
Efecto de la *Leishmania mexicana*, RANTES y TNF alfa en el fenotipo y propiedades migratorias *in vitro* de células dendríticas esplénicas de ratones BALB/c neonatos y adultos.

Julie Verzura¹, Loida Ponce¹, Mónica Pernía², Francisco Mendoza¹, Robert Toxar¹, Sioly de Orta¹ y José Corado¹.

¹Unidad de Investigación en Inmunología (UNIVENIN), Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Bárbula, Venezuela.

²Hospital "Miguel Pérez Carreño", IVSS. Caracas, Venezuela

Palabras clave: célula dendrítica, respuesta inmunitaria, ratón neonato.

Resumen. Las células dendríticas (CDs) son esenciales en el desarrollo y regulación la respuesta inmunitaria (RI). Existen controversias en cuanto al potencial de inducción de la RI por las CDs en el período neonatal. Se ha propuesto que la RI específica de un neonato depende de la relación cuantitativa CD/linfocito T, y del momento, etapa neonatal o adulta, del encuentro con el antígeno, lo que parece influir sobre las propiedades fenotípicas y biológicas de las CDs, modificando su comportamiento. Por tal motivo, nos planteamos evaluar el efecto de un antígeno, *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) y de las citoquinas TNF α y RANTES sobre las características fenotípicas y propiedades migratorias, *in vitro*, de las CDs esplénicas provenientes de ratones BALB/c neonatos y adultos, usando citometría de flujo y la cámara de Boyden. Las CDs de ratones neonatos y adultos, en condiciones basales, expresan de manera similar, las moléculas CD40, CD86, CMHII y CD54. Este mismo fenómeno se observó al incubar dichas células con el Ag (*L. mexicana*) a excepción de la molécula CD40 cuya intensidad de expresión se elevó significativamente ($P < 0,05$) en ambos grupos de estudio. El índice de migración de las CDs en presencia de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana*, RANTES y TNF α fue mayor en adultos que en neonatos. Estos resultados muestran que las CDs neonatales son fenotípicamente similares a las adultas. Ante los mismos estímulos se comportan de manera diferente, sugiriendo la existencia de otros factores, que pudieran explicar la mayor susceptibilidad a infecciones en la etapa neonatal.

Dendritic cells of BALB/c mice: phenotypic characteristics and migratory properties.

Invest Clin 2012; 53(3): 237 - 249

Keywords: dendritic cell, immune response, newborn mouse.

Abstract. Dendritic cells (DCs) are essential in the development and regulation of the immune response (IR). The inherent potential of DCs to induce a specific immune response in the neonatal period is controversial. It has been suggested that the specific IR in neonates depends on the quantitative relation of DC/T lymphocytes, as well as on the neonatal or adult age at which the interaction antigen/DC/T lymphocytes occurs. This suggests that this contact has an influence on the phenotypic and/or biological properties of DCs, which modifies its behavior. Therefore, the effects of *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) and of TNF α and RANTES cytokines on immunophenotypical characteristics were evaluated on spleen DCs, from neonate and adult BALB/c mice, by using flow cytometry and *in vitro* migratory properties with a Boyden Chamber. In basal conditions, neonate and adult DCs express the same molecules (CD40, CD86, MHCII and CD54). When the DCs interact with the antigen *L. mexicana*, the expression of these molecules are similar in adults and in neonates, with the exception of CD40 whose intensity of expression was raised ($P < 0,05$) in both groups. The rate of migration of the DCs in a culture medium conditioned of *L. mexicana*, RANTES and TNF α was higher in adults than in newborn mice. These observations suggest that neonatal and adult mice DCs have similar phenotypic characteristics. Under the effect of the same stimulus they respond differently; suggesting that other factors are involved in the higher susceptibility that newborns have to infections.

Recibido: 23-01-2012. Aceptado: 21-06-2012

INTRODUCCIÓN

El período neonatal se caracteriza por una mayor susceptibilidad frente a agentes infecciosos. Ésta se ha asociado, parcialmente, a la ausencia de memoria inmunitaria y a un predominio de la respuesta efectora tipo Th2 (1-3). Otro factor importante puede ser el bajo número de células accesorias del sistema inmunitario (SI) presentes en los tejidos linfoides periféricos, en etapas tempranas de la vida, especialmente en ratones (1). Sin embargo, diferentes estudios, tanto en humanos como en ratones, han demostrado que los neonatos son com-

petentes y, bajo ciertas circunstancias *in vivo*, pueden desarrollar una respuesta inmunitaria (RI) específica, dependiente de linfocitos T, similar a la de un adulto (4-6) lo que ha permitido sugerir que la capacidad de respuesta de los neonatos puede ser más bien dependiente de la relación cuantitativa CDs/linfocito T, que de otros factores. Así mismo, se ha reportado que la RI específica, en dichos neonatos, puede variar desde una respuesta muy pobre hasta una muy eficiente (1, 3, 7). Las CDs son células accesorias del SI, presentadoras profesionales de antígenos (Ag), fundamentales en el desarrollo y regulación de la RI, y en el

mantenimiento de la tolerancia (8, 9). Estas células tienen propiedades de captura, procesamiento, migración y presentación del antígeno (Ag), y durante estas dos últimas propiedades experimenta un proceso de "maduración", mediante el cual modifica sus características fenotípicas (10-12). Existen controversias en cuanto al potencial intrínseco que tienen dichas células para inducir una RI específica en el período neonatal. Estudios efectuados por nuestro grupo de trabajo en ratones BALB/c, en un modelo de susceptibilidad a la infección por *Leishmania*, han demostrado, mediante la transferencia adoptiva de CDs, que, efectivamente, la RI específica de un neonato depende tanto de la relación cuantitativa CD/linfocito T como del momento, etapa neonatal o adulta, en que dichas células encuentran el antígeno. Esto sugiere que la cantidad de CDs transferidas y el momento del contacto tienen una influencia diferencial sobre las propiedades fenotípicas y biológicas de dichas células en ratones neonatos y adultos, modificando de manera fundamental su comportamiento (13).

Con base en esos resultados, y tomando en consideración la estrecha relación que existe entre fenotipo, propiedades biológicas y función, nos planteamos evaluar el efecto de un Ag, en este caso, *L. mexicana* y la influencia de citoquinas como TNF α y RANTES sobre las características inmunofenotípicas y propiedades migratorias, *in vitro*, de las CDs esplénicas de ratones BALB/c neonatos y adultos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Un grupo de 50 ratones BALB/c neonatos (circa 3 días) y 10 hembras adultas (6 semanas), facilitado por el Instituto de Biomedicina (Caracas, Venezuela), mantenido bajo condiciones apropiadas de iluminación, temperatura, agua y alimentación,

fueron manejados de acuerdo con las normas para el uso de animales en docencia e investigación del Fonacit (14).

Protocolo experimental

Cultivo de parásitos y obtención de medio de cultivo condicionado de promastigotas *L. mexicana*. Los amastigotas de *L. mexicana*, cepa MHOM/BZ/82/BEL21, obtenidos a partir de una lesión leishmánica, en hámster de un mes de evolución, fueron sembrados en cultivos de Ágar-sangre (Sigma, U.S.A.) a temperatura ambiente, y al séptimo día (fase estacionaria de crecimiento), se obtuvieron los promastigotas, representativos de la fase infectiva del parásito. Para este trabajo dichos promastigotas de *L. mexicana* fueron donados por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biomedicina. La población enriquecida de promastigotas, libre de eritrocitos y detritos celular, se obtuvo mediante el cultivo 200 μ L de la muestra en 5 mL de medio Schneider's *Drosophila* (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con 20% SFB (Sigma, St. Louis, MO), 2 mM L-glutamina, 100 U/mL de penicilina/streptomicina por una semana a temperatura ambiente (15). El medio de cultivo condicionado de *L. mexicana*, sobrenadante del cultivo, obtenido mediante centrifugación a 1000g, a temperatura ambiente, por 15 minutos fue usado en los ensayos de migración *in vitro*.

Aislamiento y purificación de las células dendríticas. Las CDs, de ratones neonatos y adultos BALB/c, fueron aisladas del bazo, tal como ha sido descrito (13, 16). Bajo condiciones estériles, los bazos fueron macerados sobre una malla metálica con RPMI-1640 (SIGMA. U.S.A.) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) descomplementado (INTERNEGOCIOS S.A. Argentina), 2 mM L-glutamina (U.S.A.), 10 mM HEPES (SIGMA.U.S.A.), 1 mM piruvato de sodio (SIGMA. U.S.A.), 50 μ M 2-mercaptoethanol (GIBCO SRL.U.S.A.) y 100 U/mL

de penicilina/streptomycin (SIGMA. U.S.A.) (RPMI completo). La suspensión celular obtenida fue filtrada en un tamiz de nylon, y centrifugada a 250 g, 4°C por 10 minutos. Se verificó la viabilidad celular con azul tripano (SIGMA.U.S.A.) para ajustar su concentración a 10^7 cells/mL en RPMI suplementado. Posteriormente, fueron colocadas en frascos de cultivo de 75 cm² (Corning, Acton, U.S.A.) para incubarlas durante 2 horas a 37°C y CO₂ al 5% (NAPCO, U.S.A.), con el propósito de permitir la adherencia de las CDs y macrófagos. Al finalizar la incubación, el sobrenadante, que contiene células no adherentes, fue retirado y a continuación se agregaron 10 mL de medio RPMI suplementado a los frascos de cultivo con las células adherentes, e incubadas por 16-18 horas, en las condiciones anteriormente descritas. Al finalizar la incubación, el sobrenadante se sometió a un gradiente de separación celular utilizando Nycomed (Pharma COMO, Tors-hov, Noruega), obteniéndose células mononucleares, las cuales fueron resuspendidas en 10 mL RPMI suplementado y centrifugadas a 400 g, 20°C por 15 minutos, tres veces. El precipitado celular obtenido del último lavado, fue resuspendido a 4°C en 1 mL de solución Hank's balanceado (SIGMA. U.S.A.), suplementado con 10% SFB descomplementado y 2 mM de HEPES. Se verificó la viabilidad celular con azul tripano y se ajustó la concentración celular a 10^5 células/mL. La población celular obtenida fue sometida a un proceso de selección negativa utilizando esferas inmunomagnéticas. Con este fin, esta población celular se incubó durante 1 hora a 4°C, bajo agitación lenta y continua, con una mezcla de anticuerpos monoclonales de rata (1.5 µg/mL de anticuerpo por 1×10^6 células) dirigidos contra antígenos de ratón expresados en linfocitos B (CD19, clon K-562, Santa Cruz Biotechnology U.S.A), linfocitos T (CD3, clon KT3, Serotec E.E.U.U), células NK

(CD2, clon AT-37, Serotec E.E.U.U), y monocitos/macrófagos (clon MOMA-2, Serotec E.E.U.U). Después de la incubación, las células fueron lavadas tres veces con medio Hank's balanceado a 250g, 4°C por 10 minutos. El precipitado celular fue resuspendido en 1 mL del mismo medio e incubado con las esferas magnéticas cubiertas con un anticuerpo secundario IgG de ovejo (Dyna-beads® M-450, Dynal Biotech Inc., U.S.A), en una relación esfera/célula 7:1, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se sometió luego a la población celular a la acción del campo magnético, usando un imán (Dynal MPC® Dynal Biotech Inc., U.S.A.) por 6 minutos. Las CDs, no unidas a las microesferas magnéticas, fueron retiradas del sobrenadante, muy cuidadosamente, con una pipeta Pasteur. Este procedimiento se realizó 3 veces. Posteriormente se contó el número de CDs obtenidas y se ajustó a una concentración de 10^5 células/mL. Las CDs fueron resuspendidas en PBS (1% SFB) para la verificación de la pureza y el estudio fenotípico y en RPMI al 1% de SFB para el ensayo de quimiotaxis.

Determinación de la pureza de las CDs por citometría de flujo. Se determinó la pureza de las CDs obtenidas mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo monoclonal primario CD11c (clon N418, Pierce U.S.A), el cual reconoce molécula de adhesión, específica de células dendríticas presentes en los órganos linfoides secundarios, y un anticuerpo secundario, hámster anti-rata IgG1 conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (clon MARG1-2, Serotec Ltd., Oxford, United Kingdom). Asimismo, se incubaron las CDs con anticuerpos monoclonales anti linfocitos T, B, NK y macrófagos con el fin de verificar el grado de contaminación. El control negativo consistió en un anticuerpo de especificidad irrelevante conjugado a FITC. El grado de pureza constatado en 3 experimentos fue $\geq 95\%$.

Fenotipaje de células dendríticas por citometría de flujo. La caracterización fenotípica de las CDs se efectuó con los siguientes anticuerpos de la casa comercial: Serotec, U.S.A.: CD86 conjugado a Ficoeritrina (PE) (B7-2, clon RMMP-2), Chemicon® U.S.A.: CD40 conjugado a PE (clon 1C10) y CD54 conjugado a FITC (ICAM-1, clon LTF653) y Southern Biotech, U.S.A.: MHC clase II conjugado a PE (clon NIMR-4).

La expresión de CD40, CD86, CMHII y CD54 sobre la superficie de las CDs de ratones neonatos y adultos BALB/c, se determinó mediante citometría de flujo antes y después de la incubación, *in vitro*, de las CDs con promastigotas de *L. mexicana* en una relación 1:10 (5×10^4 CDs: 5×10^5 promastigotas vivos), en placas de cultivo a 37°C y CO₂ al 5 % (NAPCO, U.S.A.), durante 12 horas. Luego de la incubación se realizaron 3 lavados de las células con PBS centrifugando a 250g, 25°C por 10 min, con la finalidad de eliminar los parásitos libres. Posteriormente, las CDs, a una concentración de 10^5 células/mL, fueron resuspendidas en PBS (1% SFB) e incubadas, con los anticuerpos anteriormente mencionados, en la oscuridad, a 4°C durante 30 min, seguido de tres lavados con PBS (1% SFB) centrifugado a 250g, 4°C por 10 min. El precipitado celular fue resuspendido en 500 μ L de PBS (1% SFB) y se determinó el porcentaje de CDs marcadas con CD40, CD86, CMHII y CD54 en el citómetro de flujo (FACSscalibur, BectonDickinson, U.S.A.). Se hicieron grupos controles negativos utilizando anticuerpos de especificidad irrelevante.

Migración *in vitro* de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. El ensayo de migración de las CDs fue realizado con dos concentraciones 1/2 y puro, las cuales fueron seleccionadas después de haber efectuado curva de diluciones (datos no mostrados) del medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* (Ag), RANTES (10 y 100

ng/mL) y TNF α (1 y 10 ng/mL), conformándose 6 grupos experimentales. Como control negativo de migración se utilizó RPMI con 1% de SFB. La migración celular fue evaluada utilizando una cámara de quimiotaxis (Microcámara de Boyden de 48 pozos; Neuroprobe U.S.A.), siguiendo las instrucciones establecidas en el manual (17-19). En los pozos del plato inferior de la cámara fueron colocados 30 μ L de Ag, TNF α o RANTES y de RPMI, y en los pozos superiores se colocaron 5×10^4 células en 50 μ L de RPMI al 1% de SFB. Ambos platos fueron separados por un filtro estándar de policarbonato, con poros de 5 μ m de diámetro (Neuroprobe) y se procedió a incubar la cámara durante 3 horas, a 37°C y CO₂ al 5%. Después de la incubación, el lado inferior del filtro (cara brillante) donde se encuentran las células que migraron, se lavó con PBS para remover el exceso de CDs. Posteriormente, el filtro fue fijado con metanol, deshidratado con concentraciones progresivas de etanol y teñido con violeta de genciana. Las CDs que migraron se contaron en un microscopio óptico (Leica CME, U.S.A.) a 400X en 10 campos, seleccionados al azar. El valor promedio de los 10 campos fue multiplicado por un factor que se obtuvo dividiendo el área total de cada pozo entre el área de un campo, dando como resultado el valor absoluto de células que migraron. Cada grupo experimental fue hecho por triplicado (3 pozos) y cada ensayo de quimiotaxis fue realizado 3 veces.

Análisis estadístico. Se calculó el promedio y desviación estándar (DE) de la intensidad de expresión y el porcentaje de expresión de las moléculas estudiadas en tres (n: 3) experimentos independientes. Se aplicó la *t de Student* para comparar los promedios de las intensidades, después de comprobar que los datos seguían una distribución normal con el test Kolmogorov Smirnov. Cualquier valor de P <0,05 fue considerado significativo. Se muestra, en

resultados, un histograma representativo de los tres experimentos efectuados. El índice de migración de cada grupo experimental se obtuvo dividiendo el promedio del número de células de cada grupo experimental entre el promedio del número de células de la migración basal, en cada grupo de ratones. El índice de migración fue representado como la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n: 3) y se aplicó la *t de Student* para comparar la media de dichos índices. Cualquier valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo. Todas las pruebas fueron realizadas usando STATISTICA Trial versión). 8 (Stat-Soft Inc., U.S.A.

RESULTADOS

Expresión de CD40, CD86, MHCII y CD54 en CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos

En la Fig. 1 se muestran histogramas en los que se observa la expresión, en condiciones basales, de CD40, CD86, MHCII y CD54 en las CDs de ratones neonatos y adultos BALB/c. El porcentaje de CDs que expresó CD40 (71% vs 49%), CD86 (52% vs 23%) y MHCII (98% vs 58%) fue mayor en ratones adultos que en neonatos; mientras que la expresión de CD54 (97% vs 94%) fue similar en ambos grupos. La intensidad de expresión basal de las moléculas CD40 (283 vs 192), CD86 (122 vs 48) y CD54 (763 vs 615) fue mayor en ratones neonatos que en adultos, mientras que la intensidad de expresión de MHCII (3.326 vs 2.138) fue mayor en adultos. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla I).

Efecto de *L. mexicana* sobre la expresión de CD40, CD86, MHCII y CD54 en CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos

En la Fig. 2 se muestran histogramas representativos de la expresión, de CD40, CD86, MHCII y CD54 en las CDs de ratones

neonatos y adultos BALB/c antes y después de la incubación, *in vitro*, con *L. mexicana*. En las CDs de ratones neonatos el porcentaje que expresó CD40 (49 vs 57%) y CD86 (23 vs 31%) se elevó mientras que la expresión de CD54 (94 vs 95%) y MHCII (58 vs 59%) no se modificó. Se observa que a pesar de que existe una elevación de la intensidad de expresión de CD40 (283 vs 505), CD86 (122 vs 131), MHCII (2138 vs 3874) y CD54 (763 vs 974) después de la incubación con el Ag, solo la expresión de CD40 fue estadísticamente significativa ($P < 0,05$). En las CDs de ratones adultos el porcentaje que expresó CD40 (71% vs 71%), MHCII (98% vs 97%) y CD54 (97% vs 98%) no se modificó mientras que la de CD86 se elevó (52% vs 71%). Se muestra que a pesar de que existe una elevación de la intensidad de expresión de todas las moléculas en estudio CD40 (192 vs 572), CD86 (48 vs 495), MHCII (3326 vs 3950) y CD54 (615 vs 1152), solo la expresión de CD40 mostró un incremento estadísticamente significativo ($P < 0,05$) después de la incubación con el Ag (Tabla I). Al comparar adultos con neonatos después de la incubación con el Ag. Se muestra que a pesar de que la intensidad y el porcentaje de expresión de todas las moléculas estudiadas fueron mayores en adultos, no hubo diferencias significativas desde el punto de vista estadístico (Tabla I).

Efecto del medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* sobre la migración de las CDs en ratones BALB/c neonatos y adultos

En la Fig. 3 se muestra la migración basal de las CDs de ratones neonatos y adultos. Se observa que la misma fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en ratones neonatos (887 ± 36 células/pozo), que en ratones adultos (106 ± 39 células/pozo).

La Fig. 4 muestra el efecto de *L. mexicana* sobre la migración de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Se observa

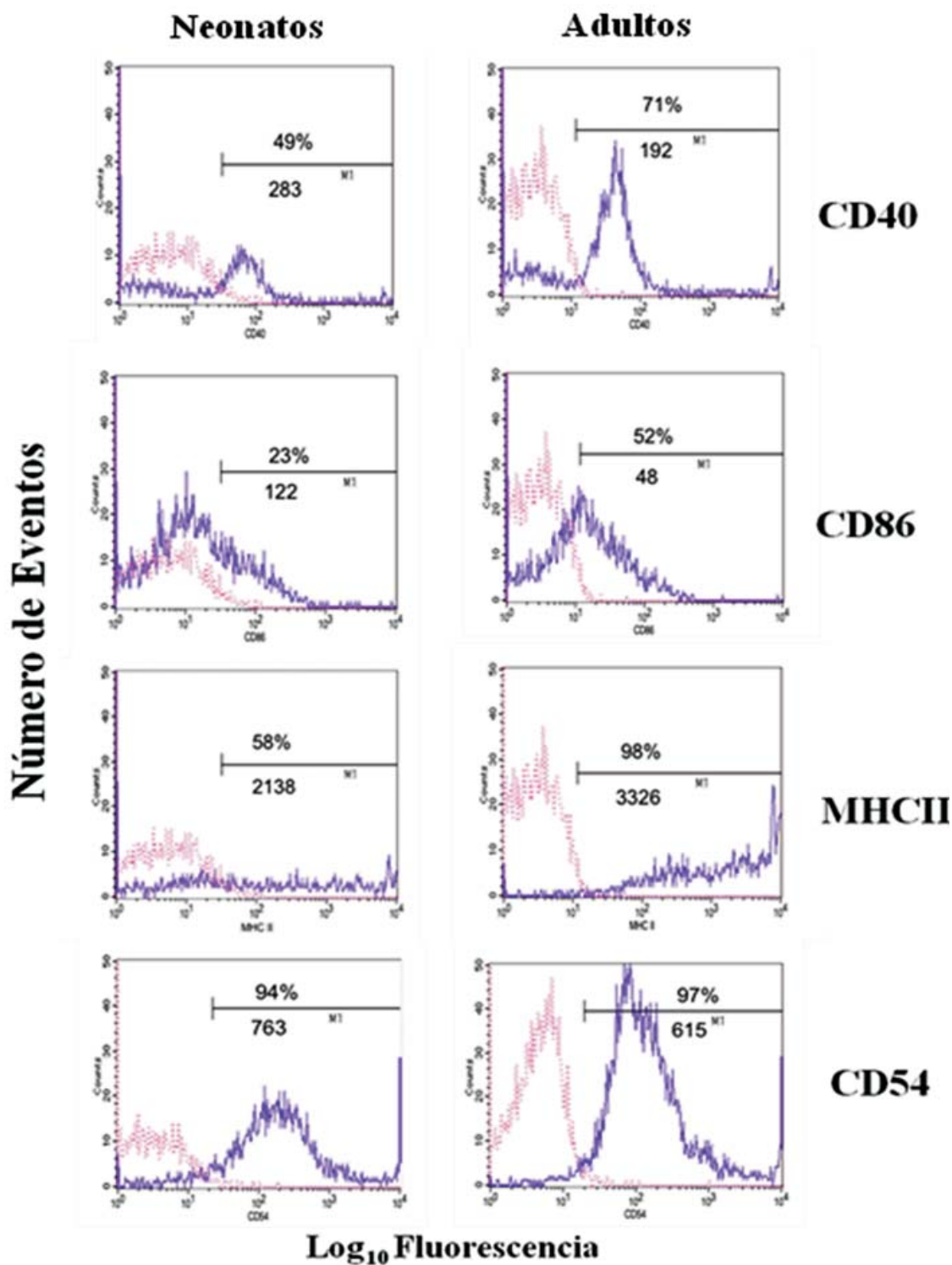


Fig. 1. Inmunofenotipo de CDs en ratones BALB/c neonatos y adultos. Los histogramas muestran el porcentaje de CDs que expresa CD40, CD86, MHCII y CD54 (histograma oscuro) y la autofluorescencia (histograma claro). En cada cuadrante se observa el porcentaje y la intensidad de fluorescencia basal de cada molécula.

TABLA I
EFECTO DE *L. mexicana* SOBRE LA EXPRESIÓN DE CD40, CD86, MHCII Y CD54 EN CDs DE RATONES BALB/C NEONATOS Y ADULTOS

	Basal		Incubación con <i>L. mexicana</i>		
	$\bar{x} \pm DE$	%	$\bar{x} \pm DE$	%	
Adultos	CD40	*206,66 \pm 27,15	68,33	543,33 \pm 47,93	68,33
	CD86	53 \pm 9,5	54,66	361,33 \pm 230,65	69,66
	MHCII	2986,66 \pm 585,14	98	3493 \pm 788,95	95,33
	CD54	530,33 \pm 142,33	96,33	918,33 \pm 402,99	98
Neonatos	CD40	*243 \pm 66,70	51	474 \pm 51,11	54,33
	CD86	101 \pm 34,65	31,33	117 \pm 23,38	35,66
	MHCII	2082,66 \pm 93,25	69,66	3429,66 \pm 767,87	70
	CD54	619,33 \pm 246,24	94	754,33 \pm 377,87	96

Los resultados son expresados como la Intensidad \pm la desviación estándar y porcentaje de expresión de CD40, CD86, MHCII y CD54 de tres experimentos (n: 3) independientes. *(P<0,05 intensidad de expresión basal CD40 adultos vs intensidad de expresión después de la incubación con el Ag. adultos). *(P<0,05 intensidad de expresión basal CD40 neonatos vs intensidad de expresión después de la incubación con el Ag. neonatos).

que, en ratones adultos, el índice de migración en presencia de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* puro, fue significativamente mayor (P<0,05) que el observado en presencia de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* 1/2 (7,4 vs 1,7). En ratones neonatos el índice de migración de CDs fue similar (P>0,05) en presencia de ambas concentraciones de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* (2,1 vs 1,3). Al comparar el índice de migración de ratones adultos versus neonatos se observa que, el mismo, fue significativamente mayor (P<0,05) en ratones adultos que en neonatos en presencia de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* puro (7,1 vs 2,1), mientras que en presencia de medio de cultivo condicionado de *L. mexicana* 1/2 el índice de migración en ambos ratones fue similar (P>0,05).

Efecto de RANTES sobre la migración de las CDs en ratones BALB/c neonatos y adultos

En la Fig. 5 se evidencia el efecto de RANTES sobre la migración de las CDs de

ratones BALB/c neonatos y adultos. Se observa que, en ratones adultos, el efecto de RANTES no depende de las concentraciones utilizadas (P>0,05), siendo de 3,3 en presencia de 100 ng/mL y de 4,8 en presencia de 10 ng/mL. El índice de migración de las CDs de ratones neonatos fue significativamente mayor (P<0,05) en presencia de RANTES 100 ng/mL que en presencia de 10 ng/mL (1,8 vs 1,3). Al comparar ambos grupos se observa que en presencia de las dos concentraciones de RANTES utilizadas, el índice de migración fue significativamente mayor (P<0,05) en adultos que en neonatos.

Efecto de TNF α sobre la migración de las CDs en ratones BALB/c neonatos y adultos

La Fig. 6 muestra el efecto de TNF α sobre la migración de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Se evidencia que, en ratones adultos, el efecto de TNF α depende de las concentraciones utilizadas (P<0,05), siendo significativamente mayor en presencia de 10 ng/mL que en presencia

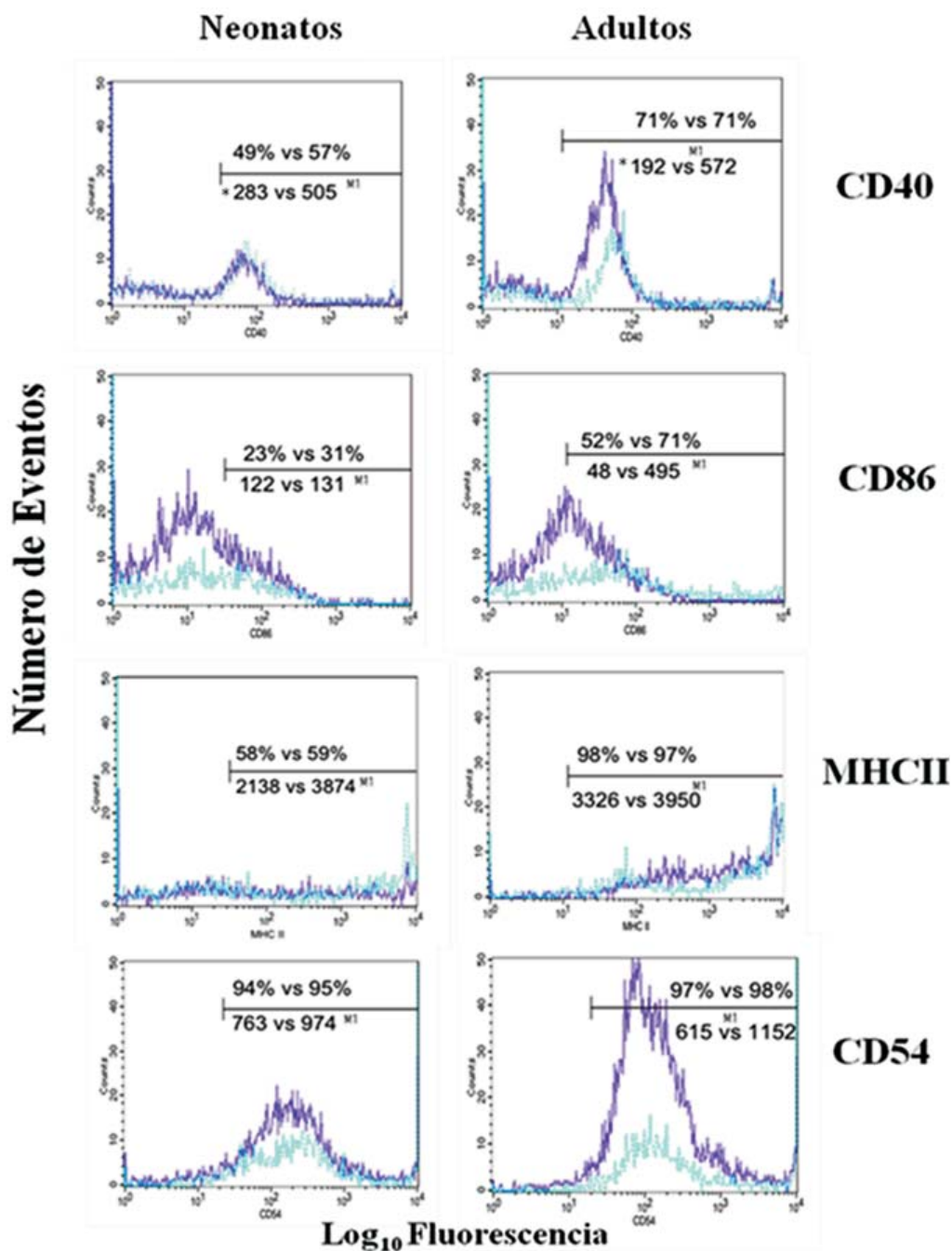


Fig. 2. Efecto de *L. mexicana* sobre la expresión de moléculas CD40, CD86, MHCII y CD54 en las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Los histogramas muestran el porcentaje y la intensidad de expresión de cada molécula antes (histograma oscuro) y después (histograma claro) de la incubación con *L. mexicana*. En cada cuadrante se observa el porcentaje y la intensidad de fluorescencia de cada molécula antes y después de la incubación con *L. mexicana*. Se aplicó *t* de Student, *($P < 0,05$ intensidad de expresión basal CD40 neonatos vs intensidad de expresión después de la incubación con *L. mexicana* neonatos) *($P < 0,05$ intensidad de expresión basal CD40 adultos vs intensidad de expresión después de la incubación con *L. mexicana* adultos).

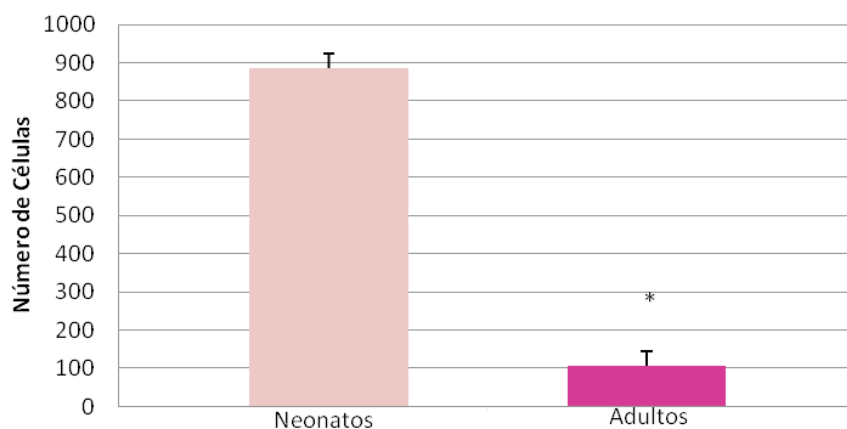


Fig. 3. Migración basal de las CDs en ratones BALB/c neonatos y adultos en presencia de RPMI 1% SFB. Valores expresados como la media \pm la desviación estándar de tres experimentos (n:3) independientes *($P < 0,05$ neonatos vs adultos).

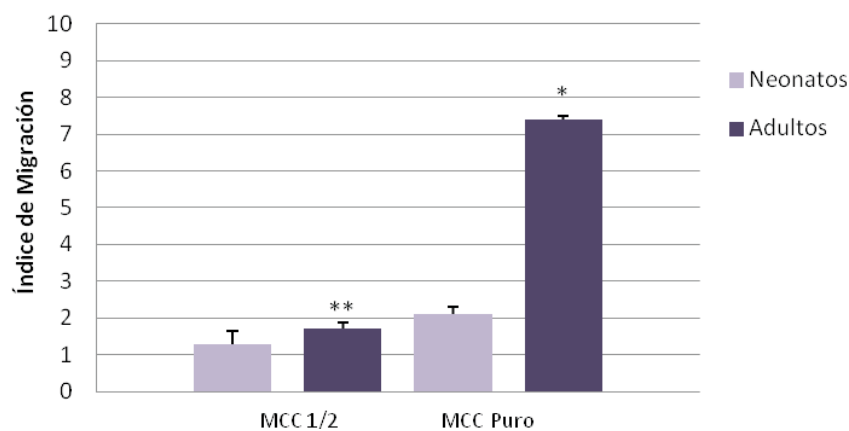


Fig. 4. Efecto de medio de cultivo condicionado de parásitos (MCC) de *L. mexicana*, sobre la migración de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Valores expresados como la media del índice de migración \pm la desviación estándar de tres experimentos (n:3) independientes

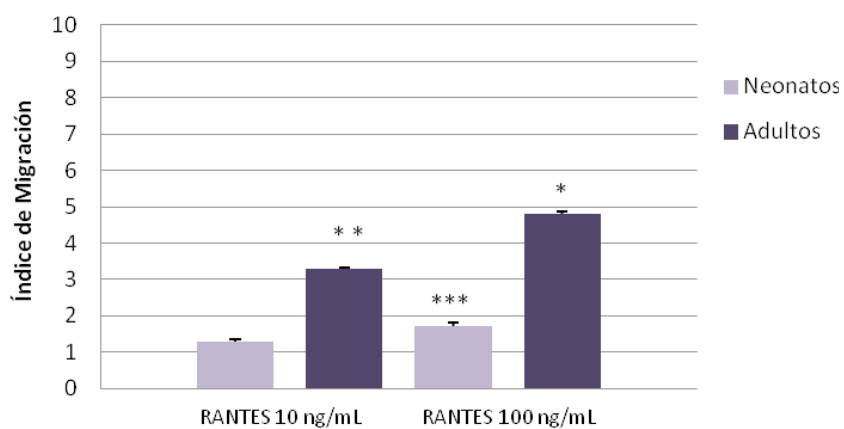


Fig. 5. Efecto de RANTES sobre la migración de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Valores expresados como la media del índice de migración \pm la desviación estándar de tres experimentos (n:3) independientes *($P < 0,05$ adultos vs neonatos 100 ng/mL), **($P < 0,05$ adultos vs neonatos 10 ng/mL), ***($P < 0,05$ neonatos 100 ng/mL vs neonatos 10 ng/mL).

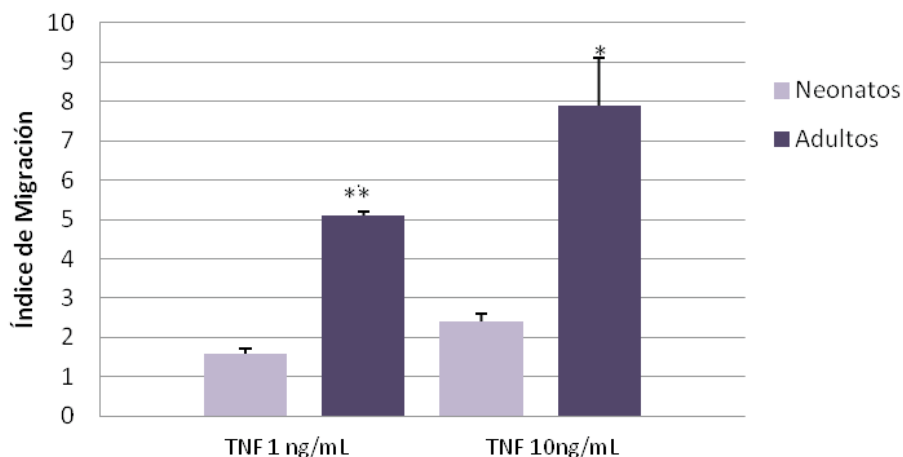


Fig. 6. Efecto de $\text{TNF}\alpha$ sobre la migración de las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos. Valores expresados como la media del índice de migración \pm la desviación estándar de tres experimentos (n:3) independientes * ($P < 0,05$ adultos vs neonatos 10 ng/mL). ** ($P < 0,05$ adultos vs neonatos 1 ng/mL).

de 1 ng/mL (7,9 vs 5,1) El índice de migración de las CDs de ratones neonatos fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en presencia de $\text{TNF}\alpha$ 10 ng/mL que en presencia de 1 ng/mL (2,4 vs 1,6). Al comparar ambos grupos se observa que en presencia de las dos concentraciones de $\text{TNF}\alpha$ utilizadas, el índice de migración fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en adultos que en neonatos.

DISCUSIÓN

Las CDs juegan un papel crucial en el inicio y regulación de la RI específica (20) y son capaces de inducir inmunidad o tolerancia (8). Para ello, poseen propiedades de captura, procesamiento, migración y presentación del Ag (8). Cuando las CDs son estimuladas por Ags. u otras moléculas maduran y modifican sus características fenotípicas (11). A pesar de la intensa investigación sobre las CDs se debate acerca de su potencial intrínseco para inducir una RI específica en el período neonatal. Así, por ejemplo, diferentes grupos de trabajo reportan que las células del SI de ratones neonatos son cualitativamente diferentes a las células de los adultos (1, 7) mientras que,

otros grupos, muestran que los ratones neonatos son capaces de desarrollar una RI específica similar a la de los adultos (46, 21, 22), sugiriendo que la RI de los neonatos depende más de la relación cuantitativa CD/linfocito T que de su propia capacidad funcional.

Asimismo, nuestro grupo de trabajo, en el modelo de susceptibilidad frente a la infección por *Leishmania*, usando ratones BALB/c, mostró, mediante la transferencia adoptiva de CDs, que la RI específica de un neonato, depende no sólo de la relación cuantitativa CD/linfocito T, sino también del momento, etapa neonatal o adulta, en que las CDs interactúan con el Ag, planteándose la hipótesis que este contacto tiene una influencia diferencial sobre las propiedades fenotípicas y biológicas de las CDs de neonatos y adultos, modificando de manera fundamental el comportamiento de dichas células (13).

Por tal motivo, decidimos evaluar el efecto del Ag, *L. mexicana*, y la influencia de las citoquinas $\text{TNF}\alpha$ y RANTES sobre las características inmunofenotípicas y propiedades migratorias, *in vitro*, de las CDs esplénicas de ratones BALB/c neonatos y adultos.

En este estudio se demuestra que tanto las CDs de ratones neonatos como las de los adultos, en condiciones basales, expresan de manera similar, las moléculas CD40, CD86, CMHII y CD54. Este mismo fenómeno se observó al incubar dichas células con el Ag (*L. mexicana*) a excepción de la molécula CD40 cuya intensidad de expresión se elevó significativamente ($P < 0,05$) en ambos grupos de estudio. Ambos resultados demuestran que las CDs de neonatos son fenotípicamente similares, al menos en lo que respecta a las moléculas estudiadas, a las CDs de los adultos (4-5-6-21-22). Estos resultados sugieren, contrariamente a la hipótesis previamente planteada, que el contacto con el Ag tiene un impacto similar sobre las CDs adultas y neonatales.

Existe poca información en la literatura sobre el estudio de las propiedades biológicas, *in vitro* e *in vivo*, de las CDs neonatales. Los grupos de Dadaglio (21) y Cheng-Ming Sun (22) mostraron, al igual que en este trabajo, que la expresión basal de las moléculas CD40, CD86 y CMHII, es similar en las CDs de ratones BALB/c neonatos y adultos, y que en presencia de estímulos, no antigénicos, como Lipopolisacárido (LPS) y oligonucleótido citosina fosfato guanina (CpG) no se modifican, sugiriendo que el microambiente neonatal no afecta la activación/ maduración de las CDs neonatales. Cabe destacar que los diseños experimentales, en ambos casos, son diferentes al de este trabajo, puesto que no usaron estímulos antigénicos y la edad de los ratones neonatos fue de 7 días. En ratones, se infiere que el impacto de la edad, en días, sobre el establecimiento de la madurez biológica e inmunitaria es significativo, sin embargo a pesar de esta diferencia en los diseños experimentales nuestros se confirman esos reportes previos.

En cuanto a la propiedad biológica de migración, en presencia de medio de cultivo condicionado de promastigotas de *L. me-*

xicana, ambos grupos de CDs migran, aunque el índice de migración es significativamente ($P < 0,05$) mayor en ratones adultos que en neonatos. La puesta en evidencia de esta propiedad biológica, en ausencia del parásito, sugiere que los promastigotas, en este cultivo, secretan moléculas con actividad quimiotáctica. Sería interesante determinar cuáles son las moléculas que se encuentran en este medio de cultivo, tal como lo señalan Ilg y Dieter (23, 24). Un hallazgo paradójico es que la migración de las CDs, en condiciones basales, es significativamente mayor que la de los adultos, sin que haya explicación plausible de dicha observación, máxime cuando se constata que, en presencia de diferentes concentraciones de TNF α (1 ng/mL vs 10 ng/mL), citoquina inductora de la maduración de estas células y potenciadora de la acción de otras quimiocinas, y RANTES (10 ng/mL vs 100 ng/mL), molécula quimiotáctica fundamental en la migración de las mismas, las CDs de los ratones adultos mostraron una movilización significativamente mayor que la observada en los ratones neonatos.

Este trabajo muestra que las CDs neonatales son fenotípicamente similares a las CDs de adultos pero se comportan de manera diferente en cuanto a su propiedad migratoria en las que los estímulos antigénicos o quimiotácticos, permiten una mayor movilización de las CDs de ratones adultos sugiriendo la existencia de otros factores, sea la expresión de otras moléculas o elementos del microambiente de citoquinas e interacción celular local que pudieran explicar la falta de eficiencia de la RI específica en las etapas más tempranas de la vida y la mayor susceptibilidad a las infecciones.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) N° S1-2001001045.

REFERENCIAS

1. **Adkins B, Leclere C, Marshall-Clarke S.** Neonatal adaptive immunity comes of age. *Nature Rev Immunol.* 2004; 4:553-564.
2. **Rose S, Lichtenheld M, Foote MR, Adkins B.** Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. *J Immunol.* 2007.1; 178(5): 2667-2678.
3. **Zaghouani H, Hoeman C, Adkins B.** Neonatal immunity: faulty T-helpers and the shortcomings of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2009; 30(12): 585-591.
4. **Ridge J, Fuchs E, Matzinger P.** Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. *Science.* 1996; 271: 1723-1726.
5. **Sarzotti M, Robbins D, Hoffman P.** Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus. *Science.* 1996; 271: 1726-1728.
6. **Forsthuber T, Yip H, Lehman P.** Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice. *Science.* 1996; 271: 1728-1738.
7. **Dakic A, Qi-xiang Shao, D'Amico A, O'Keefe M, Wei-fen Ch, Shortman K, Li W.** Development of dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol.* 2004; 172: 1018-1027.
8. **Quah B, O'Neil H.** Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med.* 2005; 9(3): 643-654.
9. **Morel P, Turner M.** Dendritic cells and the maintenance of self-tolerance. *Immunol Res* 2011; 50:124-129.
10. **Naik SH.** Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 2008; 86:439-452.
11. **Caetano Reis e Sousa.** Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev.* 2006; 6:476-483.
12. **Villadangos J, Schnorrer P.** Intrinsic and cooperative antigenpresenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat Rev* 2007; 7:543-555.
13. **Ponce L, Corado J, Díaz L, Tapia F.** Adoptive transfer of dendritic cells modulates immunogenesis and tolerogenesis in a neonatal model of murine cutaneous leishmaniasis. *Kinetoplastid Biol and Dis* 2005; 4:21-29.
14. **Código de bioética y de bioseguridad del Ministerio de Ciencias y Tecnología.** Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología parte II: Normas de bioética y de bioseguridad para la investigación con organismos vivos, ambiente y bioterios. 2002. 2^{da} Edición. Caracas.
15. **Xin L, Li Y, Soong L.** Role of Interleukin-1 β in activating the CD11c CD45RB dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4 T cells *in vitro* and *in vivo*. *Infect Imm.* 2007; 5018-5026.
16. **Schuler G, Lutz M, Bender A, Thurner B, Röder C, Young JW, Romani N.** A guide to the isolation and propagation of dendritic cells. In *Dendritic Cells. Biology and Clinical Applications.* Lotze M, Thomson AW (Eds.): Acad. Press. 1999:515-553.
17. **Protocol for using neuro probe reusable multiwall chemotaxis chambers.** Industrial drive Gaithersburg. MD 200877 USA.
18. **Chen HC.** Boyden chamber assay. *Met Mol Biol.* 2005; 294:15-22.
19. **Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ.** Dendritic cell migration in different micropore filter assays. *Immunol Lett* 2000; 71(1):5-11.
20. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
21. **Dadaglio G, Cheng-Ming Sun, Lo-Man R, Siegrist A, Leclere C.** Efficient *in vivo* priming of specific cytotoxic T cells responses by neonatal dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168: 2219-2224.
22. **Cheng-Ming Sun, Fiette L, Tanguy M, Leclere C, Lo-Man R.** Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood.* 2003; 102(2): 585-591.
23. **Ilg T, Dieter Y, Etges R, Marc A, Harbecke D, Overath P.** Secreted acid phosphatase of *Leishmania mexicana*: A filamentous phosphoglycoprotein polymer. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 8774-8778.
24. **Dieter Y, Ilg T, Russell D, Hohenberg H, Overath P.** Characterization of polymer release from the flagellar pocket of *Leishmania mexicana* promastigotes. *J Cell Biol* 1994; 125 (2): 321-331.