



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Immunización *in vitro* de células dendríticas de pollo para la producción de anticuerpos

Tesis que presenta:

QFB. Raúl Sánchez Vázquez

para obtener el grado de Maestro en Ciencias Biológicas

Asesor:

Doctor en Ciencias Biomédicas Marcos Cajero Juárez

Co-asesor:

Doctor en Ciencias Biomédicas Rosa Elvira Núñez Anita

Morelia, Michoacán, agosto de 2016

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Animal-IIAF-CMEB de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección del Dr. Marcos Cajero Juárez y co-dirección de la Dra. Rosa Elvira Núñez Anita.

El trabajo fue financiado parcialmente por el Proyecto Fondos Mixtos-CONACyT-Gobierno del Estado de Michoacán (MICH-2012-CO5-197785) y La Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo 2016.

Raúl Sánchez Vázquez fue apoyado por la beca CONACyT (No. de registro: 305198)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN.....	8
2. ABSTRACT	9
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1. Sistema inmunológico.....	10
3.2. Inmunidad humoral.....	10
3.3. Estructura de los anticuerpos	10
3.4. Interacción antígeno-anticuerpo.....	11
3.5. Anticuerpos policlonales y monoclonales	12
3.6. Inmunidad celular	12
4. ANTECEDENTES.....	13
4.1. Células dendríticas.....	13
4.2. Origen de las DCs	13
4.3. Características de las DCs.....	14
4.4. Tipos de DCs.....	17
4.5. Aplicaciones de las DCs	18
5. JUSTIFICACIÓN.....	20
6. HIPÓTESIS	21
7. OBJETIVO GENERAL	21
8. OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
9. MATERIALES Y MÉTODOS	21
9.1. Reactivos.....	21
9.2. Aislamiento de células de médula ósea de pollo	21
9.3. Generación y maduración de DCs derivadas de médula ósea	22
9.4. Caracterización morfológica.....	23
9.5. Análisis de fenotipo por Inmunofluorescencia	23
9.6. Caracterización metabólica.....	23
9.7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	24
9.8. Inmunización <i>in vitro</i>	24

9.9.	Detección de Abs IgY	25
9.10.	Ensayos de expresión génica.....	25
9.11.	Análisis estadístico.....	26
10.	RESULTADOS	27
10.1.	Generación y caracterización de las DCs.....	27
10.2.	Caracterización molecular.....	29
10.3.	Inmunización <i>in vitro</i>	34
11.	DISCUSIÓN.....	38
12.	CONCLUSIONES.....	41
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de los Abs.....	11
Figura 2. Origen y diferenciación de subtipos de DCs.....	14
Figura 3. Maduración de las DCs.	17
Figura 4. Estimulación de linfocitos T por las DCs.	19
Figura 5. Esquema de diferenciación y maduración de las DCs.	22
Figura 6. Procedimiento para la IIV.	24
Figura 7. Morfología de las DCs aisladas y diferenciadas a partir de médula ósea de pollo.	27
Figura 8. Cinética de proliferación de las DCs.....	28
Figura 9. Caracterización metabólica de las DCs.....	29
Figura 10. Análisis de la expresión de marcadores de membrana de las DCs mediante IF.	32
Figura 11. Caracterización molecular de las DCs.	33
Figura 12. Producción de anticuerpos a partir de las PMBCs.....	35
Figura 13. Amplificación de los genes VL después de la IIV.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores fenotípicos y funcionales de las células del sistema inmune.....	15
Tabla 2. Lista de anticuerpos para el análisis fenotípico.....	23
Tabla 3. Lista de oligonucleótidos.....	26

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo (del inglés antibody)
Ag	Antígeno (antigen)
APC	Célula presentadora de antígeno (Antigen-presenting cell)
CD	Grupo de diferenciación (Cluster of differentiation)
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CDP	Progenitor común de células dendríticas (Common progenitor of Dendritic cells)
CMP	Progenitor común mieloide (Common myeloid progenitor)
DC	Célula dendrítica
DCi	Célula dendrítica inmadura
DCm	Célula dendrítica madura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fc	Fragmento cristalizante de anticuerpo (Fagment crystallizable)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Fluorescein IsoTioCyanate)
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-posphate Deshydrogenase)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocito/monocito (Granulocyte
GP5	Proteína viral de PRRSV
INF	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IIV	Inmunización <i>in vitro</i>
LLME	L-leucyl-L-leucine methyl ester
LPS	Lipopolisacárido

mAb	Anticuerpo monoclonal (Antibody monoclonal)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
M-CSF	Factor estimulante de colonias macrófago (Macrophage colony-stimulating factor)
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Médula ósea
pAb	Anticuerpo policlonal
PAMP's	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen associated molecular patterns)
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfatos salino (Phosphate buffer-saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase chain reaction)
PMBC	Células mononucleares de sangre periférica
RNA	Ácido ribonucleico
rmp	Revoluciones por minuto
SI	Sistema inmunológico
TBE	Solución de Tris-Borato-EDTA
Th	Célula T cooperadora (T helper cell)
TLR	Receptor tipo Toll (Toll-like Receptor)
UFC	Unidades formadoras de colonias
µg	Microgramo
zBTB46	Factor de transcripción

1. RESUMEN

Los anticuerpos (Abs) han contribuido al desarrollo de la investigación básica y aplicada, diagnóstico y terapia de diversos tipos de enfermedades. Existen dificultades para la generación de Abs específicos contra ciertos antígenos (Ags) que incluyen los que se producen en pequeñas cantidades, tienen alta toxicidad y homología con el hospedero y la poca disponibilidad del Ag puro. Como alternativa a dicho problema, la inmunización *in vitro*, tiene algunas ventajas tales como: requerimiento de bajas cantidades de Ag y no se somete al animal a adyuvantes tóxicos. Se sabe que los Abs obtenidos *in vitro* tienen una baja afinidad comparados con los Abs generados en la inmunización *in vivo*, sin embargo, es posible aumentar la afinidad Ag-Ab mediante la obtención de mutantes una vez conocida la secuencia del Ab. El presente trabajo, planteó estimular los linfocitos B por las células dendríticas (DCs) para generar Abs específicos de Ag. Para determinar la naturaleza de las DCs y la posible aplicación de estas, como un modelo para inmunización *in vitro*, se evaluaron los siguientes aspectos: i) Diferenciación de las DCs a partir de médula ósea de pollo empleando las citocinas IL4 y GM-CSF; ii) Maduración de las DCs con Ags de diferente naturaleza; iii) Caracterización de las DCs mediante análisis morfológico y metabólico; iv) Identificación de marcadores de DCs inmaduras y maduras tales como, el factor de transcripción zBTB46, MHC-II y moléculas coestimuladoras de células linfoides CD40, CD80 y CD86. Una vez determinada la naturaleza del cultivo de DCs se evaluó la capacidad de los linfocitos B para generar Abs específicos contra Ags realizando un co-cultivo de DCs con células mononucleares de sangre periférica (PMBCs) y se detectó la IgY específica. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Las DCs se pueden identificar por el cambio morfológico inducido por el Ag en presencia de citocinas y la acumulación de ácido grasos en el citoplasma. Las DCs maduras reprimen la expresión del factor de transcripción zBTB46, y sobreexpresan MHC-II, CD40, CD80 y CD86. Se sugiere que las IgYs detectadas en el co-cultivo DCs/PMBCs son específicas para los Ags: *E. coli* inactivada, LPS de *S. typhimurium*, Proteína A de *S. aureus*, IgG humana. Se propone como alternativa, utilizar las DCs como estimulantes de las PMBCs para generar Abs específicos *in vitro*.

Palabras clave: Células, Anticuerpos, Inmunización, Antígenos, Diferenciación celular.

2. ABSTRACT

The antibodies have contributed to the development of basic and applied research, diagnosis and therapy of various types of diseases. There are difficulties in the generation of specific Abs against certain antigens including those produced in small quantities, have high toxicity and homology with the host and the unavailability of pure antigen. As an alternative to this problem, *in vitro*, immunization has some advantages such as: requirement of low amounts of antigen and is not subject to the animal to toxic adjuvants. It is known that *in vitro* antibodies have a low affinity compared with antibodies generated *in vivo* immunization, however, it is possible to increase the antigen-antibody affinity by obtaining mutants once known sequence antibody. This work, raised stimulate B lymphocytes by dendritic cells (DCs) to generate antibodies specific of antigen. To determine the nature of the DCs and the possible application of these, as a model for *in vitro* immunization, the following aspects were evaluated : i) Differentiation of DCs from chicken bone marrow using the IL4 and GM-CSF cytokines; ii) Maturation of DCs with Ags different nature; iii) characterization of morphological and metabolic DCs by analysis; iv) Identification of markers of immature and mature DCs such as transcription factor zBTB46, MHC-II and costimulatory molecules CD40 lymphoid cells, CD80 and CD86. After determining the nature of culture DCs capacity of B cells was evaluated to generate Abs against specific Ags conducting a co-culture with DCs mononuclear peripheral blood cells (PBMCs) and specific IgY was detected.

The results obtained were as follows: DCs can be identified by morphological change induced by cytokines in the presence of Ag and fatty acid accumulation in the cytoplasm. Mature DCs repress the expression of the transcription factor zBTB46 and overexpress MHC-II, CD40, CD80 and CD86. It is suggested that IgYs detected in the co-culture DCs / PBMCs are specific for antigens: *E. coli* inactivated, LPS of *S. typhimurium*, Protein A of *S. aureus*, human IgG. It is proposed as an alternative, use DCs as stimulators of PBMCs *in vitro* to generate specific antibodies.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Sistema inmunológico

El sistema inmune ha evolucionado para reaccionar a la infección y lesión ocasionada por bacterias, hongos, virus y partículas extrañas (colectivamente llamados antígenos [Ags]) para desplegar respuestas inmunes protectoras. La gran diversidad del repertorio de receptores para cada uno de los diferentes Ags, es debida a la aleatoriedad de los reordenamientos somáticos, ya que es casi ilimitada, los receptores son expresados por los linfocitos T y B, que son las células del sistema inmune adaptativo.

3.2. Inmunidad humoral

Las principales moléculas del sistema inmunitario adaptativo son el Ab y el receptor del linfocito T. Mientras que los componentes de la inmunidad innata están programados para reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y por lo tanto reconocen características compartidas por grupos de moléculas extrañas como LPS, entre otros; el Ab y el receptor de célula T exhiben un grado mayor de especificidad porque reconocen determinantes antigénicos o epítopes específicos. Los Abs reconocen a una gran cantidad de epítopes en sustancias extrañas al organismo, además de poder distinguir entre los distintos microorganismos y moléculas, incluso los muy similares.

Los Abs son glicoproteínas producidas por las células plasmáticas que maduran a partir de las células B en respuesta a un Ag (Huether *et al.*, 2011). Los Abs existen en dos formas diferentes: los Abs unidos a la membrana de células B, los cuales confieren especificidad antigénica y los Abs secretados que actúan como efectores de la inmunidad humoral.

3.3. Estructura de los anticuerpos

Una molécula de Ab tiene una estructura cuaternaria compuesta por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas (Fig.1). Estas cadenas constan de regiones amino terminales, las cuales están implicadas en la interacción con el Ag. En las cadenas pesadas (extremo carboxilo terminal) se encuentran las regiones constantes, las cuales tienen la función efectora del Ab. Cada cadena pesada y ligera está compuesta de una región variable y de una región constante (Almagro y Fransson, 2008).

3.4. Interacción antígeno-anticuerpo

La interacción Ab-Ag incluye diversas interacciones débiles no covalentes (puentes de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrófobas e interacciones de Van Der Waals) entre el epítipo del Ag y los dominios de la región variable (VH y VL) de la molécula del Ab, en particular las regiones determinantes de complementariedad (CDR) (Kierny *et al.*, 2012; Reverberi y Reverberi, 2007).

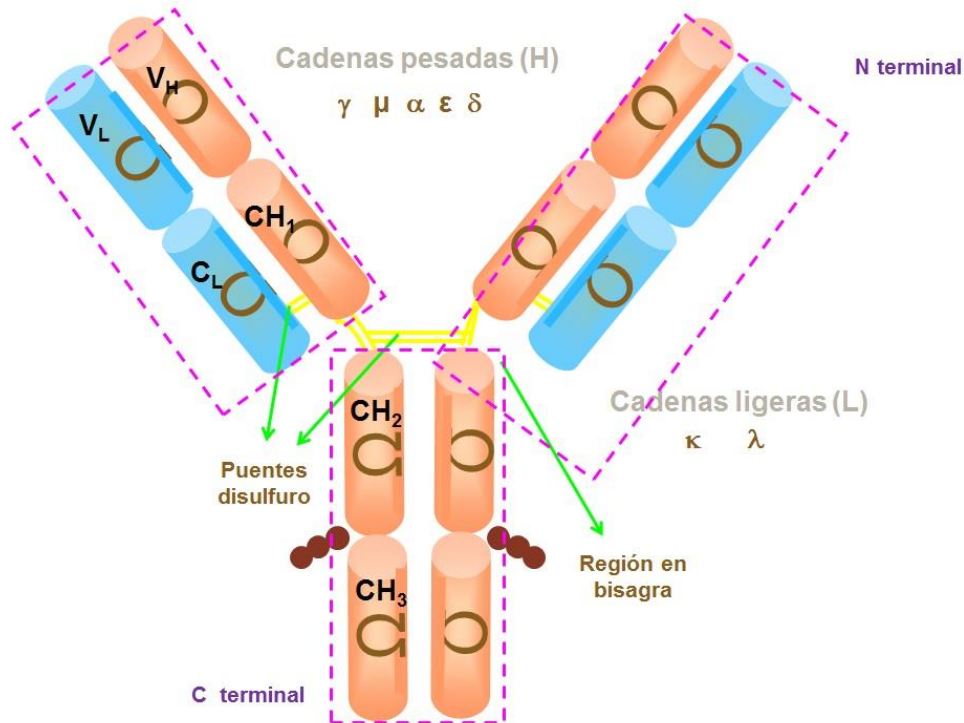


Figura 1. Estructura general de los Abs.

Cada cadena pesada y ligera en un Ab contiene una región variable (V) amino terminal (VL y VH), que incluye 100 a 110 aminoácidos, y difieren de un Ab con otro. El resto de cada cadena en la molécula, las regiones constantes (C) (CL, CH) muestran una variación limitada que define los dos subtipos de cadena ligera y las cinco subclases de cadena pesada. Algunas cadenas pesadas (γ , δ y α) contienen asimismo una región de bisagra rica en prolina (amarillo). Las porciones amino terminales, que corresponden a las regiones V, se unen a Ag; los otros dominios median las funciones efectoras. Las cadenas pesadas (μ y ϵ) que carecen de una región de bisagra, contienen un dominio adicional en la parte media de la molécula. Círculos en café indican un grupo carbohidrato unido a la cadena pesada. (Modificado de Almagro y Fransson, 2008).

Los Abs se dividen en distintas clases y subclases en función de diferencias en la región constante de la cadena pesada. En mamíferos son IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. Sólo IgA e

IgG se dividen en subclases (Janeway *et al.*, 2001). En aves existen tres tipos de Abs: IgM, IgA e IgY, este último es el homólogo a la IgG en mamíferos (Davison *et al.*, 2008).

3.5. Anticuerpos policlonales y monoclonales

Los Abs policlonales son mezclas de Abs que reconocen diferentes epítopes y diferentes afinidades. Como la mayoría de Ags tienen diferentes epítopes, pueden estimular la proliferación y diferenciación de múltiples clonas de células B (Ansar y Ghosh, 2013).

La generación y producción de Abs monoclonales (mAbs) fue desarrollada por Kohler y Milstein en 1975 (Kohler y Milstein, 1975). Los mAbs tienen aplicaciones en el diagnóstico, investigación científica y como herramienta terapéutica en el tratamiento del cáncer, leucemia, rechazo de trasplantes y artritis. Las características que le confieren la aplicación clínica a los mAbs es su especificidad a un solo epítope (Ansar y Ghosh, 2013).

3.6. Inmunidad celular

La inmunidad celular está mediada por las células 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 no cumplen su función efectora. La inmunidad celular fomenta la destrucción de los microorganismos intracelulares mediante la eliminación de las células infectadas.

Las células dendríticas (DCs) juegan un papel importante en esta inmunidad. Estas células participan en la activación de las células T vírgenes, en la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas que son esenciales para la diferenciación de células T a células efectoras. Además las DCs estimulan a las células B para la generación de Abs.

4. ANTECEDENTES

4.1. Células dendríticas

Las DCs son las principales células presentadoras de antígeno, las cuales son células especializadas del sistema inmune implicadas en la captura de Ags microbianos y otros tipos, que lo presentan a las células T y B generando señales que estimulan la proliferación y diferenciación de estas células (Gabrilovich, 2004; Belz y Nutt 2012).

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 los 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 Ags extraños, mientras que las DCs maduras presentan Ags a las células T en los tejidos linfoides. Además, también las DCs inducen tolerancia inmunológica (Gregori, 2010), mediante la presentación de antígenos propios. Por lo tanto las DCs son reguladoras del sistema inmune y su maduración refleja una serie ordenada de eventos dependientes de señales que dan lugar a las funciones inmunomoduladoras (Gatti y Pierre, 2003).

4.2. Origen de las DCs

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.2). 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).

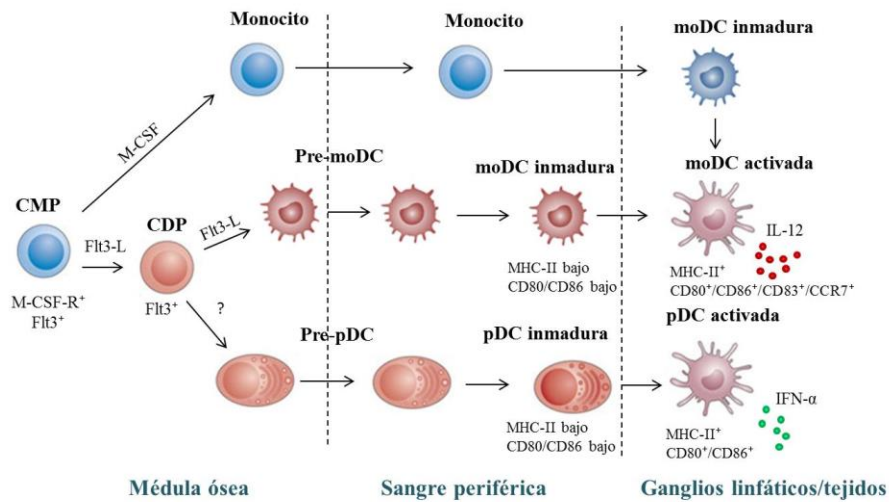


Figura 2. Origen y diferenciación de subtipos de DCs.

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 (premoDC) o pDC (pre-pDC). Pre-moDC y pre-pDC migran de la médula ósea a sangre periférica donde circulan como DC inmaduras caracterizadas por baja expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras, 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. (Modificado de Gregori, 2010; Belz y Nutt, 2012).

4.3. Características de las DCs

Existen dos estados funcionales de las DCs, lo que determina dos capacidades 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, por estímulos exógenos o endógenos 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).

El cambio fenotípico de las DCs se basa en la expresión de marcadores de superficie (Tabla 3). Las DCs inmaduras 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 defosfatidilserina (Maddur *et al.*, 2010).

CD	Linfocito T	Linfocito B	DC	Célula NK	Monocito/ Macrófago	Granulocito
CD4	+	-		-	+	+
CD8	+	-		-	+	+
CD11a	+	+		+	+	+
CD11b	+	+	+	+	+	+
CD11c	+	+	+	+	+	+
CD40	-	+	+	-	+	-
CD80	+	+	+	-	+	-
CD83	-	+	+	-	-	-
CD86	+	+	+	-	+	-
CD205	+	+	+		+	
MHC-I		+	+	+	+	+
MHC-II		+	+++		+	

Tabla 1. 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. En morado se resaltan las moléculas co-estimuladoras de células T y en verde las moléculas implicadas en la presentación de Ags. (Modificado de Steinman y Pope, 2002; Vázquez, 2012; 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, sobre-regulación 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).

Las DCs a través de su diferenciación y en sus dos estados funcionales tienen diferentes requerimientos metabólicos. En DCi la demanda metabólica es relativamente baja y el proceso metabólico principal es la oxidación de ácidos grasos y la generación de ATP mediante fosforilación oxidativa. Después con la estimulación del Ag se tiene un incremento rápido de glicolisis y en la vía de las pentosas fosfato; acompañado con un incremento en la capacidad de síntesis de ácidos grasos, mediante la activación de factores de transcripción como NF κ B e IRFs que activan la expresión de enzimas para la síntesis de ácidos grasos (Pearce y Everts, 2015). Por lo anterior, evidenciar la acumulación de ácidos grasos en forma de gotas en el citoplasma es un método válido para demostrar el cambio de las DCs inmaduras a estado maduro.

Para la caracterización molecular de las DCs en sus dos estados funcionales, se ha descrito la expresión de un factor de transcripción (zBTB46) que es específico de DCs inmaduras en humano y ratón, que actúa 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).

Factor inductor

Propiedades

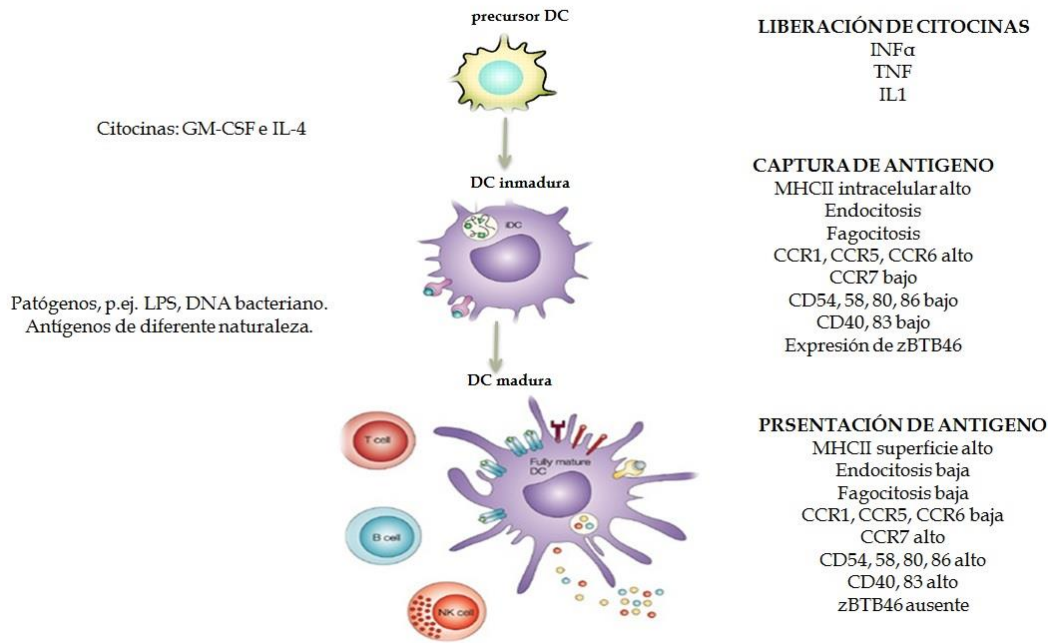


Figura 3. Maduración de las DCs.

Las DCs pueden capturar el Ag de diferentes formas; por fagocitosis, pinocitosis y macropinocitosis. Después de la captura del A y dependiendo de su naturaleza, 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 Ag y co-estimuladoras. 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).

4.4. Tipos de DCs

A pesar de la función similar de las DCs como APCs, 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 (moDC), DCs plasmocitoides (pDC) (Barchel *et al.*, 2005), DCs esplénicas marginales, DCs interdigitantes, DCs del centro germinal, DCs del timo y DCs del hígado (Chung *et al*, 2004; Vázquez, 2012).

En los últimos años se han desarrollado metodologías para la propagación *in vitro* de DCs con el uso de factores de crecimiento definidos, las modificaciones biológicas, genéticas, y farmacológicas (Gregori, 2010). La generación *in vitro* de las DCs ya sea a partir de médula ósea o de sangre periférica 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 aislado y cultivado células de médula ósea de pollo en presencia de GM-CSF e IL4, y obtuvieron DCs que mostraron morfología típica, con el fenotipo de la superficie de algunos marcadores moleculares como el MHC-II, (Wu, *et al.*, 2009) sin embargo, el tiempo requerido para la diferenciación y maduración de DCs es muy largo, por lo anterior, el presente trabajo propone establecer un periodo de tres días de cultivo y diferenciación; y por lo tanto que estas DCs puedan ser aplicables en la generación de Abs mediante inmunización *in vitro*.

4.5. Aplicaciones de las DCs

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 DC necesita de varias señales consecutivas. Las DCs pueden activar tanto a linfocitos T CD4+ como linfocitos T CD8+ por presentación antigénica vía MHCII y MHCI, respectivamente, lo que constituiría la primera señal. La segunda señal se realiza por la interacción con moléculas coestimuladoras presentes en las DCs maduras: CD80 y CD86 con el receptor linfocitario CD28, y la familia TNF con los receptores linfocitarios R-TNF. Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citocinas y células de memoria (Figura 4) (Vázquez, 2012).

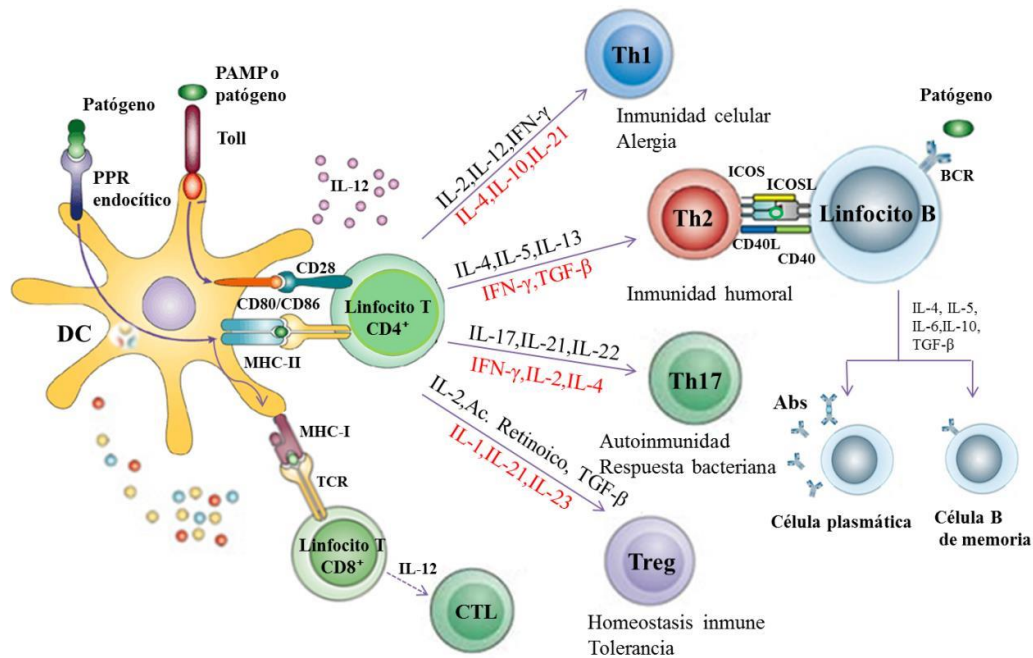


Figura 4. Estimulación de linfocitos T por las DCs.

El reconocimiento de los PAMPs se lleva a cabo por TLRs expresados en las DCs, además 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 $CD4^+$. 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 Abs y el cambio de isotipo de las Ig, 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 Ag. 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).

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 en la inmunización *in vitro*, a partir de la cual se generan Abs que reconocen al Ag y posteriormente se pueden generar Abs monoclonales mediante Phage Display.

5. JUSTIFICACIÓN

Generar Abs específicos y con alta afinidad sigue siendo un reto en la actualidad; ya que existen dificultades en su generación, como: Ags que existen en pequeña cantidad, alta homología o que resultan tóxicos en el animal hospedero.

El uso de las células de pollo como modelo para la producción de Abs, es una eficaz alternativa, ya que la distancia evolutiva entre aves y humanos es mayor, lo que permite obtener Abs contra Ags de mamíferos altamente conservados. De esta manera, en el presente trabajo se desarrolló la inmunización *in vitro* utilizando DCs por su fuerte capacidad estimuladora de linfocitos T y B. El objetivo de esta estrategia, es la generación de Abs específicos que reconozcan Ags de diferente naturaleza, en un menor tiempo.

6. HIPÓTESIS

Las células dendríticas maduras de pollo inducen en los linfocitos B aumento en la generación de anticuerpos *in vitro*.

7. OBJETIVO GENERAL

Generar *in vitro* anticuerpos que reconozcan antígenos utilizando a las células dendríticas como estimulantes de células linfoides.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Producción y caracterización de células dendríticas de pollo.
- Inmunización *in vitro* de linfocitos de pollo usando células dendríticas maduras.
- Valoración de la producción de anticuerpos específicos de antígenos.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Reactivos

IL4 y GM-SCF recombinantes de pollo fueron adquiridos en Kingfisher Biotech Inc. (USA). LLME (Bachem Bioscience Inc. USA). *E. coli* DH5 α , LPS de *E. coli*, Proteína A de *S. aureus*, LPS de *S. thiphymurium*, IgG humana, Hoestch 33248, fueron comprados en Sigma-Aldrich (USA). Péptido GP5 fue sintetizado químicamente (GenScript, USA). Los anticuerpos utilizados: mouse anti-MHCII-FITC, mouse anti-CD40, mouse anti-CD80, mouse anti-CD86 (AbD Serotec, USA); goat anti-mouse-FITC, goat anti-chicken IgY-HRP (Santa Cruz Biotechnonology, USA).

9.2. Aislamiento de células de médula ósea de pollo

Pollos de la raza Cobb con una edad de entre 2 y 3 meses se utilizaron para la obtención de médula ósea. En cada experimento se colectaron tres fémures que fueron esterilizados en una solución de cloro al 10 %. Posteriormente se lavaron con PBS (NaCl [137 mM], Na₂HPO₄ [10 mM], KCl [2.7 mM], KH₂PO₄ [2 mM], para después remover el tejido muscular usando instrumentos estériles. Ambos extremos de los fémures se cortaron y la médula ósea se recuperó en tubo cónico de 50 ml lavando 2 veces con 15 ml de PBS

usando una jeringa de 20 ml con una aguja de 0.45 mm de diámetro (21 G). Después de un lavado con PBS, las células fueron suspendidas en 3 ml de PBS y se adicionó a un volumen igual de Histopaque-1119 1.119 g/ml a 25°C (Sigma Aldrich, USA) para la separación por centrifugación a $1200 \times g$ por 30 minutos a T.A. Las células de la interfase fueron colectadas y lavadas con PBS, posteriormente, fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 (Corning, USA) y teñidas con Azul tripano para observar viabilidad y contar en un hematocitómetro en el microscopio invertido.

9.3. Generación y maduración de DCs derivadas de médula ósea

Las células obtenidas de la médula ósea fueron cultivadas a una concentración final de 6×10^6 células/ml en placa de 6 pozos (Costar Inc. USA) en medio RPMI-1640 con el 10 % de suero fetal de bovino (Gibco BRL, Life Technologies) y el 1 % de Penicilina/Streptomina, [10.000 UI/ml de penicilina y 10.000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina] (Gibco BRL, Life Technologies). Para la diferenciación a DCs se adicionó IL4 [5 ng/ml] y GM-CSF [5 ng/ml] por 3 días a 41 °C, 5 % de CO₂. 24 horas posteriores al sembrado el medio de cultivo se reemplazó para remover las células no adheridas (granulocitos y células muertas). Para inducir la maduración, las células cultivadas fueron estimuladas con LPS de *E. coli* [1 $\mu\text{g/ml}$], *E. coli* inactivada [1 x 10⁶ UFC/ml], LPS de *S. typhimurium* [1 $\mu\text{g/ml}$] Proteína A de *S. aureus* [10 $\mu\text{g/ml}$] IgG humana [10 $\mu\text{g/ml}$], péptido GP5 [5 $\mu\text{g/ml}$]. Para la caracterización de las DCs se utilizó como estímulo antigénico la *E. coli* inactivada. Al día 3 de cultivo, las células se emplearon para su caracterización y para la inmunización *in vitro*.

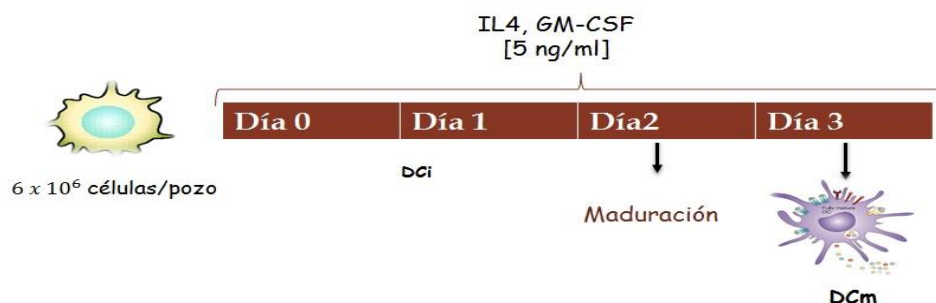


Figura 5. Esquema de diferenciación y maduración de las DCs.

Las DCs son aisladas y diferenciadas a partir de médula ósea de pollo, posteriormente al día 2 se realizó el estímulo con el Ag. En el día 3 se generaron las DCm, para su uso posterior en la caracterización y en la inmunización *in vitro*.

9.4. Caracterización morfológica

Las DCs fueron observadas a los días 1, 2 y 3 en microscopio de contraste de fases Nikon Eclipse E600, y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Coolpix 4500 con un adaptador para el ocular.

9.5. Análisis de fenotipo por Inmunofluorescencia

Las células aisladas de médula ósea se cultivaron sobre cubreobjetos redondos en placas de 12 pozos en condiciones de cultivo estándar para inducir la diferenciación a DCs. Al día 2 se maduraron con *E. coli* inactivada. En el día 3 las DCs inmaduras (DCi) y maduras (DCm) se lavaron con PBS y fijaron con paraformaldehído 2% en PBS por 20 min a temperatura ambiente (T.A), después de 5 lavados con PBS se adicionó la solución de bloqueo PBS-Triton 0.5 % (PBS-TX) con el 10 % de suero de ternera e incubó por 2 h a T.A en cámara húmeda. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS y se adicionó el primer anticuerpo, según sea el caso (ver tabla 2) diluido en PBS-TX y se incubó por 3 h a T.A en cámara húmeda. En seguida se lavó 3 veces con PBS-TX y adicionó el segundo anticuerpo goat anti-mouse-FITC e incubó por 2 h a T.A. Finalmente, los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos con glicerol al 20 % para realizar las observaciones en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600.

Anticuerpo	Antígeno específico	Anticuerpo secundario
mouse anti-MHCII chicken-FITC	MHCII	No
mouse anti-CD40 chicken	CD40	goat anti-IgG mouse-FITC
mouse anti-CD80 chicken	CD80	
mouse anti-CD86 chicken	CD86	

Tabla 2. Lista de anticuerpos para el análisis fenotípico.

9.6. Caracterización metabólica

Las células aisladas de médula ósea se cultivaron en placas de 12 pozos en condiciones de cultivo estándar para inducir la diferenciación a DCs. Al día 2 se maduraron con *E. coli* inactivada. En el día 3 las DCi y DCs se lavaron con PBS y fijaron con paraformaldehído 2% en PBS por 20 min a T.A, después de 5 lavados con PBS se adicionaron 200 µl de solución de tinción rojo oleoso e incubó por 4 h a T.A. Se lavó 3 veces con PBS para eliminar el exceso de colorante y adicionaron 200 µl de glicerol al 20 % para realizar las

observaciones en un microscopio Nikon Eclipse E600. Por otro lado, para evaluar la acumulación relativa de rojo oleoso por espectrofotometría, después de eliminar el exceso de colorante se adicionaron 100 μ l de isopropanol y se incubó por 15 min en agitación a T.A. La densidad óptica fue leída a 540 nm usando un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc. USA).

9.7. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMCs fueron aisladas del mismo pollo que se aislaron las DCs. Brevemente, la sangre total fue colectada en tubos con EDTA como anticoagulante, posteriormente fue agregada en un volumen igual de Histopaque-1077 (1.077 g/ml a 25°C; Sigma Aldrich, USA), seguido de separación por centrifugación a $400 \times g$ por 30 min a T.A. Las células de la interfase fueron colectadas, lavadas y contadas en hematocitómetro.

9.8. Inmunización *in vitro*

Las PBMCs fueron primeramente tratadas con LLLME [0.25 mM] por 20 min a T.A. Después fueron lavadas con medio RPMI-1640. Las células fueron sembradas a una concentración de 8×10^6 células/ml y sensibilizadas con el Ag que se utilizó para madurar a las DCs, en presencia de IL4 [1 ng/ml] en medio RPMI-1640 suplementado con 2-mercaptoetanol [50 μ M] y 10 % de ST. 3 días posteriores las células se colectaron para ser co-cultivadas con las DCm por un periodo de 5 días adicionales, ver Figura 6.

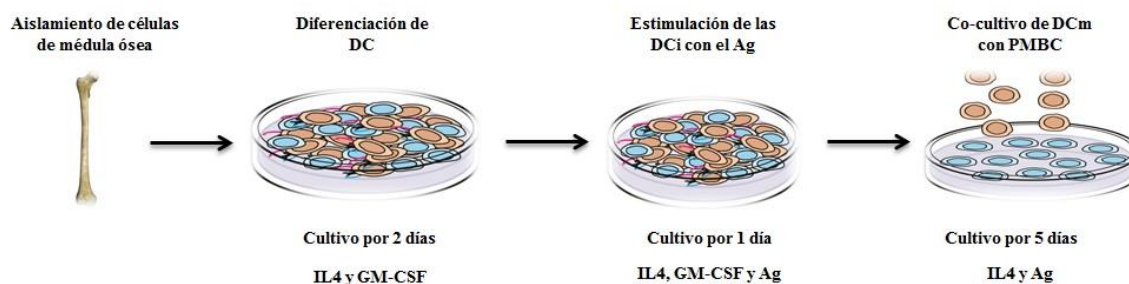


Figura 6. Procedimiento para la IIV.

Las células aisladas de médula ósea de pollo fueron diferenciadas a DCs con IL4 y GM-CSF. La maduración de las DCs se realizó con el Ag de interés. Posteriormente, el co-cultivo con las PMBCs, aisladas del mismo pollo del cual se aislaron las DCs, durante 5 días.

9.9. Detección de Abs IgY

La IgY secretada al medio de cultivo fue evaluada por la técnica ELISA indirecta. Brevemente, en una placa de 96 pozos (Costar) fue pegado el Ag, con el que se sensibilizaron las PMBCs y maduraron las DCs, en Búfer de carbonatos (NaHCO_3 0.1 M, Na_2CO_3 0.1 M, pH 9.0) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubado a 4°C toda la noche. Al día siguiente, después de lavar con PBS, fue bloqueada la placa con el 5 % de leche descremada (Bio-Rad Laboratories Inc.) en PBS durante 2 h a T.A. Posteriormente la placa fue lavada con PBS que contiene 0.05 % de Tween-20 (PBS-T), después se adicionaron 100 μl de medio de cultivo y se incubó por 2 h a T.A. La placa se lavó tres veces con PBST y posteriormente se adicionó el anticuerpo goat anti-chicken IgY-HRP e incubó a T.A por 1 h. La placa se lavó 3 veces con PBST y se adicionaron 50 μl de la solución sustrato ABTS (Sigma Aldrich). La densidad óptica fue leída a 415 nm usando un lector de microplacas (Bio-Rad Laboratories Inc.).

9.10. Ensayos de expresión génica

A partir de las DCi y DCm y del total de PMBCs se aisló RNA total usando el reactivo Trizol (Invitrogen, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor. El RNA total fue tratado con DNasa I (New England Biolabs, USA) para remover la contaminación potencial de DNA genómico. Dos microgramos de RNA tratado con DNasa I fue usado como molde para la reacción de síntesis de cDNA con la transcriptasa inversa M-MuLV (Fermentas, USA). Los genes de la región variable ligera de las inmunoglobulinas (VL) y el gen zBTB46 fueron amplificados con Taq DNA Pol (Invitrogen, USA) usando un juego de oligonucleótidos específicos (Barbas III, *et al*, 2001) como se muestra en la tabla 3. La amplificación de PCR para VL y zBTB46 se hizo con 45 ciclos (94° C por 30s, 57° C por 30s y 72° C por 50s) en un termociclador.

Descripción	Nombre	Secuencia
GAPDH	GAPDHF	s5'CTGGTGTCTTCACCACCATG 3'
	GAPDHR	a5'CAGCAGCCTTCACTACCCTC 3'
zBTB46	DCFT5	s5'AGCGGCAGCACGGCATC 3'
	DCFT3	a5'GTGGGCTGCCAGCCATC 3'
VL	CSCVK	s5'GAGGAGGAGGAGGAGGTGGCCCAGGCGGCCCTGACTCAG 3'
	CKJo-B	a5'GAGGAGGAGGAGGAGCTGGCCGCCCTGGCCACTAGTGGAGG 3'

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos.

9.11. Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos fueron analizadas usando ANOVA de una vía, \pm SD y Bonferroni como prueba post hoc, para comparar todos los pares de columnas. Se consideraron estadísticamente significativas en las que el valor de $P \leq 0.05$. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes por triplicado. Para cada grupo de experimentos se aislaron DCs de diferentes animales. En las gráficas las letras minúsculas diferentes indican una diferencia significativa en la que el valor fue $P \leq 0.05$. Se utilizó en todos los casos el GraphPad Software, Inc.

10. RESULTADOS

10.1. Generación y caracterización de las DCs

La función de las DCs en la vinculación de la inmunidad innata con la adaptativa se debe a que las DCs son capaces de captar, procesar, presentar Ags y migrar a tejidos linfáticos para seleccionar clonas de linfocitos T reactivos al Ag. Además las DCs son también sensores, respondiendo a un espectro de señales ambientales por una amplia diferenciación o maduración. Por lo anterior en el presente trabajo las DCs fueron aisladas a partir de células de médula ósea de pollo, cultivadas en presencia de IL4 y GM-CSF, ambas en una concentración de 5 ng/ml, durante 3 días, utilizando un método similar al usado para las DCs de mamífero (Frankenberger y Schendel, 2013). El cultivo de DCs mostró la morfología típica de las DCs en sus dos estados funcionales. Las DCi presentan una morfología redonda (ver Figura 7A) y cuando las DCi se estimularon con el Ag por 24 hrs se apreció el cambio morfológico (Figura 7B), presentando prolongaciones celulares. Para determinar la eficiencia de generación de DCs se realizó un conteo de DCi y DCm basándose en su morfología. En la gráfica de la Figura 7 se observa que la condición control (sin estimulación con Ag) hay aprox. 80 % de DCi, mientras las DCm en un 20%. Al estimular las DCs con los Ags: LPS, *E. coli* inactivada y el péptido GP5, el porcentaje de DCi disminuyó hasta un 20%, mientras que las DCm aumentaron en un 60% con respecto al control. Sin embargo, en los experimentos posteriores de caracterización se utilizó *E. coli* para inducir la maduración de las DCs.

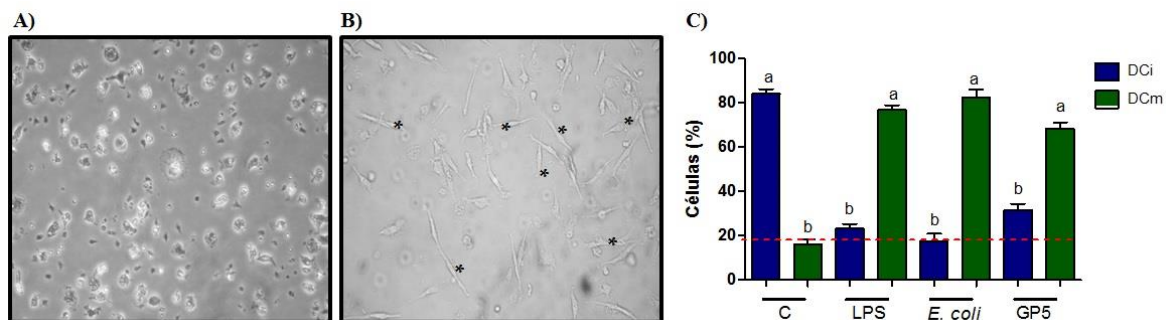


Figura 7. Morfología de las DCs aisladas y diferenciadas a partir de médula ósea de pollo. DCs cultivadas en medio RPMI suplementado con IL4 [5 ng/ml] y GM-CSF [5 ng/ml]. Imágenes representativas de A) DCs inmaduras. B) DCs que fueron estimuladas con *E. coli* inactivada [10^6

UFC/ml], C) Cuantificación de acuerdo a la morfología de DCi y DCm empleando tres Ags diferentes.

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. Cuando las células de médula ósea fueron aisladas y cultivadas bajo las condiciones descritas en la metodología, pero sin la adición de IL4 y GM-CSF, el número de células adheridas al pozo, y que presentaban la morfología típica de DCi, fue descendiendo durante el transcurso de los días en los cuales se realizó el conteo celular (Figura 8). Mientras tanto, en el cultivo de DCi con citocinas, el número de células se mantiene durante los 11 días. Por otro lado, cuando las células de médula ósea fueron diferenciadas con las citocinas a DCi y estimuladas con *E. coli*, presentaron un comportamiento similar a las DCi que no fueron estimuladas con el Ag y en presencia de citocinas, ya que al realizar el conteo en el último día y realizar el análisis estadístico no existe diferencia significativa entre ambas condiciones, como se aprecia en la gráfica de la Figura 8.

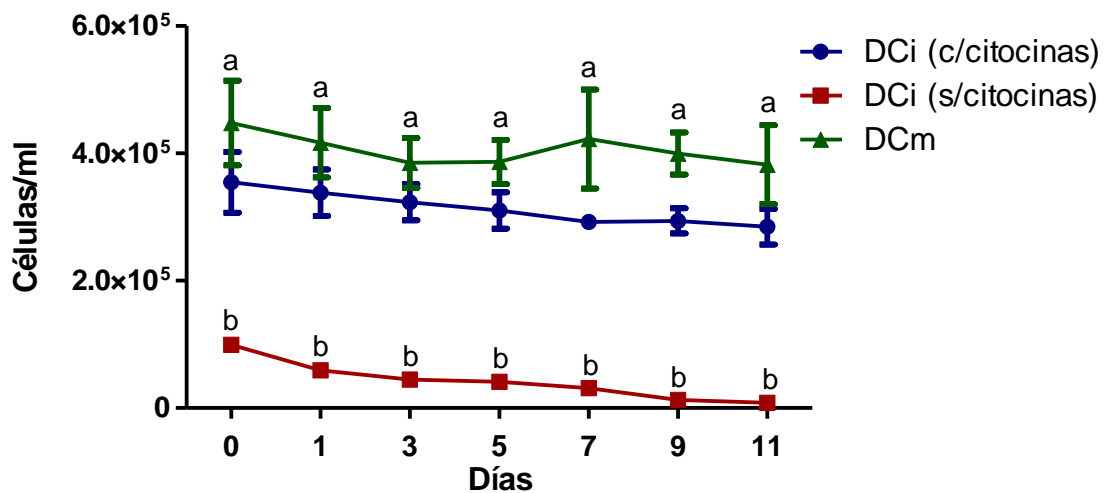


Figura 8. Cinética de proliferación de las DCs.

Se representa el cultivo de las células de médula ósea aisladas bajo las condiciones descritas en la metodología y cultivadas en condiciones estándar, con o sin la adición de citocinas y con la maduración de las DCs. A los días indicados se levantaron las células del pozo y fue contado el número de células vivas.

Por otro lado, durante la diferenciación y activación de las DCs, ocurren cambios importantes a nivel metabólico para satisfacer los diferentes requerimientos celulares. La diferenciación de las DCs con IL4 y GM-CSF aumenta la expresión de receptores activados por proliferadores peroxisomales-g (PPAR-g) que es un factor transcripcional regulador del metabolismo de lípidos. De esta manera, después de la estimulación de las DCi con el Ag se induce la expresión de enzimas que catalizan la síntesis de lípidos y acumulación de estos en el citoplasma, asegurando de esta manera la correcta activación de las DCs (Vuelca *et al.*, 2014; Pearce y Everts, 2015). Por lo anterior, para caracterizar a las DCs en sus estados funcionales se decidió teñir con rojo oleoso, ya que este colorante tiñe de color rojo a los lípidos neutros acumulados en el citoplasma. En las DCi los lípidos no son evidentes en el citoplasma, mientras que al estimular las DCi con el Ag se aprecia la acumulación citoplasmática de lípidos neutros en forma de gotas, como se muestra en la Figura 11A. Además, al cuantificar la acumulación del rojo oleoso en las DCi y DCm, se aprecia la diferencia que existe entre los dos estados funcionales de las DCs (Figura 11B). Por lo tanto, caracterizar a las DCs por tinción con rojo oleoso de los lípidos neutros acumulados en el citoplasma, por nuestros resultados, es una forma adicional a los métodos que se utilizan para caracterizar a las DCs en sus dos estados funcionales.

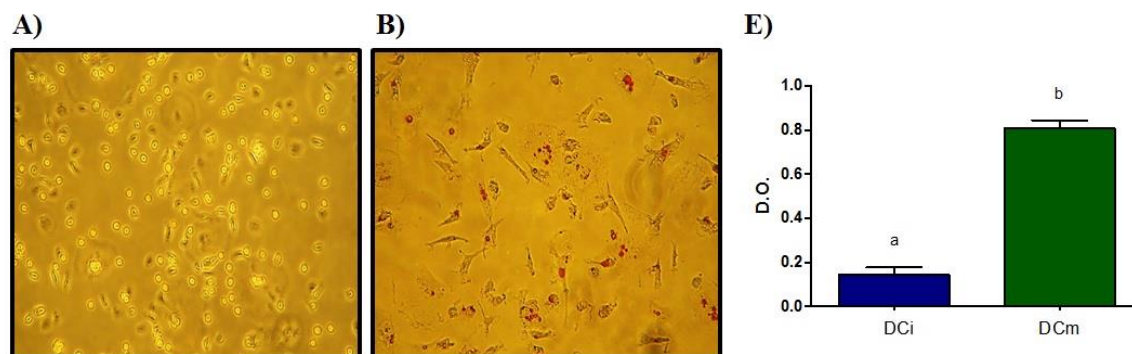


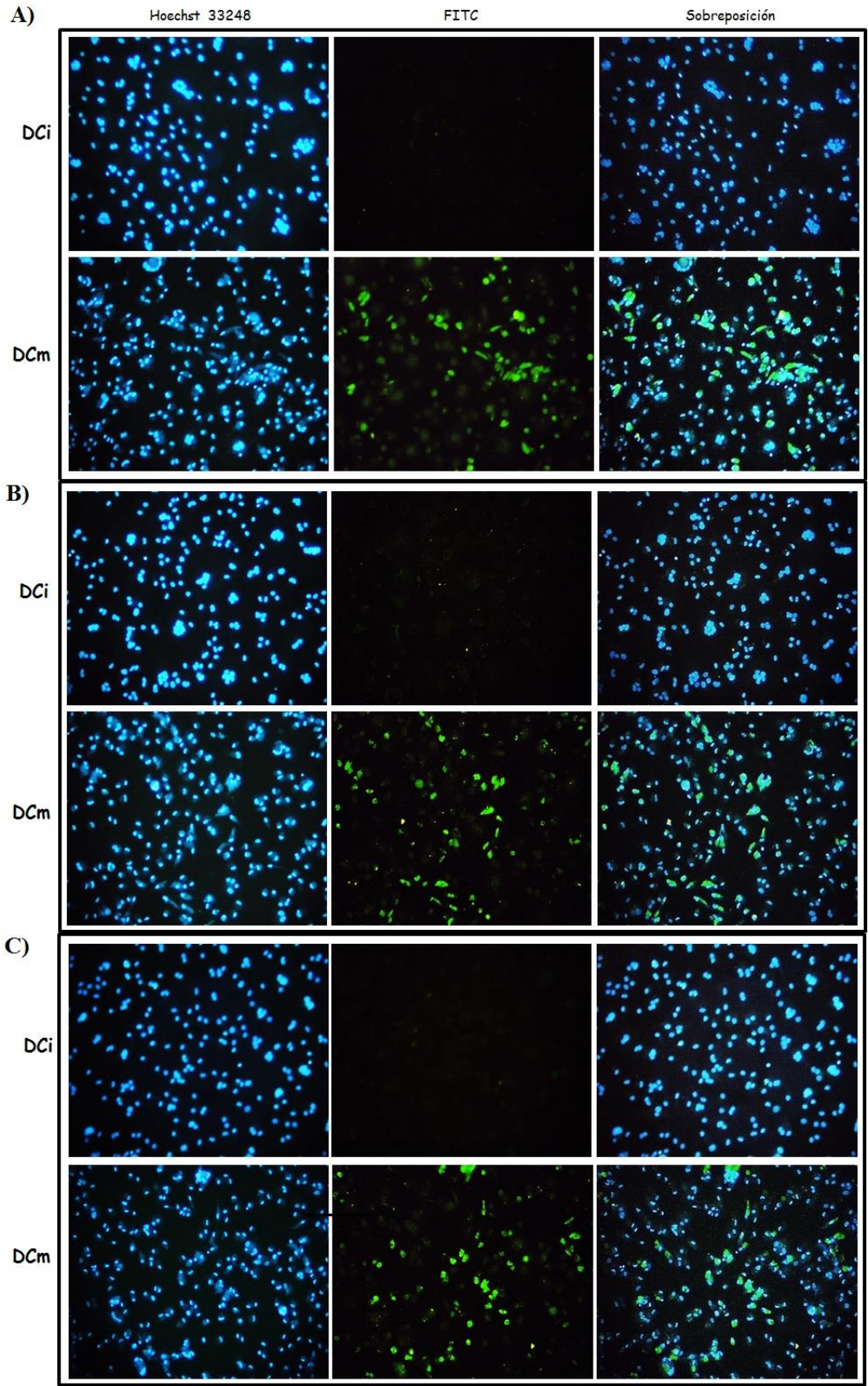
Figura 9. Caracterización metabólica de las DCs.

A) DCi y B) DCm, imágenes representativas, en ambos casos teñidas con rojo oleoso, se observa la acumulación citoplasmática de lípidos neutros en forma de gotas. C) Cuantificación de rojo oleoso por colorimetría a 590 nm. Se obtuvieron las DCs con el protocolo de 3 día y se maduraron con *E. coli* inactivada.

10.2. Caracterización molecular

La inmunofluorescencia (IF) fue usada para evaluar la expresión de marcadores de membrana expresados típicamente por las DCs. En mamíferos, los principales marcadores

de membrana incluyen MHC-II, CD11, CD40, CD80, CD86. Para el presente trabajo se analizaron MHC-II, CD40, CD80 y CD86. Nuestros resultados de análisis por IF de las DCs son mostrados en la Figura 9. El fenotipo mostrado por las DCs sin estimular es de 25% de células positivas a MHC-II y 10% en CD40, CD80 y CD86, lo que sugiere que son DCs en su estado funcional inmaduro. Mientras que al estimular las DCs con *E. coli* inactivada durante 24 h presentan alta expresión de los marcadores de membrana con más del 75% de células positivas; por lo tanto, presentando un fenotipo de DC en estado maduro (Fig. 9E). Lo anterior coincide con la caracterización morfológica realizada en el presente trabajo. En consecuencia, para la diferenciación, maduración de las DCs de pollo se utilizó el protocolo que involucra 3 días, ya que las DCs mantienen las mismas características morfológicas y de marcadores de membrana que al utilizar el protocolo de diferenciación y maduración reportado por Wu y colaboradores en 2009, que involucra 7 días.



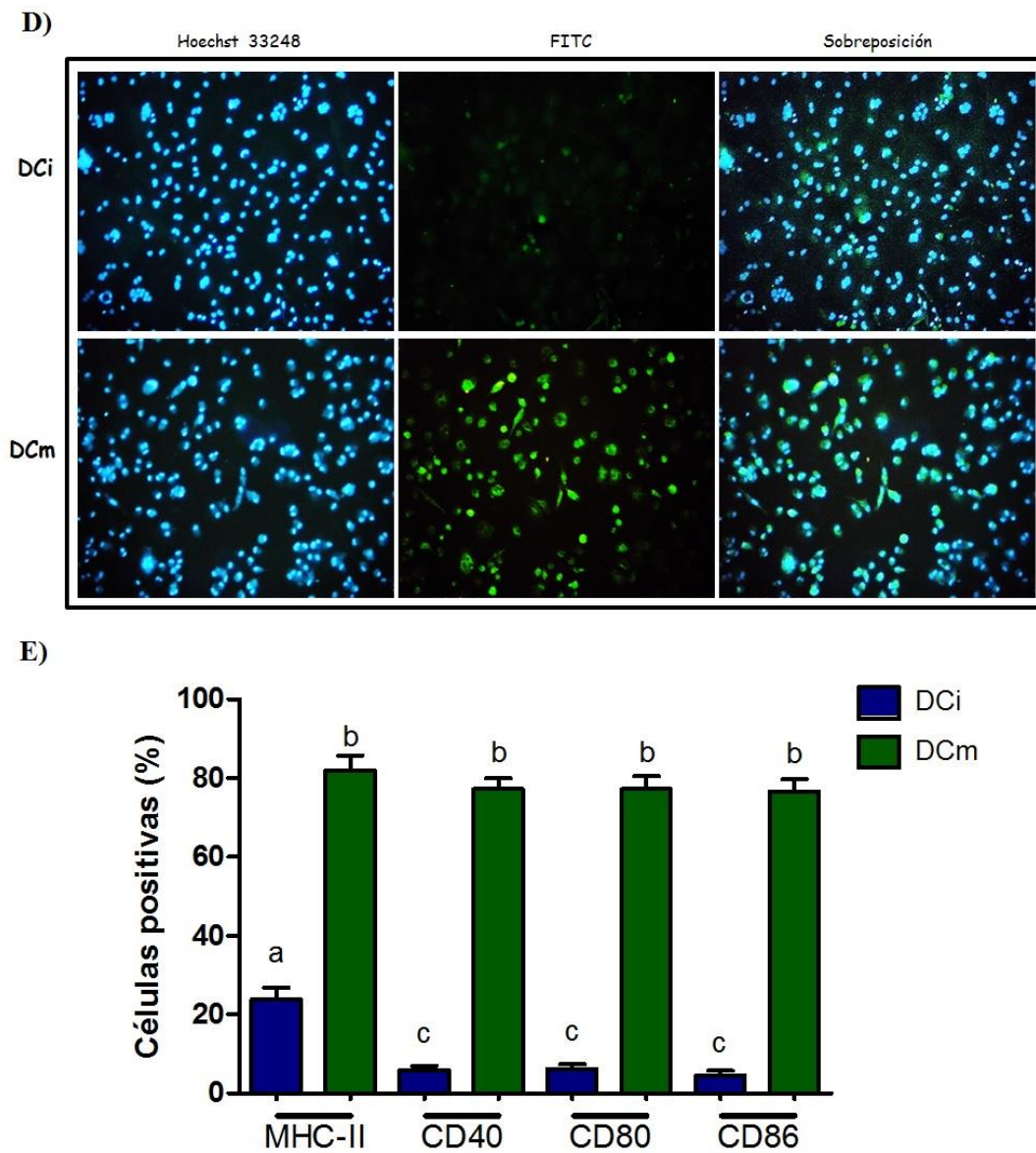


Figura 10. Análisis de la expresión de marcadores de membrana de las DCs mediante IF.

Imágenes representativas de células positivas a marcadores específicos de DCi y DCm 24 hrs post-maduración: A) CD40, B) CD80, C) CD86 y D) MHC-II utilizando Abs acoplados a FITC. El núcleo fue teñido Hoechst 33248. Se obtuvieron las DCs con el protocolo de 3 días y se maduraron con *E. coli* inactivada; E) Cuantificación de marcadores de membrana empleando el software ImageJ.

Adicionalmente, para confirmar la funcionalidad de las DCs que se aíslan y diferencian *in vitro*, se evaluó la expresión del factor de transcripción específico de DCs (zBTB46) y que

no presenta ninguna otra célula del sistema inmune (Meredith *et al.*, 2012). zBTB46 es un represor transcripcional que se une al promotor del MHC-II en DCi inhibiendo la expresión de esta molécula, mientras tanto, en las DCm no se une al promotor permitiendo la expresión de MHC-II. Con base en lo anterior, se aisló RNA total de las DCi y DCm y se sintetizó el cDNA para amplificar por PCR un fragmento del gen zBTB46 utilizando primer específicos (tabla 2). Como se muestra en la Figura 10, en las DCi se amplificó el gen zBTB46 por PCR (730 pb), mientras que en las DCm la expresión de zBTB46 es reprimida y por lo tanto, no se amplifica el fragmento del gen; este resultado sugiere que utilizando la metodología reportada en el presente trabajo se induce la maduración de las DCs diferenciadas a partir de células de médula ósea de pollo; ya que el factor de transcripción sólo se expresa en DCs en estado inmaduro, además de no ser expresado por ningún otro tipo celular del sistema inmune, como monocitos o macrófagos (Meredith *et al.*, 2012).

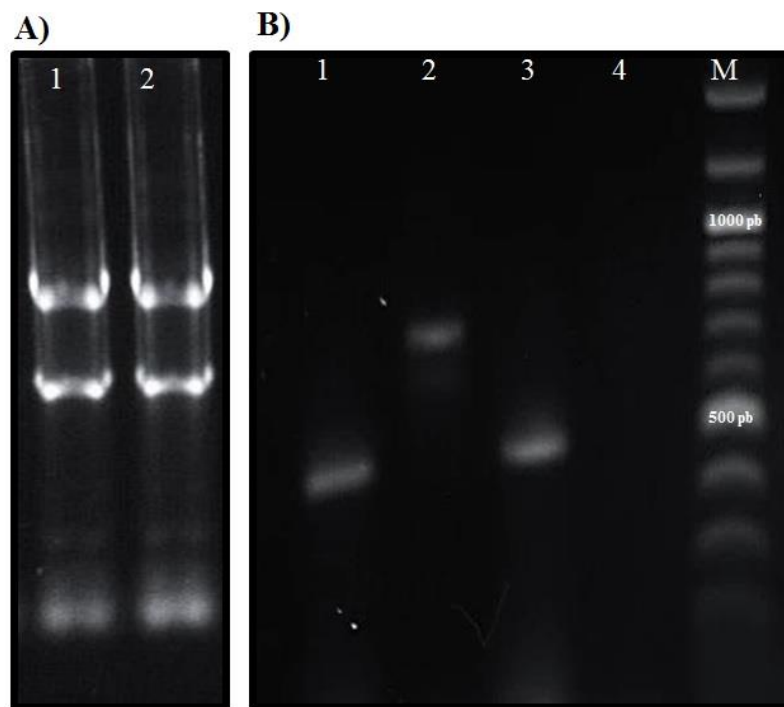


Figura 11. Caracterización molecular de las DCs.

A) Extracción de RNA total. Carril 1: DCs inmaduras. Carril 2: DC maduras. B) Amplificación por PCR del gen zBTB46. Carril 1 y 3: gen GAPDH. Carril 2 y 4: gen zBTB46. M: Marcador de DNA. GAPDH 450 pb y zBTB46 730 pb. Gel de agarosa al 1% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio [5 ug/ml].

Después de caracterizar la funcionalidad de las DCs a través de la caracterización morfológica, metabólica, fenotípica y molecularmente en sus dos estados funcionales y comprobar que el método utilizado para aislar y diferenciar a las DCs se obtiene más del 75% de DCs del total de células que se aíslan de la médula ósea; además que las DCs al ser estimuladas con el Ag cambian a su estado maduro. En consecuencia, el siguiente paso fue analizar la posible estimulación de las DCm a los linfocitos T y B, por lo tanto incrementar la generación de Abs cuando se realizó el co-cultivo de DCm y PMBCs. Para cumplir el objetivo se implementó la inmunización *in vitro* (IIV) utilizando DCs.

10.3. Inmunización *in vitro*

La Figura 6 muestra el procedimiento experimental usado para inducir la producción de IgY específica de Ag mediante la IIV. Primero, se aislaron los precursores de DCs a partir de células de médula ósea y PMBCs del mismo pollo. Posteriormente, las células de médula son diferenciadas a DCs utilizando citocinas, seguido de estimulación con el Ag de interés para generar DCs en estado maduro. Paralelamente, al aislar las PMBCs son tratadas con L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLME) para eliminar la mayoría de las células NK, monocitos, granulocitos, linfocitos T CD8⁺, debido a que el LLME es un agente lisosomatropico que actúa preferentemente sobre las células que contienen enzimas de la dipeptidil peptidasa I (DPPI) en sus gránulos citolíticos (Friedman *et al.*, 2007); posteriormente, un total de 8 x 10⁶ células/ml de PMBCs, como lo reporta Kato *et al.*, 2012, son estimuladas con el Ag de interés y cultivadas en condiciones estándar por tres días. El siguiente paso fue realizar el co-cultivo de las DCs con las PMBCs, estimuladas con el mismo Ag, durante 5 días adicionales. Finalmente, al terminar el co-cultivo el medio es colectado para evaluar la producción de IgY anti-Ag mediante ELISA. En paralelo, las PMBCs son colectadas para realizar la extracción de RNA total y analizar por PCR la expresión del gen de la variable ligera (VL) de la IgY. La Figura 12 muestra que la producción de IgY se detectó en las PMBCs sin estimular (Control), lo que sugiere que las condiciones de cultivo estimula la proliferación de células B de una manera no específica. En este sentido, para verificar si el co-cultivo de las DCs/PMBCs aumenta la producción de Abs, se estimuló sólo a las PMBCs con el Ag, como se ha reportado (Mieko *et al.*, 2012; Shin-ei *et al.*, 2008); en estas condiciones se detecta la presencia de IgY que reconoce el Ag con el cual se estimularon las células. Sin embargo, en el co-cultivo de DCs/PMBC la

detección de IgY es incrementada significativamente comparada con respecto al control y a la condición donde solo se cultivan y estimulan a las PMBCs. Cabe destacar que al estimular las DCs y PMBCs con *E. coli* inactivada, estadísticamente es el Ag que genera la mayor producción de IgY. Sin embargo, todos los Ags utilizados en este trabajo estimulan la producción de IgY específicos de Ag; ya que las DCs pueden sensibilizar y estimular a las células linfoides para generar una respuesta inmunológica *in vitro* para el Ag utilizado en nuestro protocolo de IIV.

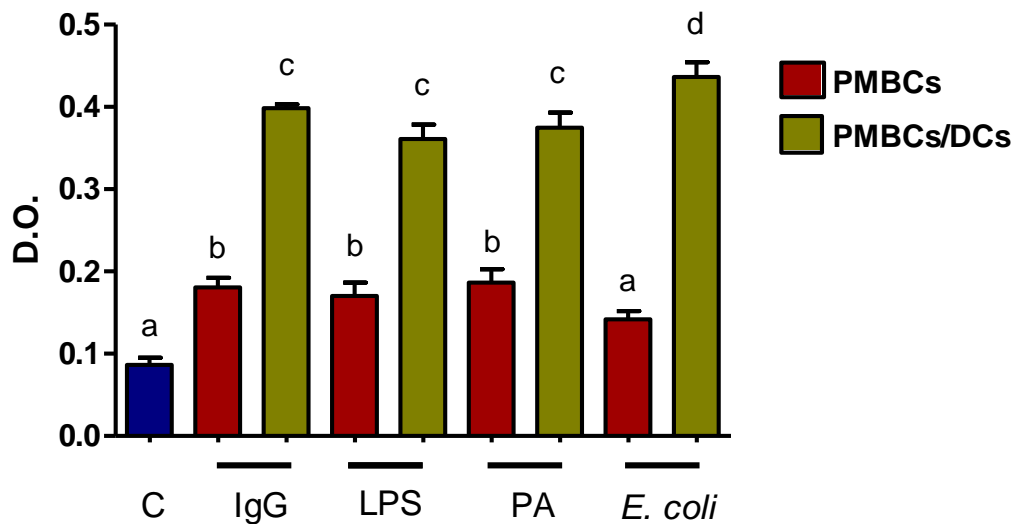


Figura 12. Producción de anticuerpos a partir de las PMBCs.

Después de cinco días de co-cultivo se utilizó el medio para identificar la IgY específica para el Ag mediante ELISA. Control (PMBCs sin estimular), PMBCs estimuladas con el Ag indicado.

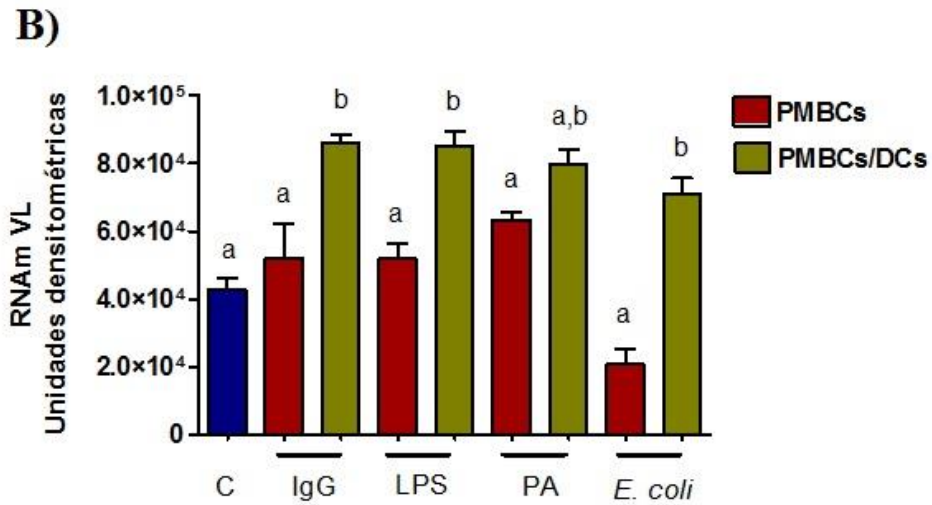
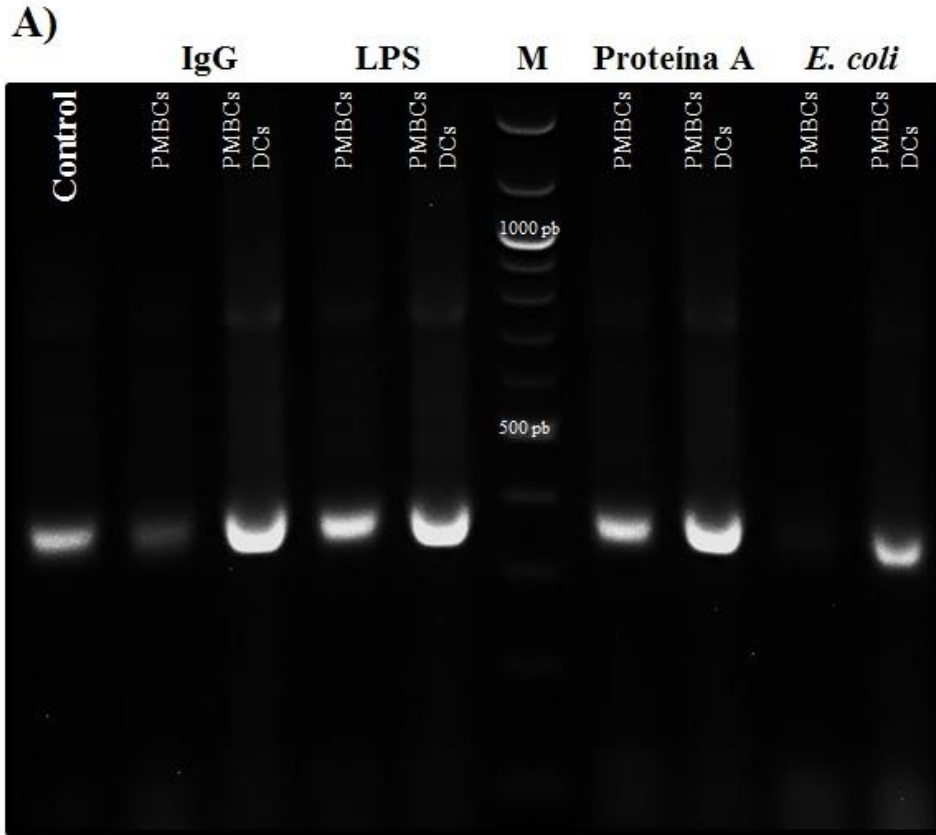


Figura 13. Amplificación de los genes VL después de la IIV.

Expresión del gen de la VL mediante PCR. A) Amplificación del gen VL (350 pb). M: Marcador de DNA. Gel de agarosa al 1% en buffer TBE, teñido con bromuro de etidio [5 µg/ml]. B) Análisis densitométrico de tres diferentes geles.

A continuación, se analizó la expresión del gen de la VL de las IgY, producidas por la activación de las células B en la IIV, mediante PCR. A partir de RNA total de las PMBCs estimuladas con los diferentes Ags, indicados en la Figura 13, se generó un banco total de cDNA por Transcripción inversa, posteriormente se amplificó el gen GAPDH para verificar la viabilidad del cDNA, seguido se amplificó el gen VL utilizando oligoprimers específicos (Tabla 2). En la Figura 13 se muestra una imagen representativa de un gel de agarosa, en el que se amplifica el gen VL de la IgY. Los resultados muestran que en todas las condiciones (control, PMBCs y DCs/PMBCs) se amplifica el gen de la VL. Sin embargo, para analizar la imagen de manera cuantitativa se realizó un análisis densitométrico, Figura 13B, en donde se aprecia como la diferencia entre la condición PMBCs/DCs es de 1.5 a 2 veces mayor que la condición PMBCs en los cuatro diferentes Ags utilizados.

Estos resultados indican que la sensibilización de las DCs con los Ags *E. coli* inactivada, LPS de *E. coli*, Proteína A de *S. aureus*, LPS de *S. thiphymurium*, IgG humana en el co-cultivo con las PMBCs, estimulan la producción de células B que generan Abs específicos del Ag con el que se sensibilizaron, lo anterior, porque en el medio de cultivo se encontró la IgY mediante ELISA y por la expresión del gen VL de la IgY se ve aumentada con respecto al control y la condición en donde las PMBCs son sólo estimuladas con el Ag.

11. DISCUSIÓN

Las DCs son las encargadas de la regulación de la respuesta inmune y son las células presentadoras de Ag, ya que tienen la capacidad de captar, procesar y presentar Ags a las células B y T. Se ha descrito que son las células que vinculan a la inmunidad innata con la adaptativa (Gabrilovich, 2004; Belz y Nutt 2012).

En trabajos previos se mostró que es posible generar DCs *in vitro*, a partir de sus precursoras de médula ósea empleando diferentes citocinas o combinación de ellas (Wu *et al.*, 2009). Las DCs se han caracterizado en mamíferos; en su estado inmaduro son células grandes y redondas y en su estado maduro son células con prolongaciones que semejan dendritas, de ahí su nombre (Steinman, 2007). De hecho, la funcionalidad de las DCs *in vitro*, está asociada a varios aspectos que incluyen las citocinas que se emplean, el tipo de Ag y el tiempo de maduración. En nuestro trabajo, se implementó la obtención sistemática de DCs de pollo, considerando que el modelo en aves es poco estudiado y que hasta el momento no se ha habido descrito si es posible generar Abs después de co-cultivar éstas con células B y T en un sistema completamente *in vitro*.

Las células de médula ósea de pollo fueron cultivadas en presencia de IL4 y GM-CSF recombinantes durante 3 días y se observó la selección de estas con respecto a otras células presentes en médula ósea, este dato coincide con lo reportado por Frankenberger y Schendel, 2013 en DCs de mamíferos. En contraste, Wu *et al.*, 2009, logró seleccionar DCs de pollo en 7 días. Para reforzar el análisis morfológico de las DCs de pollo se llevó a cabo un ensayo para analizar la acumulación de lípidos neutros en citoplasma en células estimuladas con un Ag determinado (maduración) y se observó que efectivamente únicamente las DCs maduras presentan el fenotipo dendritizado con prolongaciones celulares y acumulación de lípidos. Lo anterior se basa en lo reportado por Pearce y Everts, 2015, en donde se describe que las DCm sobre-expresan un factor de transcripción que regula la diferenciación y el metabolismo de lípidos, este es el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ). Se ha reportado que la diferenciación de monocitos a DCs *in vitro* y el desarrollo de DCs en órganos linfáticos y tejidos periféricos muestran dependencia de la síntesis de ácidos grasos (Rehman, *et al.*, 2013) y esta

conclusión es razonable ya que el proceso de diferenciación de DCs depende de las vías metabólicas que integran la función mitocondrial con la síntesis de ácidos grasos, por lo anterior, proponemos analizar el papel del PPAR γ en las DCs aisladas de pollo, ya que este factor de transcripción está involucrado en el metabolismo de lípidos.

Las DCs presentan patrones de marcadores de membrana que las diferencian de otros tipos celulares que también presentan Ag, tales como, monocitos-macrófagos y linfocitos B. En particular, el MHC-II tiene como función presentar los péptidos procesados a partir del Ag a los linfocitos T, mediante la interacción con el receptor del linfocito T (TCR). Los resultados muestran que las DC_m sobre-expresan MHC-II a diferencia de las DC_i que presentan una expresión basal. Por otro lado, las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 favorecen el tiempo de interacción entre MHC-II y el TCR. A su vez esta interacción regula la estimulación de los linfocitos T CD4⁺. Los datos muestran que las DC_m sobre-expresan CD40, CD80 y CD86.

Existen diversos factores de transcripción que controlan la diferenciación celular en el sistema inmune; Meredith *et al.*, 2012 mostraron que el factor de transcripción, zBTB46, es un regulador negativo de la maduración de las DCs, es decir, solo se expresan en las DC_i. Además, se documentó que este factor no es expresado en ninguna otra célula del sistema inmune. Los resultados coinciden con estos hallazgos, dado que solo se observó la expresión de zBTB46 en las DC_i. Se sugiere también que en las DC_m se reprime la expresión de zBTB46. Resta por analizar de forma cuantitativa la relación entre la maduración de las DCs y la expresión de dicho factor, así como su interacción con otras moléculas que participan en el proceso de maduración.

La respuesta inmunológica que se inicia tras la presencia de un Ag está orquestada por un conjunto de células que actúan sinérgica y coordinadamente; en este contexto las DCs actúan como centinelas. Una vez que las DCs detectan al Ag su función es procesar y presentar a las células linfoides para iniciar una respuesta humoral. En este sentido, se realizó la inmunización *in vitro* (IIV) utilizando las DCs previamente caracterizadas y valorar la generación de Abs por las PMBCs al realizar el co-cultivo con DCs. El análisis de ELISA demostró que al realizar el co-cultivo se induce mayor producción de Abs anti-Ag comparado con la condición en donde solo se estimulan las PMBCs con el Ag. Los Ags

LPS, IgG y Proteína G estimulan de forma similar la producción de IgY. Mientras que *E. coli* inactivada mostró ser más eficiente para inducir la formación de IgY. La presencia de IgY en la IIV se sugiere que existe cambio de clase de inmunoglobulina (Ig), de IgM a IgY. Aunque para fortalecer este dato serían necesarios experimentos adicionales en los que se identificaran la IgM, además de analizar la expresión de la enzima citidin desaminasa inducida por activación, considerando que dicha enzima está involucrada en la hipermutación somática y en el cambio de clase de IgM a IgG (Casellas, *et al.*, 2016).

Como parte de la valoración de la producción de Abs en la IIV, se determinó la expresión del gen de la variable ligera (VL) de la IgY. El resultado indicó que la expresión del gen VL en la condición DCs/PMBCs aumenta con respecto a la condición en donde sólo se estimularon las PMBCs con el Ag, ya que las células B al diferenciarse en células plasmáticas productoras de Abs aumentan la expresión de los genes de la cadena ligera y pesada. Este dato concuerda con el proceso de inmunización *in vivo* (Victoria y Nussenzweig, 2012).

La IIV posee una serie de ventajas sobre la inmunización convencional. Sin embargo, es poco eficiente en la activación de linfocitos B limitando el número de células positivas e insuficiente maduración de células productoras Abs. Esta dificultad resulta desde la carencia de estimulación inmune efectiva y aspectos inherentes al procedimiento que implica mezcla de células, Ags y estimulantes inmunológicos (Zafiroopoulos *et al.*, 1997). Incrementar el número de clones positivos es crucial e importante para la generación de Abs en respuesta al estímulo antigénico. Sin embargo, el establecimiento de un protocolo de IIV eficiente para inducir células que producen Abs con alta especificidad es necesario. Para este propósito se han utilizado en otros trabajos la adición de IL2, LPS y Ab-anti CD40 como inmunomoduladores en la IIV (Saito *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2007). Sin embargo, los efectos de estos estimuladores es restrictivo e insuficiente y además de que estos requieren de un tiempo muy largo de estimulación a PMBCs de 19 días. Los periodos largos de incubación son incompatibles con la sobrevivencia de las PMBCs *in vitro* (Chin *et al.*, 1995).

Se han reportado diferentes trabajos de inmunización *in vitro* utilizando PMBCs de diferentes especies como humano y murinos (Jung, *et al.*, 2008; Matsumoto, *et al.*, 2012;

Kato, *et al.*, 2012) en los cuales se establecieron metodologías para inducir la diferenciación a células plasmáticas de células B específicas de Ag requiriendo sólo un pequeño número de PMBCs. El presente trabajo, mostro que al utilizar DCs y PMBCs de pollo en la inmunización *in vitro* se producen Abs que reconocen al Ag y que las PMBCs son capaces de producir IgY.

En resumen, nuestros resultados muestran que la inmunización *in vitro* podría ser una estrategia alterna para la generación de Abs. Particularmente, en casos en los que el Ag es difícil de inocular a animales por inmunización convencional; Ags que son muy conservados en los mamíferos y que por lo tanto tienen un alto grado de homología y en Ags de los que se disponen en pequeña cantidad. Por otra parte, la combinación de IIV y despliegue de fagos (phage display), podrían ser útiles para generar Abs monoclonales.

12. CONCLUSIONES

- Las DCs de pollo maduran con Ags de diferente naturaleza estructural.
- Utilizando el protocolo de 3 días, se obtuvo el aislamiento de las DCs en aprox. un 70%. Las cuales fueron seleccionadas con las citocinas IL4 y GM-CSF para su posterior caracterización morfológica y molecular
- Las DCm mostraron ser células con prolongaciones celulares tipo dendritas y que acumulan lípidos neutros en el citoplasma. Sobre-expresan MHC-II, CD40, CD80 y CD86 y no expresan a zBTB46.
- El co-cultivo de las DCs/PMBCs estimuladas con los diferentes Ags mostró generación de IgY y además sobre-expresión de la VL.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. 2008. *Immunología celular y molecular*. 6 Ed. Madrid. Elsevier Saunders.
- Alikhani, F.E. 2013. Phage Display Technology. *Journal of Biology and Today 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. *et al.* 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends in immunology*, 22(12), 691–700.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., *et al.* 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, *et al.* 2011. Principles of Immunopharmacology. (F. P. Nijkamp & M. J. Parnham, Eds.), 15–28.
- 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.
- Chin, L.T., Malmberg, A.C., Kristensson, K., et al. 1995. Mimicking the humoral immune response in vitro results in antigen-specific isotype switching supported by specific autologous T helper cells: generation of human HIV-1-neutralizing IgG monoclonal antibodies from naive donors. *Eur. J. Immunol.* 25, 657.
- Chung, N. P., Chen, Y., Chan, *et al.* 2004. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histology and histopathology*, 19(1), 317–24.
- Comabella, M., Montalban, X., Münz, C., *et al.* 2010. Targeting Dendritic Cells to Treat Multiple Sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. Sep; 6(9):499-507.
- Conti, L., Cardone, M., Varano, B., *et al.* 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.
- Edward Pearce y Bart Everts. 2015. Dendritic cell metabolism. *Nature Reviews Immunol.* 15: 18-29
- 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.
- Friedman TM, Filicko-O'Hara J, Mookerjee B, et al., 2007. T cell repertoire complexity is conserved after LLME treatment of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13(12):1439-47.

- 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., et al. 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., et al. 2006. Characterization of chicken epidermal dendritic cells. *Immunology*, 119(2), 278–288.
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Steinman, R. M., et al. 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., et al. 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.

Juan C. Almagro y Johan Fransson. 2008. Humanization of antibodies. *Frontiers in Bioscience* 13, 1619-1633.

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., *et al.* 2010. Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 460–7.

Kierny, M.R., Cunningham, T.D., Kay, B.K. 2012. Detection of biomarkers using recombinant antibodies coupled to nanostructured platforms. *Nano Rev.* 3.

Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A. 2007. INMUNOLOGÍA de Kuby. 6 edición. México, D.F. McGraw-Hill.

Kohler, G., Milstein, C., 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.

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., *et al.* 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., *et al.* 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., *et al.* 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., *et al.* 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., *et al.* 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.
- Mieko K, Huimin Y., Noriko MT, *et al.*, 2012. A method for inducing antigen-specific IgG production by in vitro immunization. *Journal of Immunological Methods* 386:60–69
- Moniuszko, A., Penza, P., Czupryna, P., *et al.* 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., *et al.* 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.

Rehman, A. et al. 2013 Role of fatty-acid synthesis in dendritic cell generation and function. *J. Immunol.* 190, 4640–4649.

Roberto Reverberi y Lorenzo Reverberi. 2007. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus;* 5: 227-240.

Saito, T., Kitayama, D., Sakamoto, A., et al. 2008. Effective collaboration between IL-4 and IL-21 on B cell activation. *Immunobiology* 213, 545.

Sardar, A. J., Oates, M. E., Fang, H., et al. 2014. The evolution of human cells in terms of protein innovation. *Molecular biology and evolution*, 31(6), 1364–74.

Shin-ei M., Makiko Y., Yoshinori K., et al., 2008. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by in vitro immunization and the phage display method. *Journal of Immunological Methods* 332:2–9

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., *et al.* 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 311: 17-58.

Tamura, T., Tomimatsu, K., Katakura, Y., et al. 2007. Anti-peptide antibody production elicited by in vitro immunization of human peripheral blood mononuclear cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2871

Ueno, H., Klechevsky, E., Schmitt, N., *et al.* 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., et al. 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.

Victoria, G., Nussenzweig, M., 2012. Germinal centers. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 429.

Wang, F., Ekiert, D. C., Ahmad, I., *et al.* 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 cáncer 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., et al. 2010. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 129(1), 133–45.

Zafiroopoulos, A., Andersson, E., Krambovitis, E., Borrebaeck, C.A., 1997. Induction of antigen-specific isotype switching by in vitro immunization of human naive B lymphocytes. *J. Immunol. Methods* 200, 181.

Zhao, E., Xu, H., Wang, L., et al. 2012. Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & molecular immunology*, 9(1), 11–9.