



---

## GENERACIÓN *in vitro* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DE ORIGEN MIELOIDE

**Adriana Cuellar Avila<sup>1\*</sup>, Catherine Cifuentes Rojas<sup>1</sup>, John Mario González Escobar<sup>1-2</sup>**

1. Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

2. Department of Neurology, Keck Medical School, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

[acuellar@javeriana.edu.co](mailto:acuellar@javeriana.edu.co)

### RESUMEN

Las células dendríticas son importantes reguladores de la respuesta inmune celular. Estas células son consideradas como presentadoras profesionales de antígenos, con potente capacidad de estimular linfocitos T vírgenes. El objetivo de este trabajo fue establecer un modelo de cultivo *in vitro* para la obtención de células dendríticas mieloides humanas a partir de monocitos CD14+ de sangre periférica. Se utilizaron citoquinas como IL-4 y factor estimulador de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF) para la obtención de células inmaduras y la posterior incubación con PGE2 y TNF $\alpha$  para la obtención de células maduras. Utilizando este modelo se obtuvieron células dendríticas inmaduras al día 5 y células dendríticas maduras al día 7, lo cual fue confirmado por los cambios en la morfología y la expresión de marcadores de superficie como CD14, CD86, HLA-DR y CD83. El estudio de la cinética de maduración de células dendríticas, es de utilidad en protocolos de inmunoterapia para diferentes tipos de cáncer y en la definición de mecanismos inmunes involucrados en diferentes inmunopatologías causadas por antígenos provenientes de alérgenos o de microorganismos.

**Palabras claves:** citoquinas, células dendríticas, monocitos, GM-CSF, IL-4.

### ABSTRACT

Dendritic cell activity is an important step to elicit cellular immunity. These cells are the most potent antigen presenting cells and the main activating factor for naive T cells. There are several phenotypes of dendritic cells originated from different cell precursors. The aim of this study was to assess a model to obtain human myeloid dendritic cells from peripheral blood CD14+ monocytes. Cells were cultured in the presence of granulocyte-monocyte colonies stimulating factor (GM-CSF) and IL-4 to obtain immature dendritic cells, which were further cultured with PGE2 plus TNF $\alpha$  to induce their maturation. We obtained immature dendritic cells at day 5 and mature dendritic cells at day 7, according to microscopic cellular phenotype and positivity of membrane markers for CD14, CD86, HLA-DR and CD83.

**Key words:** cytokines, dendritic cells, monocytes, GM-CSF, IL-4.

---

### INTRODUCCION

Una de las células con capacidad para estimular linfocitos que no han tenido contacto con antígenos son las células dendríticas, las cuales se consideran como potentes células presentadoras de antígeno profesionales. Esta función es posible gracias a su

potencial para capturar antígenos en los tejidos periféricos en su estado de inmadurez, procesarlos mientras viajan al órgano linfático secundario, en donde se completa su maduración y presentarlos en contexto

---

\* En memoria del Doctor Julio Alberto Latorre Lázaro

de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad en las áreas de linfocitos T del nódulo linfoide (Revy, 2001; Lanzavechia, 2001; Romani, 1989; Russo, 200; Teunissen, 1990).

En este proceso de activación de linfocitos T, las células dendríticas expresan moléculas de superficie y liberan moléculas que polarizan la respuesta de los linfocitos activados para secretar citoquinas de tipo Th1, como en el caso de las células que secretan INF $\gamma$  y TNF $\beta$ , o citoquinas de tipo Th2 como IL-4, IL-5, IL-9 o IL-13 (Jankovic, 2001; Lanzavechia, 2000; Romagnani, 2000).

El ejemplo claro de una citoquina secretada por la célula dendrítica y que participa en la regulación de la respuesta linfoide, es la IL-12. Cuando la célula dendrítica secreta IL-12, los linfocitos se convierten en células Th1. En contraste, si la producción de IL-12 por células dendríticas es baja o negativa, la respuesta linfoide puede ser sesgada hacia Th2 (Langenkamp, 2000; Lanzavechia, 2000).

La capacidad de las células dendríticas para regular la respuesta inmune celular ha despertado gran interés, debido a que pueden participar en los mecanismos inmunopatológicos de diferentes enfermedades y se utilizan como blancos para el desarrollo de protocolos de inmunomodulación en procesos infecciosos, alérgicos y cáncer (Hsu, 1995; Kugler, 2000; Lodge, 2000; Mukherji, 1995; Murphy, 1996, Nestle, 1998).

Las células dendríticas han sido clasificadas de acuerdo con diferentes linajes hematopoyéticos en linfoides (CD11c-) y mieloides (CD11c+), estas subpoblaciones pueden ser diferenciadas mediante la utilización de marcadores de superficie. Adicionalmente, existen protocolos para

obtener diferentes tipos de células dendríticas in vitro a partir de precursores de médula ósea CD34+ y células circulantes CD14+. Las células dendríticas de diferentes fenotipos han sido involucradas en la inducción de tolerancia o activación por parte de los linfocitos (Albert, 2001; Cella, 1996; Fonteneau, 2001; Grouard, 1997; Kohrgruber, 1999; Macatonia, 1995; Rissoan, 1999; Robinson, 1999; Steinman, 2000).

El objetivo del presente trabajo fue establecer el modelo de cultivo para la obtención de células dendríticas mieloides a partir de células circulantes de sangre periférica CD14+, mediante la utilización de citoquinas como IL-4 y factor estimulador de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), para su posterior utilización en estudios in vitro o para el posible desarrollo de modelos de inmunoterapia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Purificación de los monocitos:** a partir de una muestra de sangre anticoagulada con heparina se obtuvieron poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por gradientes de Ficoll-Hypaque. Los monocitos se separaron con anticuerpos monoclonales anti-CD14 acoplados a perlas magnéticas utilizando el sistema de MiniMaCs (Miltenyi, Alemania). Las células obtenidas se lavaron en medio base (RPMI 1640, Sigma, USA) con 2% de SFB HyClone. La viabilidad celular fue evaluada mediante citometría de flujo y tinción con 7-Actinomicina-D (7-AAD, Becton Dickinson, USA). Además, se realizó conteo celular en hemocitómetro. La pureza de la población fue evaluada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD14 (Becton Dickinson).

**Diferenciación de monocitos a células dendríticas:** las células CD14+ se incubaron en medio completo (RPMI 1640,

antibióticos, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y 10% SFB) en placas de 24 pozos a una densidad de  $8 \times 10^5$  por ml en presencia de 1,000 U/ml de IL-4 y 50 ng/ml de GM-CSF (R&D system, USA) durante 5 días y se verificó su morfología por microscopia de luz. Al día 5 de cultivo, se adicionaron 5,000 U/mL de TNF $\alpha$  y 10 mM/mL de PGE2 durante 48 horas; como control negativo se utilizaron células sin estímulo de maduración. La morfología de las células fue evaluada con coloración de Wright en láminas obtenidas por citospin. La presencia de marcadores de células dendríticas inmaduras se evaluó por citometría de flujo al día 5 de cultivo y de células dendríticas maduras al día 7 de cultivo.

**Citometría de Flujo para expresión de marcadores de superficie:** para evaluar la expresión de marcadores de superficie se utilizó citometría de flujo de cuatro colores con anticuerpos anti CD14.APC (BD Biosciences), anti HLA-DR.PerC (BD Biosciences), anti CD86.PE (Pharmlingen) y anti CD83.FITC (Pharmlingen), con controles de isotipo para HLA-DR (IgG2a.PerC-BD Biosciences), CD86 (IgG2b.PE-Pharmlingen) y CD83 (IgG1. FITC-Pharmlingen).

En total  $1 \times 10^5$  células se colocaron en tubos de citometría y se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad con las diferentes combinaciones de anticuerpos. Se realizaron tres lavados con PBS pH 7.2 y azida de sodio 0.1% y se resuspendieron en solución de fijación (PBS 1x, paraformaldehído 1%). La adquisición y análisis de los datos, se realizó usando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Immunocytometry Systems, USA).

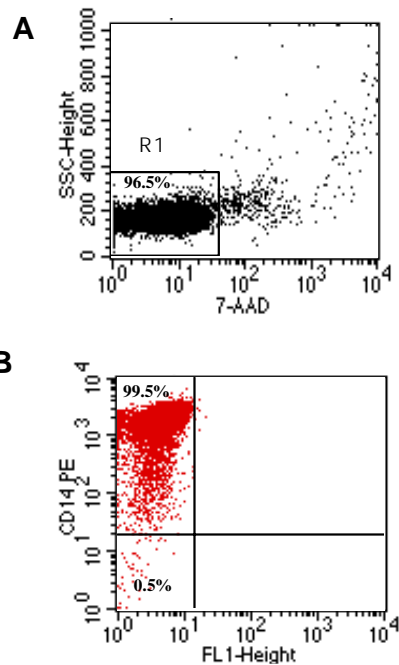
### PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Las medias de los porcentajes de expresión de los marcadores para cada condición en el día 5 y en el día 7, fueron comparados

por una prueba de t para muestras pareadas utilizando 0.05 de nivel de confianza.

### RESULTADOS

**Recuperación de células:** los gradientes de Ficoll-Hypaque permitieron una recuperación de CMSP de  $2 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  células por ml de sangre anticoagulada. La separación de células CD14+, mediante la utilización de perlas magnéticas, permitió obtener entre el 7 y 10% de los CMSP con viabilidad mayor del 95% y porcentajes de pureza no menores a 95% (Fig 1).



**FIGURA 1. Pureza de la población CD14+**

Porcentaje de pureza de la población de monocitos CD14+ obtenidos por selección positiva con anticuerpos anti-CD14 acoplados a perlas magnéticas. A. Dispersograma (citometría de flujo) para identificación de las células vivas que no incorporan 7- Actinomicina-D (7-AAD) y en las células muertas que si incorporan el colorante. B. Dispersograma que muestra el porcentaje de células CD14+ después de la purificación.

Se cultivaron  $8 \times 10^5$  células CD14+, de las cuales se obtuvo un porcentaje de recuperación de células dendríticas al final del cultivo (día 7) de 75%.

**Expresión de marcadores celulares:** para determinar si la metodología utilizada para la obtención de las células CD14+ tenía un efecto en la expresión de los marcadores a analizar, se realizó un marcaje en sangre completa (SC), en las CMSP y en la población de células CD14+ purificada con anticuerpos anti CD14+ acoplados a perlas magnéticas. Los marcadores evaluados fueron CD83, CD86 y HLA-DR en la población CD14+. Los resultados muestran que no hay diferencias entre las diferentes poblaciones, de acuerdo con el porcentaje de células que expresan cada marcador y la intensidad de fluorescencia correspondiente Tabla 1. Estos datos indican que la metodología utilizada para obtener las poblaciones celulares, no alteran la expresión de estos marcadores.

Los sistemas de cultivo utilizados corresponden a células en RPMI completo en ausencia de citoquinas (fenotipo esperado:

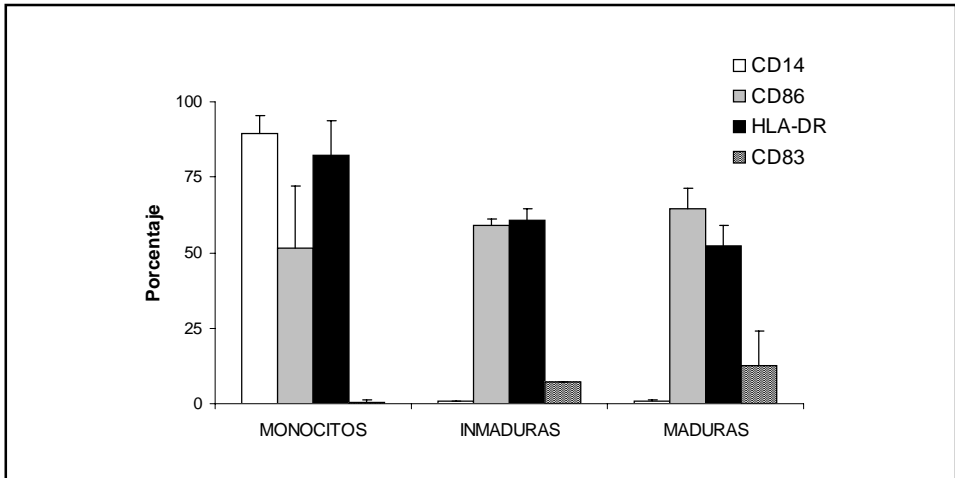
monocitos), células cultivadas en presencia de IL-4 y GM-CSF desde el día 0 (fenotipo esperado: células inmaduras) y células cultivadas en presencia de IL-4 y GM-CSF desde el día 0, con adición del estímulo de maduración (TNF $\alpha$  y PGE2) el día 5 de cultivo (fenotipo esperado: células maduras). La expresión de marcadores fue analizada en el día 5 y día 7 de cultivo.

La expresión de marcadores en el día 5 de cultivo muestra un gran porcentaje de células expresan CD14+ en el cultivo en ausencia de citoquinas, a diferencia de las expuestas a citoquinas. La expresión de CD86+ se mantiene constante. El marcador CD83+ se expresa en bajo porcentaje en presencia de citoquinas. La expresión de HLA-DR muestra una tendencia a disminuir en las células expuestas a citoquinas. Teniendo en cuenta que las células expuestas a citoquinas para obtener poblaciones de células dendríticas inmaduras y maduras se encuentran en la misma condición hasta el día 5 de cultivo, no se observan diferencias en la expresión de los marcadores en estas dos poblaciones (Figura 2).

**TABLA 1. Expresión de marcadores CD86, HLA-DR y CD83 después de los procesos de obtención de poblaciones celulares**

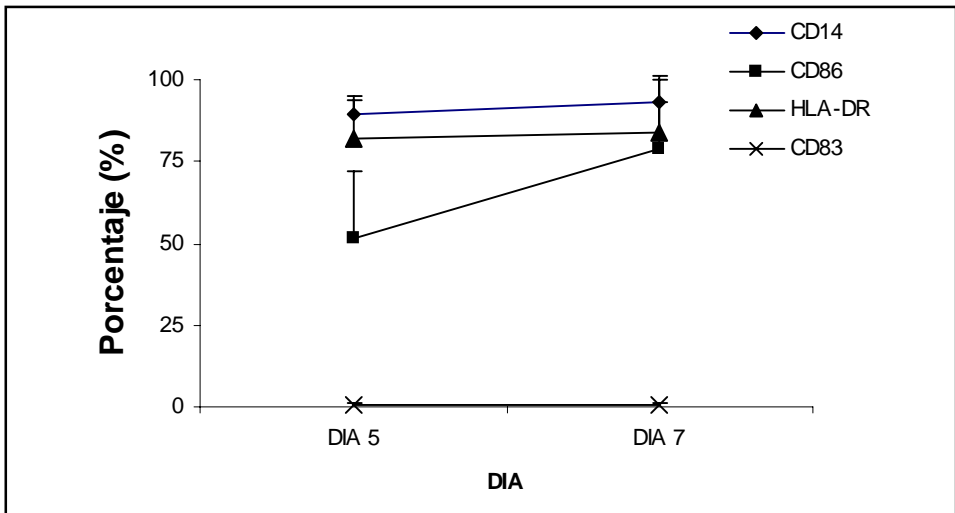
	SP		CMSP		CD14+	
	%	MIF	%	MIF	%	MIF
CD86	88.8	355	91.1	390	92.0	325
HLA-DR	66.4	123	62.4	119	77.5	167
CD83	0.7	69	0.3	167	1.2	162

CD14+: Células CD14+ después de la separación con perlas magnéticas  
 MIF: Intensidad media de fluorescencia  
 CMSP: Células mononucleares de sangre periférica  
 SP: Sangre completa



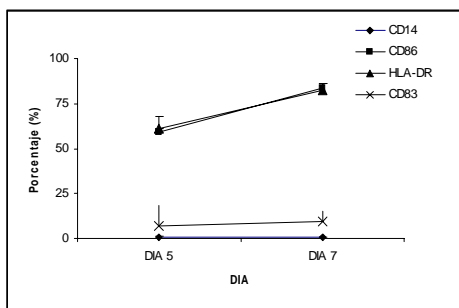
**Figura 2. Expresión de marcadores al día 5 de cultivo**

Expresión de CD14, CD86, HLA-DR y CD83 al día 5 de cultivo. Se observan células en ausencia de citoquinas (Monocitos) y células en presencia de IL-4 y GM-CSF desde el día 0 de cultivo (Células inmaduras y Células maduras).



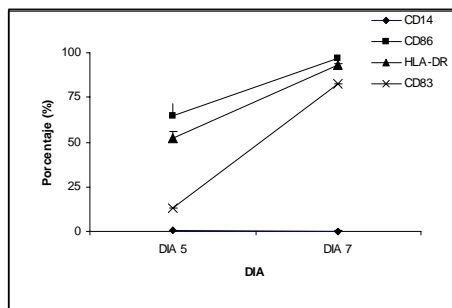
**Figura 3A. Expresión de marcadores al día 5 y 7 de cultivo**

Expresión de CD14+, CD86+, HLA-DR+ y CD83+ al día 7 de cultivo. Se observan células en ausencia de citoquinas (Monocitos, Figura 3A), células en presencia de IL-4 y GM-CSF desde el día 0 de cultivo (Células inmaduras, Figura 3B) y células en presencia de IL-4 y GM-CSF desde el día 0 de cultivo y estímulo de maduración adicionado al día 5 de cultivo (Células maduras, Figura 3C). \*\*\*Diferencia altamente significativa en la expresión de CD86 ( $p=0.00088$ ) y CD83 ( $p=0.0017$ ) entre el día 5 y día 7 de cultivo, con un nivel de significancia de 0.05. \*Diferencia significativa en la expresión de HLA-DR ( $p=0.11$ ) entre el día 5 y día 7 de cultivo, con un nivel de significancia del 0.5.



**Figura 3B.**

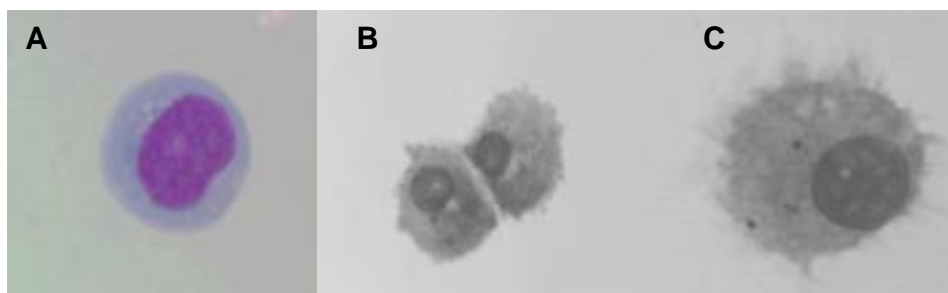
Comparando la expresión de marcadores entre el día 5 y el día 7, se observa en el cultivo de monocitos que el CD14<sup>+</sup> se mantiene en un gran porcentaje, CD86<sup>+</sup> tiende a aumentar, HLA-DR<sup>+</sup> no cambia su expresión y CD83<sup>+</sup> se mantiene negativo hasta el final del cultivo (Figura 3A). En ninguno de los casos se encuentra una diferencia estadísticamente significativa (CD14  $p=0.06$ , CD86  $p=0.09$ , HLA-DR  $p=0.82$  y CD83  $p=0.95$ ). Las Células inmaduras se mantienen negativas para CD14<sup>+</sup> hasta el final del cultivo, aumenta su expresión de CD86<sup>+</sup> y HLA-DR<sup>+</sup> y un bajo porcentaje de las células expresa CD83<sup>+</sup> (Figura 3B). En las células maduras se mantiene igualmente negativa la expresión de CD14<sup>+</sup>, aumenta la expresión de CD86<sup>+</sup> con una diferencia estadística altamente significativa con una  $p=0.00088$ , se observa un gran aumento en la expresión de CD83<sup>+</sup>



**Figura 3C.**

$p=0.0017$  con un nivel de significancia de 0.05 y aumento en la expresión de HLA-DR que no tiene una diferencia estadísticamente significativa (Figura 3C).

Para observar la morfología de las células al final del cultivo, se realizó un citospin para permitir la adherencia de las células a láminas portaobjetos y hacer una coloración de Wright. Las células cultivadas en ausencia de citoquinas y prostaglandinas muestran la morfología característica de monocitos de sangre periférica (Figura 4A), las células dendríticas inmaduras muestran una disminución en el tamaño del núcleo y emiten algunas prolongaciones citoplasmáticas (Figura 4B) y las células dendríticas maduras tienen un núcleo pequeño comparado con el de los monocitos y emiten prolongaciones como dendritas, características de estas células (Figura 4C).



**Figura 4. Morfología de las células al final del cultivo**

Células al día 7 de cultivo coloreadas con Wright. A. En ausencia de citoquinas. B. Con IL-4 y GM-CSF en el día 0. C. Con IL-4 y GM-CSF en el día 0 y TNF $\alpha$  y PGE2 al día 5 de cultivo.

## DISCUSIÓN

Las células dendríticas son importantes moduladores de la respuesta inmune, ya que tienen la capacidad de regular procesos inmunes locales en el sitio de entrada del antígeno, así como de influenciar la respuesta inmune sistémica activando y regulando la actividad linfoide en los órganos linfoides secundarios. Existen múltiples modelos que permiten conocer los mecanismos de activación de linfocitos CD4+ y CD8+ por células dendríticas. Estos modelos pretenden definir las condiciones óptimas de cultivo para obtener células dendríticas en gran cantidad y con la capacidad necesaria para activar la respuesta linfoide tanto *in vivo* como *in vitro* (Mailliard, 2002).

Existe amplia evidencia de que los monocitos CD14+ pueden diferenciarse hacia células dendríticas. Esto ha sido demostrado utilizando células humanas en cultivos *in vitro* y modelos *in vivo* en ratón con microesferas fluorescentes inyectadas por vía cutánea (Lyakh, 2000).

La separación de células CD14+ por selección positiva utilizando perlas magnéticas, podría inducir una pre-activación de las células que afectaría los resultados obtenidos en la cinética de maduración de las células dendríticas. En este trabajo se evaluó la expresión de marcadores en sangre completa, en CMSP obtenidos por gradientes de densidad y en poblaciones de células CD14+ correspondientes a los monocitos, separados por selección positiva con anticuerpos anti-CD14 conjugados con perlas magnéticas. Los resultados muestran que los procesos de separación utilizados no alteran la expresión de marcadores de manera significativa.

El marcador CD14+ se expresa en células de linaje mielomonocítico, tiene un peso molecular de 53 a 55 KDa y actúa como

complejo de unión a lipopolisacárido (LPS) y la proteína de unión a LPS.

El marcador CD86, también denominado B7.2, es una molécula expresada en monocitos, células B activadas y células dendríticas, tiene un peso molecular de 80 KDa y actúa como ligando para CD28 y CTLA-4 en los linfocitos T. Esta molécula es importante en la generación de señales coestimuladoras que contribuyen a la activación del linfocito T.

HLA-DR es una molécula de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), que se expresa en células presentadoras de antígenos tales como monocitos, células B y células dendríticas. El CMH de clase II une péptidos que son presentados a los linfocitos T CD4+.

La molécula CD83+ pesa 43 KDa y se expresa selectivamente en células dendríticas maduras. Su restringida expresión, sugiere que puede tener una función especializada durante la presentación antigénica por las células dendríticas, contribuyendo así con la activación linfoide, actuando como una molécula de adhesión (Scholler, 2001).

Nuestros resultados muestran que los monocitos en cultivo, sin adición de citoquinas, no se diferencian espontáneamente en células dendríticas *in vitro* en un porcentaje importante, ya que mantienen su expresión de CD14+.

Cuando las células son expuestas a GM-CSF e IL-4 en el día 0 de cultivo comienzan un programa de diferenciación a células dendríticas, lo cual se demuestra por la ausencia de la molécula CD14+ en la superficie y el aumento de moléculas coestimuladoras como CD86+ y HLA-DR+ y aunque algunas células adquieren la expresión de CD83+, el porcentaje de estas células es muy bajo, lo cual indica que las células se mantienen en estado de inmadurez.

Las células cultivadas al día 0 con GM-CSF e IL-4 con adición de PGE2 y TNFa al día 5 de cultivo, culminan su proceso de diferenciación a células dendríticas maduras. Esto se confirmó, ya que además de perder la expresión de CD14+ y aumentar la expresión de las moléculas CD86+ y HLA-DR, un gran porcentaje de las células expresaron el marcador de maduración CD83+.

La expresión de HLA-DR aumento en las DC maduras al día 7 con respecto al día 5, aunque no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa. Esto pudo deberse a la presencia de LPS en el sistema de cultivo, lo cual fue evaluado por la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* sp. Existe controversia en la literatura sobre el efecto del LPS desde el día 0 de cultivo. En algunos reportes se encuentra inhibición de la expresión de CD83 en presencia de LPS, lo cual no ocurrió en nuestro sistema de cultivo (Rieser, 1998).

De acuerdo con la morfología celular y la expresión de marcadores, hemos logrado establecer el sistema de cultivo para la obtención de células dendríticas inmaduras y maduras *in vitro*, a partir de monocitos de sangre periférica humana. Estableciendo las condiciones de cultivo *in vitro* que permita simular los estados de maduración de células dendríticas, se pueden estudiar los mecanismos inmunopatológicos de diferentes enfermedades y procesos infecciosos, en los que es necesario determinar la capacidad fagocítica de células dendríticas inmaduras y el potencial de presentación de antígenos de las células dendríticas maduras. De la misma manera se puede obtener información sobre el tipo y la concentración de citoquinas secretadas por estas células que pueden modular el tipo de respuesta adaptativa, influenciando el patrón de citoquinas secretadas por los linfocitos.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero de la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana.

Un especial agradecimiento a las Doctoras Lilia Magdalena Osorio y Yubelly Avello del Departamento de Patología de la Pontificia Universidad Javeriana.

## LITERATURA CITADA

- ALBERT, ML., JEGATHESAN, M., DARNELL, R. 2001. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature Immunol* 2:1010-1017.
- ARDAVIN, C., WU, L., LI, CL., SHORTMAN, K. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the Thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761-763.
- ARDAVIN, C., MARTINEZ, G., MARTIN, P., ANJUERE, F., ARIAS, C., MARIN, A., RUIZ, S., PARRILLAS, V., HERNANDEZ, H. 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* 22:691-700.
- BLOM, B., HO, S., ANTONENKO, S., LIU, Y. 2000. Generation of interferon alpha-producing pre-dendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1785-1795.
- BUIDOSO, R., HOPKINS, J., DUTIA, B., YOUNG, P., MCCONELL, I. 1989. Characterization of sheep afferent lymph dendritic cells and their role in antigen carriage. *J Exp Med* 170:1285-1302.
- CELLA, M., SCHEIDEGGER, D., PALMER-LEHMANN, K., LANE, P., LANZAVVECHIA, A., ALBERT, G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels



- of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184:747-752.
- FONTENEAU, J-F., LARSSON, M., SOMERSAN, S., SANDERS, C., MÜNZ, C., KWOK, W., BHARDWAI, N., NJOTEREAU, F. 2001. Generation of high quantities of viral and tumor specific human CD4+ and CD8+ T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 258:111-126.
- GROUARD, G., RISSOAN, M., FILGUEIRA, L., DURAND, I., BANCHEREAU, J., LIU, Y. 1997. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185: 1101-1112.
- HSU, FJ., BENIKE, C., FAGNONI, F., LILES, TM., CZERWINSKI, D., TAIDI, B., ENGLEMAN, EG., LEVY, R. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 2:52-8.
- JANKOVIC, D., LIU, Z., GAUSE, W. 2001 Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *TRENDS Immunol* 22:450-456.
- KOHRGRUBER, N., HALANEK, N., GROGER, NM., WINTER, D., RAPPERSBERGER, K., SCHMITT-EGENOLF, M. 1999. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J Immunol* 163:3250-3259.
- KUGLER, A., STUHLER, G., WALDEN, P., ZOLLER, G., ZOBYWALSKI, A., BROSSART, P., TREFZER, U., ULLRICH, S., MULLER, CA., BECKER, V., GROSS, AJ., HEMMERLEIN, B., KANZ, L., MULLER, GA., RINGERT, RH. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 6:332-6.
- LANGENKAMP, A., MESSI, M., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation : impact on priming of Th1, Th2 and non-polarized T cells. *Nat Immunol* 1:311-315.
- LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: Intermediates, effectors and memory cells. *Science* 290:92-97.
- LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. 2001. The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics *Curr Opin Immunol* 13:291-298.
- LODGE, PA., JONES, LA., BADER, RA., MURPHY, GP., SALGALLER, ML. 2000. Dendritic cell-based immunotherapy of prostate cancer: immune monitoring of a phase II clinical trial. *Cancer Res* 60:829-33.
- LYAKH, L., KOSKI, G., TELFORD, W., GRESS, R., COHEN, P., RICE, N. 2000. Bacterial lipopolysaccharide, TNF-a, and calcium ionosphere under serum free conditions promote rapid dendritic cell like differentiation in CD14+ monocytes through distinct pathways that activate NF-kB. *J Immunol* 165:3647-3655.
- MACATONIA, S., HOSKEN, N., LITTON, M., VIEIRA, P., HSIEH, C., CULPEPPER, J. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of TH1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154: 5071-5079.
- MODLIN, R., BRIGHTBILL, B. 1999. The toll of innate immunity on microbial pathogens *N Engl J Med* 340:1834-1835
- MAILLIARD, R., EGAWA, S., CAI, Q., KALINSKA, A., BYKOVSKAYA, S., LOTZE, M.,

- KAPSENBERG, M., STORKUS, W., KALINSKI, P. 2002. Complementary dendritic cell activating function of CD8+ and CD4+ T cells: Helper role of CD8+ T cells in the development of T helper type 1 responses. *J Exp Med* 195:473-483.
- MUKHERJI, B., CHAKRABORTY, NG., YAMASAKI, S., OKINO, T., YAMASE, H., SPORN, JR., KURTZMAN, SK., ERGIN, MT., OZOLS, J., MEEHAN, J. 1995. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8078-82.
- MURPHY, G., TJOA, B., RAGDE, H., KENNY, G., BOYNTON, A. 1996. Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* 29:371-80.
- NESTLE, FO., ALJAGIC, S., GILLIET, M., SUN, Y., GRABBE, S., DUMMER, R., BURG, G., SCHADENDORF, D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-32.
- REVVY, P., SOSPREDA, M., BARBOUR, B., TRAUTMANN, A. 2001 Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2:925-931.
- RIESER, C., PAPESH, C., HEROLD, M., BÖCK G., RAMONER, R., KLOCKER, H., BARTSCH, G., THURNHER, M. (1998) Differential deactivation of human dendritic cells by endotoxin desensitization: Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Prostaglandin E2. *Blood* 91:3112-3117.
- RISSOAN, M., SOUMELIS, V., KADOWAKI, N., GROUARD, G., BRIERE, F., DE WAAL MALEFYT, R. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-1186.
- ROBINSON, S.P., PATTERSON, S., ENGLISH, N., DAVIES, D., KNIGHT, S.C., REID, C. 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29:2769-2778.
- ROMANI, N., LENZ, A., GLASSEL, H. 1989. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function *J Invest Dermatol* 93:600-609.
- ROMAGNANI S. 2000. The role of lymphocytes in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 105:399-408.
- RUSSO, V., TANZARELLA, S., DALERBA, P., RIGATTI, D., ROVERE, P., VILLA, A., BORDIGNON, C., TRAVERSARI, C. 2000. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I restricted T cell response *Proc Nat. Acad Sci USA* 97:2185-2190.
- SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *J Exp Med* 179:1109-1118.
- SCHOLLER, N., HAYDEN-LEDBETTER, M., HELLSTRÖM, K., HELLSTRÖM, I., LEDBETTER, J. 2001. CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cells. *J Immunol* 166:3865-3872.

SMITH, A., ST GROTH, B. 1999. Antigen pulsed CD8+ dendritic cells generate an immune response after subcutaneous injection without homing to the draining lymph node. *J Exp Med* 189:593-598.

STEINMAN, R., TURLEY, S., MELLMAN, I., INABA, K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411-416.

TEUNISSEN, M., WORMEESSTER, J., KRIEG, S. 1990. Human epidermal Langerhans

cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture *J Invest Dermatol* 94:166-173.

WITMER-PACK, M., OLIVER, W., VALINSKY, J., SCHULER, G., STEINMAN, R. 1987. Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells *J Exp Med* 166:1484-1498.

**Recibido: 19-08-03**

**Aceptado: 18-03-04**