

LAS CELULAS DENDRITICAS: POSIBLES APLICACIONES TERAPEUTICAS.

*Gisela Cáceres-Dittmar, Ph.D. **

Gisela Cáceres-Dittmar, Ph.D., **Las células dendríticas: Posibles aplicaciones terapéuticas.** Derm. Venez, 1998, 36: 1 32-1 35

RESUMEN.

La interacción entre el sistema inmune y las células tumorales o microorganismos es muy compleja, involucra una serie de tipos celulares y mediadores. Las células dendríticas juegan un papel fundamental en el desarrollo del sistema inmune, son las células presentadoras de antígeno profesionales más importantes en la activación de células T en reposo y de linfocitos T vírgenes. Estas características señalan a las células dendríticas como fundamentales para una respuesta inmune efectiva. Actualmente, estas células son el blanco para las vacunas génicas, con el objetivo de utilizarlas en inmunoterapia y para el desarrollo de vacunas.

ABSTRACT.

The interaction between tumor cells, microorganisms and the immune system is complex, involving a multitude of cell types and mediators. The dendritic cells play a crucial role in development of the immune system. They are the professional antigen-presenting cells most efficient in the activation of resting T cells and are the major antigen presenting cells for activation of naive T cells. These characteristics point the dendritic cells as a key cell for the effectiveness of a immune response. Actually, these cells are being the target for the genetic vaccinations, with the object of use them in immunotherapy and development of vaccines.

INTRODUCCION

Las células dendríticas (CDs) tienen un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmune. Se caracterizan por ser muy eficientes en la estimulación de linfocitos T en reposo y ser las únicas células presentadoras de antígeno (CPA) capaces de estimular a linfocitos T vírgenes^{1,2}. Característica que ha dirigido su visualización como posibles adyuvantes en inmunoterapia³.

La idea es: en procesos tumorales extraer CDs de la sangre de un individuo y hacerlas crecer en medios de cultivo mientras son estimuladas con antígeno. Posteriormente, éstas mismas células se devuelven al mismo individuo con la esperanza de lograr incrementar la resistencia del paciente.

Las células de Langerhans, que son las CDs epidérmicas también podrían ser utilizadas en procesos de vacunación, escogiendo las secuencias del cDNA adecuadas para inducir la respuesta inmune contra el parásito, el éxito del proceso radicaría en la fácil accesibilidad para vacunar a un individuo y en que puede obtenerse una vacuna universal.

Las Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) constituyen un sistema ampliamente

distribuido e interconectado de células presentadoras de antígenos. Las cuales tienen nombres diferentes dependiendo de su localización: las células dendríticas foliculares asociadas a las áreas de linfocitos B en los tejidos linfoides, las células veladas en los vasos linfáticos aferentes, las células interdigitantes asociadas a las áreas de linfocitos T en el timo, los dendrocitos dérmicos en la dermis y las células de Langerhans en la epidermis (CL)⁴. En órganos no linfoides se han descrito células dendríticas en corazón, hígado, pulmón, intestino y piel⁵.

Las células dendríticas se originan en la médula ósea, presentan el antígeno CD34+, precursor común para granulocitos y macrófagos. En humanos se ha demostrado la existencia de un formador de colonias

Dirección:
Lab. Inmunología Celular, Instituto de
Biomedicina, Apartado 4043, Caracas 1010A
Venezuela
E-mail: gcacer@telcel.net.ve
Fax: 58-2-861.12.58

de células dendríticas (CFU-DC). Además, de la existencia de una célula bipotencial, que en presencia de ciertos factores formadores de colonia (post-CFU-CD14) puede diferenciarse en una célula dendrítica o en un macrófago⁶.

Migración de las células dendríticas

Las células dendríticas se caracterizan por capturar y procesar antígenos eficientemente, pero son pobres activadoras de linfocitos T. En respuesta a un insulto cutáneo (entrada de toxinas, ruptura del tejido), las CDs maduran rápidamente y se convierten en potentes células presentadoras de antígeno. La supervivencia y activación de las CL está determinada por la presencia de antígenos y por el microambiente de citocinas producidas por los queratinocitos y los linfocitos T $\gamma\delta$. Además es interesante mencionar que algunas células pueden permanecer en la epidermis a pesar de haber tomado algún antígeno⁷.

Se ha demostrado que las CL recién aisladas de la piel cambian al ser mantenidas en cultivo. Las CL cultivadas expresan altas cantidades de moléculas MHC-II, B7-1 (CD80), ICAM-1 e incrementan la capacidad de presentar antígenos a linfocitos T vírgenes; además, pierden los gránulos de Birbeck, la expresión de E-cadherina y la capacidad de procesar antígenos proteicos complejos^{8,11}.

Basándose en éstas evidencias se acepta que las CL frescas tienen las características de las CL en la epidermis, mientras las cultivadas las características de las CD de los ganglios linfáticos.

Experimentos con líneas celulares han demostrado que las citocinas tienen un papel fundamental en la diferenciación de las CDs. Pre-tratamiento con Gm-CSF e interleucina 4 incrementan la capacidad de toma del antígeno, pero no inducen la

capacidad de presentación antigénica¹².

Recientemente hemos demostrado que aunque los cambios de las células dendríticas se inician con la toma del antígeno y la migración, las células dendríticas sufren un proceso de "maduración terminal" que está determinado por la interacción de la célula dendrítica con el antígeno y los linfocitos¹³.

Purificación de las células dendríticas

La importancia en obtener líneas de células dendríticas ya no es sólo interés de los inmunólogos que quieran estudiar sus características e importancia, sino de toda la comunidad médica y científica que entiende la relevancia que pueden tener estos estudios en la clínica, existiendo la posibilidad de utilizar las CDs en inmunoterapia, y otras enfermedades infecciosas.

La relevancia de estos estudios ha hecho que en los últimos años muchos grupos se dediquen a generar líneas de células dendríticas, por lo que sólo veremos un rápido panorama de éste campo.

Nuestro grupo obtuvo líneas de células dendríticas epidérmicas de origen murino, (serie XS). Las cuales se aíslan de la epidermis de ratones BALB/c neonatos y son mantenidas en cultivo con GM-CSF. Estas células muestran gran similitud con las CL frescas obtenidas de piel en las siguientes características: tienen forma elongada y dendrítica; expresan bajos niveles de la, son CD45+, E-cadherin+ y B7-1-; moderada capacidad de presentación antigénica a linfocitos T vírgenes y alta capacidad de presentación antigénica a linfocitos T específicos¹⁴.

Como expondremos más adelante, estas células pueden ser de gran ayuda para estudios de vacunación. Pero también nos parece importante mencionar que la

obtención de éstas células nos ha permitido realizar estudios dermatológicos importantes, tales como los efectos de la exposición a la radiación ultravioleta. En el hombre una exposición moderada al sol tiene conocidos efectos benéficos^{15,17}. Pero es conocido que la exposición prolongada, asociada a otra serie de factores entre los que debemos mencionar susceptibilidad genética, induce mutaciones sobre la moléculas de ADN, cambio del ácido trans-uracónico y la generación de especies reactivas de oxígeno^{18,20}.

Diversos grupos han trabajado en la obtención de líneas de células dendríticas, entre los que podemos mencionar, Richters y col²¹ aíslan células dendríticas humanas basándose en la capacidad de migración de las células de explantes de tejido después de unas 24 horas. Girolomoni y col^a han generado células mieloides fetales de piel de ratón a través de fusiones de genes.

Las células de Langerhans

La historia de las células de Langerhans (LC) se inició en 1868 cuando el estudiante de medicina Paul Langerhans²² (en Berlín) descubrió una población de células dendríticas intraepidérmicas, que parecían estar en continuidad con las fibras nerviosas de la dermis, concluyendo que era un sistema de células nerviosas intraepidérmicas.

Después de muchos años e investigaciones, se demostró que las CL eran fuertemente positivas a la enzima ATPasa, lo que las asocia a células como los macrófagos. Evidencia reportada por primera vez en 1966 por la Venezolana Dra. Imelda Campo Aasen²³.

Las células dendríticas residentes en la epidermis, son centinelas en el reconocimiento de antígenos ambientales, que incluyen químicos (reacciones de hipersensibilidad por

contacto). aloantígenos (rechazo de injertos), microorganismos (inmunidad protectora contra infecciones) y antígenos asociados a tumores (inmunidad protectora contra tumores).

El papel de éstas células en la leishmaniasis cutánea americana ha sido parte de nuestro trabajo. Hemos encontrado que las diferentes formas de la enfermedad están claramente asociadas con diferencias en la densidad y en la expresión de moléculas accesorias por parte de las CL^{24,28}

Las células dendríticas en inmunoterapia.

Antes de abordar éste tema es necesario mencionar en qué consiste el proceso de inmunización génica. La protección de las enfermedades infecciosas tradicionalmente se ha realizado con vacunas de organismos atenuados o muertos. La introducción de la terapia génica ha abierto nuevas posibilidades, la técnica es rápida, específica y conceptualmente debe permitir un rápido desarrollo de vacunas seguras y efectivas.

inmunización génica

La vacuna génica se caracteriza por estimular una respuesta inmune celular y humoral, estableciendo una memoria inmunológica, lo que se cree determina una larga protección con una sola dosis²⁹.

Se han realizado esfuerzos en utilizar la inmunización génica después del nacimiento, introduciendo información genética nueva en los tejidos, ya sea acompañada de vectores o incluso RNA o DNA encapsulados en liposomas.³⁰

Actualmente, se construye un plasmido para garantizar la síntesis de antígenos del parásito en el sitio de inoculación. Lo que permitirá la

síntesis de proteínas extrañas dentro del organismo y podrán ser mantenidas bajo la vigilancia inmunológica.

Así mismo, se considera que el sitio exacto de inoculación es importante, se puede realizar una inyección intramuscular o intradérmica usando inyectoras convencionales. También puede aplicarse tópicamente utilizando vectores virales como vehículos o puede hacerse intracelularmente con una pistola génica. Esto implica la precipitación de pequeñas partículas de DNA cubiertas de oro que se introducen rápidamente dentro de las células del individuo por la fuerza motriz causada por una descarga eléctrica o helio comprimido.

Aplicación en inmunoterapia

La idea de que tumores, humanos y murinos, tienen epitopes inmunogénicos en su superficie, es cada vez más aceptada. Ofreciéndonos la posibilidad de tener un blanco contra quien dirigir el sistema inmune. Nuevamente las células dendríticas tendrían un papel fundamental para lograr una respuesta efectiva. Grabbe y col³¹ hacen una revisión al respecto y acumulan datos que demuestran que las CL estimuladas con antígenos de tumor son capaces de estimular una respuesta de linfocitos T citotóxicos in vitro, los cuales sabemos son críticos para actuar contra tumores y células infectadas por virus. Ha sido demostrado en diversos modelos animales que células dendríticas estimuladas con antígenos del tumor in vitro y después reinyectadas inducen respuestas inmunes protectoras que bloquean el crecimiento del tumor³². Además, trabajos en humanos han confirmado el valor de estas observaciones. Recientemente, Celluzzi y Faló³³ demuestran que las células dendríticas epidérmicas pueden ser potentes

inductores en la inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos CD8+.

La capacidad única que tienen las células dendríticas de inducir una respuesta inmune, sin otros adyuvantes, hace que se puedan considerar "adyuvantes naturales", razón por la que son excelentes candidatos para procesos de vacunación³⁴.

Por razones obvias, muchos de los intentos de aislamiento y purificación de éstas células se realiza en modelos experimentales. Pero, con el objetivo de utilizarlas en la inmunoterapia de cáncer y otras enfermedades infecciosas, grupos como los de Strunk y col³⁵ realizan estudios utilizando sangre periférica de adultos normales. Otros grupos piensan que es posible y más factible la utilización de las CL epidérmicas.

LAS CÉLULAS DE LANGERHANS EN VACUNAS

Nuestro grupo está interesado en el desarrollo de una vacuna efectiva contra la leishmaniasis. Desarrollando un plasmido que contenga parte de la secuencia del cDNA de *Leishmania* sp., el cual será introducido en las células de Langerhans epidérmicas y podrá funcionar como una vacuna contra la leishmaniasis. El posible éxito de éste modelo de vacunación es que podría utilizarse tanto en prevención como en tratamiento de pacientes y animales asintomáticos que pueden estar actuando como reservorio. Además la escogencia de secuencias claves del cDNA de *Leishmania* sp. puede superar el problema de las diferentes especies de *Leishmania*, y obtener de esta manera una vacuna universal.

La posible vacuna génica para Leishmaniasis es factible. Existen estudios que utilizando la vacunación génica demuestran protección en ratones contra *Mycoplasma pulmonis*³⁶ y una vigorosa respuesta de

anticuerpos en monos Rhesus después de desafiarlos con subunidades de HIV³⁷.

Los actuales estudios siembran la esperanza de que éste tipo de metodologías pueda dar nuevas herramientas para controlar la inmunidad, la tolerancia y los diferentes tipos de infección, como el HIV-1.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado con el apoyo del UNDP/World Bank/WHO Special Programa for Research and Training in Tropical Diseases y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

BIBLIOGRAFIA

1. Macatonia, S.E., Knight, S.C., Edwards, A.J. y cols. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J. Exp. Med.*, 1987;166:1654-1667.
2. Austin, J.M. En: Antigen-presenting cells. Austin, J.M. (ed). Oxford, IRL, 1989, pp1 7-27.
3. Girolomoni, G., Lutz, M., Pastore, S. Y col. Establishment of a cell line with features of early dendritic cell precursors from fetal mouse skin. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25:2163-2169.
4. Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991;9:271-296.
5. Bos, J.D., Kapsenberg, M.L. The skin immune system. *Immunol. Today* 1986, 7:235-241.
6. Szabolcs, P., Avigan, D., Gezelter, y col. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colonyforming unit intermediate. *Blood*, 1996;87:4520-4530.
7. Van Wilsem, E.J.G., Brevé, J., Kleijmeer, M., y col. Antigen-bearing Langerhans cells in skin drainin⁹ lymph nodes: Phenotype and kinetics of migration. *J. Invest. Dermatol.*, 1994;103:217-22C
8. Schuler, G. y Steinman, R.M. Murine epiderma Langerhans cell mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.*, 1985;161:526-546.
9. Witmer-Pack, M.D., Valinsky, J., Oliver, W., Steinman, R.M. Quantitation of surface antigen: on cultured murine epidermal langerhans cells rapid and selective increase in the level of surface MHC products. *J. Invest. Dermatol.*, 1988;90:387-394.
10. Romani, N., Lenz, A., Glassel, H. y col. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J. Invest. Dermatol.*, 1989; 93:600-609.
11. Girolomoni, G., Zambruno, G., Manfredini, R. y col. Expression of B7 costimulatory molecule in cultured human epidermal Langerhans cells regulated at the mRNA level. *J. Invest. Dermatol.*, 1994;103:54-59.
12. Lutz, M.B., Abmann, C.U., Girolomoni, G., Ricciardi-Castagnoli, R. Different cytokines regulate antigen uptake and presentation of a precursor dendritic cell line. *Eur. J. Immunol.*, 1996;26:586-594.
13. Kitajima, T., C Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F. J., Jester, J., Bergstresser, P.R., Takashima, A. T cell-mediated terminal maturation of dendritic cells. Loss of adhesive and phagocytic capacities. *J. Immunol.*, 157 (1996) 2340-2347
14. Xu, S., Ariizumi, K., Cáceres-Dittmar, G. y col. Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J. Immunol.*, 1995; 154:2697-2705.
15. HARRY, F.R.: "Sunscreen and Suntan and anti-sunburn preparation". En: Wilkinson, J.B. & Moore, R.J. (eds). *Harry's Cosmetico Logy*, New York, 223-245, 1982.
16. Kochevar, I.E., Pathak, M.A. Parrish, J.A.: "Photophysics, Photochemistry and Photobiology". En: Fitzpatrick, T.B.: Eisen, A.Z.: Wolff, K.: Freedberg, I.M.; Austen, K.F. (eds) *Dermatology in general medicine*. McGraw-Hill, Inc. 1627-1637, 1993.
17. Castro De Castro, A.: "Sol y Piel". En: Rondón Lugo, A. (ed.) *Dermatología*. Godoy, R. Caracas. 831-841. 1995.
18. Cruz, P.D. Jr.: "Ultraviolet B (UVB)-induced immunosuppression: biologic, cellular, and molecular effects". *Advanc. Dermatol.* 9:79-95, 1994.
19. Cáceres-Dittmar, G., Ariizami, K., Zu, S., Tapia, F. J., Bergstresser, P.G., Takashima, A. Hydrogen peroxide mediates UV-induced impairment of antigen presentation in a murine epidermal-derived dendritic cell line. *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 176-183.
20. Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F.J. *Fotoinmunología Básica. Medicina Cutánea Ibero Latinoamericana*. 1997. En prensa.
21. Richters, C.D., Hoesktra, M.J., van Baare, I. y col. Isolation and characterization of migratory human skin dendritic cells. *Cli. Exp. Immunol.*, 1994;98:330-336.
22. Langerhans, P. Uber die nerven der menschlichen haut. *Virchow's Arch. Pathol. Anat. U Physiol.* 1968; 44:325-257.
23. Campo-Aasen, I., Pearse, G.E. *Enzimología de la célula de Langerhans*. *Med. Cut.* 1966; 1:35-44
24. Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M., Oriol y cols. Epidermal compromise in American cutaneous leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.*, 1992;99:95S-98S.
25. Cáceres-Dittmar, G., Tapia, F. J., Sánchez, M.A., Yamamura, M., Uyemura, K., Modlin, R.L., Bloom B. R., Convit, J. "Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction". *Clin. Exp. Immunol.* 91 (1993) 500-505.
26. Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A., Fernández, A.E., Convit, J. The cutaneous lesion in American leishmaniasis: leukocyte subsets, cellular interaction and cytokine production. *Biol. Res.* 26 (1993) 239-247.
27. Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Today* 15 (1994) 160-165
28. Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G., Sánchez, M.A. Immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. En: *Molecular and Immune Mechanisms in the pathogenesis of Cutaneous leishmaniasis*. Tapia, F.J., Cáceres-Dittmar, G & Sánchez, M.A. (eds), R.G. Landes Co. Bioscience Publishers, 1996, Austin, Texas, USA. (1996) 139-147.
29. Haynes, J.R., McCabe, D.E., Swain, W.F. y col. Particle-mediated nucleic acid immunization. *I. Biotechnol.*, 1996; 44:1-37
30. Wolff, J.A., Malone, R., Williams, P. Y col. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990; 247:1465-1468
31. Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T, Granstein, R. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol. Today*, 1995; 16:117-121
32. Sun, W., Burkholder, J., Sun, J. y col. In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:2889-2893.
33. Celluzzi, C. Faló, L.D. Jr. Epidermal dendritic cells induce potent antigen-specific CTL-mediated immunity. *J. Inv. Dermatol.*, 1997; 108:716-720
34. Steinman, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp. Hematol.*, 1996; 24:859-862.
35. Strunk, D., Nemeth, P., Elbe, A. y col. Generation of Langerhans cells from CD34+ peripheral blood stem cells. *J. Invest. Dermatol.*, 1994; 102:525.
36. Lai, W.C., Bennett, M., Johnston, S.A. y col. Protection against Mycoplasma pulmonis infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol.*, 1995;14:643-651.
37. Fuller, D.H., Murphey-Corb, M., Clements, J. y col. Induction of immunodeficiency virus-specific immune response in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *J. Med. Primatol.*, 1996;25:236-241.