acontecimientos madurativos del linfocito B. Se ha sugerido que la médula ósea es un órgano regulador inmunológico capaz de ajustar la inmunidad y puede ser una posible diana terapéutica para la inmunoterapia y vacunación inmunológica (Zhao *et al.*, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Células dendríticas

En 1966, Robert Mishell y Richard Dutton añaden glóbulos rojos de oveja a una suspensión de células de bazo de ratón, logrando la generación de la primera respuesta primaria de Abs *in vitro*. Posteriormente otros investigadores informaron que esta respuesta requiere la presencia de un conjunto de células esplénicas accesorias, de las cuales un componente grande eran macrófagos. En 1970 Ralph M. Steinman y Zanvil A. Cohn investigaron estas células accesorias esplénicas mediante microscopia de contraste de fases, encontraron un pequeño número de células ampliamente ramificadas y móviles mezcladas con los macrófagos esperados. Debido a la morfología única de las células, Steinman y Cohn decidieron nombrarlas "Células dendríticas " (Steinman, 2006).

La teoría de la selección clonal, propuesta por Frank Macfarlane Burnet en 1957 (Brownlee, 2007), postula que los linfocitos proliferan en respuesta a antígenos sólo si el Ag coincide con su receptor. Pero en la década siguiente, una gran incógnita permanecía: ¿cómo fue el Ag presentado para iniciar la respuesta? Durante sus estudios Steinman consideró que la capacidad de comprender y manipular esta etapa de iniciación era esencial

para el desarrollo de nuevos enfoques para el tratamiento de la enfermedad. La teoría en ese momento era que los linfocitos tienen receptores para Ags, que responderían al contacto, pero eso no era lo suficientemente claro (Steinman, 2006).

Una pista importante para determinar la función de las DCs fue la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) (van Niel *et al.*, 2008), que luego resultó ser necesario para la presentación de antígenos a los linfocitos T. Steinman y colaboradores (1973) desarrollaron técnicas para cultivar las DCs *in vitro*. Este trabajo sentó las bases para la investigación actual sobre la regulación de la función de DCs y el diseño de vacunas basadas en DCs para el VIH y el cáncer (Steinman, 2006).

Las DCs desempeñan un papel único en la iniciación de la respuesta inmune, debido a su excepcional capacidad de presentación de antígenos a los linfocitos T vírgenes. Las DCs migran a los órganos periféricos y controlan su entorno ante la presencia de microorganismos, detectan moléculas propias de patógenos, como lipopolisacáridos, que inducen la maduración y migración hacia los ganglios linfáticos. Las DCs inmaduras actúan como centinelas que detectan los antígenos extraños, mientras que las DCs maduras presentan antígenos capturados a los linfocitos T en los tejidos linfoides. Además, observaciones recientes sugieren que las DCs podrían inducir tolerancia inmune (Gregori, 2010), mediante la presentación de antígenos propios. Por lo tanto las DCs son reguladores del sistema inmune y su maduración refleja una serie ordenada de eventos dependientes de señales que dan lugar a las funciones inmunomoduladoras potentes (Gatti y Pierre, 2003).

2.2. Origen de las células dendríticas

Debido a ciertas similitudes con los monocitos y/o macrófagos en su distribución dentro de los tejidos linfoides, su morfología, fenotipo, actividades enzimáticas y capacidad endocítica o fagocítica, las DCs originalmente fueron consideradas de origen mieloide (Fig.1). De acuerdo a evidencias experimentales se pudo comprobar que algunos subtipos son de origen mieloide. Sin embargo, una serie de resultados generados *in vivo* e *in vitro*, tanto en seres humanos y ratones, ha llevado al concepto de que DCs pueden ser generadas a partir de precursores linfoides (Ardavin *et al.*, 2001).

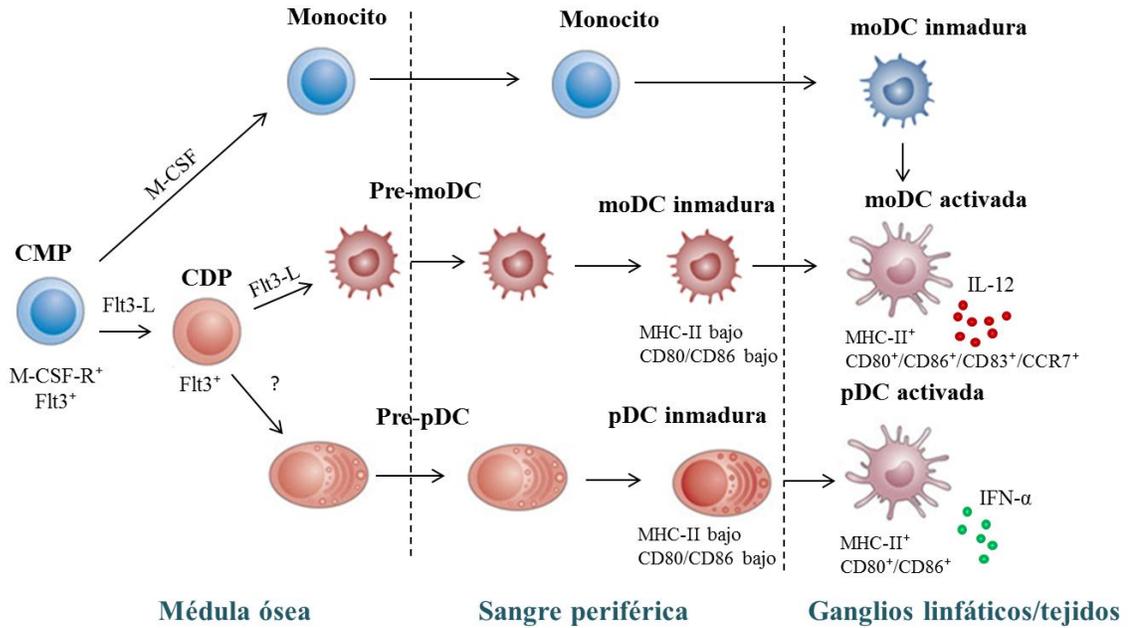


Fig. 1. Origen y diferenciación de subtipos de DCs en humanos. Las DCs mieloides (moDC) y DCs plasmocitoides (pDC) se derivan de células progenitoras de médula ósea y surgen de progenitores comunes mieloides (CMP) con la expresión de Flt3 y a su vez de progenitores comunes de DCs (CDP) al encontrarse con el ligando Flt-3 (Flt3-L). Flt3-L induce a CDP a diferenciarse en precursores de DC mieloides (pre-moDC) o pDC (pre-pDC). Pre-moDC y pre-pDC migran de la médula ósea a sangre periférica donde circulan como DCs inmaduras caracterizadas por baja expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras, alta actividad endocítica y bajo potencial de activación de linfocitos T. Además CMP puede diferenciarse en monocitos en presencia de M-CSF y migrar a sangre periférica. Una vez que llegan a los órganos linfoides secundarios o tejidos pueden diferenciarse en función del entorno en macrófagos o en moDC que se pueden activar de la forma descrita anteriormente (Modificado de Gregori, 2010; Belz y Nutt, 2012).

2.3. Características de las células dendríticas

Se han identificado dos estados de diferenciación de las DCs, los que determinan dos funciones inmunológicas distintas. Antes del reconocimiento de un agente microbiano, las DCs se encuentran en un estado inmaduro que les confiere una alta capacidad fagocítica, pero un bajo potencial activador de linfocitos T (Iruretagoyena, 2005). Sin embargo, múltiples estímulos endógenos o exógenos pueden conducir a la maduración de las DCs en células con un fenotipo maduro. Estos estímulos incluyen; el ligando de CD40 (expresado principalmente en linfocitos T CD4⁺ activados), citocinas tales como GM-CSF, TNF- α y la IL-1, la prostaglandina E, LPS, todas las bacterias, los ARN virales de doble cadena, oligonucleótidos CpG (Keestra *et al.*, 2010). En contraste, la IL-10, TGF- β y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) inhiben este proceso de maduración. En

respuesta a la activación por los estímulos, las DCs expresan altos niveles de la familia de NF- κ B de proteínas de control de la transcripción para la síntesis de proteínas inmunes e inflamatorias. Por otra parte, en la maduración de las DCs comienzan a cargar moléculas MHC recientemente sintetizadas con péptidos antigénicos que se derivan de Ags fagocitados y procesados, y muestran estos complejos en la superficie celular. Las DCs también comienzan a expresar moléculas coestimuladoras requeridas para la activación de los linfocitos T (Chung *et al.*, 2004).

El cambio fenotípico de las DCs se basa en la expresión de marcadores de superficie (Tabla 3). Las DCs inmaduras o en reposo tienen alta capacidad para capturar e internalizar antígenos debido a la expresión de receptores que permiten el reconocimiento y endocitosis de antígenos potenciales. Estos receptores incluyen los receptores tipo Toll (Liang *et al.*, 2013), receptores tipo lectina C (CLRs), receptor de manosa (DEC-205) (Banchereau *et al.*, 2000), receptores Fc (FcR), receptores del complemento, receptores scavenger, y receptores involucrados en la captación de cuerpos apoptóticos tales como receptor de fosfatidilserina (Maddur *et al.*, 2010).

Las DCs también poseen numerosos receptores de citocinas que les permiten responder a estímulos específicos. Así, las DCs inmaduras actúan como sensores inmunológicos que reciben estímulos del medio ambiente para alertar al sistema inmunológico. Sin embargo las DCs inmaduras son estimuladores pobres de los linfocitos T y deben someterse a una maduración y proceso de activación (Maddur *et al.*, 2010).

La maduración está definida como una serie de cambios fenotípicos que permite a las DCs iniciar la inmunidad como APCs profesionales (Fig.2). Este proceso involucra morfología similar y cambios funcionales en DCs de humanos y ratón, que incluye, pérdida de receptores de endocitosis/fagocitosis, cambios morfológicos tales como pérdida de estructuras adhesivas, reorganización del citoesqueleto y la adquisición de alta motilidad celular, secreción de citocinas inmunoreguladoras y quimiocinas tales como IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23, TNF, CCL17, CCL19 y CCL22, sobreexpresión de moléculas de adhesión y coestimuladoras: CD80, CD86, CD40, CD54, CD58, críticas en la agrupación y activación de los linfocitos T, translocación de MHC-I/II en los compartimentos de la

superficie celular y migración de las DCs maduras a regiones de los tejidos linfoides (Maddur *et al.*, 2010).

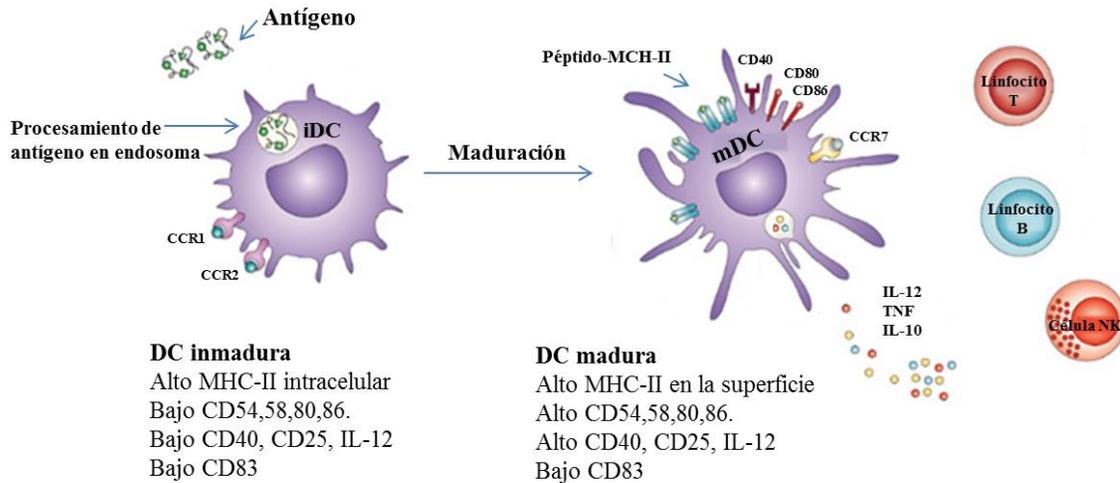


Fig. 2. Características fenotípicas y funcionales de las DCs durante la maduración. Las DCs pueden capturar el antígeno de diferentes formas; por fagocitosis, pinocitosis y macropinocitosis. Después de la captura de antígeno y dependiendo de la naturaleza del antígeno, las DCs migran a tejidos linfáticos y maduran cambiando su morfología fenotípica. Hay un aumento en la expresión de moléculas de adhesión, de presentación de antígeno, y coestimuladoras. Durante la interacción con los linfocitos T, B o células NK producen citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF) (Modificado de Banchereau y Steinman, 1998; Hackstein y Thomson, 2004).

Dentro de la caracterización molecular de las DCs en sus dos estados funcionales, se ha descrito la expresión de un factor de transcripción (Zbtb46), miembro de la familia BTB-ZF, que es específico de DCs inmaduras en humano y ratón, que actúa principalmente como un represor transcripcional. La maduración de las DCs implica la activación de reguladores positivos como NF- κ B, pero también la disminución de la expresión de Zbtb46, que mantiene a las DCs en estado inmaduro. En la maduración de las DCs, la expresión de moléculas de MHC se ve afectada por la unión de Zbtb46 a los promotores del MHC, donde normalmente se encuentra unido el factor de transcripción Creb1, el cual promueve la expresión de moléculas de MHC, lo que sugiere que estos dos reguladores tienen efectos opuestos en la expresión de genes del MHC, a través de la competencia por unión a los promotores. La degradación de Zbtb46 durante la estimulación al TLR, permite a Creb1 asociarse libremente a los promotores del MHC, lo que conlleva a la maduración de las DCs; aunque existe evidencia de esto, sería necesario implementar más investigaciones para probar esta competencia (Meredith, *et al.*, 2012).

Marcadores fenotípicos y funcionales de las células del sistema inmune en humanos.						
CD	Linfocito T	Linfocito B	DC	Célula NK	Monocito/macrófago	Granulocito
CD2	+	+		+		-
CD3	+	-		-	-	-
CD4	+	-		-	+	+
CD8a	+	-		+	-	-
CD11a	+	+		+	+	+
CD11b	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+	+	+	+	+
CD14	-	-	+	-	+	+
CD19	-	+	+	-	-	-
CD20	+	+	-	-	-	-
CD33	-	-	+	-	+	+
CD40	-	+	+	-	+	-
CD50	+	+		+	+	+
CD54	+	+			+	
CD56	+			+		
CD58	+	+	+	+	+	+
CD66b	-	-		-		+
CD80	+	+	+	-	+	-
CD83	-	+	+	-	-	-
CD86	+	+	+	-	+	-
CD102	+	+			+	-
CD123	-	-	+		-	+
CD205	+	+	+		+	
MHC-I		+	+	+	+	+
MHC-II		+	+++		+	

Tabla 3. Marcadores fenotípicos y funcionales de las células del sistema inmune. Moléculas presentes en la superficie de las diferentes células del SI, que permiten caracterizar los diferentes tipos celulares. Las DCs

se caracterizan por la presencia de moléculas de adhesión (Naranja), moléculas de captura de antígeno (Amarillo), moléculas presentadoras de antígeno (Morado), presentando un aumento de MHC-II en estado maduro, moléculas coestimuladoras (Rosa), que permiten la activación de los linfocitos T vírgenes (Modificado de Steinman y Pope, 2002; Vázquez, 2012; Maddur *et al.*, 2010).

2.4. Tipos de células dendríticas

A pesar de la función similar de las DCs como células presentadoras de antígenos, las DCs difieren en sus vías de desarrollo, ubicación, propiedades migratorias, marcadores fenotípicos y funciones inmunológicas. Por lo tanto, las DCs son heterogéneas y existen varios subtipos con características distintas identificadas en tejidos linfoides y no linfoides (Maddur *et al.*, 2010).

Las DCs reciben diferentes nombres según la ubicación, pero guardan características y funciones similares entre sí (Vázquez, 2012). Residen prácticamente en todos los tejidos del cuerpo, tales como células de Langerhans, DCs intersticiales, DCs derivadas de monocitos (moDCs), DCs mieloides BDCA-1⁺ y BDCA-3⁺, DCs plasmocitoides (pDCs) (Barchel *et al.*, 2005), DCs esplénicas marginales, DCs interdigitantes, DCs del centro germinal, DCs del timo, DCs del hígado, y DCs de sangre periférica (Chung *et al.*, 2004). Además las podemos encontrar en otros tejidos como, faringe, esófago, vagina, ectocérvix y ano, en las superficies mucosas de los sistemas respiratorio y gastrointestinal, también están presentes en corazón, parénquima pulmonar y lámina propia del intestino. Extienden sus procesos membranosos entre las estrechas uniones de las células epiteliales sin alterar la función de la barrera epitelial. Esto aumenta la captura de Ag del entorno incluso si no hay infección o inflamación, conduciendo al silenciamiento del sistema inmune ante los Ags ambientales inocuos (Vázquez, 2012).

Un avance importante en la biología de la DCs, dentro de los últimos años, ha sido la estructura de los protocolos para la propagación *in vitro* de grandes números de DCs, el uso de factores de crecimiento definidos, las modificaciones biológicas, genéticas, y farmacológicas (Fig.4) (Gregori, 2010). La generación *in vitro* de las DCs ya sea a partir de médula ósea o de sangre es de rutina en los mamíferos. Su morfología distinta y fenotipo así como su capacidad única de estimular linfocitos T vírgenes se utilizan para definir las DCs. Se han cultivado células de médula ósea de pollo en presencia del factor estimulante

de colonias granulocito/macrófago (GM-CSF) e IL-4, y los resultados obtenidos mostraron células con la morfología típica, con el fenotipo de la superficie de algunos marcadores moleculares como el MHC-II y su posterior maduración con LPS (Wu, 2009).

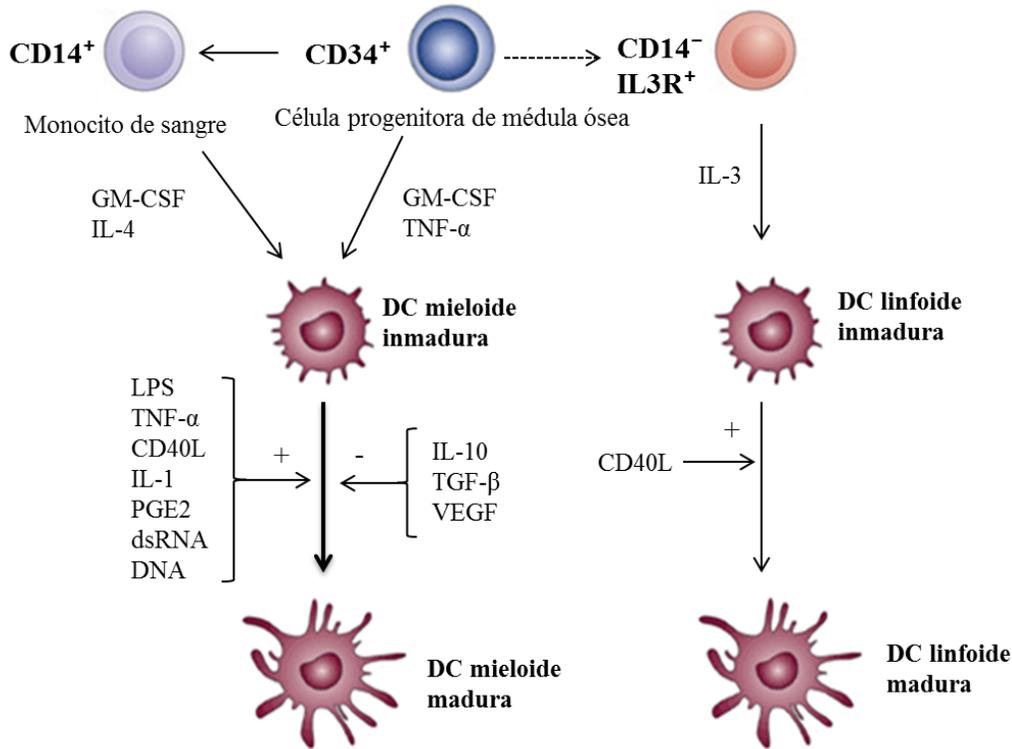


Fig. 4. Diferenciación y maduración *in vitro* de DCs. Las DCs mieloides inmaduras pueden diferenciarse de células madre CD34⁺ cultivadas con GM-CSF e IL-4 y estimuladas con varios estímulos endógenos o exógenos, por ejemplo con LPS, TNF-α, CD40L, DNA, para inducir su maduración. Las DCs linfoides se pueden derivar de células plasmacitoides (CD14⁻IL-3⁺) cultivadas con IL-3 y maduradas con CD40L. (Modificado de Chung *et al.*, 2004 y Ardavín *et al.*, 2001).

2.5. Usos y aplicaciones de las células dendríticas

Las DCs estimulan a los linfocitos T de una manera mucho más potente que los macrófagos o los linfocitos B. Su expresión de moléculas de MHC es entre 10 y 100 veces mayor que la de los linfocitos B. La activación eficaz de los linfocitos T por parte de las DCs necesita de varias señales consecutivas. Las DCs pueden activar tanto a linfocitos T CD4⁺ como linfocitos T CD8⁺ por presentación antigénica vía MHC-II y MHC-I, respectivamente, lo que constituiría la primera señal. La segunda señal se realiza por la interacción con moléculas coestimuladoras presentes en las DC maduras: CD80 y CD86

con el receptor linfocitario CD28, y la familia TNF con los receptores linfocitarios R-TNF. Si falla esta coestimulación, los linfocitos T se vuelven tolerogénicos. Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células de memoria (Fig.5) (Vázquez, 2012).

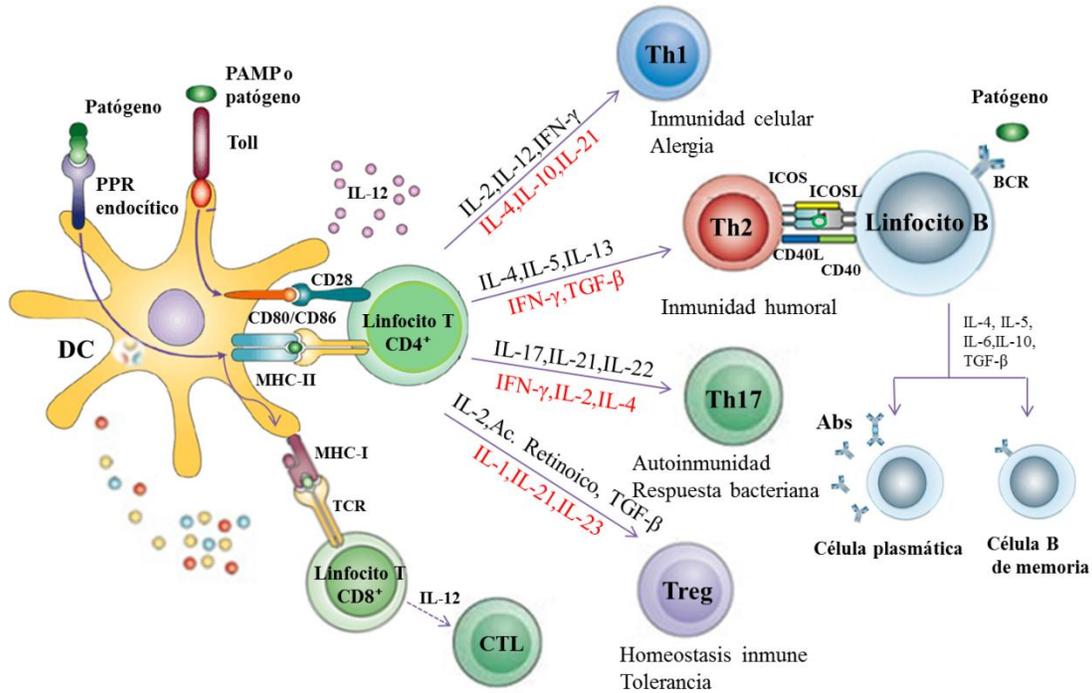


Fig. 5. Estimulación de linfocitos T por DCs en la presentación de antígeno. El reconocimiento de los PAMPs se lleva a cabo por TLRs expresados en las DCs, además las DCs expresan moléculas de MHC-II y moléculas coestimuladoras en su superficie, así como la producción de citocinas, las cuales conducen a la activación de los linfocitos T vírgenes, lo cual conlleva a la diferenciación a diferentes tipos de linfocitos T CD4⁺, tales como; Th1, Th2, Th17 y Treg, donde cada célula desempeña una función importante en el sistema inmune. Además puede activar a los linfocitos T CD8⁺ a través de MHC-I, para la diferenciación a linfocitos T citotóxicos (CTL). Las DCs estimulan la proliferación de los linfocitos B que han sido estimulados por CD40L en linfocitos Th2, así como la diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos y el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas, al producir las citocinas y factores que son críticos para esta acción, la cual puede depender de la interacción del linfocito B con el linfocito Th2 o ser independiente, ya que el linfocito B también actúa como célula presentadora de antígeno, la cual puede capturar y procesar el antígeno. Citocinas indicadas en color negro indican activación, citocinas en color rojo indican inhibición (Modificado de Medzhitov, 2001; Comabella *et al.*, 2010; Lambotin *et al.*, 2010).

Los microbiólogos, encabezados por Louis Pasteur, han ideado maneras de generar vacunas mediante la inactivación de patógenos. La mayoría de estas vacunas actúan a través de la inducción de respuestas humorales. La necesidad de descubrir y desarrollar

vacunas contra enfermedades para las que no hay vacunas eficaces como en el caso del VIH, el virus de la hepatitis C, Micobacterias, *Clamidia* y *Plasmodium*, hace hincapié en la necesidad de entender mejor la relación entre la inmunidad innata y adaptativa. Los estudios sobre la caracterización funcional de las DCs en humanos proporcionan una oportunidad para el nuevo diseño de vacunas y terapias (Steinman y Hemmi, 2006; Ueno *et al.*, 2011).

La capacidad de las DCs para generar respuestas antitumorales *in vivo* ha sido documentada en modelos animales y en estudios clínicos humanos. La mayoría de los ensayos implican el aislamiento de DCs, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas DCs portadoras de Ags. Se han descrito un elevado número de antígenos tumorales susceptibles de ser utilizados en protocolos de inmunoterapia, por lo cual las DCs han sido aplicadas como vacunas terapéuticas contra cáncer (Wojas, 2003).

Por lo tanto, múltiples parámetros deben tenerse en cuenta para el desarrollo de vacunas usando DCs. Estos incluyen: 1) función biológica de los subtipos de DCs (por ejemplo, inducción de la inmunidad humoral y/o celular), 2) la selección de antígenos y su formulación para controlar la enfermedad, 3) la selección de los receptores expresados por las DCs para mejorar la captación y procesamiento, y 4) la distribución tisular de las DCs (Steinman y Pope, 2002; Ueno *et al.*, 2011).

Además de las aplicaciones anteriores, las DCs pueden ser útiles para obtener anticuerpos monoclonales, donde a partir de los anticuerpos que reconocen cierto antígeno, previamente presentado por las DCs a los linfocitos T, pueden ser aislados con la técnica conocida como Phage display. Esta técnica se introdujo por primera vez en 1985 por George Smith. La presentación en fagos es una técnica poderosa para la identificación de péptidos o proteínas que tienen propiedades de unión deseables. En este método, un péptido o proteína se muestra en la superficie de un fago como una fusión a una proteína que normalmente se encuentra en la partícula del fago. Los bacteriófagos más comunes utilizados en la presentación en fagos son M13 y fagos filamentosos, aunque T4, T7, y el fago λ también se han utilizado. Esta tecnología ha tenido una influencia importante en el

trabajo y los descubrimientos hechos en el campo de la inmunología, la biología celular, la farmacología y el descubrimiento de fármacos (Smith y Petrenko, 1997; Alikhani, 2013).

Con base en lo anterior en un proceso *in vitro* se aíslan los genes de las inmunoglobulinas que reconocen al antígeno con el que se inmunizó al animal o a las células *in vitro*, y posteriormente se fusionan a la proteína de la superficie del fago, seguido de una ronda de selección subsecuente para obtener anticuerpos altamente específicos al antígeno. De esta forma se pueden identificar los fragmentos de anticuerpo con alta afinidad y ser convertidos en inmunoglobulinas intactas clonando los genes variables en plásmidos que incorporan la región constante de la inmunoglobulina.

3. JUSTIFICACIÓN

Los anticuerpos durante las últimas décadas han sido utilizados en la investigación científica, diagnóstico clínico y terapéutico, como en el tratamiento de enfermedades infecciosas, autoinmunes y en el cáncer. Por lo anterior, generar anticuerpos específicos y con alta afinidad sigue siendo un reto en la actualidad; ya que existen dificultades en su generación, como: antígenos que existen en pequeña cantidad, alta homología o que resultan tóxicos en el animal hospedero. De esta manera, se pueden desarrollar otras metodologías para generar anticuerpos, tal como, la inmunización *in vitro*, utilizando DCs por su fuerte capacidad estimuladora de linfocitos T, donde inducen la activación a linfocitos Th2 productores de IL-4, IL-5 y IL-13 que estimulan la inmunidad humoral.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se desarrollará el aislamiento de DCs de pollo, con el uso de protocolos previamente reportados, así como la caracterización morfológica y molecular de estas células en sus dos estados funcionales, que muestren su evidencia como DCs, para poder ser empleadas en la inmunización *in vitro*. El uso del pollo como modelo para la producción de anticuerpos, es una eficaz alternativa, ya que la distancia evolutiva entre aves y humanos es mayor, lo que permite obtener anticuerpos contra antígenos de mamíferos altamente conservados. El objetivo de esta estrategia, es la generación de anticuerpos específicos para antígenos de diferente naturaleza, en un menor tiempo, que permitan responder ante una futura emergencia sanitaria.

4. HIPÓTESIS

Células dendríticas de pollo producidas *in vitro* expresan el gen tejido específico *Zbtb46*

5. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar de manera morfológica y molecular las DCs producidas *in vitro* a partir de médula ósea de pollo.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Aislar y cultivar *in vitro* DCs de médula ósea de pollo.
2. Inducir la maduración de las DCs *in vitro*.
3. Caracterizar de manera morfológica e identificar el gen *Zbtb46* en las DCs inmaduras y maduras.

7. MATERIALES

7.1. Material biológico

7.1.1. Animales

-Pollos de la raza Cobb de 2-3 meses de edad.

-Suero de pollo inactivado estéril.

7.2. Citocinas

-Factor Estimulante de Colonias Granulocito-Monocito (GM-CSF, Kingfisher Biotech, Inc).

-Interleucina 4 (IL-4, Kingfisher Biotech, Inc).

7.3. Antígenos

-Lipopolisacárido de *Escherichia coli* (L2630, Sigma Aldrich).

-*Escherichia coli* DH5 α .

-Péptido sintético viral (GP5): RLYRWRSPVIGHLIDLKRVVRSVAEQWGRP (GenScript).

7.4. Oligonucleótidos

-Gen *GAPDH* de pollo.

GAPDHF 5' CAg CAg CCT TCA CTA CCC TC 3'

GAPDHR 5' CTg gTg TCT TCA CCA CCA Tg 3'

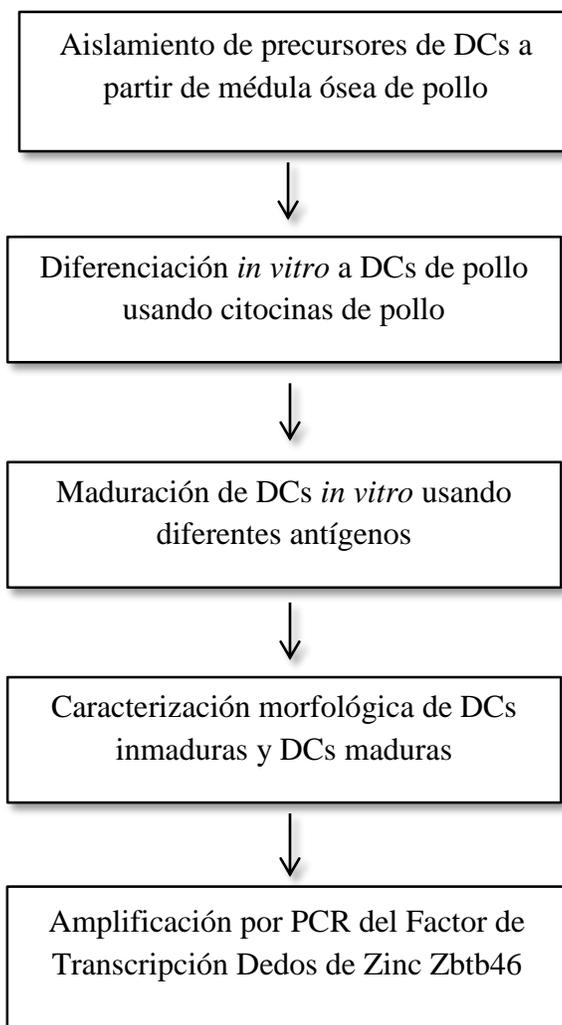
-Gen del factor de transcripción *Zbtb46* de pollo.

cDCTF5 5' AgC ggC AgC ACg gCA TC 3'

cDCTF3 5' gTg ggC TgC CAg CCA TC 3'

8. METODOLOGÍA

Diagrama de flujo para el aislamiento de DCs de pollo.



8.1. Aislamiento de precursores de DCs de pollo

La médula ósea se obtuvo del fémur de pollos de la raza Cobb entre 2 y 3 meses de edad, los procedimientos fueron llevados a cabo según la guía de la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995. Se removió perfectamente el músculo; los fémures se colocaron en hipoclorito de sodio al 10% para esterilizar, y los huesos fueron lavados con PBS pH 7.4. Los extremos del fémur fueron cortados y se les inyectó PBS para obtener la médula ósea (MO). Se realizaron 2 lavados con PBS de la suspensión anterior y se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos, al final la pastilla se resuspendió en PBS. En un segundo tubo con 2 ml de Histopaque-1119 (1.119 g/ml, SIGMA-ALDRICH), se adicionaron los 2 ml de la suspensión de médula ósea. La preparación se centrifugó a 1200g por 30 minutos, se recuperó la interfase celular. Esta nueva suspensión celular se lavó con medio RPMI 1640 (RPMI 1640 with L-glutamine, CORNING). Al final una alícuota celular fue teñida con azul tripano (SIGMA-ALDRICH) durante 5 minutos y las células fueron contadas en un hemocitómetro.

8.2. Cultivo celular

Las células de MO se sembraron en placas de 6 pozos (Tissue Culture Plate 6-well, SARSTEDT, Inc.) a una concentración de 6×10^6 células/pozo, para llevar a cabo los protocolos de diferenciación y maduración (3 y 7 días) de las DCs. El medio de cultivo celular fue RPMI 1640 con suero de pollo al 10%; penicilina/estreptomicina al 1% (Gibco BRL). Además de adicionar al medio de cultivo el GM-CSF [10ng/ml] y la IL-4 [10ng/ml] (cultivo estándar). Finalmente las células se incubaron a 41°C y en atmósfera de 5% de CO₂.

8.3.- Diferenciación y maduración de DCs de pollo

Se llevaron a cabo dos protocolos de diferenciación y maduración de las DCs (Fig.6), con fines comparativos.

8.3.1. Protocolo de 3 días

El procedimiento se llevó a cabo según lo reportado por, Frankenberger y Schendel (2012). Brevemente:

Día 0: Las células de MO fueron sembradas bajo las condiciones de cultivo estándar.

Día 1: Se lavaron las células, las células vivas permanecieron adheridas a la caja de cultivo, se adicionó medio fresco y las citocinas GM-CSF [10 ng/ml] e IL-4 [10 ng/ml].

Día 2: Se estimuló a las DCs para su maduración, durante 24 horas utilizando LPS de *E. coli* (500 ng/ml) (*E.coli* L2630, Sigma).

Día 3: Se observaron los cambios morfológicos presentes en las DCs.

8.3.2. Protocolo de 7 días

El procedimiento se llevó a cabo según lo reportado por Wu y colaboradores (2009). Brevemente:

Día 0: Las células de MO fueron sembradas bajo las condiciones de cultivo estándar.

Día 1: Se lavaron las células, las células vivas permanecieron adheridas a la caja de cultivo, se adicionó medio fresco y las citocinas GM-CSF [10 ng/ml] e IL-4 [10 ng/ml].

Día 3: Se cambió medio de cultivo y se mantuvo la misma concentración de citocinas.

Día 6: Se estimuló a las DCs para su maduración, durante 24 horas utilizando LPS de *E. coli* (500 ng/ml).

Día 7: Se observaron los cambios morfológicos presentes en las DCs.

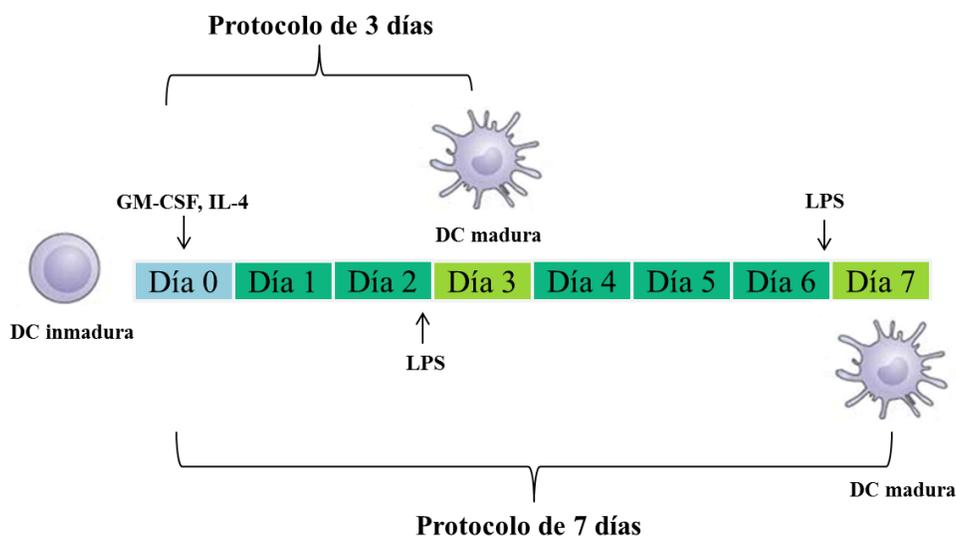


Fig. 6. Esquema de diferenciación y maduración de DCs de pollo *in vitro* basada en dos protocolos.

8.4. Maduración de DCs con diferentes antígenos

Se utilizó el protocolo de 3 días para madurar a las DCs, se emplearon diferentes antígenos: LPS de *E. coli* [1µg/ml], *E. coli* DH5α [10⁶ UFC] inactivada con calor y el péptido viral GP5 [3.5 µg/ml].

8.5. Proliferación de células precursoras de DCs de pollo

Se realizó de la siguiente manera; se utilizaron 1×10⁶ células de MO por pozo en placas de 12 pozos (cultivadas con y sin citocinas). Las células se contaron 24 hrs después de sembradas, y posteriormente cada 48 hrs (conteos por duplicado). Las células en suspensión fueron contadas con un hemocitómetro.

8.6. Caracterización morfológica de las DCs

Las DCs diferenciadas, se observaron en el microscopio invertido (Nikon ECLIPSE TE2000-U), se pudo apreciar la morfología característica de las DCs inmaduras y las DCs maduras.

8.7. Extracción de RNA total de las DCs

Se usaron aproximadamente 4×10⁶ DCs maduras y DCs inmaduras recuperadas en tubos eppendorf 1.5 ml, se adicionaron 200 µl del reactivo TRIzol ® Reagent (Invitrogen), se homogenizaron las células y se incubaron 5 minutos a 4°C, se adicionaron 40 µl de Cloroformo a cada tubo, se agitó vigorosamente por 20 segundos y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras a 12000g por 15 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa (contiene RNA) en tubos nuevos. Para la precipitación del RNA se adicionaron 100 µl de isopropanol; se mezcló por inversión e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g durante 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, se dejó secar cada tubo y se disolvió el RNA con 50 µl de agua libre de RNAsas. Se cuantificó 5 µl de RNA más 995 µl de agua en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260nm.

8.8. Obtención del cDNA de las DCs (Retrotranscripción).

El cDNA fue generado a partir del RNA total (1 µg) de las DCs, Brevemente: Buffer 1X (Fermentas), oligo dT (50 pM/µl), 1 ug de dNTPs (mezcla de 10 mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 20 U/µl de la enzima M-MuLVRT (Fermentas) y RNAsin 0.5U. La

mezcla se incubó, durante 10 minutos a temperatura ambiente, y finalmente 50 minutos a 42°C.

8.9. Amplificación por PCR de genes de las DCs.

Amplificación por PCR del gen *GAPDH* de pollo, Brevemente: 1 µl de cDNA de las DCs, Buffer 1X (Invitrogen), 25 pM de c/u de los oligoprimers específicos; 200 µM de c/u de los dNTPs (Invitrogen), MgCl₂ [1.5 mM] (Invitrogen), 600 ng de BSA (New England Biolabs) y 1U de Taq DNA polymerase (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo en el termociclador (GeneAmp® PCR System 2700, AB Applied Biosystems).

Amplificación del factor de transcripción dedos de zinc *Zbtb46* de las DCs de pollo. Brevemente: 1 µl del cDNA de las DCs, Buffer 1X, 200 µM de c/u de los dNTPs, MgCl₂ [1.5mM], 25 pM de c/u de los oligoprimers específicos; 1U de Taq DNA polymerasa, 600 ng/µl de BSA. La reacción se llevó a cabo en el termociclador indicado anteriormente.

9. RESULTADOS

9.1. Aislamiento de las DCs de pollo

A partir de células precursoras de DCs obtenidas de MO de pollo, se diferenciaron las DCs de pollo *in vitro*, bajo las condiciones de cultivo establecidas con la adición de las citocinas GM-CSF e IL-4 (Fig.7).

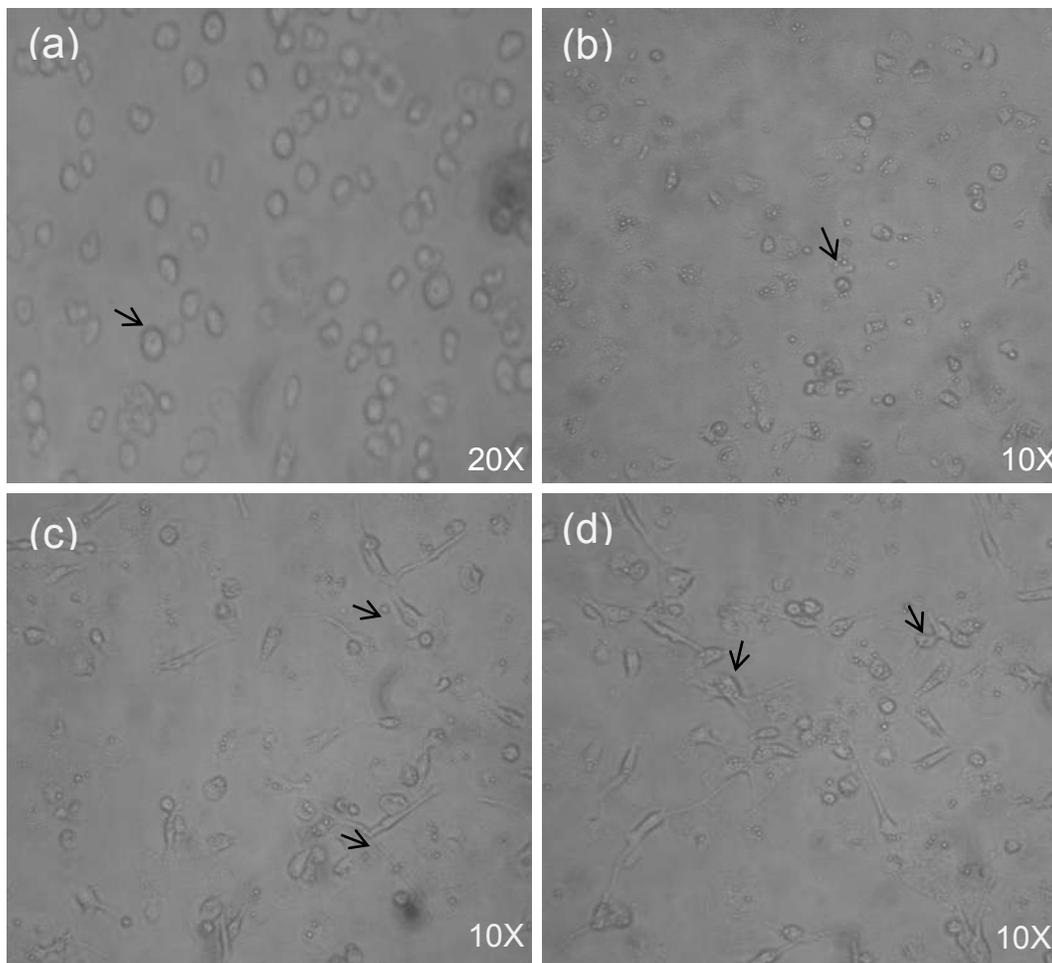


Fig. 7. Morfología de células de MO de pollo cultivadas. a) Células de MO de pollo no adheridas (día 0). b) Células adheridas (día 1), comienza la diferenciación. c) DCs diferenciadas y maduras con LPS de *E. coli* (protocolo de 3 días). d) DCs diferenciadas y maduras con LPS de *E. coli* (protocolo de 7 días). Flechas indican DCs diferenciadas y maduras.

De acuerdo al protocolo de 3 y 7 días, se obtuvieron DCs con base en las condiciones óptimas de cultivo, en ambos protocolos la diferenciación en DCs requiere el uso de citocinas GM-CSF e IL-4. El GM-CSF, es una citocina pleiotrópica que regula múltiples actividades biológicas como; regulación de la supervivencia, diferenciación y

activación de células efectoras. Se ha reportado que es usado en la diferenciación de DCs solo o en combinación con otros factores de crecimiento o citocinas. Esta citocina regula la baja expresión de receptores de M-CSF en los monocitos, lo que inhibe la diferenciación a macrófagos. La adición de IL-4 podría conducir a la adquisición de funciones más especializadas, como la orientación del linfocito T activado (Conti *et al.*, 2008; Hiasa, *et al.*, 2009), así como mediar la expresión de moléculas CD23, MHC-II y receptores de IL-4 (Nelms *et al.*, 1999).

Por lo anterior se decidió emplear la diferenciación y maduración en 3 días para los siguientes experimentos, ya que con este protocolo el tiempo requerido es mucho menor y además igual de eficiente que el protocolo de 7 días reportado por Wu y colaboradores (2009).

9.2. Maduración de las DCs con diferentes antígenos

La maduración de las DCs se realizó con el protocolo de 3 días empleando diferentes antígenos. Las células se estimularon con el antígeno durante un lapso de 24 h. Posterior a la maduración celular se pudo apreciar el cambio de morfología que ocurre en las DCs, presentando prolongaciones celulares que semejan dendritas. Mientras que cuando las DCs están inmaduras se observó morfología de células redondas, donde se pueden apreciar grandes vacuolas endocíticas (Fig.8).

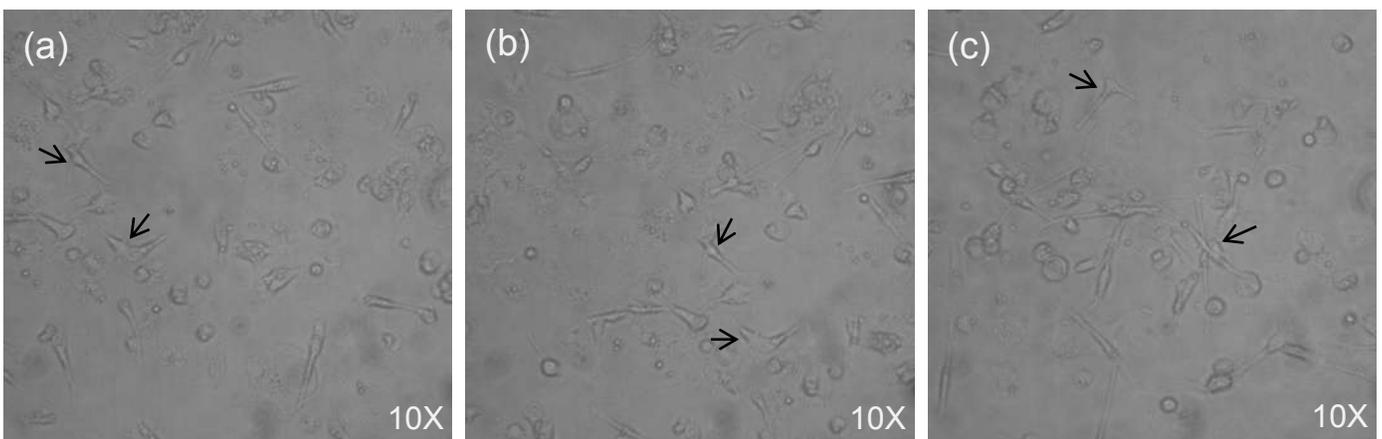


Fig. 8. Maduración de DCs de pollo usando diferentes antígenos. a) DCs estimuladas con LPS de *E. coli* [1µg/ml]. b) DCs estimuladas con bacterias *E. coli* DH5α [10^6 UFC] inactivadas y c) DCs estimuladas con el péptido viral GP5 [3.5 µg/ml]. Flechas muestran las células con morfología dendritizada.

Las DCs presentan índices de maduración muy parecidos con el uso de los diferentes antígenos, pero la diferencia en la maduración (Fig.9), puede radicar en la naturaleza del antígeno que se está utilizando, además de considerar que el tiempo de maduración es de 24 hrs, para lo cual se debe establecer un marco de tiempo apropiado para mantener una efectiva estimulación. Las DCs sin estimulación fueron usadas como control, en el cual se observó una maduración mínima comparada con las DCs estimuladas.

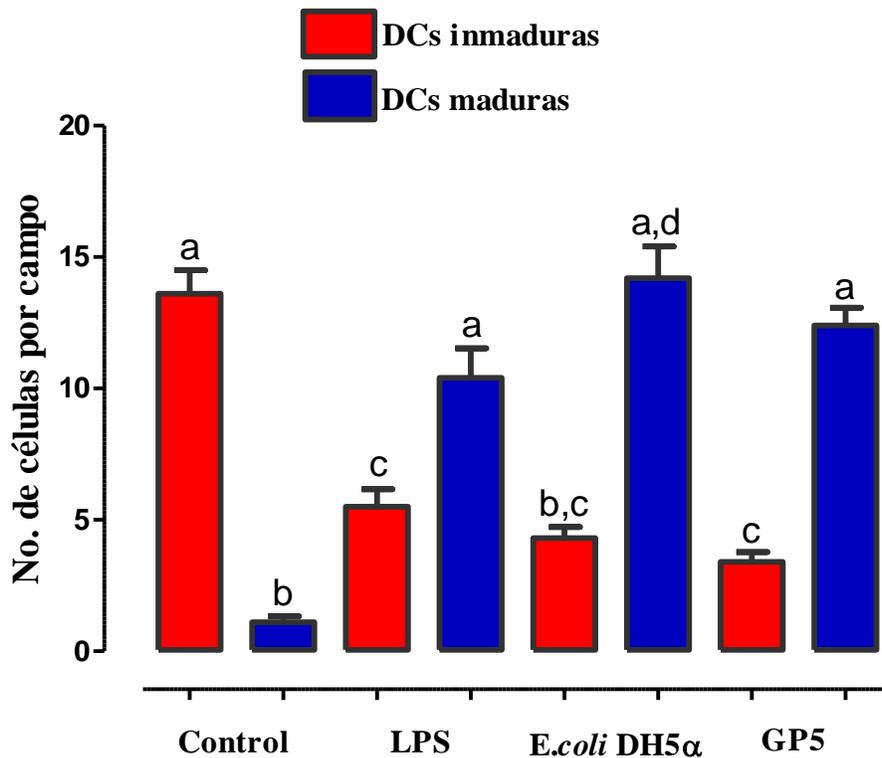


Fig. 9. Maduración *in vitro* de DCs con diferentes antígenos. Proceso de diferenciación y maduración de acuerdo al protocolo de 3 días. Conteo directo de células sembradas en placa, seleccionando 5 campos aleatoriamente/pozo, por duplicado. El eje de las x, representa la maduración inducidas con los diferentes antígenos, mientras que el eje de las y representa el número de células por campo. El análisis estadístico fue ANOVA de una vía con análisis post hoc de Tukey. Las letras diferentes indican una diferencia significativa con $P \leq 0.05$.

9.3. Proliferación de células precursoras de DCs

Este cultivo celular se realizó con células precursoras con y sin citocinas (GM-CSF e IL-4) en una concentración de [5 ng/ml].

Una de las características que se debe conocer de un cultivo primario es su proliferación *in vitro*; por lo anterior se realizó la cinética de proliferación de las DCs. Al cultivar las células en condiciones libres de citocinas se observó que no hubo proliferación celular. Mientras que en las células con citocinas tampoco se observó proliferación, pero la muerte celular disminuye, lo cual permite mantener viable el cultivo celular por más tiempo (Fig.10). Este resultado indica la importancia de las citocinas en el mantenimiento de este cultivo primario.

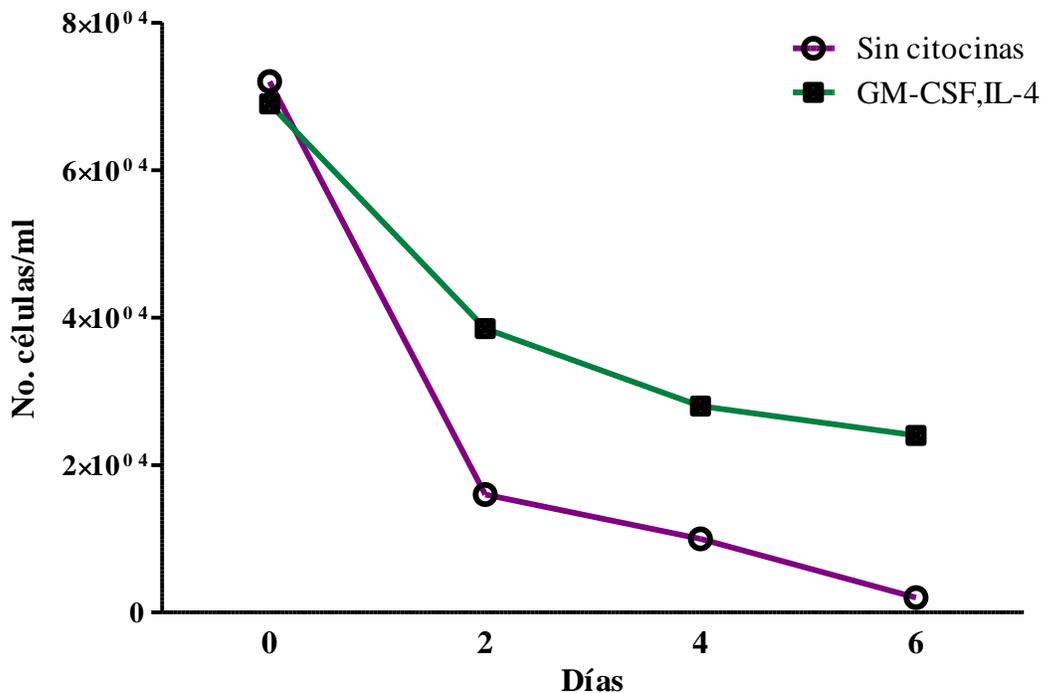


Fig. 10. Proliferación de células precursoras de DCs con y sin suplementación de citocinas. Conteo cada 48 hrs.

9.4. Extracción de RNA de las DCs maduras e inmaduras

Se obtuvo el RNA total a partir de las DCs maduras y DCs inmaduras producidas en cultivo; para recuperar las DCS del cultivo se usó Tripsina 1X (0.05% Trypsin, SIGMA-ALDRICH, 0.02% EDTA) y para extraer el RNA el TRIZOL[®] Reagent.

La calidad del RNA total obtenido fue analizado mediante electroforesis en agarosa al 0.8%, de esta forma se observó la integridad del RNA (Fig.11). Posteriormente fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260nm.

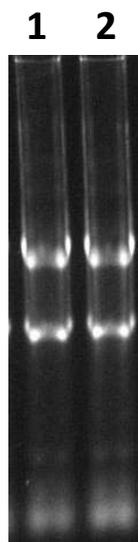


Fig. 11. RNA total de DCs de pollo. Carril 1, RNA de DCs inmaduras, carril 2, RNA de DCs maduras. Se pueden apreciar las tres bandas del RNA ribosomal (28S, 18S y 5S). Gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio [5 mg/ml].

9.5. Amplificación por PCR de genes de las DCs de pollo.

La amplificación de los genes *GAPDH* y *Zbtb46* se realizó utilizando el cDNA generado a partir del RNA total de las DCs inmaduras y DCs maduras. La amplificación del gen *Zbtb46* se observó en las DCs inmaduras (Fig.12), mientras que las DCs maduras no muestran amplificación de dicho gen, lo cual indica que *Zbtb46* es expresado solamente por las DCs en estado inmaduro. El gen *Zbtb46* es un factor de transcripción expresado solamente por DCs en estado inmaduro y no se presenta en ninguna otra célula del sistema inmune. La expresión de este gen está reportado solamente en DCs inmaduras de ratón y humano (Meredith *et al.*, 2012). El gen *GAPDH* es un gen de expresión basal, el cual se presenta de manera constante en todas las células y es de utilidad como señal control de la transcripción inversa y la misma PCR (Eisenberg y Levanon, 2013).

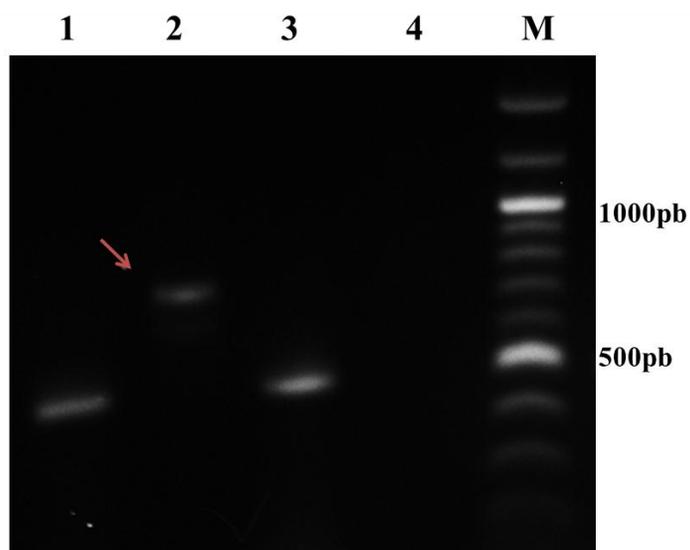


Fig. 12. Amplificación por PCR del gen *GAPDH* y del factor de transcripción *Zbtb46*. Carril 1 y 3 gen *GAPDH*. Carril 2 y 4 gen *Zbtb46*. Carril 1 y 2, DCs inmaduras. Carril 3 y 4, DCs maduras. M Marcador de DNA. *GAPDH* 450pb y *Zbtb46* 730pb. Gel de agarosa al 0.8% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio [5mg/ml].

Las condiciones de PCR para *Zbtb46* fueron optimizadas utilizando un gradiente de $MgCl_2$, así como el uso de aditivos como BSA (600 ng/ul) y DMSO (7.5%), para aumentar la estabilidad y progresividad de la amplificación.

10. DISCUSIÓN

Las células dendríticas (DCs) son las células profesionales presentadoras de antígeno, que tienen un papel fundamental en la ejecución y regulación de la respuesta inmune (Banchereau y Steinman, 1998). Las DCs vinculan la inmunidad innata y la adaptativa, teniendo una participación importante desde el momento de la invasión del patógeno, hasta la activación y regulación de la respuesta de los linfocitos T. En la médula ósea de los vertebrados se producen precursores celulares, que entran a la circulación y migran a los tejidos periféricos, donde residen como DCs inmaduras con gran capacidad fagocítica. Existen diferentes tipos de DCs, que dependiendo del origen y del sitio donde residen, reciben diferente nombre. Las DCs inmaduras capturan antígenos y migran a los órganos linfoides secundarios, en esta etapa las DCs sufren una serie de cambios funcionales y fenotípicos. Una vez procesado el antígeno por las DCs, estas células son capaces de presentarlos asociados a sus moléculas MHC-I o MHC-II a los linfocitos T. De esta manera se logra inducir la activación celular, logrando promover el proceso inmune mediado por los linfocitos T, la activación de los linfocitos B para producir linfocitos B de memoria y su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. En mamíferos ya se conocen varias funciones de las DCs y están bien caracterizadas, de hecho han sido propuestas en la terapia de ciertos cánceres posteriores a la inmunización (activación) con un antígeno determinado. En años recientes la inmunoterapia ha cobrado relevancia y la generación de modelos para la identificación de antígenos potenciales hace atractivo el estudio de las células dendríticas debido a su especialización en dicha función.

En el presente trabajo desarrollamos una metodología para aislar y caracterizar células dendríticas *in vitro* a partir de precursores CD34⁺ de médula ósea de pollo. Basado en el protocolo de 7 días descrito por Wu y colaboradores (2009), generamos DCs inmaduras de médula ósea de pollo en presencia de las citocinas GM-CSF e IL-4 ó de 3 días de acuerdo al protocolo de Frankenberger y Schendel (2013). En ambos protocolos el GM-CSF es una citocina efectiva y capaz de inducir el establecimiento y diferenciación de células progenitoras de MO. Según nuestros resultados se muestra que la población celular de la MO aislada contiene aproximadamente 42% de células precursoras de DCs, es decir, a partir de 6×10^6 células de MO total, solo se seleccionaron 2.5×10^6 empleando el producto comercial denominado Histopaque-1119, cuya característica principal de las DCs aisladas

fue adherirse a la caja petri después de 24 h de incubación en condiciones estándar de cultivo celular. El Histopaque-1119 es empleado para la separación de células de acuerdo a su tamaño y complejidad, por ejemplo, para separar células mononucleares de eritrocitos y plaquetas, se basa en el principio de densidad celular después de la exposición a una fuerza centrífuga. Se han reportado estrategias alternas para aumentar la concentración y pureza de DCs, usando microperlas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos o anticuerpos fluorescentes, posteriormente se emplea citometría de flujo para cosechar el tipo celular deseado.

Datos en la literatura muestran la importancia del empleo de citocinas para lograr la sobrevivencia de las DCs (Conti, *et al.*, 2008; Hiasa, *et al.*, 2009). Justamente, cuando las DCs son cultivadas en ausencia de citocinas no proliferan y mueren. Mientras que cuando se administran citocinas, tales como GM-CSF e IL-4 se mantienen vivas por más de 48 h, pero no proliferan.

La maduración de las DCs se caracteriza por una serie de cambios morfológicos, que van de células grandes redondas, a células con prolongaciones que semejan dendritas. A nivel molecular en el proceso de maduración las DCs pierden los receptores de endocitosis/fagocitosis, ocurre una reorganización del citoesqueleto, se adquiere mayor motilidad celular, se secretan citocinas inmunoreguladoras y quimiocinas, se sobreexpresan moléculas de adhesión, se presenta la translocación de MHC-I y MHC-II, además se expresan moléculas coestimuladoras como por ejemplo CD40, CD80, CD83 y CD86. Estas mismas características fenotípicas también han sido observadas en DCs de porcinos, humano y ratón derivadas a partir de precursores hematopoyéticos (Ardavin *et al.*, 2001).

En nuestro procedimiento, una vez obtenidas las DCs inmaduras generadas a partir de los precursores de MO como ya se describió en párrafos anteriores, inducimos su maduración *in vitro* utilizando diferentes estímulos (antígenos) como: LPS de *E. coli*, bacterias *E.coli* y el péptido viral GP5. De hecho, se ha reportado la inducción de maduración de las DCs de mamíferos empleando LPS y CD40L con buenos resultados (Wurten *et al.*, 2001; Bai *et al.*, 2002).

El cambio de morfología de células redondas y grandes de las DCs (inmaduras) a células semejantes a dendritas DCs (maduras), fue diferencial de acuerdo al antígeno empleado, es decir, el mejor agente estimulante de la maduración de las DCs en nuestros grupos experimentales fue la adición del péptido viral GP5 del virus PRRSV de porcinos, seguido de bacterias *E.coli* inactivadas, y finalmente con la adición del LPS de origen bacteriano. Este dato fue confirmado cuantitativamente a través de conteo simple de las DCs inmaduras y maduras.

El proceso molecular y celular anterior fue determinado por la naturaleza del antígeno, así como por la concentración empleada del agente estimulante, lo cual representa la acción diferencial en la eficiencia de los antígenos en el proceso de maduración. Como parte de los mecanismos de señalización intracelular las DCs expresan un repertorio específico de receptores TLRs, capaces de reconocer componentes microbianos y señales internas extrañas, los cuales estarían involucrados en el inicio del proceso de captura y posterior procesamiento del antígeno. Dependiendo de la naturaleza del antígeno este será procesado como exógeno o endógeno y finalmente presentado al linfocito T virgen unido a moléculas MHC-I o MHC-II. El compuesto LPS es un antígeno bacteriano que se une al TLR4 e induce la maduración de DCs humanas y de ratón (Liang *et al*, 2013). Por su parte, las bacterias inactivadas inducen la maduración de DCs debido a las diferentes moléculas que conforman dicho microorganismo y que funciona como antígeno. El péptido viral GP5 de un virus porcino que produce el síndrome respiratorio y reproductivo mostró ser el mejor antígeno, tal como muestran los resultados en donde se observa un mayor porcentaje de maduración de las DCs.

Para la caracterización molecular se puede emplear inmunofluorescencia y/o citometría de flujo, la cual es facilitada por el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de marcadores celulares que ayudan a identificar subpoblaciones celulares de una manera más precisa y eficiente. Con base en la identificación de marcadores moleculares expresados en la superficie de las DCs, se puede hacer una diferenciación inmediata entre inmaduras y maduras. En el presente trabajo no se emplearon ninguna de estas metodologías ya que en el mercado los anticuerpos anti-pollo

en su mayoría no se encuentran disponibles, ya que las DCs de pollo han sido poco estudiadas, en contraparte con otras especies como el ratón y el humano.

Para tener evidencia de la naturaleza de las DCs obtenidas de MO, se determinó de manera molecular la expresión del gen del factor de transcripción *Zbtb46* específico de tejido a través de la técnica de PCR cualitativa. Aunque solo se ha reportado la expresión del gen *Zbtb46* en ratón y humano, en la base de datos se encontró la secuencia homóloga en el genoma del pollo (NCBI Reference Sequence: XM_004947124.1). El gen *Zbtb46* es miembro de la familia BTB-ZF, esta familia contiene algunos otros factores de transcripción como: Bcl6, PLZF, ThPOK, PLZF, MARZ, BAZF, LRF y Miz, los cuales funcionan como represores transcripcionales que controlan el desarrollo de otras células inmunes y su función. El factor de transcripción de tipo dedos de zinc *Zbtb46* es un represor transcripcional específico de las DCs, necesario para evitar la activación de las DCs en estado inmaduro. Dicho factor no es expresado por ninguna otra célula del sistema inmune, como monocitos o macrófagos (Meredith, *et al.*, 2012).

En el presente trabajo se determinó la expresión de dos genes de las DCs de pollo, el gen *GAPDH*, que fue usado como control de la expresión y el gen de interés *Zbtb46*, que como se ha mencionado es un factor de transcripción expresado en DCs en estado inmaduro. Con base en los resultados de PCR se puede observar que este gen también se está expresando en DCs de pollo como muestran los resultados. Se encontró de manera clara la amplificación de *Zbtb46* en las DCs inmaduras, lo cual coincide con lo reportado para ratón y humano, mientras que en las DCs maduras no se observó amplificación del gen.

Para robustecer los resultados anteriores es necesario realizar otras pruebas que nos permitan comprobar dicha hipótesis, en este caso, considerar algunos factores como; tiempo de cultivo celular, número de células y la cantidad del RNA, empleados para esta metodología, que puedan estar afectando dicho resultado. Además sería útil amplificar *Zbtb46* en células progenitoras de DCs y DCs residentes de otro sitio, por lo cual en este caso, realizamos una pequeña prueba con células procedentes de médula ósea y células de sangre periférica. En estos dos casos se observó también la amplificación de *Zbtb46*, por lo

cual se puede considerar que las células progenitoras de DCs en sangre periférica, están expresando al gen *Zbtb46*. Otras metodologías de mayor precisión para validar este resultado podrían ser el uso de la PCR cuantitativa, para obtener el número de copias y la cantidad relativa del gen *Zbtb46* expresado en cada tipo celular empleado.

Finalmente la generación de anticuerpos de alta afinidad y especificidad ha sido de gran enfoque en la actualidad, en aplicaciones como la investigación, diagnóstico y uso terapéutico, sin embargo la obtención de anticuerpos específicos contra ciertos antígenos sigue siendo una dificultad. Así como se ha desarrollado la inmunización *in vivo*, se comenzó a implementar la inmunización *in vitro*, con algunas ventajas y desventajas. Con este trabajo se pretende llevar a cabo posteriormente la inmunización *in vitro*, usando las DCs de pollo aisladas y maduras con antígenos específicos para estimular a los linfocitos T virgen *in vitro*. En estas circunstancias los linfocitos T podrían diferenciarse en los diferentes tipos funcionales de linfocitos. De funcionar lo anterior conllevaría a la activación de la inmunidad humoral, y de esta forma generar linfocitos B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos. Estandarizado el protocolo de aislamiento, maduración e inmunización (cocultivo de DCs maduras y linfocitos), se podría lograr la generación de anticuerpos monoclonales recombinantes mediante la técnica conocida como Phage Display, con la finalidad de obtener anticuerpos terapéuticos, de diagnóstico o catalíticos de alta afinidad contra diferentes antígenos de interés.

Las DCs cumplen un papel fundamental en la ejecución y regulación de la respuesta inmune. En los últimos años su producción *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en Inmunología, donde cada vez se desarrollan nuevas metodologías que garanticen la generación de DCs *in vitro* en condiciones óptimas y poder explotar su potencial de células presentadoras de antígeno, y ser empleadas como adyuvantes naturales para generar resistencia inmune.

11. CONCLUSIONES

- El uso de las citocinas GM-CSF e IL-4 son necesarias para generar DCs *in vitro* a partir de células precursoras de médula ósea de pollo.
- El protocolo de 3 días de diferenciación y maduración de las DCs es suficiente para generar DCs en sus dos estados funcionales.
- Antígenos de diferente naturaleza estimulan a las DCs de manera diferencial y en este trabajo el antígeno viral resultó mejor estimulante para la maduración de las DCs.
- Por primera vez se demuestra y se reporta que las DCs inmaduras de pollo expresan de manera específica el Factor de Transcripción dedos de zinc Zbtb46.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2008. *Inmunología celular y molecular*. 6ª edición. Madrid. Elsevier Saunders.
- Alikhani, F.E. 2013. Phage Display Technology. *Journal of Biology and Today's World*. 2(6): 289-295.
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., von Andrian, U. H. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*, 29(3), 325–42.
- Ardavín, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C. F., Marín, A. R., Hernández, H. 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in immunology*, 22(12), 691–700.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunology*. 2000. 18: 767-811.
- Banchereau, J., Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245–52.
- Barchet, W., Cella, M., Colonna, M. 2005. Plasmacytoid dendritic cells-virus experts of innate immunity. *Seminars in immunology*, 17(4), 253–61.
- Belz, G.T., Nutt, S.L. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature Reviews Immunology*. Jan 25; 12(2):101-113.
- Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845–859.
- Broere, F., Apasov, S. G., Sitkovsky, M. V, Eden, W. V. 2011. Principles of Immunopharmacology. (F. P. Nijkamp & M. J. Parnham, Eds.), 15–28. doi:10.1007/978-3-0346-0136-8
- Brownlee, J. 2007. A Review of the Clonal Selection Theory of Acquired Immunity, (February), 1–6.
- Burry, R.W. 2000. Specificity Controls for Immunocytochemical Methods. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 48 (2): 163-165, 2000.

- Cauerhff, A., Goldbaum, F. A., Braden, B. C. 2004. Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody, 3539–3544.
- Chung, N. P.-Y., Chen, Y., Chan, V. S. F., Tam, P. K. H., Lin, C.-L. S. 2004. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histology and histopathology*, 19(1), 317–24.
- Coico, R., Sushine, G. 2009. *Immunology. A short course*. 6th edition. United States of America. Wiley-Blackwell. p 49-55.
- Comabella, M., Montalban, X., Münz, C., Lünemann, J.D. 2010. Targeting Dendritic Cells to Treat Multiple Sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. Sep; 6(9):499-507.
- Conti, L., Cardone, M., Varano, B., Puddu, P., Belardelli, F., & Gessani, S. (2008). Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *European journal of immunology*. 38(3), 750–62.
- Cooper, E. L., Angeles, L. 2001. Immune Response : Evolution. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group. 1–8.
- Davison, F., Kasper, B., Schat, K.A. 2008. *Avian Immunology*. Gran Bretaña. Elsevier.
- Eisenberg, E., Levanon, E. Y. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in genetics : TIG*, 29(10), 569–74.
- Frankenberger, B., Schendel, D.J. 2012. Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *European journal of cell biology*, 91(1), 53-58.
- Gatti, E., Pierre, P. 2003. Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), 468–473.
- George, A.J.T., Urch, C.E. 2000. *Diagnostic and Therapeutic Antibodies (Methodos in Molecular Medicine)*. United States of America. Humana Press Inc. p 23-34.
- Ghosh, S., Ansar, W. 2013. Monoclonal Antibodies: A Tool in Clinical Research. *Indian Journal of Clinical Medicine*, 9.
- Gregori, S. 2010. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue antigens*, 77(2), 89–99.

- Hackstein, H., Thomson, A.W. 2004. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature Reviews Immunology*. Jan: 4(1):24-34.
- Hiasa, M., Abe, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Moriyama, K. (2009). GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-converting enzyme (TACE), (November), 1–3.
- Höglund, P. 2006. Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger. *European journal of immunology*, 36(2), 264–6.
- Huether, S.E., 2011. *Understanding Pathophysiology*. 5th edition. United States of America. Elsevier. p 143-144.
- Igyártó, B.-Z., Lackó, E., Oláh, I., Magyar, A. 2006. Characterization of chicken epidermal dendritic cells. *Immunology*, 119(2), 278–288.
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Steinman, R. M., Romani, N., Schuler, G., Brinster, C. 2009. Isolation of dendritic cells. *Current protocols in immunology* / edited by John E. Coligan .et al, Chapter 3, Unit 3.7. doi:10.1002/0471142735.im0307s86
- Iruretagoyena, B., Mirentxo, I., Sergio, H., Iacobella, G., Alexis, M., Kalergis, P. 2005. Células Dendríticas como Determinantes del Equilibrio entre la Inmunidad y Autoinmunidad. *Reumatología* 2005; 21 (2): 58-64.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. New York: Garland. Science; 2001.
- Kaiser, P. 2010. Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*, 39(5), 309–24.
- Keestra, a M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., van Putten, J. P. M. 2010. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 460–7.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. 2007. *INMUNOLOGÍA de Kuby*. 6^a edición. México, D.F. McGraw-Hill.
- Kuhn, S., Ronchese, F. 2013. Emerging players in the antitumor immune response Monocyte-derived dendritic cells, (November), 10–12.

- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. 2009a. Pathogen recognition in the innate immune response. *The Biochemical journal*, 420(1), 1–16.
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. 2009b. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(4), 621–5.
- Kushwah, R., Hu, J. 2011. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell & bioscience*, 1(1), 20.
- Lambotin, M., Raghuraman, S., Keller, F.S., Baumert, T.F., Barth, H. 2010. A look behind closed doors: interaction of persistent viruses with dendritic cells. *Nature Reviews Microbiology*; 8 (5): 350-360.
- Liang, J., Fu, J., Kang, H., Lin, J., Yu, Q., Yang, Q. 2013. The stimulatory effect of TLRs ligands on maturation of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 155(3), 205–10.
- Maddur, M. S., Vani, J., Dimitrov, J. D., Balaji, K. N., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Bayry, J. 2010. Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *The Open Arthritis Journal*, 3, 1–7.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. Nov; 1(2):135-145.
- Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–26.
- Meredith, M. M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A. O., Schreiber, H. a, Guermonprez, P., Nussenzweig, M. C. 2012. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of experimental medicine*, 209(6), 1153–65.
- Meredith, M. M., Liu, K., Kamphorst, A. O., Idoyaga, J., Yamane, A., Guermonprez, P., Nussenzweig, M. C. 2012. Zinc finger transcription factor zDC is a negative regulator required to prevent activation of classical dendritic cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine*, 209(9), 1583–93.
- Moniuszko, A., Penza, P., Czupryna, P., Pancewicz, S., Zajkowska, J. 2013. The role of dendritic cells in the pathogenesis of Lyme disease. *Central European Journal of Immunology*, 4(4), 569–577.

- Murray, P. J., Wynn, T. A. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), 723–37.
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., Paul, W. E. 1999. THE IL-4 RECEPTOR: Signaling Mechanisms and Biologic Functions. *Annu. Rev. Immunol.* 1999. 17: 701-38.
- Parham, P. 2009. *The immune system*. Third edition. United States of America. T&F Informa. p 1-3.
- Paulin, M. T. 2014. Inmunidad humoral. *ConScience & Art. Beyond the method.* 1(3): 147-150.
- Ray, S. (2013). Autoimmune Disorders: An Overview of Molecular and Cellular Basis in Today's Perspective. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 01 (S10).
- Sardar, A. J., Oates, M. E., Fang, H., Forrest, A. R. R., Kawaji, H., Gough, J., Rackham, O. J. L. 2014. The evolution of human cells in terms of protein innovation. *Molecular biology and evolution*, 31(6), 1364–74.
- Smith, G.P., Petrenko, V.A. 1997. Phage Display. *Chemical Reviews*. 97, 391-410.
- Steinman, R. M. 2004. Dendritic cells: from the fabric of immunology. *Clinical and investigative medicine. Médecine clinique et experimentale*, 27(5), 231–6.
- Steinman, R. M. 2006. Kicking off adaptive immunity: the discovery of dendritic cells. *JEM The Rockefeller University Press*. Vol.203, No.7, July 10, 2006, 1622.
- Steinman, R. M. 2007. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nature medicine*, 13(10), 1155–9.
- Steinman, R. M., Hawiger, D., Nussenzweig, M. C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology*, 21, 685–711.
- Steinman, R. M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P., Mellman, I. 1999. Antigen Capture, Processing, and Presentation by Dendritic Cells : Recent Cell Biological Studies. *Human Immunology*; 60, 562-567.
- Steinman, R. M., Pope, M. 2002. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy, (June), 1519–1526.
- Steinman, R.M., Hemmi, H. 2006. Dendritic cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. *Springer- Verlag Berlin Heidelberg. CTMI (2006) 311: 17-58.*

- Todd, I. 2001. Cells of the Immune System. Encyclopedia of life sciences. 2001. Nature Publishing Group. p 1-7.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., Ni, L., Flamar, A.L., Zurawski, S., Zurawski, G., Palucka, K., Banchereau, J., Oh, S. 2011. Targeting Human Dendritic Cell Subsets for Improved Vaccines. *Semin Immunol.* February; 23 (1): 21-27.
- Van Niel, G., Wubbolts, R., Stoorvogel, W. 2008. Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Current opinion in cell biology*, 20(4), 437–44.
- Vázquez, M. B., Sureda, M., Rebollo, J. 2012. Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, 31(1), 21–30.
- Verdijk, P., van Veelen, P. a, de Ru, A. H., Hensbergen, P. J., Mizuno, K., Koerten, H. K., Mommaas, a M. 2004. Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *European journal of immunology*, 34(1), 156–64.
- Wang, F., Ekiert, D. C., Ahmad, I., Yu, W., Zhang, Y., Bazirgan, O., Smider, V. V. 2013. Reshaping antibody diversity. *Cell*, 153(6), 1379–93.
- Werling, D., Jungi, T. W. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary immunology and immunopathology*, 91(1), 1–12.
- Wieder, E. 2003. Dendritic Cells: A Basic Review. *International Society for Cellular Therapy*. 1-6.
- Wojas, K., Tabarkiewicz, J., Roliński, J. 2003. Dendritic cells in cancer immunotherapy - a short review. *Folia morphologica*, 62(4), 317–8.
- Wu, Z., Kaiser, P. 2011. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. *Immunobiology*, 216(11), 1177–83.
- Wu, Z., Rothwell, L., Young, J. R., Kaufman, J., Butter, C., Kaiser, P. 2010. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 129(1), 133–45.
- Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., Zou, W. 2012. Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & molecular immunology*, 9(1), 11–9.

ANEXO

Preparación de:

Buffer Fosfato Salino (PBS)

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

Disolver 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na₂HPO₄ y 0.24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 7.4 con HCl. Adicionar H₂O para 1 litro. Filtrar y alicuotar, después esterilizar en el autoclave por 20 minutos a 15 psi.

Medio de cultivo RPMI 1640

Adicionar el 10% de suero de pollo inactivado estéril y el 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina), homogenizar y filtrar con membrana 0.22. Mantener en refrigeración.

Bromuro de etidio (10mg/ml)

Adicionar 1 g de bromuro de etidium a 100 ml de H₂O.