



Revisión

Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones

M. Begoña Vázquez*, Manuel Sureda y Joseba Rebollo

Plataforma de Oncología, USP Hospital San Jaime, Torrevieja, Alicante, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 9 de mayo de 2011

Aceptado el 24 de octubre de 2011

On-line el 29 de diciembre de 2011

Palabras clave:

Inmunoterapia

Células dendríticas

Terapia celular

Keywords:

Immunotherapy

Dendritic cells

Cell therapy

R E S U M E N

Las células dendríticas (CD) juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune. Son las principales células presentadoras antigénicas, por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a linfocitos T, y generar respuestas inmunes específicas. Posteriormente al descubrimiento de esta función y al aparecer técnicas metodológicas que permitían su purificación y maduración *in vitro*, se ha comprobado que también son capaces de activar otros tipos celulares, como linfocitos B, células NK, macrófagos o eosinófilos, e incluso generar tolerancia inmunológica. Este mejor conocimiento de su biología y funciones ha permitido el desarrollo de ensayos clínicos basados en el uso de CD en el campo de la inmunoterapia antitumoral y antiinfecciosa o para inducir tolerancia postrasplante o en patologías autoinmunes.

© 2011 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Dendritic cells I: Basic biology and functions

A B S T R A C T

Dendritic cells (DC) play a critical role in the regulation of the immune response. They are the main antigen presenting cells, due to their ability to capture, process and present antigens to T lymphocytes in an optimal way, and to generate specific immune responses. Subsequently, when methodological techniques allowed their *in vitro* purification and maturation, it was verified that they were able to activate several other immune cell subsets, like B lymphocytes, NK cells, macrophages or eosinophils, and even to induce immune tolerance. A deeper knowledge of their biology and functions has allowed the development of clinical trials in anti-tumour and anti-infective DC-based therapies, and also to induce post-transplant tolerance and to treat autoimmunity.

© 2011 Sociedad Española de Inmunología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: begona.vazquez@usphospitales.com (M.B. Vázquez).

0213-9626/\$ – see front matter © 2011 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

doi:10.1016/j.inmuno.2011.10.001

Introducción

El hallazgo del papel central de las células dendríticas en la respuesta inmune parte de observaciones de Cohn et al. y Steinman et al.^{1,2}. Estos autores, mediante variadas técnicas de separación celular, eran capaces de enriquecer una población de células procedentes de tejidos linfoides que parecían mucho más eficaces que los macrófagos promoviendo la proliferación de linfocitos T aloreactivos³. Hasta ese momento, se pensaba que los macrófagos eran las más potentes células presentadoras antigénicas profesionales.

Los conocimientos biológicos sobre este nuevo tipo celular avanzaron lentamente en la década de los 80, debido a la complejidad metodológica derivada de la purificación de una población minoritaria de los tejidos linfoides. Este panorama cambió radicalmente en los 90, ya que una serie de descubrimientos metodológicos permitieron la diferenciación *in vitro* de células que compartían marcadores celulares y características funcionales con las descritas CD⁴⁻⁷. En el año 2000 se caracterizaron una serie de antígenos específicos de las CD sanguíneas, los Blood Dendritic Cell Antigens (BCDA)⁸. Desde que estas técnicas de identificación y diferenciación *in vitro* fueron disponibles, se avanzó rápidamente en el conocimiento de las CD.

En las dos últimas décadas se han hecho espectaculares progresos en el entendimiento del papel que ejercen las CD en el sistema inmune, derivados de los múltiples y variados estudios en diferentes aspectos del ciclo celular de las mismas. Entre ellos se incluyen los mecanismos de captura, procesamiento y presentación de antígenos derivados de patógenos, células apoptóticas o tumorales, la sinapsis inmune entre las CD y los linfocitos T, el descubrimiento de receptores lectina tipo C en la captura antigénica, el control de la activación de las CD a través de receptores Toll-like (TLR), la importancia de las CD plasmacitoides en la respuesta antiviral, el papel de la CD en la polarización de la respuesta de linfocitos T *helper*, la regulación de las respuestas de linfocitos B y células *natural killer* (NK), el análisis *in vivo* del tráfico de las CD y las interacciones inmunes, el control de inmunidad versus tolerancia por las CD, el papel de las CD en las infecciones microbianas, patologías autoinmunes, reacciones alérgicas, rechazo de trasplantes, y respuestas inmunes antitumorales, y las vías de diferenciación de las CD.

Estos avances en la inmunobiología de las CD, junto con las técnicas de transfección y diferenciación *in vitro*, han permitido el desarrollo de prometedoras terapias en el campo de la inmunoterapia antitumoral y antiinfecciosa, así como para promover tolerancia postrasplante o en enfermedades autoinmunes.

Características de las CD

Las CD maduras (CDm) presentan una morfología propia, caracterizada por la presencia de numerosos procesos membranosos que pueden tomar la forma de dendritas, pseudópodos o velos. Contienen altas concentraciones de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento antigénico, como endosomas, lisosomas o los gránulos de Birbeck de las células de Langerhans de la epidermis. Están

presentes en tejidos y órganos linfoides y no linfoides, así como circulantes en linfa aferente y sangre periférica. Reciben diferentes nombres según la ubicación, pero guardan características y funciones similares entre sí.

Fuera de tejidos linfoides, son abundantes en piel, faringe, esófago alto, vagina, ectocérvix y ano, y en las superficies mucosas de los sistemas respiratorio y gastrointestinal⁹. Extienden sus procesos membranosos entre las estrechas uniones de las células epiteliales sin alterar la función de la barrera epitelial¹⁰. Esto aumenta la captura de antígenos del entorno incluso si no hay infección o inflamación, conduciendo al silenciamiento del sistema inmune ante los antígenos ambientales inocuos.

Aparecen en las regiones T dependientes de los ganglios linfáticos y bazo, donde se las conoce como células interdigitantes. En el bazo son más numerosas, ya que hay nidos de ellas en la periferia del área de linfocitos T, donde están posicionadas como puentes a través de los cuales deben pasar los linfocitos para entrar en el torrente sanguíneo. Las células dendríticas foliculares se encuentran en los centros germinales de los folículos secundarios de las áreas de linfocitos B de ganglios linfáticos y bazo, siendo parte integral del microambiente del folículo. También están presentes en el timo, sobre todo en la región medular. En linfa aferente se las conoce como células veladas, representando células de Langerhans migrantes en tránsito desde la piel al ganglio linfático donde se transformarán en células interdigitantes. En sangre periférica constituyen menos del 2% de las células mononucleares.

También se encuentran en corazón, hígado, parénquima pulmonar y lámina propia del intestino. En el cerebro no se han descrito; sin embargo, las células de la microglía se asemejan a CD por la forma y por sus marcadores de membrana.

Un obstáculo para la detección y estudio de las CD hasta el descubrimiento de los BCDA ha sido la ausencia de un marcador en la superficie celular específico de esta estirpe celular. Se caracterizan por la elevada expresión de antígenos MHC clase II y la ausencia de marcadores de linaje como CD14 (monocitos), CD3 (linfocitos T), CD19, CD20 y CD24 (linfocitos B), CD56 (células NK) y CD56b (granulocitos)¹¹. Presentan moléculas de adhesión comunes con monocitos y macrófagos (CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58, CD102)¹² y moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86)^{13,14}. Su fenotipo varía a lo largo de los diferentes estados de maduración y activación. Los precursores circulantes en la sangre pueden expresar CD2, CD4, CD13, CD16, CD32 y CD33, que van perdiendo gradualmente con la maduración¹⁵. Por el contrario, las moléculas coestimuladoras, de adhesión y los antígenos del MHC aumentan a lo largo de la maduración. Otras moléculas, como CD80 y CD86, incrementan su expresión con la activación, principalmente tras la unión de CD40 a su ligando. CD86 es un marcador temprano de maduración, mientras que CD80 aparece más tardíamente y está ausente en los precursores circulantes¹⁶.

Subclases de CD

Con la excepción de las CD ganglionares foliculares, que son de origen mesenquimal¹⁷, las CD se originan a partir de progenitores hematopoyéticos medulares CD34+ por la influencia del ligando de FLT-3 (sFlt-3L) y GM-CSF¹⁸. Estos precursores

CD34⁺ se diferencian en células progenitoras comunes mieloides (CMP) y células progenitoras comunes linfoides (CLP).

En sangre periférica circulan dos tipos de CD fenotípica y funcionalmente diferentes. Se distinguen por su expresión de CD11c y CD123^{19,8,20}. Las CD CD11c⁺CD123^{lo} tienen una morfología monocitoide, por lo que se denominan CD monocitoides o mieloides (MDC), mientras que las CD CD11c⁻CD123^{hi} presentan características morfológicas similares a las células plasmáticas, por lo que se han denominado CD plasmacitoides (PDC). Se diferencian a partir de CMP y CLP, respectivamente. En humanos, las MDC pueden derivar de precursores ya comprometidos hacia CD o bien de precursores del linaje de granulocitos y monocitos. También pueden originarse a partir de diversos tipos celulares previamente a su diferenciación definitiva; precursores de monocitos y granulocitos pueden diferenciarse hacia CD cuando se exponen *in vitro* a combinaciones apropiadas de citoquinas, que incluyan GM-CSF y TNF α en presencia o ausencia de IL-4^{21,22}. PDC y MDC difieren en numerosos aspectos, incluyendo su distribución tisular, su producción de citoquinas y los factores de crecimiento necesarios para su diferenciación.

Las MDC se pueden dividir en dos subpoblaciones según su expresión de BDCA1 (CD1c) y CD141: MDC1 (células Lin⁻CD4⁺HLA DR⁺CD11c⁺CD1c⁺CD141⁻) y MDC2 (células Lin⁻CD4⁺HLA DR⁺CD11c⁺CD1c⁻CD141⁺)⁸. También se clasifican según su localización: residentes en tejidos periféricos, residentes en órganos linfoides secundarios y MDC circulantes. Estas últimas en humanos sanos suponen un total de $14,2 \pm 3,9$ células/ μ l²⁰. Las mejor estudiadas son las MDC de la piel, localización en la que al menos se pueden diferenciar tres tipos de MDC: las células de Langerhans (CLs), que residen en la epidermis, y DC CD1a⁺ y DC CD14⁺, que aparecen en la dermis. Las DC CD14⁺ expresan un gran número de lectinas tipo C, como DC-SIGN, DEC-205, LOX-1, CLEC-6, Dectin-1 y DCIR. En contraste, las CL expresan las lectinas langerina y DCIR. Estos dos subtipos celulares también difieren en el panel de receptores TLR que presentan: las MDC CD14⁺ dérmicas presentan TLR2, 4, 5, 6, 8 y 10, mientras que las CL expresan TLR1, 2, 3, 6 y 10²³⁻²⁵. Otra discrepancia entre estos dos subtipos celulares es el tipo de citoquinas que secretan. Mientras que las DCs CD14⁺ producen una gran variedad de factores solubles, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, GM-CSF, MCP y TGF β , las CL secretan una pequeña cantidad de citoquinas, entre las que destaca la IL-15²⁶. Esta producción de citoquinas diferencial explica las diferentes funciones biológicas de los distintos subtipos de MDC. Las MDC CD14⁺ dérmicas inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ naive hacia un subset de linfocitos T CD4⁺ especializados en la cooperación con los linfocitos B, activando su producción de grandes cantidades de IgM y el cambio isotópico hacia IgG e IgA. De estas funciones es responsable la IL-21 producida por los linfocitos T CD4⁺, inducida a su vez por la IL-12 secretada por las MDCs CD14⁺ dérmicas²⁷. Por el contrario, las LC son eficientes inductoras de respuesta de linfocitos T CD8⁺, parece ser que por la acción de IL-15²⁸.

Las PDC son importantes en las respuestas inmunes antivirales y en procesos autoinmunes. Constituyen la principal fuente de INF I tras las infecciones²⁹. Circulan por el torrente sanguíneo y entran en los órganos linfoides a través de las vénulas de endotelio alto. En sujetos sanos suponen

$8,9 \pm 1,7$ células/ μ l²⁰. Estas células, marcadores de linaje⁻HLA DR⁺CD11c⁻, expresan altos niveles de CD123 y marcadores específicos como BDCA-2 (CD303) y BDCA-4 (CD304)³⁰. A diferencia de las MDC, presentan TLR1, 6, 7, 9 y 10²⁹. Pueden ser activadas por virus³¹, IL-3 y ligando de CD40 de origen mastocítico³², y por componentes microbianos como motivos CpG de ADN³³. Por su enorme plasticidad funcional, son capaces de desencadenar diferentes respuestas inmunológicas. Cuando son expuestas a virus viables, inician respuestas de memoria, induciendo la expansión y diferenciación de linfocitos B de memoria antígeno específicos a células plasmáticas³³, y de linfocitos T antígeno específicos, a CTL³⁴. Por el contrario, las PDC activadas por motivos CpG o IL3/CD40L inducen la secreción de IL-10 por parte de linfocitos T CD4⁺ reguladores³⁵ y la activación de linfocitos T CD8⁺ supresores por la expresión del ligando de ICOS³⁶.

Se ha comprobado la existencia de dos subtipos de PDC según su expresión de CD2. Ambos subtipos se han encontrado tanto circulantes como en amígdala; sin embargo, las PDC CD2^{high} también se detectan en algunas biopsias tumorales, sugiriendo alguna función en la inmunovigilancia tumoral. Tanto las PDC CD2^{high} como las PDC CD2^{low} secretan IFN α y expresan las moléculas citotóxicas granzima B y TRAIL. Las PDC CD2^{high} son potentes activadoras de la respuesta de linfocitos T. En contraste, las PDC CD2^{low} parecen presentar una capacidad limitada para inducir la proliferación de linfocitos T alogénicos. Estas diferencias funcionales entre los dos subtipos de PDC están asociadas con distintos patrones de transcripción, secreción diferencial de IL12p40 y expresión diferencial de la molécula coestimuladora CD80 tras su activación³⁷.

En humanos, las PDC pueden ser movilizadas *in vivo* con citoquinas como el ligando de Flt3 y GM-CSF, mientras que las MDC son movilizadas únicamente por Flt3^{18,38}. La movilización diferencial de diferentes subclases o precursores de CD por estas citoquinas ofrece una nueva estrategia de manipular las respuestas inmunes en humanos.

Maduración de las CD

Se han propuesto dos modelos para explicar la diferenciación de las CD a partir de precursores hematopoyéticos. Uno postula un único linaje de precursores de CD dotado de plasticidad funcional, mientras que el otro defiende la existencia de varios linajes de precursores de CD funcionalmente diferentes³⁹. Ambos modelos definen tres estados de maduración: precursores de CD, CD inmaduras (CDi) y CD maduras (CDm). Para comprender las funciones de las CD, deben de entenderse sus diferentes estadios de maduración.

Los precursores de CD migran de la médula ósea y circulan por la sangre hasta lugares específicos del organismo donde maduran y actúan como centinelas del sistema inmune. Este tráfico hacia los tejidos periféricos está dirigido por la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR5 y CCR6, y por moléculas de adhesión como el ligando de CD62P⁴⁰⁻⁴².

Las CDi expresan CCR1 y CCR3, cuyos ligandos se expresan en los endotelios activados y en células inflamatorias, promoviendo su migración hacia piel, bazo, hígado, pulmón, corazón, riñón y mucosas, constituyendo una red de CD

intersticiales en todos los órganos excepto en sistema nervioso central y testículo¹¹. La función principal de las CDi es la captura antigénica. Las CDi procesan antígenos adquiridos tanto endógenamente (sintetizados en el citosol de las CD) como exógenamente (procedentes del entorno extracelular). Los posibles orígenes de antígenos extracelulares incluyen bacterias, virus, células necróticas o apoptóticas, proteínas de choque térmico, inmunocomplejos y otros tipos de proteínas. Son capturados por diversos mecanismos (macropinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis) gracias a los receptores de superficie presentes en las CD, como receptores de Fc⁴³, integrinas⁴⁴, lectinas tipo C⁴⁵, y los llamados receptores scavenger, como LOX-1 y CD91⁴⁶.

Ya en el interior de las CD, los antígenos proteicos son degradados a péptidos que se unirán a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC I) o clase II (MHC II) y serán transportados a la superficie celular para el posterior reconocimiento por linfocitos T antígeno-específicos. Los antígenos proteicos endógenos, procesados a través de la vía del MHC I, son primeramente ubiquitinados y degradados en péptidos por el proteosoma en el citosol. Posteriormente son transportados al retículo endoplásmico (RE) por moléculas transportadoras asociadas con el procesamiento antigénico (TAP), donde son cargados en el MHC I. Los complejos MHC I-péptido son llevados desde el RE a la membrana celular a través de la red trans-Golgi para la presentación a los linfocitos T CD8⁺.

Los antígenos proteicos exógenos son procesados en endosomas que se fusionan con lisosomas portadores de proteasas, responsables de la degradación de las proteínas en péptidos que se unirán a moléculas de MHC II. Los complejos MHC II-péptido son transportados por túbulos especializados a la superficie celular, donde se presentarán a linfocitos T CD4⁺. Estas proteínas exógenas también pueden ser procesadas por las CD a través del MHC I, fenómeno conocido como «presentación cruzada»; esto permite la activación de una respuesta inmune tanto de linfocitos CD4⁺ como de linfocitos T CD8⁺ ante antígenos exógenos⁴⁷.

Los antígenos lipídicos, tanto los expresados en patógenos (por ejemplo, micolatos de micobacterias) como los presentes en tejidos propios (esfingolípidos, fosfatidil inosítidos), son presentados por las CD a través de la molécula CD1, que heterodimeriza con la β 2-microglobulina⁴⁸. El procesamiento de estos antígenos lipídicos hasta las diferentes moléculas CD1(a-d) se realiza en compartimentos intracelulares especializados. El repertorio celular restringido por CD1d incluye linfocitos T con su característica diversidad en el TCR, así como células NKT invariantes.

El fenotipo de las CDi se caracteriza por la expresión de grandes cantidades de receptores de quimioquinas inflamatorias, que les permiten extravasarse a los tejidos inflamados^{49,50} y por una baja expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión, de MHC y marcadores específicos de CD.

La maduración de las CD es un complejo proceso que conduce a la diferenciación final de las CD, transformándolas desde unas células escasamente inmunoestimuladoras que funcionan como centinelas periféricos que capturan antígenos, en las más potentes células estimuladoras de linfocitos T. Además de la captura de antígenos, las CD deben

recibir las llamadas «señales de peligro» originadas por patógenos, inflamación o daño tisular^{51,52} para sufrir este proceso madurativo que les permitirá desplazarse a los órganos linfoides secundarios y estimular de forma eficiente los linfocitos vírgenes. Estas señales madurativas se deben tanto a moléculas inflamatorias originadas en el propio organismo (ligando de CD40, TNF α , IL-1, IL-6, IFN α) como a productos microbianos o bacterianos agonistas de los TLR.

Con la maduración las CD adquieren una gran motilidad y pierden su capacidad de capturar antígenos al disminuir la expresión de receptores de fagocitosis y endocitosis. Las CDm optimizan el procesamiento de antígenos aumentando la expresión de los componentes de la maquinaria enzimática responsable del proceso^{53,54}, y adquieren la capacidad de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T tras el incremento en la expresión de moléculas del MHC y de moléculas de adhesión y co-estimulación (CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86). La mayoría de estos marcadores ya están presentes en las CDi y sirve como marcador para distinguir las CDi de las CDm. Algunas de estas moléculas están implicadas en la señalización bidireccional entre la CD y el linfocito T, modulando tanto la activación del linfocito como las funciones de la CD.

Durante la maduración, las CD disminuyen la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR5, y aumentan la de CCR7. El ligando de este último se encuentra en las paredes de los ganglios linfáticos y en la zona paracortical ganglionar⁵⁵. Las propias CD secretan quimioquinas como TARC, MDC o IP-10, que reclutan diferentes tipos de linfocitos T, y RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β , que reclutan monocitos y otras CD hacia el microambiente local.

Funciones de las CD

Las CD 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 B³. Imágenes a tiempo real de CD murinas y linfocitos T naive en ganglios linfáticos intactos revelan que una CD puede interactuar hasta con 500 linfocitos T en una hora^{56,57}.

La activación eficaz de los linfocitos T por parte de las CD necesita de varias señales consecutivas. Las CD pueden activar tanto a linfocitos T CD4⁺ como linfocitos T CD8⁺ por presentación antigénica vía MHC clase II y MHC clase I, respectivamente, lo que constituiría la primera señal. La segunda señal se realiza por la interacción con moléculas coestimuladoras presentes en las CDm: CD80 y CD86 con el receptor linfocitario CD28, y la familia TNF con los receptores linfocitarios R-TNF. Si falla esta coestimulación, los linfocitos T se vuelven tolerogénicos.

Tras su activación, los linfocitos T vírgenes sufren una expansión clonal y una diferenciación a células efectoras secretoras de citoquinas y células memoria. El tipo de respuesta consiguiente de los linfocitos T depende de varios factores, como la concentración antigénica en la CD, la afinidad del TCR por el MHC, la duración de la interacción de la CD con el linfocito T, el estado de maduración de la CD, y el

tipo de estímulo responsable de la maduración de la CD⁵⁸. La supervivencia a largo plazo de los linfocitos T y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con CD maduras. La activación inducida por CD inmaduras es de más corta duración.

Los linfocitos CD4⁺ pueden diferenciarse hacia linfocitos Th-1, que producen IFN γ y secundan una respuesta de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos, o hacia linfocitos Th-2, que producen IL-4, IL-5 e IL-13, e implican inmunidad humoral y disminución de la respuesta Th-1. El patrón de citoquinas producido por la CD activada determinará la dirección de esta polarización; IL-12, IL-18 e IL-27 dirigen hacia Th-1, mientras que CCL17, CCL22 o la ausencia de IL-12 lo hacen hacia Th-2. A su vez, este patrón de citoquinas está regulado por factores como el subtipo de CD, la localización anatómica de la CD o el tipo de estímulo madurador. Estos parámetros también controlan otras características de la respuesta de los linfocitos T, como la inducción de tolerancia o la recirculación (*homing*) de los linfocitos T.

La cooperación de los linfocitos T CD4⁺ en el momento de la activación es necesaria para generar linfocitos T CD8⁺ memoria. Se cree que esta interacción está mediada por la unión entre la molécula CD40 de la CD y su ligando en el linfocito CD4 activado, el CD40L⁵⁹, aunque hay estudios que sugieren una interacción directa entre los linfocitos CD4⁺ y el CD40 de los linfocitos CD8⁺⁶⁰. Otras moléculas que se han implicado en la generación de células de memoria y en las respuestas duraderas son proteínas pertenecientes a las familias de CD28 y del receptor de TNF (TNFR).

Además de su papel central en la activación de los linfocitos T, las CD interactúan directamente con células NK, células NKT y linfocitos B. CDm y CDi pueden activar e inducir la expansión de células NK *resting* por mecanismos no aclarados totalmente, aunque se han descrito algunos proteínas y factores solubles implicados^{61,62}. Las CD activadas también inducen directamente la proliferación de linfocitos B, el cambio de isotipo de inmunoglobulinas y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpos; estas acciones las pueden llevar a cabo tanto de forma linfocito T-dependiente como linfocito T-independiente.

Es reseñable el papel de la CD en la generación de la tolerancia inmunológica antígeno-específica en el control de los fenómenos autoinmunes. Las CD tímicas promueven la eliminación de los linfocitos T autorreactivos⁶³, y las CD periféricas inducen tolerancia principalmente en su estado inmaduro o semimaduro⁶⁴. Como ya se ha comentado, la presentación antigénica en ausencia de moléculas coestimuladoras o sin IL-12 inducen linfocitos T reguladores que suprimen la respuesta inmune mediante la secreción de IL-10 y TGF β . Las propias CD sufren un proceso de parada madurativa y se vuelven tolerogénicas en presencia de sustancias como esteroides, vitamina D3, IL-10, TGF β ^{65,66} o CTLA-4 producido por la población reguladora CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺⁶⁷.

Obtención de precursores de CD

Desde los primeros estudios en los que se aislaban CD del bazo de ratones, se han desarrollado diferentes protocolos para optimizar la obtención de una cantidad adecuada

de CD que permita su uso clínico, principalmente en protocolos de inmunoterapia tumoral. Inicialmente se obtenían precursores de CD presentes en sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad, pero el proceso no era demasiado rentable dada su escasa frecuencia. En los últimos años se han conseguido obtener del orden de 1×10^6 - 1×10^8 CD mediante técnicas de cultivo *ex vivo*.

Una de las técnicas más empleadas en la diferenciación de CD a partir de monocitos de sangre periférica. Los monocitos se purifican de productos de aféresis por elutriación, inmunoselección o adherencia. Posteriormente se diferencian a CD en presencia de GM-CSF e IL-4, y maduran con TNF, IL-1 β , PGE₂ o IL-6, en un protocolo que tiene una duración de 6-10 días^{21,68}.

También se pueden usar células CD34⁺ como fuente de CD. En este caso, las células se obtienen a partir de productos de aféresis, médula ósea o cordón umbilical mediante inmunoselección y se cultivan con GM-CSF y TNF α durante 6-10 días^{69,70}.

Otra alternativa es la expansión de CD *in vivo*. El uso de citoquinas como G-CSF⁷¹ o Flt3L^{72,73} aumenta considerablemente el número de precursores de CD en sangre periférica, que pueden ser recogidos mediante una aféresis y purificados mediante inmunoselección. Esta estrategia acorta el tiempo de cultivo *ex vivo*, ya que estos precursores maduran rápidamente, en 24-48 horas.

Algunos grupos han hecho comparaciones de las CD obtenidas a partir de diferentes técnicas. Cuando se comparan CD de sangre periférica con CD obtenidas a partir de monocitos, se observa que las primeras fenotípicamente parecen estar más activadas, ya que precisan de un menor periodo de tiempo para madurar, mientras que en las segundas ese periodo de tiempo es muy variable y depende mucho del estímulo utilizado. Sin embargo, parece que las CD de sangre periférica son peores productoras de citoquinas, menos activas en endocitosis y carecen de la expresión de DC-SIGN, pero son mejores iniciadoras de respuestas T antígeno-específicas y presentan una mayor capacidad de polarizar la respuesta hacia un perfil Th1⁷¹⁻⁷³. Si se comparan CD derivadas de monocitos con CD derivadas de progenitores CD34⁺, ambos tipos presentan morfología y fenotipo similares, aunque la inducción de respuesta T antígeno-específica está aumentada cuando se utilizan las CD derivadas de progenitores CD34⁺⁷⁴⁻⁷⁶. Otros autores han publicado ensayos estudiando las diferencias entre distintas estrategias de diferenciación de CD a partir de monocitos, variando las citoquinas utilizadas tanto en su generación como en su maduración; los resultados presentados en este sentido son muchas veces contradictorios.

La inducción de una respuesta anti-tumoral exitosa requiere el uso de CD maduras inmunoestimuladoras por dos motivos: por su capacidad para inducir una respuesta T antígeno-específica y porque las CD inmaduras parecen inducir tolerancia inmune. Se ha comprobado que las CDi inducen la expansión de linfocitos T reguladores, aunque también se ha descrito que las CDm también pueden inducir esta expansión tras ciertos estímulos⁷⁷⁻⁷⁹. Además, se ha comprobado que las CDm son resistentes a ciertos factores inmunosupresores producidos por las células tumorales, y son fenotípica y funcionalmente estables en ausencia de citoquinas. En la

Tabla 1 – Principales estímulos utilizados en la maduración de las CD

Mediadores pro-inflamatorios	Interleuquinas (IL-1 β , IL-6), interferones (IFN α/β , IFN γ), MCM, TNF α , PGE $_2$
Agonistas de moléculas co-estimuladoras Agonistas de TLR	CD40L, OX40L, 4-1BBL Peptidoglicano, zymosan, LPS, MPL, Ribomunyl [®] , Luivac [®] , Biostim [®] , OK432, caTLR4, flagelina, poli(I:C), Ampligen [®] , ssRNA, R848, poli-G10, oligonucleótidos CpG
Quimioquinas	CCL16
Otros	Factor del complemento C5b-9, inmunocomplejos

tabla 1 se resumen los principales estímulos utilizados en la maduración de las CD.

Carga con antígenos tumorales

La capacidad de las CD 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 CD, seguido de la carga con antígenos tumorales y la posterior infusión de estas CD portadoras de antígenos. Se han descrito un elevado número de antígenos tumorales susceptibles de ser utilizados en protocolos de inmunoterapia. Los más significativos se resumen en la tabla 2.

La exposición al antígeno puede hacerse siguiendo diferentes estrategias. La más frecuente es la incubación de las CD con péptidos derivados de proteínas tumorales restringidos por MHC y con epítomos definidos para la estimulación de linfocitos T, principalmente CD8⁺. Desde finales de la década de los 90 se han hecho ensayos utilizando péptidos derivados de antígenos tumorales como MART-1, MAGE-1, gp100, CEA, PSMA o HER-2/neu, por citar algunos⁸⁰⁻⁸². Esta

metodología se basa en algoritmos predictivos que identifican péptidos con alta afinidad por la molécula de HLA, más comúnmente con los alelos HLA*A0201. Este sistema tiene las ventajas de evitar procesos autoinmunes y el no requerimiento de células o tejido tumoral. Sus principales inconvenientes son la necesidad de conocer los epítomos tumorales y la posibilidad de aplicarla únicamente a los pacientes cuyo HLA sea el adecuado. Para evitar los mecanismos de escape tumoral, es frecuente el uso de varios péptidos simultáneamente, en lugar de un único péptido.

En caso de que el epítomo no esté definido, se suele utilizar la proteína tumoral completa. De esta forma se evita la restricción por un HLA concreto. Se han utilizado diferentes métodos para introducir las proteínas solubles en interior de las CD, como microinyección⁸³, fusión mediada por liposomas⁸⁴, electroporación⁸⁵, o a través de su unión a otras moléculas que faciliten su transporte, como pueden ser fragmentos de receptor de Fc⁸⁶, toxinas bacterianas⁸⁷ o proteínas víricas⁸⁸.

Con el objeto de intentar inducir una respuesta dirigida contra el mayor número de antígenos tumorales posibles, se han desarrollado estrategias en las que se cargan las CD

Tabla 2 – Antígenos tumorales potencialmente utilizables en inmunoterapia

Clase de antígeno	Antígeno	Tipo de tumor
Antígenos tumor específicos	Idiotipos de inmunoglobulinas	Leucemias/linfomas B, mieloma
	TCR	Linfomas T
	Ras (p21) mutado	Páncreas, colon, pulmón
	P53 mutado	Colorrectal, pulmón, vejiga, cabeza y cuello
Proteínas de desarrollo	Proteína de fusión bcr-abl	LMC, LLA
	MART-1/Melan-A	Melanoma
	MAGE-1, MAGE-3	Melanoma, colorrectal, pulmón, gástrico
	Familia GAGE	Melanoma
Antígenos virales	Telomerasa	Varios
	HPV	Cérvix, pene
	EBV	Linfoma Burkitt, nasofaringe, síndromes linfoproliferativos pos-trasplante
Antígenos específicos de tejido	Tirosinasa	Melanoma
	Gp100	Melanoma
	PAP	Próstata
	PSA	Próstata
	PSMA	Próstata
	Tiroglobulina	Tiroides
	a-fetoproteína	Hígado
Antígenos sobre-expresados	Her-2/neu	Mama, pulmón
	CEA	Colorrectal, pulmón, mama
	Muc-1	Colorrectal, páncreas, ovario, pulmón

CEA: antígeno carcinoembrionario; EBV: virus de Epstein Barr; HPV: virus del papiloma humano; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; PAP: fosfatasa ácida prostática; PSA: antígeno prostático específico; PSMA: antígeno prostático específico de membrana; TCR: receptor de células T.

con antígenos derivados de las células tumorales completas; esto también puede reducir la posibilidad del escape tumoral que puede ocurrir si la vacunación se hace con un pequeño número de antígenos. La congelación repetida o la sonicación de las células tumorales producen extractos que pueden aplicarse en este tipo de protocolos^{89,90}. Otra opción es el uso de células tumorales a las que previamente se ha inducido apoptosis⁹¹ o necrosis⁹². Una estrategia más reciente emplea la fusión de las CD con las células tumorales mediante técnicas de electroporación⁹³ o polietilenglicol⁹⁴.

Por último, existen técnicas en las que se introduce ARN^{95,96} o ADN^{97,98} de las células tumorales en las CD, de forma que se consigue la expresión de los antígenos tumorales dentro de la CD y su posterior presentación en la membrana unidos al MHC.

Cada uno de los sistemas expuestos presenta ventajas e inconvenientes característicos, incluso se han obtenido resultados contradictorios utilizando el mismo método.

Conclusión

Desde su descubrimiento, las CD se han confirmado como las principales células presentadoras de antígenos, desempeñando un papel central en la respuesta inmune. Por ello constituyen la base de los intentos de conseguir un tratamiento inmunoterápico antitumoral eficaz. Durante décadas la generalización de protocolos en esta dirección ha estado dificultada por numerosos problemas metodológicos basados en la escasa información sobre su biología y funciones. En la actualidad se disponen de las técnicas y los conocimientos necesarios para introducir las terapias basadas en CD dentro del arsenal de la oncología moderna, así como en el tratamiento de otras patologías de origen infeccioso o inmunológico.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- Steinmann RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*. 1975;141:804-20.
- Steinmann RM, Kaplan G, Witmer MD, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med*. 1979;149:1-16.
- Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med*. 1983;157:613-27.
- Lopez M, Amorim L, Gane P, Cristoph A, Bardinet D, Abina AM, et al. IL-13 induces CD34+ cells isolated from G-CSF mobilized blood to differentiate in vitro into potent antigen presenting cells. *J Immunol Methods*. 1997;208:117-29.
- Luft T, Pang KC, Thomas E, Bradley CJ, Savoia H, Trapani J, et al. A serum-free culture model for studying the differentiation of human dendritic cells from adult CD34+ progenitor cells. *Exp Hematol*. 1998;26:489-500.
- Berger TG, Feuerstein B, Strasser E, Hirsch U, Schreiner D, Schuler G, et al. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J Immunol Methods*. 2002;268:131-40.
- Felzmann T, Witt V, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, Paul P, et al. Monocyte enrichment from leukapheresis products for the generation of DCs by plastic adherence, or by positive or negative selection. *Cytotherapy*. 2003;5:391-8.
- Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000;165:6037-46.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, et al. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science*. 2005;307:254-8.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001;2:361-7.
- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997;90:3245-87.
- Hart DN, Prickett TC. Adhesion molecules in tonsil DC-T cell interactions. *Adv Exp Med Biol*. 1993;329:65-9.
- Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:881-922.
- Fagnoni FF, Takamizawa M, Godfrey WR, Rivas A, Azuma M, Okumura K, et al. Role of B70/B7-2 in CD4+ T-cell immune responses induced by dendritic cells. *Immunology*. 1995;85:467-74.
- Takamizawa M, Rivas A, Fagnoni F, Benike C, Kosek J, Hyakawa H, et al. Dendritic cells that process and present nominal antigens to naive T lymphocytes are derived from CD2+ precursors. *J Immunol*. 1997;158:2134-42.
- McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DN. Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol*. 1995;25:2064-8. Erratum in: *Eur J Immunol* 1995;25:3525.
- van Nierop K, de Groot C. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin Immunol*. 2002;14:251-7.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, et al. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol*. 2000;165:566-72.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100:4512-20.
- Szabolcs P, Park KD, Reese M, Marti L, Broadwater G, Kurtzberg J. Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells*. 2003;21:296-303.
- Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol*. 1998;160:4587-95.
- Oehler L, Majdic O, Pickl WF, Stockl J, Riedl E, Drach J, et al. Neutrophil granulocyte-committed cells can be driven to acquire dendritic cell characteristics. *J Exp Med*. 1998;187:1019-28.
- van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, De Jong EC, Teunissen MB. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol*. 2007;178:1900-86.
- Klechevsky E, Liu M, Morita R, Banchereau R, Thompson-Snipes L, Palucka AK, et al. Understanding human myeloid dendritic cell subsets for the rational design of novel vaccines. *Hum Immunol*. 2009;70:281-8.

25. Flacher V, Bouschbacher M, Verronèse E, Massacrier C, Sisirak V, Berthier-Vergnes O, et al. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol.* 2006;177:7959-67.
26. Klechevsky E, Morita R, Liu M, Cao Y, Coquery S, Thompson-Snipes L, et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14+ dermal dendritic cells. *Immunity.* 2008;29:497-510.
27. Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, et al. Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity.* 2009;31:158-69.
28. Oh S, Perera LP, Burke DS, Waldmann TA, Berzofsky JA. IL-15/IL-15Ralpha-mediated avidity maturation of memory CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:15154-9.
29. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194:863-9.
30. Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 2001;194:1823-34.
31. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med.* 1999;5:919-23.
32. Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997;185:1101-11.
33. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31:2154-63.
34. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Münz C, Liu YJ, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood.* 2003;101:3520-6.
35. Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007;204:105-15.
36. Gilliet M, Liu YJ. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195:695-704.
37. Matsui T, Connolly JE, Michnevitz M, Chaussabel D, Yu CL, Glaser C, et al. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol.* 2009;182:6815-23.
38. Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood.* 2000;95:2484-90.
39. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:151-61.
40. Robert C, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Ayeheun S, Hynes RO, Cheng G, et al. Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med.* 1999;189:627-36.
41. Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, Dieu MC, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, et al. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med.* 1997;186:837-44.
42. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161:1083-6.
43. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest.* 2002;110:71-9.
44. Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 1998;188:1359-68.
45. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002;196:1627-38.
46. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14:123-8.
47. Ackerman AL, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol.* 2004;5:678-84.
48. Joyce S, Van Kaer L. CD1-restricted antigen presentation: an oily matter. *Curr Opin Immunol.* 2003;15:95-104.
49. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767-811.
50. Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005;175:1373-81.
51. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science.* 2002;296:301-5.
52. Skoberne M, Beignon AS, Bhardwaj N. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med.* 2004;10:251-7.
53. Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* 2003;299:1400-3.
54. Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature.* 2002;418:988-94.
55. Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol.* 2005;26:273-87.
56. Stoll S, Delon J, Brotz TM, Germanin RN. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science.* 2002;296:1873-6.
57. Bousso P, Robey E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol.* 2003;4:579-85.
58. Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J, Gett AV, Sallusto F, et al. T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol.* 2003;4:355-60.
59. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998;393:480-3.
60. Bourgeois C, Rocha B, Tanchot C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science.* 2002;297:2060-3.
61. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol.* 2003;170:1249-56.
62. Ferlazzo G, Münz C. NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172:1333-9.

63. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med.* 1997;185:541-50.
64. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192:1213-22.
65. Rutella S, Lemoli RM. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol Lett.* 2004;94:11-26.
66. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104:2235-46.
67. Sanchez J, Casañó J, Alvarez MA, Roman-Gomez J, Martin C, Martinez F, et al. Kinetic of regulatory CD25high and activated CD134+ (OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2004;126:697-703.
68. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109-18.
69. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994;180:83-93.
70. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res.* 1995;55:1099-104.
71. Jefford M, Schnurr M, Toy T, Masterman KA, Shin A, Beecroft T, et al. Functional comparison of DC generated in vivo with Flt3 ligand or in vitro from blood monocytes: differential regulation of function by specific classes of physiologic stimuli. *Blood.* 2003;102:1753-63.
72. Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC- dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol.* 2000;12:1511-9.
73. Osugi Y, Vuckovic S, Hart DN. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood.* 2002;100:2858-66.
74. Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umansky V, Schirmacher V. Generation of dendritic cells from human bone marrow mononuclear cells: advantages for clinical application in comparison to peripheral blood monocyte derived cells. *In J Oncol.* 2002;20:247-53.
75. Chen B, Stiff P, Sloan G, Kash J, Manjunath R, Pathasarathy M. Replicative response, immunophenotype, and functional activity of monocyte-derived versus CD34(+)-derived dendritic cells following exposure to various expansion and maturation stimuli. *Clin Immunol.* 2001;98:280-92.
76. Syme R, Bajwa R, Robertson L, Steward D, Gluck S. Comparison of CD34 and monocyte-derived dendritic cells from mobilized peripheral blood from cancer patients. *Stem Cells.* 2005;23:74-81.
77. Banerjee D, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar K. Expansion of FOXP3high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after DC injection of Cytokine matured DCs in myeloma patients. *Blood.* 2006;108:2655-61.
78. De Vries IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LP, Ruiter DJ, Gerritsen MJ, et al. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2003;9:5091-100.
79. McIlroy D, Gregoire M. optimizing dendritic cell-based anticancer immunotherapy; maturation state does have clinical impact. *Cancer Immunol Immunother.* 2003;52:583-91.
80. Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998;4:328-32.
81. Alters SE, Gadea JR, Sorich M, O'Donoghue G, Talib S, Philip R. Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. *J Immunother.* 1998;21:17-26.
82. Tjoa BA, Erickson SJ, Bowes VA, Ragde H, Kenny GM, Cobb OE, et al. Follow-up evaluation of prostate cancer patients infused with autologous dendritic cells pulsed with PSMA peptides. *Prostate.* 1997;32:272-8.
83. Diacumakos EG, Holland S, Pecora P. A microsurgical methodology for human cells in vitro: evolution and applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;65:911-8.
84. Poste G, Papahadjopoulos D, Vail WJ. Lipid vesicles as carriers for introducing biologically active materials into cells. *Methods Cell Biol.* 1976;14:33-71.
85. Li Y, Ke Y, Gottlieb PD, Kapp JA. Delivery of exogenous antigen into the major histocompatibility complex class I and class II pathways by electroporation. *J Leukoc Biol.* 1994;56:616-24.
86. Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Théry C, Rescigno M, et al. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med.* 1999;189:371-80.
87. Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, Adotevi O, Warnier G, Lacabanne V, et al. The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol.* 2000;165:3301-8.
88. Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, et al. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:664-8.
89. Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:9482-7.
90. Lambert LA, Gibson GR, Maloney M, Durell B, Noelle RJ, Barth Jr RJ. Intranodal immunization with tumor lysate-pulsed dendritic cells enhances protective antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001;61:641-6.
91. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60:3542-9.
92. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;191:423-34.
93. Imura K, Ueda Y, Hayashi T, Itoh T, Shimizu K, Tamai H, et al. Induction of cytotoxic T lymphocytes against human cancer cell lines using dendritic cell-tumor cell hybrids generated by a newly developed electrofusion technique. *Int J Oncol.* 2006;29:531-9.
94. Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, et al. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2715-8. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5011.

-
95. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, et al. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol.* 2001;166:2953-60.
 96. Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Coleman DM, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.* 2001;61:3388-93.
 97. Irvine AS, Trinder PK, Laughton DL, Ketteringham H, McDermott RH, Reid SC, et al. Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat Biotechnol.* 2000;18:1273-8.
 98. Walter E, Dreher D, Kok M, Thiele L, Kiama SG, Gehr P, et al. Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells. *J Control Release.* 2001;76:149-68.