



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

***MODULACIÓN DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE
ANTÍGENOS POR HISTAMINA EN CÉLULAS
DENDRÍTICAS: “ACCIÓN SOBRE LA CRONICIDAD DE
LOS PROCESOS ALÉRGICOS”***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

María Marta Amaral

Director de tesis: Dra. Mónica Vermeulen

Consejero de estudios: Dr. Omar Coso

Laboratorio de Inmunología Oncológica. Instituto de Investigaciones
Hematológicas “Mariano R. Castex”. Academia Nacional de
Medicina.

Buenos Aires, 20 de noviembre de 2007

ÍNDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN EN CASTELLANO	1
RESUMEN EN INGLÉS	2
AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCIÓN	8
1. Histamina	9
1.1 Aspectos generales	9
1.2 Receptores histaminérgicos	9
1.3 Rol de la histamina sobre el sistema inmune	10
1.3.1 Acción de la histamina sobre las células dendríticas	11
1.3.2 Acción de la histamina sobre los linfocitos T	11
1.3.3 Acción de la histamina sobre los linfocitos B	12
1.4 Rol de la histamina en los procesos tumorigénicos	13
1.5 Regulación de la histamina en los procesos inflamatorios	14
1.5.1 Efecto de la histamina sobre los procesos autoinmunes	15
1.5.2 Modulación de la alergia por histamina	15
2. Aspectos generales de las células dendríticas	17
2.1 Captación de antígenos y maduración de las células dendríticas	18
2.2 Regulación de la respuesta adaptativa por las células dendríticas	22
2.3 Inducción de tolerancia y de linfocitos T regulatorios por las células dendríticas	23
2.4 Procesamiento y presentación de antígenos	24
2.4.1 Vías de procesamiento y presentación antigénica	24
3. Presentación cruzada de antígenos	25
3.1 Vía clásica de presentación	27
3.2 Influencia del antígeno en la presentación cruzada	27

3.3 Vías involucradas en la presentación cruzada de antígenos: Mecanismos moleculares	28
3.3.1 Vía fagosoma-citosol	29
3.3.2 Vía retrógrada	30
3.3.3 Vía vacuolar	30
3.4 Células mediadoras de la presentación cruzada de antígenos	31
3.5 Contribución de la presentación cruzada de antígenos a la respuesta inmune: Inmunidad versus tolerancia	32
3.5.1 Rol de la presentación cruzada en las infecciones frente a virus	32
3.5.2 Participación de la presentación en el mantenimiento de la tolerancia	34
4. Desarrollo de los procesos alérgicos	35
4.1 Generalidades	35
4.2 Función de las células dendríticas en los procesos alérgicos	39
4.3 Rol de los linfocitos CD8 ⁺	39
4.4 Rol de la histamina en la alergia	41
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Ratones	46
2. Obtención de células dendríticas murinas	46
3. Estudio de la expresión del H1R y H2R mediante el ensayo de unión de ligandos a receptores.	46
4. Análisis de la expresión del H3R y H4R por RT-PCR	47
5. Producción de histamina	48
6. Endocitosis de OVA-FITC	48
7. Endocitosis de HRP	49
8. Adsorción de OVA a perlas de látex	49
9. Fagocitosis de perlas de látex adsorbidas a OVA-FITC	49
10. Análisis fenotípico de las células dendríticas mediante	50

citometría de flujo	
11. Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas	50
12. Determinación intracitoplasmática de la producción de citoquinas: IL- 10, IL-12 e INF-γ.	51
13. ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares	51
14. ELISA para la evaluación de las respuestas de anticuerpos anti OVA de isotipos IgG e IgE	52
15. Ensayo de presentación cruzada de antígenos	52
16. Modelo de asma alérgico	53
17. Análisis de las poblaciones presentes en lavado bronquial y pulmón por citometría de flujo	53
18. Purificación de células dendríticas y linfocitos T a través de columnas de afinidad	54
19. Análisis estadístico	55
RESULTADOS	56
1. Expresión de receptores histaminérgicos por las células dendríticas murinas	57
2. La histamina potencia la endocitosis por las células dendríticas	60
3. La histamina estimula la endocitosis de OVA por macropinocitosis y en menor medida por el receptor de manosa	62
4. La histamina potencia la endocitosis de OVA actuando a través del receptor H2R	64
5. La histamina aumenta la expresión de las moléculas del CMH de clase II y favorece la presentación de antígenos por las células dendríticas	65
6. Efecto del microambiente en la modulación de la funcionalidad de las células dendríticas por histamina.	67
6.a Análisis de la capacidad endocítica	67
6.b En condiciones ácidas la histamina induce la producción de IL-12 por las células dendríticas	69

6.c La producción de IL-12 por células dendríticas estimuladas con HIS involucra a los receptores H1R y H3R/H4R	70
7. La histamina potencia la presentación cruzada de antígenos	71
8. El incremento de la presentación cruzada por la histamina involucra el H3R/H4R	72
9. La histamina no afecta la presentación cruzada de antígenos particulados	74
10. La histamina aumenta la estabilidad del complejo CMHII-péptido sobre la superficie de la célula dendrítica	76
11. Modulación de la presentación cruzada de antígenos por histamina: su probable rol in vivo	77
12. La histamina promueve el reclutamiento de CD4⁺ “ linfoides” y de linfocitos CD8⁺ en el pulmón de los ratones alérgicos	80
13. La histamina incrementa la producción de IL-12 e INF-γ en el pulmón	82
14. La histamina promueve en pulmón la producción de IL-5 en LT CD8⁺	85
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	104
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

MODULACIÓN DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS POR HISTAMINA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS: “ACCIÓN SOBRE LA CRONICIDAD DE LOS PROCESOS ALÉRGICOS”

RESUMEN

La histamina desempeña un rol importante en las respuestas inflamatorias y en las reacciones alérgicas. Estudios recientes demostraron que la histamina es también capaz de modular la función de las células dendríticas, particularmente como promotora de las respuestas del tipo T_H2 , que son importantes en el desarrollo de los procesos alérgicos. En este trabajo de tesis analizamos la capacidad de la histamina de modular la endocitosis y la presentación cruzada de antígenos por las células dendríticas. Demostramos que la endocitosis de ovoalbúmina y la presentación cruzada de antígenos solubles son marcadamente potenciadas por esta amina. Notoriamente, la estimulación de ambos mecanismos involucró la activación de receptores distintos: el incremento de la endocitosis fue prevenido por cimetidina, un antagonista del receptor H_2 , mientras que la presentación cruzada fue inhibida por la tioperamida, un antagonista de los receptores H_3/H_4 .

Finalmente, en un modelo de asma murino, demostramos que la histamina al actuar sobre las células dendríticas incrementa la población de $LT\ CD8^+$ específicos a nivel del tejido pulmonar. Estos clones pertenecerían al tipo $TC2$ dado que secretan IL-5, una citoquina que contribuye a la cronicidad del proceso alérgico en las vías respiratorias.

Palabras clave: histamina, células dendríticas, presentación cruzada, $LT\ CD8^+$, alergia.

**HISTAMINE MODULATES CROSS PRESENTATION OF ANTIGENS BY
DENDRITIC CELLS: “ACTION ON THE ALLERGIC PROCESSES
CHRONICITY”**

ABSTRACT

Histamine plays an important role in a variety of inflammatory processes and allergic reactions. Recent studies have shown that histamine is also able to modulate the function dendritic cells. In addition, it promotes a T_H2 response and appears to have a central role in allergic processes. In this work, we analyzed the capacity of histamine to regulate the endocytosis and cross presentation by dendritic cells. We demonstrated that ovalbumin uptake and soluble antigen cross presentation were strongly increased by this amine. Both mechanisms were activated by histamine acting through different receptors, since endocytosis was inhibited by the H₂R antagonist cimetidine, and cross presentation was blocked by the H₃R/H₄R antagonist thioperamide. Finally, we showed in an asthma model in mice, that dendritic cells treated with histamine promote an increase in the population of allergen-specific CD8⁺ T cells in the lung. Surprisingly, these specific clones belong to the TC2 type, as they secreted IL-5, a cytokine that appears to contribute to the chronicity of allergic responses in the airways.

Keys words: histamine, dendritic cells, cross presentation, CD8⁺ T cells, allergy

AGRADECIMIENTOS

A Mónica, mi directora de Tesis, quién desde el primer día me transmite sus amplios conocimientos y su experiencia, los que me permitieron llegar a esta instancia de mi profesión. Le agradezco sobre todo su constante apoyo y su incansable ayuda, en el trabajo diario, en la realización de esta Tesis y en situaciones difíciles por las que me tocó atravesar. Por compartir también momentos muy importantes no relacionados a la ciencia, pero de mucha alegría.

A Jorge, por darme junto a Mónica la posibilidad de ingresar al Laboratorio de Inmunología Oncológica y por haberme brindado todo su apoyo en ese momento de cambios. Por estar siempre dispuesto a ayudar a todos. Le agradezco también el tiempo dedicado a la discusión de resultados, ya que sus opiniones fueron sumamente importantes, por su claridad y gran criterio.

A Analía, Mirta, Gaby y Romi, por su buena predisposición y ayuda para todo.

A todos los chicos y chicas del laboratorio, Karen, Juan, Julián, Cristian, Mercedes, Yanina, Silvina, Paulita, Pablo, Jere, quienes me acompañan a diario creando un clima muy agradable para trabajar. A los que siguieron los caminos alternativos de la ciencia, pero que siempre recuerdo y por suerte con algunos de ellos nos seguimos viendo, Paulita, Diego, Euge.

A Selma, Evelia, Mabel y Bety, por toda la ayuda que me ofrecieron y me siguen dando en el laboratorio.

A mis amigas del colegio, Laura C, Laura G y Lorena, quienes desde hace muchísimo tiempo, me escuchan, me aconsejan y sobre todo comparten los momentos importantes de mi vida.

Agradezco muy especialmente a mi más querida amiga Lauri, con quien no sólo comparto el día a día en este laboratorio, sino también muchísimos momentos importantes fuera de él. Por su compañía, su sensibilidad, sus consejos, su inagotable ayuda y voluntad para hacerlo. Le agradezco todas esas charlas en las que cada vez nos convencemos más de lo parecidas que

somos, aunque no físicamente, y quienes nos conocen lo saben bien! Gracias amiga, por todo!!!.

A mis padres, quienes me apoyan y acompañan siempre. Por su infinita ayuda y sus consejos. Por enseñarme a valorar la familia, los amigos y sobre todo la vida.

A mi hermano, por compartir siempre mi entusiasmo en todo lo que emprendo, como si lo estuviera haciendo él.

A mi abuela, por todo su apoyo y por preocuparse demasiado por el estado de mis guardapolvos con olor a ratón!

A mi segunda familia, los Moreira, quienes siempre están dispuestos a ayudarme en todo.

Mis agradecimientos más especiales son para mi esposo Diego y para nuestra hijita María Agustina. A Diego por estos doce años juntos compartiendo todo, por su infinita paciencia, por su apoyo, sus palabras de aliento, por haberme dado quizás la felicidad más grande de mi vida, la de ser madre. Por estar siempre a mi lado y no dejarme nunca dar por vencida. A Agus, por traer tanta felicidad a esta familia y porque a pesar de no estar todo el tiempo que Yo quisiera con ella, siempre tiene una sonrisa y un abrazo para darme.

ABREVIATURAS

Histamina: HIS
Histidina decarboxilasa: HDC
Células dendríticas: CDs
Receptor histaminérgico 1: H1R
Receptor histaminérgico 2: H2R
Receptores histaminérgicos 3 y 4: H3/H4R
Ketotifeno: Kt
Cimetidina: Ci
Tioperamida: Ti
Células presentadoras de antígeno: CPA
Ovoalbúmina: OVA
Peroxidasa de rábano: HRP
Citocalasina B: CitB
Wortmanina: Wort
Receptor de manosa: RM
Manano: Man
Cultivo mixto linfocitario: CML
Médula ósea: MO
Medio completo: MC
Complejo mayor de histocompatibilidad: CMH
Linfocitos T: LT
Linfocitos B: LB
Lipopolisácarido: LPS
Células T auxiliaadoras del tipo 1: (Th1)
Células T auxiliaadoras del tipo 2: (Th2)
Anticuerpos: (Acs)
Antígenos: (Ags)
Proteína quinasa A: (PKA)
Proteína quinasa C: (PKC)

INTRODUCCIÓN

1. Histamina

1.1 Aspectos generales.

La histamina (HIS) (β -imidazoletildiamina) es uno de los mediadores preformados más importantes que es almacenado en gránulos citoplasmáticos y secretado por los mastocitos y basófilos. Constituye la principal amina biogénica con propiedades vasoactivas, además de ser un reconocido agente inmunomodulador de las reacciones alérgicas e inflamatorias (1-2). Los diversos procesos fisiológicos y patológicos modulados por esta amina, incluyen la neurotransmisión, la regulación de las funciones gastrointestinales y circulatorias, la secreción de las hormonas de la hipófisis y la regulación de las reacciones inflamatorias (3).

La histidina decarboxilasa (HDC) es la enzima responsable de la síntesis de HIS en los mamíferos. Muchas células del linaje mielóide y linfóide que no almacenan HIS, presentan alta actividad de HDC (4) y son productoras de elevadas concentraciones de HIS frente a determinados estímulos, entre ellas se incluyen a las plaquetas, las células dendríticas (CDs) y los linfocitos T (LT) (5-7).

1.2. Receptores histaminérgicos.

Los efectos biológicos de la HIS son mediados a través de 4 tipos de receptores: H1R, H2R, H3R y H4R, los cuales se hallan acoplados a proteínas-G (3). Como todos los receptores acoplados a la proteína G, presentan siete dominios transmembrana, sitios de glicosilación amino-terminal y sitios de fosforilación para las proteínas quinasa A (PKA) y la proteína quinasa C (PKC). Los receptores H1R y H2R están expresados en muchos tipos celulares, incluyendo las células nerviosas, bronquiales y del músculo liso vascular, hepatocitos, células endoteliales, neutrófilos, eosinófilos, monocitos, CDs, LT y B (1). Existen diferencias en relación a las vías involucradas en la activación de los distintos receptores histaminérgicos, así la primera señal para la activación del H1R está dada por la fosfolipasa C con producción de inosítoles-1, 4,5-trifosfato, 1,2-diacilglicerol e incremento del Ca^{2+} citoplasmático (8). Los

receptores H2R están acoplados tanto a la adenilato ciclasa como al sistema de fosfoinositidos, sin embargo, la estimulación de este receptor resulta principalmente de la formación de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (3, 8-9). Estas diferencias en la activación podrían explicar, al menos en parte, la dualidad funcional de la amina, es así que en la mayoría de los sistemas, la HIS puede ejercer efectos tanto supresores a través del H2R como estimuladores a través del H1R (10). El receptor H3R se encuentra expresado en las neuronas histaminérgicas del cerebro y de algunos tejidos periféricos, sin embargo el nivel de expresión de este receptor es muy bajo si se lo compara con el de los receptores H1R y H2R, respectivamente (11). El receptor H4R presenta entre un 37% a un 43% de homología con el H3R y sus transcritos sólo se observaron en las células hematopoyéticas, incluyendo neutrófilos, eosinófilos, CDs, células T auxiliaadoras (Th), mastocitos y basófilos (12-13). Su exacta función no se ha dilucidado hasta el momento, pero ha sido demostrado que activa a las células por medio de la inhibición del AMPc e incremento del Ca^{2+} citosólico (13). Un hecho interesante de destacar, es que la expresión de estos receptores puede ser afectada durante la respuesta inmune normal, así también como en procesos patológicos como la arterosclerosis, la artritis reumatoidea y rinitis alérgica (14-15).

1.3. Rol de la histamina sobre el sistema inmune

Desde hace unos años, existe un gran interés en los mecanismos inmuno-regulatorios inducidos por la HIS, sin embargo en muchos casos los estudios son contradictorios en relación a sus efectos pro o anti-inflamatorios. Éstos dependen en gran medida de la concentración particular de los receptores histaminérgicos en cada célula, sumado a la rápida degradación de la amina y al gran recambio de receptores a nivel de la membrana durante el transcurso de la respuesta inmune. Las células críticas en la respuesta inmune, como los linfocitos, CDs y monocitos, presentan receptores para HIS como mencionamos anteriormente (1, 12-13) y en determinadas condiciones son capaces de sintetizarla y secretarla (6, 16). Ha sido demostrado que la HIS afecta en forma directa la funcionalidad de estas células. En los monocitos estimulados con productos bacterianos como el lipopolisácarido (LPS), la HIS

inhibe la producción de la IL-1, el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la IL-12, por el contrario, incrementa la IL-10 a través de la activación del H2R (17-19).

1.3.1 Acción de la histamina sobre las células dendríticas

En relación a las CDs humanas, se demostró que la HIS actuando sobre las mismas cambia su capacidad de polarización sobre las células T (19-21). En este sentido, se describió que la HIS inhibe la producción de IL-12 en CDs tanto humanas como murinas luego de ser maduras con LPS (21-22), determinando un perfil de respuesta del tipo T_H2 (23). Sin embargo, existe mucha contradicción en relación a su efecto sobre la maduración de las CDs en términos de cambios fenotípicos o capacidad de primar a las células T. A pesar de este hecho, existe consenso en aceptar que la HIS incrementa la expresión del CD80, CD86 así como las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II (20, 24). Asimismo, induce transientes citósolicos de Ca²⁺, polimerización de actina y quimiotáxis de las CDs humanas inmaduras. La maduración de estas células resulta en la pérdida de estas respuestas, sin embargo en las CDs maduras, la HIS actuando sobre los H2R y H4R induce un incremento del AMPc intracelular y de la IL-10, mientras que suprime la producción de IL-12 (25). La utilización de agonistas y antagonistas específicos de los receptores histaminérgicos permitió dilucidar a través de cuáles actúa la HIS para ejercer muchas de sus funciones. Así, se pudo conocer que los transientes de Ca²⁺, la polimerización de la actina y la quimiotáxis de CDs inmaduras, se inducen a través de la activación de los receptores H1R y H3R (25).

1.3.2 Acción de la histamina sobre los linfocitos T

Una gran cantidad de inmunopatologías que incluyen las reacciones alérgicas, los procesos infecciosos y las enfermedades autoinmunes, correlacionan positivamente con el desarrollo de dos subtipos distintos de células T CD4⁺ efectoras, las células T auxiliaoras del tipo 1 (Th1) o del tipo 2 (Th2). Las Th1 secretan predominantemente IFN- γ y TNF- α y median la

activación de la respuesta inmune celular. Las Th2 producen principalmente IL-4, IL-5 e IL-13 e inducen la inmunidad humoral y la eosinofilia. Además, las citoquinas producidas por las células Th2 inducen el cambio de isotipo de inmunoglobulinas hacia la IgE. Un hecho interesante de mencionar es que, la expresión de los receptores H1R y H2R está diferencialmente regulada tanto en los LT vírgenes humanos como murinos y, durante la activación de los mismos, se determina el perfil de receptor que se expresará en la célula T efectora (10). Como mencionáramos en párrafos precedentes la HIS actuando sobre las CDs favorece la polarización de las células T hacia un perfil T_H2. Así, las Th1 muestran una predominante expresión de los receptores H1R, mientras que las Th2 lo hacen para el H2R. Es así, que la HIS potencia las respuestas efectoras Th1 a través de la activación del H1R, mientras que ambas respuestas T_H1 y T_H2 son reguladas negativamente mediante el receptor H2R (3), a través de vías de activación diferenciales. En ratones, la supresión del receptor H1R resulta en la pérdida de IFN- γ , mientras que incrementa la liberación de citoquinas del perfil T_H2 como la IL-4 e IL-13 entre otras (26). Por el contrario, la pérdida del H2R induce un incremento de citoquinas de ambos tipos de respuestas. En este sentido, la amina estimula la producción de IL-10 actuando sobre los H2R (27). La IL-10 es uno de los mayores reguladores de las respuestas inflamatorias y de la proliferación y secreción de citoquinas por los LT. Es decir, que la HIS al incrementar la liberación de la IL-10 por las CDs y las células T, constituye un mecanismo de control de las respuestas inflamatorias. Sin embargo, debe resaltarse que la HIS contribuye en la progresión de las respuestas inflamatorias asociadas a los procesos alérgicos mediante la inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-1 α , la IL-1 β y la IL-6, de quimioquinas, como RANTES ó la IL-8 en diversos tipos celulares y tejidos a nivel local (28). Por el contrario, la producción de TNF- α es inhibida por la HIS (29).

1.3.3 Acción de la histamina sobre los linfocitos B

En relación a la acción de la HIS sobre la producción de anticuerpos (Acs), se encontró que la amina cumple un rol importante en la determinación

de los isotipos de Acs durante la diferenciación de los linfocitos B (LB), y esta modulación es fuertemente dependiente de la expresión de los receptores histaminérgicos (10). En ratones deficientes para el receptor H1R, se demostró que la HIS inhibe la proliferación de las células B productoras de IgM (30). En este sentido, en estos ratones se encontraron niveles de IgM disminuidos frente a antígenos (Ags) T-independientes, como el TNP-ficolil, mientras que las respuestas proliferativas de las células B no eran afectadas frente a estímulos como el LPS y la IL-4. Por el contrario, la respuesta frente a Ags T-dependientes como la ovoalbúmina (OVA) muestra un patrón diferente. Los ratones deficientes para el H1R producen grandes cantidades de Acs anti-OVA de isotipos IgG1 e IgE, comparados con los ratones normales (10). En contraste, los ratones deficientes para el H2R presentan bajos niveles séricos de Acs anti-OVA de isotipos IgG3 e IgE en comparación con los ratones normales y los deficientes para el H1R. Sin embargo, las células T de estos ratones secretan grandes cantidades de IL-4 e IL-13, mientras que las respuestas IgE específicas fueron inhibidas en presencia de cantidades elevadas de interferón- γ (IFN- γ). Indicando que el H1R y las respuestas Th1 relacionadas juegan un rol central en la supresión de las respuestas humorales.

1.4. Rol de la histamina en los procesos tumorigénicos.

Durante el desarrollo de numerosos tumores se demostró la existencia de una gran proporción de mastocitos infiltrantes, así como también una actividad incrementada de HDC en el seno de la masa tumoral. Esto originó un gran número de trabajos tratando de dilucidar el rol ejercido por la amina sobre la génesis del proceso tumoral.

Como mencionáramos previamente, la HIS induce la producción de IL-10 en CD4 y en células Th2, y también incrementa la actividad supresora del TGF- β sobre las células T, actuando a través del H2R (20, 27, 31). Respecto a este punto se pudo comprobar, a partir de un modelo tumoral en ratones deficientes en HDC y de una línea tumoral que expresaba esta enzima, que la producción local de HIS en el tejido del tumor suprimió la producción local de citoquinas como INF- γ , TNF- α y linfotoxina- β , actuando a través del H2R (32-33).

Es bien conocido, el rol de la proteína inductora del IFN (IP-10) en relación a su capacidad de generar una respuesta antitumoral en células de melanoma a través de la inducción de INF- γ . La HIS parece inhibir o suprimir la respuesta mediada por la IP-10, disminuyendo así la inmunidad anti-tumoral (34). También se sabe que la HIS estimula la producción de IL-4 en células Th2 a través del H2R, y que esta citoquina inhibe la migración de las células de Langerhans hacia la región tumoral (35).

Todos estos efectos desencadenados por la HIS a través del H2R tienen incidencias negativas sobre la inmunidad anti-tumoral, lo que ha llevado a incorporar el uso de antagonistas de este receptor, como la cimetidina (Ci), logrando en algunos casos detener el desarrollo tumoral (36-37).

La administración de este antagonista a pacientes con cáncer de colon, melanoma y carcinoma renal, aumentó la sobrevida (36-39). Recientemente, Fujikawa y col. analizaron el efecto de la Ci sobre el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF), teniendo en cuenta que éste controla funciones biológicas íntimamente implicadas en las patologías tumorales como la proliferación, diferenciación, migración y modulación de la apoptosis. Dado que su expresión incrementada o su activación persistente ha sido asociada al desarrollo de hepatocarcinoma celular (HCC), estudiaron la acción de la Ci sobre líneas celulares de HCC y sobre fibroblastos murinos que expresaban el receptor del EGF humano. Encontraron que este antagonista inhibió la proliferación y la migración celular inducidas por el EGF, y también la autofosforilación de su receptor a través de la disminución de los niveles intracelulares de AMPc (40).

Sin embargo, el uso de otros antagonistas del H2R como ranitidina y famotidina no mostraron los mismos efectos que la Ci en el tratamiento de estas patologías (41-43).

1.5 Regulación de la histamina en los procesos inflamatorios

Es conocido, el rol que ejerce la HIS en la modulación de las respuestas inflamatorias durante muchos procesos patológicos. La HIS como mencionáramos anteriormente, puede modular las respuestas T_H1 vía su unión al H1R o al H3R, pudiendo entonces generar procesos de etiología

autoinmune. Además, a través de su acción sobre los H₂R o H₄R puede activar perfiles del tipo T_H2, pilares fundamentales en el desarrollo de las reacciones alérgicas.

1.5.1 Efecto de la histamina sobre los procesos autoinmunes.

Es conocido, el rol de los LT en la génesis de los procesos autoinmunes. Es justamente la interacción entre las CDs y los LT a nivel del ganglio lo que va a determinar el balance entre la inmunidad o la tolerancia. En este sentido, al ser la HIS un modulador tanto de las CDs y de los LT, se especuló sobre su posible rol en los procesos autoinmunes.

Así, se encontró una asociación muy fuerte entre la HIS y el desarrollo del lupus eritematoso sistémico (LES), la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (44). Recientemente, Tanda y colaboradores (45) demostraron en modelos murinos que la HIS en una concentración de 20 mg/ml reduce el porcentaje de glomérulos que se hallan comprometidos en la glomerulonefritis autoinmune, inducida por Acs contra la membrana basal del riñón. Un hecho importante, fue encontrar que la HIS también disminuía la concentración de proteínas en orina, es decir la proteinuria. Más interesante fue el hallazgo de que la HIS disminuyera los niveles plasmáticos de la IL-12. Los efectos fueron bloqueados parcialmente cuando se utilizaron antagonistas de los receptores H₂R y H₄R como el dimaprit. Esta inhibición en la producción de IL-12 por la HIS actuando vía el H₄R, probablemente reduzca la sintomatología del proceso autoinmune, ya que esto provocaría una disminución en el reclutamiento de macrófagos hacia el riñón, por encontrarse disminuídas las respuestas del tipo T_H1 con la consiguiente amplificación de la señal a través de la activación de los mismos.

1.5.2 Modulación de la alergia por histamina

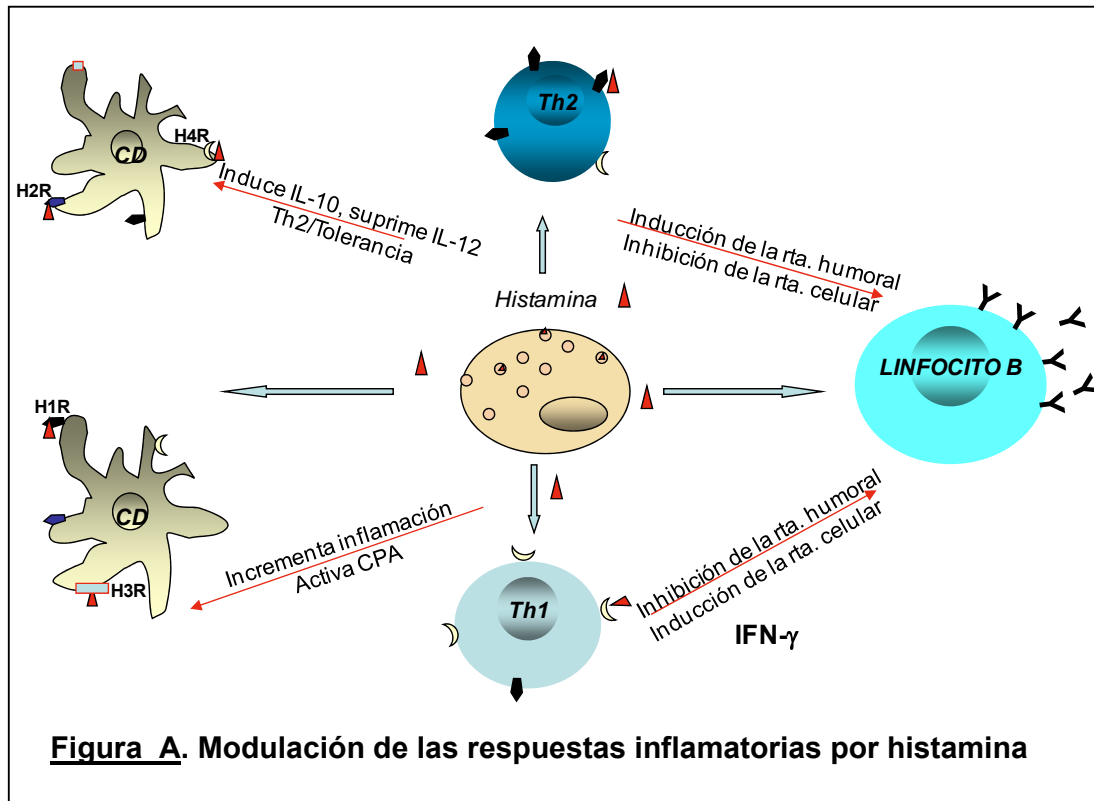
La HIS a través del H₁R media una variedad de efectos que se encuentran asociados con síntomas de anafilaxis y otras enfermedades alérgicas (46). Entre éstos, promueve el aumento en varios tipos celulares y tejidos locales de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y también de

quimioquinas, contribuyendo a la progresión de las respuestas inflamatorias alérgicas (17, 47-49). Por otro lado, la inducción en la liberación de quimioquinas a través del H1R en cultivos de explantos de mucosa nasal, sugiere la existencia de un ciclo inflamatorio prolongado en la rinitis alérgica del cual formarían parte las células liberadoras de HIS y la migración aumentada de éstas hacia la mucosa nasal. Además se vio que incrementa la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales (50-52) actuando sobre este mismo receptor.

La HIS regularía también el reclutamiento de granulocitos en los tejidos. Empleando antagonistas del H1R se observó una inhibición en la acumulación de eosinófilos inducida por un alérgeno (53). Respecto a este punto, se encontró que a altas concentraciones de HIS se inhibe la quimiotaxis de estas células a través del H2R, mientras que a bajas concentraciones aumenta su migración vía el H1R (54).

La administración de HIS vía endovenosa o por inhalación lleva a bronco-constricción, pudiendo ser inhibida por antagonistas del H1R. Los pacientes asmáticos son más sensibles a este efecto, respecto a los individuos sanos, y en algunas investigaciones se ha podido demostrar que el uso de antagonistas del H1R disminuiría los síntomas de esta patología y mejoraría la función pulmonar (46, 55-58). Sin embargo, el tratamiento con estos antagonistas no disminuye sustancialmente los eventos de bronco-constricción de la fase temprana y de la tardía en las vías aéreas asmáticas en respuesta al desafío con un alérgeno.

Para concluir, en la **Figura A** se muestra como la HIS actuando sobre sus receptores en las CD4 y los LT promovería el desarrollo de procesos de etiología inflamatoria alérgica o la inducción de autoinmunidad.



2. Aspectos generales de las células dendríticas

Las CDs componen un grupo heterogéneo de diferentes poblaciones celulares, altamente especializadas en captar, procesar y presentar Ags a los LT vírgenes, permitiendo así el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. En ratón, se han descrito de acuerdo a sus características fenotípicas y funcionales, seis subtipos principales de CDs CD11c⁺. Las convencionales: *mieloides* que comprenden las CD8⁻, localizadas en bazo, nódulos linfáticos, placas de Peyer e hígado, las *linfoides* CD8⁺ a quienes se las puede encontrar también en el timo, y las CD8^{int} ubicadas solamente en los nódulos linfáticos. Además las CDs convencionales pueden ser divididas en distintas poblaciones dependiendo de su localización. Así las CDs de la piel incluyen a las células de Langerhans de la epidermis, y en las áreas dérmicas las CDs dérmicas, las CDs asociadas a mucosas, las CDs asociadas a los tejidos linfoides como las de la zona marginal del bazo, las interdigitales del área T y las de los tejidos intersticiales como el hígado y el pulmón (59). Por último, las CDs

plasmacitoides (pCDs) B220⁺GR1⁺ se encuentran en todos los órganos linfoides y se caracterizan por su potencial para producir grandes cantidades de IFN del tipo1 (IFN- α/β) en respuesta a las infecciones virales (60). Asimismo, se demostró que estas células estarían involucradas en el mantenimiento de la tolerancia-T mediante la inducción de la diferenciación de las células T vírgenes en LT-regulatorios (T_R) (61), a través de la secreción de IL-10 (62). Durante muchos años fue motivo de controversia el origen de cada subtipo de CD, y se pensaba si esta diversidad era consecuencia de distintos estados de activación de un único precursor común o bien el producto del desarrollo a partir de precursores diferentes. En ratón, previamente se demostró que muchas CDs tienen en etapas tempranas del desarrollo pasos similares a las células B (63), mientras que las CDs CD8⁺ atraviesan fases de desarrollo similares a los LT y derivarían de un precursor linfoide (64), las CD8⁻ derivarían de un precursor mieloide. De allí surgió el término CD mieloide y CD linfoide. Sin embargo, recientes experimentos sostienen la idea de que los diferentes subtipos, incluyendo las CDs convencionales y las pCDs, pueden ser generadas de progenitores mieloides o linfoides a través de precursores intermediarios de CDs que se alojan en los sitios de potencial entrada de Ags, diferenciándose localmente a CDs inmaduras (59).

2.1. Captación de antígenos y maduración de las células dendríticas

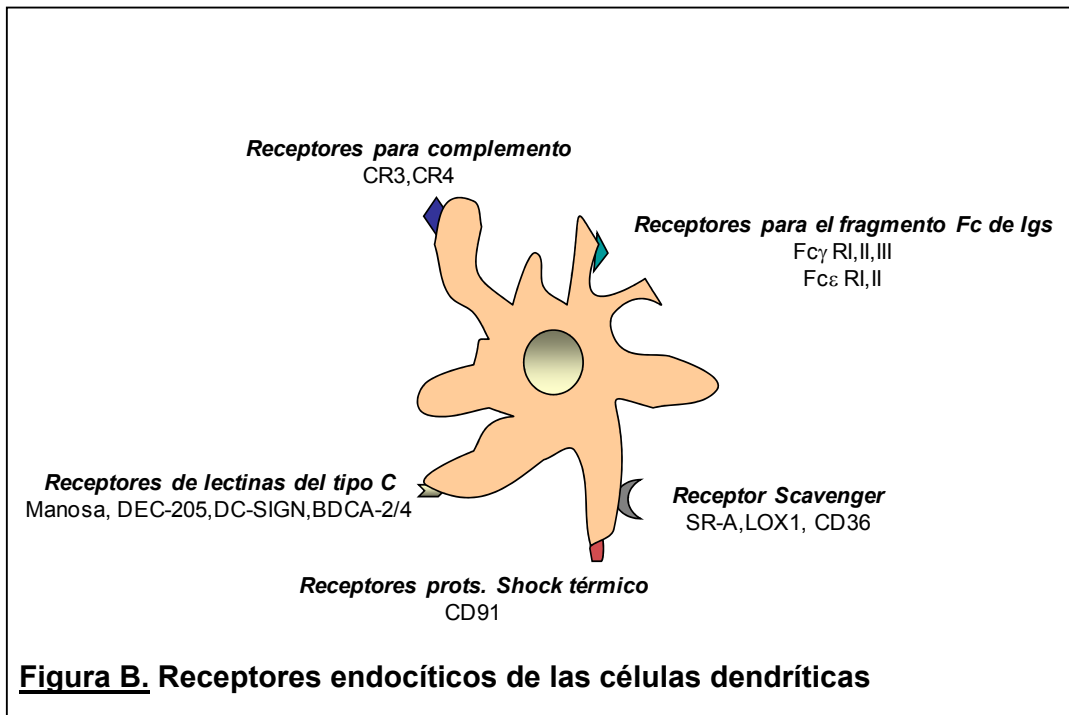
Las CDs inmaduras, se encuentran distribuidas en la mayoría de los tejidos periféricos, principalmente en la piel y las mucosas, donde constantemente evalúan la presencia de Ags a través de la emisión de dendritas. Estas células se caracterizan por su alta capacidad de internalizar Ags presentes en el medio extracelular. Dos vías fundamentales permiten la captación de Ags por estas células: endocitosis y fagocitosis. A la primera se la puede subdividir en macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores. A través de la macropinocitosis las CDs captan en forma constitutiva Ags solubles presentes en la fase fluída mediante la emisión de pseudópodos desde la membrana plasmática. El correcto funcionamiento de esta vía depende principalmente de la integridad del citoesqueleto (65), de la actividad de la bomba Na/H⁺ (66) y de la actividad de la PI3K (67). La endocitosis

mediada por receptores, involucra la formación de vesículas cubiertas de clatrina que son reconocidas por receptores como el de manosa, permitiendo también la internalización de Ags solubles (68).

A través de la fagocitosis, las CDs son capaces de captar Ags. particulados, mediante la desorganización del citoesqueleto de actina y la emisión de pseudópodos que engloban a la partícula permitiendo su inclusión en la vacuola fagocítica (69).

Las CDs presentan múltiples receptores que permiten la captación del Ag (ver **Figura B**) entre otros:

1. Los receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, que permiten la internalización de Ags luego de su interacción con Acs específicos.
2. Los receptores del complemento, involucrados no sólo en la captación de microorganismos *etiquetados* por las opsoninas generadas por activación de las cascadas del complemento, sino también en la internalización de células apoptóticas (70).
3. Receptores de la familia de las lectinas de tipo C, involucrados en el reconocimiento de carbohidratos.
4. Receptores para las proteínas del shock térmico (hsp), que reconocen Ags asociados a las hsp en células tumorales ó infectadas.
5. Receptores scavenger, que se caracterizan por su unión promiscua a ligandos policatiónicos permitiendo el clareado de lipoproteínas, así como la captación de patógenos, en particular de etiología bacteriana (71).



Cabe mencionar, que la fagocitosis de microorganismos opsonizados involucra la participación de los receptores Fc y de los receptores para el complemento, por el contrario en la fagocitosis de microorganismos no opsonizados participan principalmente los receptores de las lectinas del tipo C y los receptores scavenger.

Como mencionáramos, las CDs inmaduras presentan una alta capacidad endocítica, por el contrario su capacidad para procesar y presentar los Ags se encuentra muy restringida. En relación a sus características fenotípicas, presentan una baja expresión en la superficie celular de las moléculas CD80, CD86, CD40 y de la molécula del CMH de clase II. Esta última sin embargo, tiene una alta expresión a nivel intracelular.

Luego de la captación del Ag y en presencia de estímulos diversos, las CDs inmaduras sufren una serie de cambios fisiológicos que culminan con su *maduración*.

La maduración de las CDs puede ser desencadenada por estímulos de diferente naturaleza:

1. Mediante la liberación de productos patogénicos como el LPS, ADN CpG o ADN simple cadena. En su mayoría éstos son reconocidos por los receptores del tipo Toll (TLRs) (72). La interacción de estos componentes

con los TLRs correspondientes en la CD, desencadena la maduración de las mismas. Así por ejemplo, la interacción del ADN viral o bacteriano con motivos CpG reconocidos por el TLR9, el ARN viral de doble cadena reconocido por el TLR3, culminan con la maduración de las CDs.

2. Diversas citoquinas y mediadores inflamatorios liberados por las células de los tejidos infectados o de las células infiltrantes tienen la capacidad de inducir la maduración de las CDs, entre ellas se pueden mencionar, las citoquinas proinflamatorias: TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , los IFNs del tipo I y las prostaglandinas.
3. Señales liberadas por las células en condiciones de estrés, que serían reconocidas por las CDs a través de los TLRs (73) o del CD40 (74) también inducen maduración de las CDs.
4. Por último, cabe mencionar, la importancia de la señalización inducida a través de la molécula CD40, luego de su interacción con la molécula CD40L presente en los LT activados, que conduce a la maduración de las CDs, mientras que el linfocito T reconoce su Ag en la superficie de la misma (75). Este proceso, ocurre en el ganglio zonal.

Este proceso de maduración genera cambios en las CDs que resultan en la pérdida de su capacidad endocítica, así como en el incremento de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y de las moléculas del CMH de clase I y del CMH de clase II, lo que determina que se conviertan en óptimas presentadoras de Ags a los LT vírgenes (76-78). Asimismo, se producen de manera simultánea cambios a nivel de membrana, que determinan que comiencen a expresarse ciertas integrinas y receptores para quimioquinas que permitirán su migración a las áreas T de los nódulos linfáticos. Allí se localizan como CDs maduras y presentan los péptidos derivados del procesamiento del Ag a los LT vírgenes, dirigiendo de esta manera su diferenciación en células T efectoras y T de memoria. También, poseen la capacidad de desencadenar la inmunidad humoral (79-80).

Es decir, que una de las funciones principales de las CDs es la de actuar como nexo entre los tejidos periféricos y los órganos linfáticos, mediante el transporte del Ag. Otro componente importante en esta conexión está determinado por la capacidad de las CDs de recibir y transmitir la información en relación a la naturaleza del patógeno reconocido, así como características

de la génesis del proceso inflamatorio en curso (81). Estas características les permiten a las CDs no sólo iniciar la respuesta inmune adaptativa, sino además modular el tipo de respuesta inducida.

2.2 Regulación de la respuesta adaptativa por las células dendríticas.

Brevemente, debemos mencionar que la activación de los LT vírgenes y su posterior diferenciación en células T efectoras y T de memoria, dependen de 2 señales. La 1° está referida a la interacción entre el receptor del LT (TCR) con el péptido unido a la molécula del CMH de la CD. La 2° señal es aquella generada por la unión entre las moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) presentes en las CDs con la molécula CD28 en el LT (82). La concurrencia de ambas señales induce la activación de los LT vírgenes, que culmina con la expansión clonal y la diferenciación en células efectoras y de memoria (83). Para que el LT virgen se diferencie en un tipo particular de linfocito T efector, depende en última instancia del perfil de citoquinas secretado predominantemente por las CDs. Actualmente, se postula que esta sería la 3° señal necesaria para orientar la génesis de la respuesta adaptativa. Esta 3° señal, involucra a aquellos “ligandos” liberados por las CDs que determinan la orientación del perfil de la respuesta inmune adaptativa, a través de la diferenciación de los LT en (Th1, Th2 o LT citotóxicos (LTC) (84-85). En este sentido, La citoquina IL-12 sería un mediador que se libera como señal 3 y que promueve el desarrollo de los linfocitos en perfiles T_H1 o LTC (86), mientras que los ligandos Notch lo harían para los T_H2 (87-88).

Sin embargo, la polarización de la respuesta inducida por las CDs, es asimismo, influenciada y modificada por señales provenientes de otras células, o por señales que son originadas en el momento de reconocimiento del microorganismo por el TLR correspondiente (89). A modo de ejemplo, *Cándida albicans* en estado de levadura, cuando es incubada con CDs, induce la secreción de IL-12 y el desarrollo de respuestas del tipo T_H1, tanto in vivo como in vitro, mientras que en el estado de hifa, induce un perfil T_H2 con producción de IL-4 por los LT (90).

2.3 Inducción de tolerancia y de linfocitos T regulatorios por las células dendríticas

Como se mencionara previamente, la maduración de las CDs induce su migración hacia los órganos linfáticos secundarios, donde al presentar el Ag a los LT vírgenes darán inicio a la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, las CDs pueden migrar también en estado inmaduro. En estas condiciones, están imposibilitadas de desencadenar inmunidad, pero al no perder su capacidad para procesar, transportar y presentar Ags inducen tolerancia. De esta manera, al transportar auto-Ags captados en la periferia causan delección o anergia de los LT específicos, inhibiendo la diferenciación de LT vírgenes en efectores o suprimiendo la actividad de estos últimos. Este estado de semi-maduración se logra en condiciones en las que las señales de inflamación se encuentran ausentes, por lo que las CDs producirían niveles bajos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-12p70 (91). Asimismo, la ausencia de señales coestimuladoras induce tolerancia periférica al provocar un estado de no respuesta de los LT estimulados (92). En este sentido, ha sido demostrado que la internalización de cuerpos apoptóticos no induce la maduración de las CDs, pero incrementa la expresión de CCR7 (un receptor para quimioquinas fundamental para su migración a los ganglios linfáticos secundarios). Esto, permitiría la inducción de tolerancia contra Ags propios provenientes de las células que mueren por muerte programada (90). Otro mecanismo por el cual las CDs inmaduras son capaces de inducir tolerancia, es a través de la diferenciación de los LT regulatorios del tipo I (Tr1), productores de IL-10, contra Ags bacterianos, virales y parasitarios, tales como M. Tuberculosis, Hepatitis C, Schistosoma mansoni (93-94).

La regulación ejercida por los linfocitos Tr1 está mediada por la secreción de IL-10 y en menor medida por TGF- β , las cuales al actuar sobre las CDs, disminuyen la expresión de sus moléculas coestimuladoras (CD86/CD80) así como la de la molécula del CMH de clase II. Asimismo, se ven disminuidos los niveles de secreción de las citoquinas IL-12 y del TNF- α (95). Por lo cual, durante la génesis de las respuestas contra estos patógenos, la diferenciación de los linfocitos Th1, Th2 y LTC está deprimida. La función ejercida por los linfocitos Tr sería primordial para controlar el daño inmunopatológico al cual

son sometidos los tejidos del huésped al montar la respuesta inmune contra los Ags microbianos (96).

2.4 Procesamiento y presentación de antígenos.

Los Ags que fueron captados por las CDs o aquellos que se liberaron al citoplasma, deben ser convertidos en péptidos pequeños, proceso denominado procesamiento antigénico, para luego poder ser presentados en la superficie celular en el contexto de las moléculas del CMH. Estos péptidos servirán como ligandos de los receptores de los LT CD4⁺ y T CD8⁺ específicos, los que al recibir las señales coestimuladoras (CD86/CD80) otorgadas por las CDs, se activarán y diferenciarán a LT efectores.

Todas las células del organismo, a excepción de los glóbulos rojos expresan moléculas del CMH de clase I, mientras que las del CMH II se encuentran restringidas a las células presentadoras de Ags (CPA) profesionales, es decir, las CDs, los macrófagos y los LB (97).

2.4.1 Vías de procesamiento y presentación antigénica

Las CDs para procesar el Ag y asociarlo a las moléculas del CMH, utilizan dos vías principales que se detallan a continuación.

Vía endógena o biosintética.

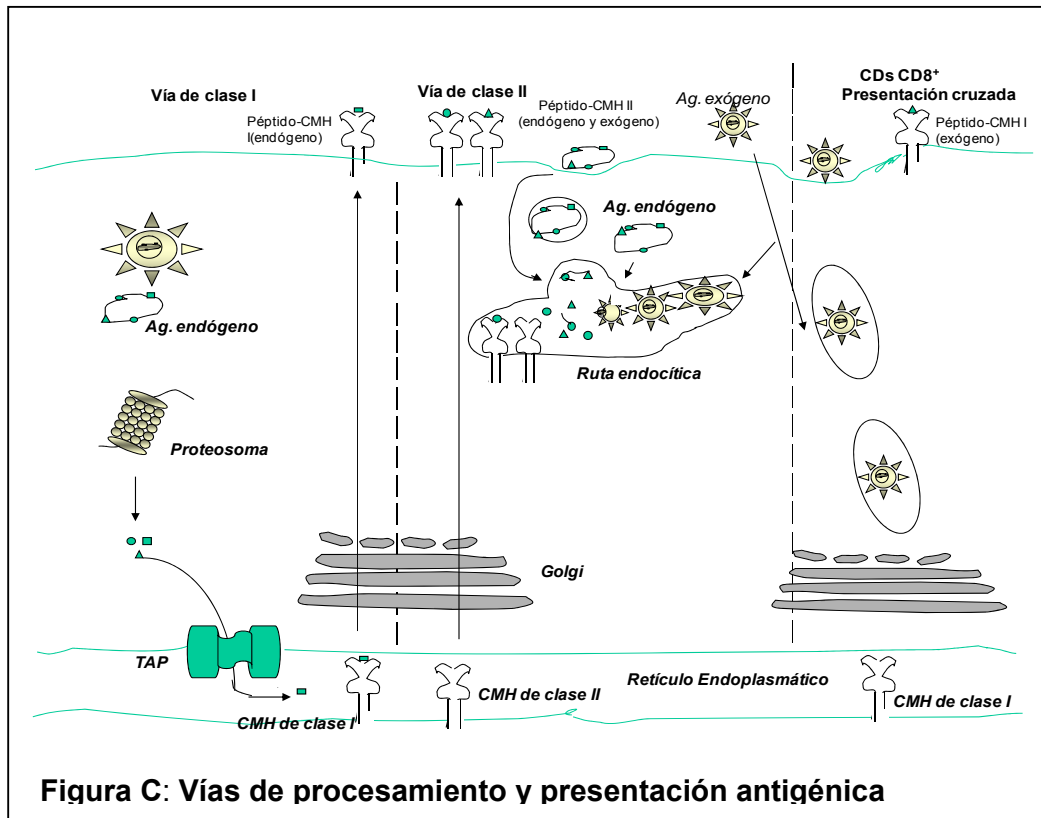
Genera péptidos para ser presentados por las moléculas del CMH de clase I a los LTC. Los péptidos presentados por esta vía provienen mayormente de la degradación de proteínas presentes en el citoplasma ya sean propias o de patógenos que se replican en él (98). A partir de esta vía, los Ags son degradados en el citoplasma por una enzima multicatalítica, el proteosoma, y luego translocados por los transportadores asociados a la presentación (TAP) al interior del retículo endoplasmático (RE), donde finalmente se unen a las moléculas del CMH de clase I (**Figura C**).

Vía exógena o endocítica

Genera péptidos para ser presentados por las moléculas del CMH de clase II a los LT CD4⁺. Esta vía está presente en los endosomas y es mediada por un conjunto de proteasas que degradan a las proteínas en este

compartimento. Los péptidos provienen principalmente de Ags exógenos (99-100).

En esta vía las vesículas endocíticas, que contienen a los Ags, se fusionan con otras vesículas que acidifican su contenido. Allí se lleva a cabo la degradación antigénica y luego, los péptidos resultantes se unen a las moléculas del CMH II que fueron transportadas desde el RE hacia la vesícula (**Figura C**).



3. Presentación cruzada de antígenos

Clásicamente, las células que expresaban moléculas del CMH de clase I presentaban péptidos derivados principalmente de las proteínas sintetizadas por la propia célula. Sin embargo, posteriormente pudo demostrarse en modelos murinos de trasplante alógeno, que en ciertas ocasiones los Ags presentes en el microambiente extracelular también podían ser presentados en moléculas del CMH de clase I y así activar a los LT CD8⁺ y estimular las respuestas citotóxicas. Este proceso fue denominado *presentación cruzada de antígenos* (101-102) (ver **Figura C**).

La presentación cruzada es la única vía por la cual el sistema inmune puede detectar y responder a las infecciones virales o mutaciones que sólo ocurren en las células parenquimales y no en las CPA derivadas de médula ósea (MO) (103). De las CPA profesionales, las CD3 son las que tienen mayor capacidad para presentar los Ags por esta vía (104-107). Para ello, el Ag es captado de proteínas de otros tejidos o células a través de la vía endocítica, por endocitosis o fagocitosis y luego es procesado por mecanismos distintos, lo que dependerá en gran parte de la naturaleza del Ag. El resultado final de la presentación cruzada, será el desarrollo de inmunidad o tolerancia (se hará referencia más adelante). Cuál sea el resultado, dependerá en gran medida de cómo el Ag es captado. Es así que la internalización de péptidos llevará a la tolerancia, mientras que en presencia de señales estimuladoras se originará inmunidad. En este sentido, las células en apoptosis liberan sustancias inmunomoduladoras, como las hsp, quienes representan señales de "peligro" promoviendo la inducción de inmunidad contra sus Ags (108).

En el estado de células vírgenes, los LT CD8⁺, se encuentran en muy baja frecuencia y en estado quiescente. En la iniciación de la respuesta inmune los Ags foráneos provocan la expansión clonal que culmina con la generación de LT CD8⁺ efectoras, tanto citotóxicas como productoras de citoquinas. En la fase efectora los LTC reconocen los blancos que expresan el Ag foráneo y los eliminan.

Las vías precisamente, en las que el Ag es presentado para estimular a las células TCD8⁺ vírgenes o efectoras, son diferentes. Durante la activación de los TCD8⁺ vírgenes estos deben reconocer el Ag unido a moléculas de clase I sobre la superficie de las CD3. Si la CD3 no sintetiza el Ag, debe tomarlo exógenamente desde los tejidos y exponerlo a través del mecanismo de presentación cruzada. Por el contrario, en la fase efectora de la respuesta, los LTC son estimulados por Ags presentados por moléculas del CMH de clase I de las células infectadas o transformadas que sintetizan el Ag (103). El mecanismo por el cual las células presentan sus Ags sintetizados internamente en moléculas del CMH de clase I, se conoce como *vía clásica de presentación*, la cual ha sido esquematizada en la **Figura C**.

3.1 Vía clásica de presentación

Todas las células reciclan sus proteínas mediante la degradación de éstas en el citoplasma o en el núcleo a través de la vía de ubiquitina-proteosoma (98,109). En este proceso, las proteínas son ubiquitinadas para luego ser degradadas (110-112). Las proteínas poliubiquitinadas y otras sin modificar son degradadas en oligopéptidos (113-114). La mayoría de éstos son además hidrolizados por peptidasas citosólicas para ser reutilizados por las células, pero una fracción de péptidos escapan de la destrucción y son transportados al retículo endoplasmático (RE) a través de un transportador denominado TAP. En el RE, los péptidos más largos son además clivados por la aminopeptidasa asociada al RE (ERAP1) en otros más pequeños de entre 8 a 9 residuos (115-118). Finalmente los péptidos se unen a las moléculas del CMH de clase I para luego ser translocados y presentados en la superficie celular, este mecanismo constituye entonces la *vía clásica de presentación* (**Figura C**). Las proteínas exógenas que no fueron producidas por la propia célula, no son procesadas y presentadas en moléculas del CMH I de la mayoría de las células, debido a que no pueden atravesar la membrana plasmática o los endosomas para luego acceder al compartimento citosólico.

3.2 Influencia del antígeno en la presentación cruzada

El mecanismo de internalización del Ag influye significativamente sobre la eficiencia de la presentación cruzada, en este sentido los Ags solubles, que son captados por macropinocitosis, son presentados pobremente. Mientras que, los Ags particulados, los cuales ingresan a las células por la vía de fagocitosis, son presentados más eficientemente en moléculas del CMH de clase I (119). Consecuentemente, éstos últimos generan respuestas citotóxicas más vigorosas respecto a las que son desencadenadas por Ags solubles (120).

En este sentido, se demostró que la adsorción de proteínas solubles a partículas inertes de 1-5 μm reduce las concentraciones de Ags necesarias para ser presentados a través de las moléculas del MHC de clase I 10.000 veces (119-121). Lo mismo fue observado para otro tipo de Ags particulados, las bacterias, que son eficientemente presentadas por esta vía, tanto por

macrófagos como por CDs (122). Las partículas que presentan un tamaño mayor a 1 μm son internalizadas por el proceso de fagocitosis. Tanto los macrófagos como las CDs inmaduras tienen una alta capacidad fagocítica e ingieren partículas antigénicas con alta avidéz. Así cuando este mecanismo es bloqueado en estas células con agentes como la citocalasina, que inhibe la despolarización de la membrana plasmática, la presentación de Ags particulados se ve reducida (123). Es decir, que la fagocitosis es el mecanismo por el cual los Ags particulados se presentan en forma cruzada. Sin embargo, las CDs inmaduras son la únicas células capaces de adquirir Ags pequeños ($<1\mu\text{m}$) y proteínas solubles a través del mecanismo de macropinocitosis en fase fluida y activar así la presentación cruzada de los mismos (103, 124). Pero qué determina que las respuestas citotóxicas sean más vigorosamente inducidas por la presentación cruzada de Ags particulados que de Ags solubles?. Este fenómeno guarda relación no sólo con el mecanismo por el cual el Ag fue captado sino también con las vías moleculares a través de las cuales el mismo es degradado para ser luego asociado a las moléculas del CMH de clase I. En este sentido, se sugiere que las vías por las cuales los Ags son presentados en forma cruzada son más fácilmente accesibles en los fagosomas o macropinosomas que en otros compartimentos endocíticos, ya que en este último caso el Ag debe escapar al citoplasma mientras que los fagosomas presentan la maquinaria que permite su procesamiento y presentación en las moléculas del CMH de clase I.

3.3. Vías involucradas en la presentación cruzada de antígenos: Mecanismos moleculares

Hasta el momento, se han podido describir tres modelos diferentes que explicarían los mecanismos por los cuales algunos Ags son procesados y presentados en moléculas del CMH de clase I. Mientras que las vías fagosoma-citosol y la retrógrada son dependientes de la acción del proteosoma, la vía vacuolar es independiente de éste para la generación de los péptidos antigénicos.

3.3.1 Vía *fagosoma-citosol*: Como se muestra en la **Figura D**, los Ags son internalizados en fagosomas o macropinosomas y desde allí serán transportados al citoplasma a través de un complejo constituido por proteínas que permite la formación de un poro en la membrana del fagosoma, dicho poro se conoce con el nombre de Sec61 (125-127). En un comienzo, se demostró que Sec61 se encuentra involucrada en la importación y exportación de proteínas hacia el lumen del RE (128), sin embargo también es capaz de translocar proteínas intactas desde el RE al citoplasma (92). Hace algunos años, se demostró que durante la fagocitosis existe la fusión de las membranas del RE con el fagosoma naciente (129-130), de tal manera que el fagosoma se asemeja en parte al RE en composición. En este momento, no es raro que los Ags exógenos, encuentren un compartimento que contenga al complejo Sec61, así como otros cofactores del RE vitales para su translocación y degradación (131). Una vez en el citoplasma, los Ags exógenos pueden re-ingresar en la vía clásica de presentación, por lo cual los serán clivados por el proteosoma. Los péptidos resultantes de esa degradación son transportados por TAP hacia el RE con el fin de que éstos se unan a moléculas del CMH I para finalmente ser presentados (132). En esta vía estaría involucrado el procesamiento de Ags particulados (123, 133).

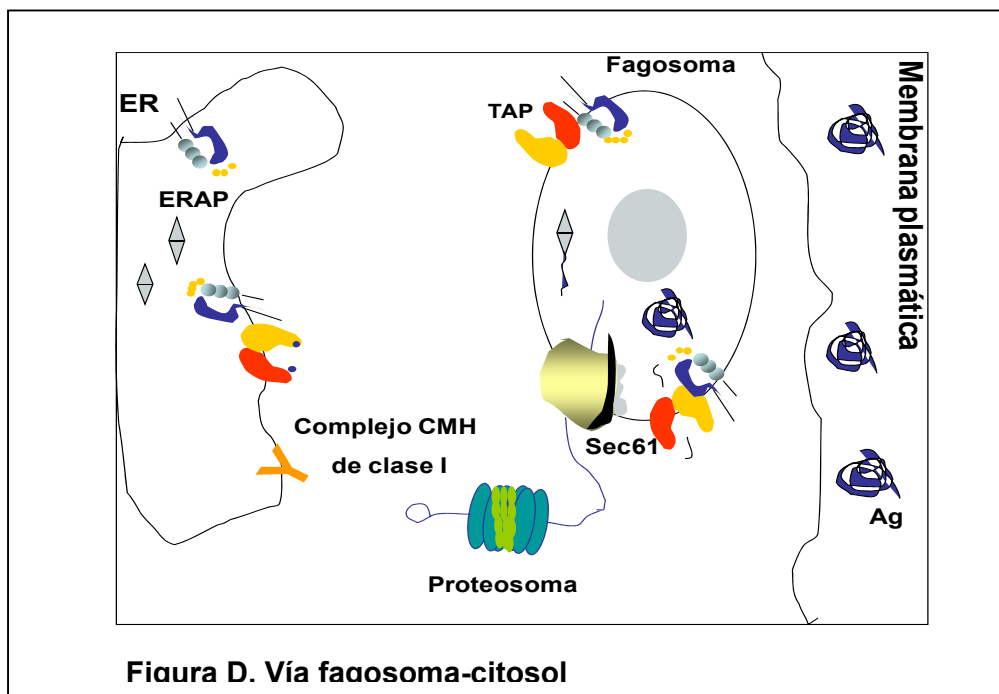
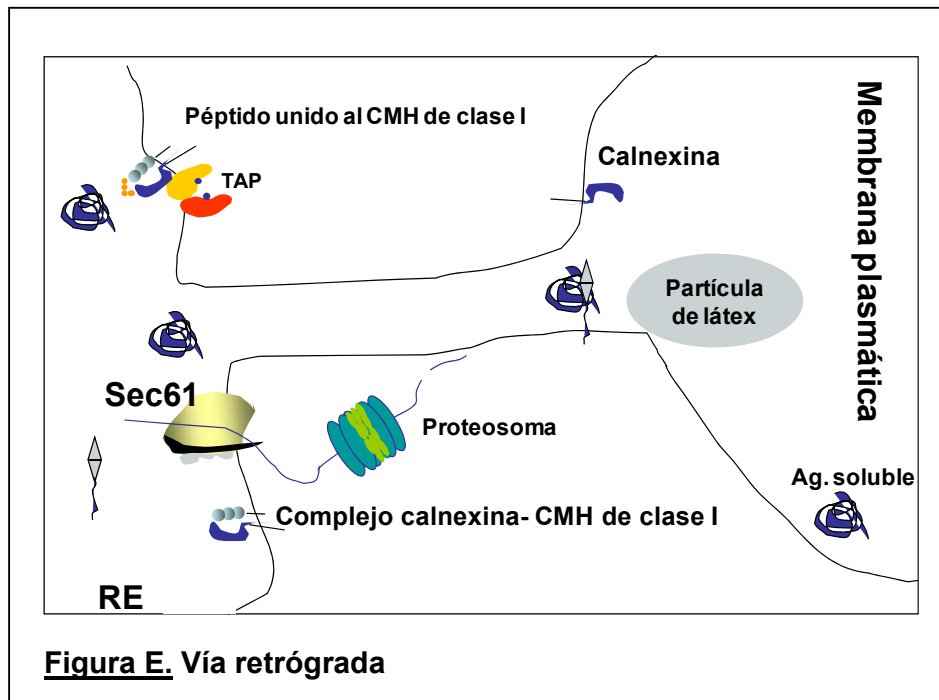


Figura D. Vía fagosoma-citosol

3.3.2 *Vía retrógrada*: para los Ags solubles, se ha propuesto recientemente que una vez que han sido internalizados en una vesícula, pueden acceder al lumen del RE debido a la fusión entre las membranas plasmáticas de éste y de la vesícula. Luego, a través de Sec61 presente en el RE, como se mencionó anteriormente, éstos son transportados al citoplasma para ser degradados por el proteosoma. Finalmente los péptidos resultantes ingresarían por TAP al RE para asociarse a las moléculas del CMH I (131, 134), como se observa en la **Figura E**.



3.3.3 *Vía vacuolar*: su mecanismo es independiente de TAP y del proteosoma (135), es decir que los péptidos presentados no son generados en el citoplasma, sino en otros compartimentos como vacuolas endocíticas. Las proteasas involucradas en esta vía parecerían ser diferentes a las de la vía fagosoma-citosol, y la catepsina S cumpliría con la función principal de degradación en la vía vacuolar, pero no así en la vía fagosoma-citosol (136). Respecto a cómo los péptidos se unen a las moléculas del CMH I, Harding (122, 137) postula que éstos serían exocitados de la vacuola para luego unirse en la superficie celular a moléculas del CMH I, sin embargo Rock (103)

propone que este evento se llevaría a cabo dentro la misma vacuola. Sugiere que los péptidos se unirían a moléculas del CMH I que han ingresado a las vesículas, provenientes de la membrana plasmática o del RE, por internalización, transporte o fusión con el fagosoma (129, 138-139). Sin embargo, aún no es claro como se produciría este fenómeno.

3.4 Células mediadoras de la presentación cruzada de antígenos.

Cuáles son las CPA más relevantes en inducir *in vivo* el mecanismo de presentación cruzada, aún es tema de debate. Sin embargo, ha sido demostrado, que las CDs y los macrófagos difieren en su capacidad proteolítica (140). Mientras ciertos Ags son degradados rápidamente en los macrófagos, una fracción de éstos queda protegida de la proteólisis en las CDs, debido a que queda retenida en el RE, haciendo más eficiente la presentación cruzada. De esta manera, la alta eficiencia de este mecanismo en las CDs comparada con la de los macrófagos, resultaría de la capacidad de las CDs para proteger los Ags exógenos de la destrucción por proteasas lisosomales (134).

Las poblaciones de CDs que participan presentando Ags por la vía de presentación cruzada a los LT CD8⁺, en cierta manera, dependen de la naturaleza del Ag. En experimentos en los cuales se inmunizaron ratones con células asociadas a Ags (141-143), infectadas con virus (144-146), se vio que las CD8α⁺ actuarían principalmente promoviendo la estimulación de los clones T CD8⁺. Por otro lado, la OVA asociada a células es presentada por CD8α⁺, mientras que la OVA asociada a complejos inmunes o soluble, puede serlo por CDs CD8⁺ y CD8⁻ (143,147).

La importancia del mecanismo de presentación cruzada se basaría en que las CDs inicialmente se encuentran presentes en todos los tejidos como parte de un sistema de vigilancia, y además, pueden adquirir Ags y migrar a los ganglios linfáticos drenantes donde interactúan y activan a los LT vírgenes. Si las CDs no pueden sintetizar ciertos Ags extraños, entonces deben captarlos exógenamente y luego presentarlos en moléculas del CMH I para generar una respuesta citotóxica. Esto sólo sería posible a través de la vía de presentación cruzada. Otra situación en la cual esta vía de presentación de Ags es importante, está relacionada con la vigilancia inmune de fagocitos infectados

con bacterias intracelulares, protozoos o parásitos. La presentación cruzada permitiría el reconocimiento de los fagocitos infectados por LTC, conduciendo a la producción de IFN- γ y colaborando con la activación de los fagocitos o promoviendo la muerte de las células infectadas para eliminar los reservorios de infección (103).

3.5 Contribución de la presentación cruzada de antígenos a la respuesta inmune: Inmunidad versus tolerancia

La generación de LTC tiene una importancia central en cuanto a su función de provocar la muerte de las células infectadas con virus, con bacterias intracelulares o células tumorales, sin embargo esta capacidad de los LTC tiene un precio. La generación de LTC específicos contra Ags propios es plausible de atacar tejidos propios y generar procesos autoinmunes. Debido a lo cual, es imprescindible regular finamente la generación de los LTC, maximizando su capacidad de muerte frente a patógenos pero minimizando su potencial autoinmune. Este control se produce principalmente en el timo durante la selección tímica, por la cual la mayoría de las células T auto-reactivas son eliminadas. Sin embargo, existe también control por el mecanismo de tolerancia periférica.

3.5.1 Rol de la presentación cruzada en las infecciones frente a virus

Como fuera mencionado en párrafos precedentes, el fenómeno de presentación cruzada fue principalmente descrito por su capacidad de generar inmunidad citotóxica contra los Ags menores de histocompatibilidad expresados por las células alogeneicas trasplantadas a receptores murinos (103). Posteriormente, se demostró que otros Ags, particularmente expresados por virus (81) y células tumorales (148) tenían la capacidad de generar *inmunidad* a través del mecanismo de presentación cruzada.

Desde hace algunos años se sabe que los virus pueden ser presentados de forma cruzada. Las células responsables de este fenómeno son las CDs. La inmunidad citotóxica fue demostrada para virus como el de la

polio (149), vaccinia (150), influenza (149) entre otros. Sin embargo, en estos casos es difícil descartar la presentación directa. Varios grupos se centraron en descartar este fenómeno, por tratamiento de las células hematopoyéticas con métodos químicos, físicos o inhibición de la infección, para descartar que la inmunidad generada fuese por procesamiento y presentación directa. Así logro demostrarse la inducción de inmunidad citotóxica específica contra el virus de la polio resultante del mecanismo de presentación cruzada, ya que la infección se indujo en ratones que no son los huéspedes naturales del virus por carecer del receptor de ingreso a las células humanas, el cual fue transfectado en las células no hematopoyéticas murinas (149,151). Cabe preguntarse, cuándo es importante la activación del mecanismo de presentación cruzada en las infecciones naturales? a) Cuando el virus se aloja en compartimentos linfoides periféricos como ocurre con el virus papiloma que infecta las células epiteliales de la piel (152); b) Cuando el virus evade la vía clásica de procesamiento y presentación restringida a la molécula del CMH de clase I (153-155); en estos casos la presentación cruzada es esencial para inducir inmunidad citotóxica ya que no hay presentación directa por CDs infectadas; c) cuando los virus tienen efectos perjudiciales sobre las CDs, como el virus de herpes (156), los retrovirus, el virus vaccinia (157) entre otros, en estos casos dado que las CDs son necesarias para primar la respuesta inmune, la conclusión lógica es que la inmunidad sea generada por presentación cruzada

Entonces, dos razones fundamentales hacen necesario el mantenimiento de este mecanismo durante las infecciones virales, para permitir la activación de los LT CD8⁺ vírgenes:

1. Generación de inmunidad citotóxica con virus tejido específicos que no infectan a las CDs
2. Generación de inmunidad contra virus que infectan a las CDs pero inhiben su función

Un párrafo aparte merece la generación de LTC anti-tumorales, existirían dos posibilidades para ello; 1) que los LTC sean primados por reconocimiento directo del Ag en la célula tumoral o 2) que los Ags tumorales sean presentados en forma cruzada por las CDs del huésped. Hasta el momento, han sido halladas evidencias de ambas posibilidades (148,158). Sin embargo, aún no han podido encontrarse datos concluyentes en cuanto al rol de la

presentación cruzada de Ags en el mecanismo de inmunovigilancia frente a tumores espontáneos. En este sentido, algunos tumores son de etiología viral, en estos casos es probable que la presentación cruzada de los Ags virales pueda limitar la tumorigénesis. Sin embargo, hasta el momento es difícil establecer el rol real de la presentación cruzada en la inmunidad de los tumores naturales, ya que numerosos tumores espontáneos escapan a la inmunovigilancia.

3.5.2 Participación de la presentación en el mantenimiento de la tolerancia

La presentación cruzada de Ags llevada a cabo por las CDs sería un mecanismo sumamente importante para el mantenimiento de la tolerancia central (159) y también periférica (160-161). Fue demostrado que ciertos Ags de histocompatibilidad son presentados dentro del timo a través de esta vía, determinando la tolerización por delección de LTC (162), es decir la eliminación de los clones específicos por apoptosis a través del sistema FAS/FASL. A este proceso se lo denominó *tolerancia cruzada*. Posteriormente, se observó lo mismo para Ags expresados extra-tímicamente en órganos como el páncreas y el riñón (160-161). Se pudo establecer que estos Ags podían ser constitutivamente presentados a través de esta vía por CPA derivadas de MO, como las CDs (163). Cabe destacar que serían los niveles de expresión del Ag los que determinarían el estado de tolerancia a lo propio. Las altas dosis de Ag conducirían a la tolerancia por delección a través de la presentación cruzada mientras que las bajas dosis serían ignoradas (164). Asimismo, se encontró que cuando la cantidad de Ag es suficiente para causar presentación cruzada, las tasas de delección pueden ser afectadas también por la dosis. En este sentido, Morgan y col. (165) observaron una más rápida delección de los LTC específicos para hemaglutinina en ratones transgénicos homocigotas que en los heterocigotas, debido a la alta expresión de hemaglutinina en el páncreas de los primeros.

Asimismo, otras consideraciones a tener en cuenta para la inducción de tolerancia por el mecanismo de presentación cruzada de Ags propios son el sitio de expresión del Ag y la edad del huésped (166-167). Se encontró que la presentación cruzada de los Ags de los islotes del páncreas es evidente recién

luego de la tercer semana de vida de los ratones diabéticos obesos (NOD) (165). Un fenómeno similar se encontró para otros Ags expresados transgénicamente en las células β del islote como la OVA y la hemaglutinina (167). Sin embargo, pudo demostrarse en todos estos casos que este hecho no tenía que ver con la pérdida de expresión del Ag, sino más bien con una supresión de la presentación cruzada de Ags pancreáticos durante las etapas tempranas del desarrollo. Un hecho interesante de resaltar, es que este no es un mecanismo operativo en todos los tejidos ya que la OVA expresada en el hígado sufre el proceso de presentación cruzada tempranamente, en diferentes modelos murinos (166). De forma tal que, la consecuencia más importante de la activación tardía de la presentación cruzada de Ags pancreáticos, es la falta de generación de LTC específicos en ratones jóvenes. Así, se observó que ratones que expresan transgénicamente hemaglutinina en las células β del páncreas, al ser infectados tempranamente con el virus de influenza, generan LTC específicos para la hemaglutinina que causan el desarrollo de la diabetes autoinmune (167). Por el contrario, en ratones adultos que han eliminado los clones de LTC específicos para el Ag, no se induce la diabetes autoinmune por infección con el virus de influenza. Esta regulación tanto temporal como regional del mecanismo de presentación cruzada, podría explicar en cierta medida de qué manera se induce la diabetes infantil en el hombre, al fallar la generación de los LTC específicos contra los Ags del islote pancreático y no ser tolerizados tempranamente del repertorio normal.

4. Desarrollo de los procesos alérgicos

4.1 Generalidades

La disfunción en la regulación del sistema inmune contribuye al desarrollo de patologías. Un ejemplo de ello son las reacciones de hipersensibilidad, dentro de las cuales se incluyen a las enfermedades autoinmunes en las que la respuesta está dirigida contra Ags propios, y a las respuestas inmunes que carecen de una regulación adecuada, dirigidas contra Ags foráneos. Estas reacciones desencadenan daño tisular debido a la acción

de los mecanismos normalmente utilizados por el sistema inmune para combatir a los patógenos.

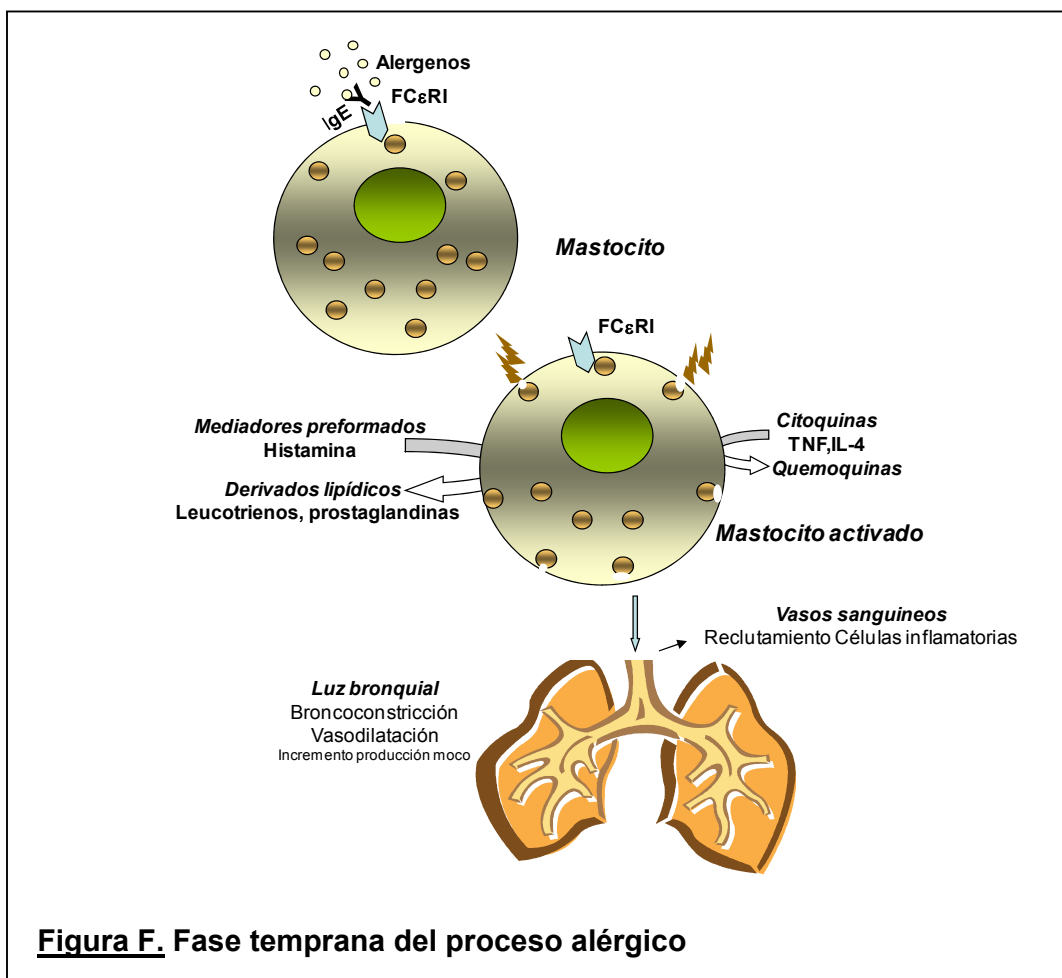
Gell y Coombs (168) clasificaron a las reacciones de hipersensibilidad en cuatro tipos, de acuerdo al mecanismo inmunitario involucrado en su etiopatogenia. En este sentido, se hará referencia a las de tipo I, dentro de las cuales encontramos al asma, las rinitis alérgicas, alergias alimentarias y angioedema, entre otras.

El asma es un trastorno inflamatorio crónico de la vía aérea que se caracteriza por la obstrucción del flujo aéreo en grado variable, hiperreactividad bronquial, inflamación de la vía aérea con infiltración crónica por eosinófilos, producción excesiva de moco y concentración sérica elevada de IgE (169).

Los alergenos son considerados Acs ambientales que desencadenan una respuesta inmune del tipo T_H2 con producción de IgE. Su naturaleza determina que en los procesos alérgicos, los órganos más afectados sean principalmente la piel y los tractos respiratorio y gastrointestinal. Todos los individuos están expuestos a alergenos y normalmente responden frente a ellos con una respuesta inmune que se caracteriza por bajos tenores de Acs específicos de tipo IgG1 e IgG4, asociada a un perfil del tipo T_H1 . Sin embargo, hay personas que generan una respuesta caracterizada por la producción de Acs IgE alergeno específicos, a las cuales se las denomina atópicas. En ellas, frente a la exposición al alergeno podrán desarrollar un proceso alérgico en el cual se pueden describir dos etapas; una fase temprana y una tardía (170).

Durante la fase temprana, la principal célula efectora es el mastocito (**Figura F**). Frente al primer encuentro con el alergeno, éste es captado, procesado y transportado por las CDs al ganglio linfático local donde es finalmente presentado a los LT $CD4^+$, originando una respuesta T_H2 que conduce a la producción de Acs IgE alergeno-específicos. Éstos viajan a los diferentes tejidos y se unen a los receptores de alta afinidad para IgE, a través de su porción Fc, a la superficie de basófilos y mastocitos. Así, se genera en el individuo un estado de sensibilización que condiciona que frente a una segunda exposición del individuo a ese mismo alergeno, se activen los mastocitos por unión de este Ag a las IgE que se encuentran ancladas en su superficie. Con su activación, el mastocito se degranula y rápidamente libera HIS, y luego mediadores lipídicos (leucotrienos y prostaglandinas) citoquinas,

quimioquinas y el factor activador plaquetario, originando una serie de eventos, consistentes en: contracción del músculo liso bronquial e intestinal, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular e hipersecreción de moco. Por otro lado, el mastocito activa receptores de las células endoteliales y epiteliales amplificando la reacción inflamatoria, también conduce al aumento de la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio inflamado a través de la liberación de diferentes citoquinas, favoreciendo el reclutamiento de leucocitos a través de la producción de quimioquinas dando inicio a la fase tardía (170).



Ésta se inicia entre las seis y nueve horas de la exposición al alérgeno, pudiendo resolverse lentamente o bien perpetuarse originando procesos inflamatorios crónicos. Como se muestra en la **Figura G**, las principales células efectoras de esta etapa son los eosinófilos y los linfocitos Th2. En las vías

aéreas se reclutan en primer lugar neutrófilos y eosinófilos y luego LT. Las citoquinas como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 junto con otros mediadores producidos por los mastocitos, eosinófilos y las propias células epiteliales del tejido afectado, serían los responsables de perpetuar la respuesta inflamatoria desencadenada por el alérgeno (171).

La IL-4 tiene un rol inicial en la determinación del perfil de la respuesta inmune adaptativa del tipo T_H2 , junto con la IL-13 induce además el cambio de clase a IgE. La IL-5 es importante para la infiltración y la activación de los eosinófilos. La IL-13 promueve también la hipersecreción de moco y regula la hipersensibilidad a nivel de las vías aéreas (170-174).

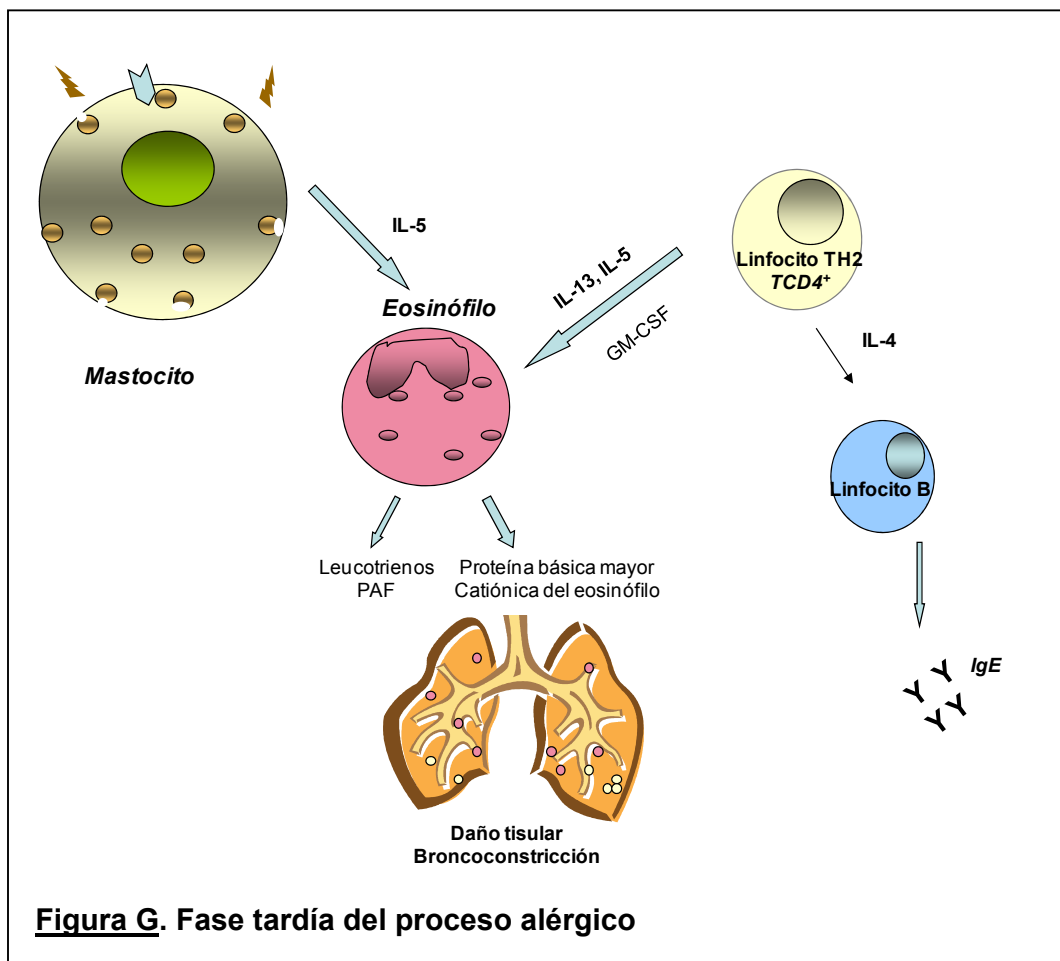


Figura G. Fase tardía del proceso alérgico

4.2 Función de las células dendríticas en los procesos alérgicos

En relación al rol que desempeñan las CDs en la alergia y sus implicancias en el asma, recientemente se ha propuesto que a nivel pulmonar, la decisión para el disparo de una respuesta inmune o bien para el establecimiento de la tolerancia, dependería de diferentes factores. El grado de maduración de las CDs que interactúan con los LT vírgenes influiría en esta decisión, debido a que se ha observado que las CDs inmaduras inducen células T abortivas y también regulatorias (175-176), lo que contribuiría con la tolerancia respiratoria. En ratones, la eliminación de las pCDs lleva a una ruptura en la tolerancia a la OVA y al desarrollo de inflamación asmática (177). En ausencia de estas células, las CDs mieloides se vuelven más inmunogénicas y promueven la formación de citoquinas efectoras para células T en división. El mecanismo involucrado en la tolerancia inducida por las pCDs se desconoce (178). Otra explicación para las propiedades tolerogénicas de estas células, estaría relacionada con su fenotipo inmaduro, ya que se demostró que al ser aisladas de pulmón eran capaces de promover T regulatorios específicos para OVA (177).

Por otro lado, la eliminación de las CDs mieloides durante la etapa de desafío con el alérgeno, llevó a la desaparición de todas las características típicas del asma, como inflamación de las vías aéreas, hiperreactividad bronquial, entre otras (179).

Se propone entonces, que las CDs de las vías aéreas cumplirían con roles importantes no sólo en la sensibilización frente a la inhalación de alérgenos, sino también en el mantenimiento de la inflamación de las vías aéreas, con infiltración de eosinófilos, a través de la inducción de respuestas del tipo T_H2 en los nódulos drenantes y en el control del reclutamiento y la activación de células efectoras $Th2$ en los sitios de inflamación (178).

4.3 Rol de los linfocitos $CD8^+$

Los requerimientos celulares y de citoquinas durante la fase de sensibilización difieren considerablemente de aquellos necesarios para la fase de desafío, mantenimiento y progresión del proceso alérgico (180). En ratón, se

tienen evidencias que la IL-4 cumpliría un rol relevante en la fase inicial, mientras que su desaparición en la fase de desafío no tendría efecto. Contrariamente, la IL-13 sería importante en esta etapa, ya que la reducción de sus niveles durante el desafío conduce a la atenuación en el desarrollo de la hiperreactividad bronquial, inflamación de las vías aéreas, hipersecreción de moco, entre otras (180-182). Los LT CD4⁺ han sido siempre considerados como las células responsables de las patologías asociadas con los procesos alérgicos. Sin embargo, en modelos murinos de asma alérgica, la depleción de estas células, posterior a la sensibilización, no genera efectos importantes en la respuesta desencadenada frente al desafío con el alérgeno. Esto sugiere que otros tipos celulares podrían estar involucrados en el mantenimiento de la hiperreactividad bronquial e inflamación de las vías aéreas.

Desde hace un tiempo, se demostró la existencia de al menos dos poblaciones distintas de LT CD8⁺. Los TC1 que secretan citoquinas del tipo T_H1 y los TC2 quienes liberan del tipo T_H2 (183-185). Se tienen evidencias sobre la existencia de esta última población tanto en humanos como en ratones (183-189). Las TC2 secretan preferentemente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e in vitro se ha demostrado que pueden desarrollar citotoxicidad mediante la vía de las perforinas, mientras que los TC1 secretan principalmente INF γ y median citotoxicidad no sólo por perforinas sino también a través de los mecanismos mediados por Fas/FasL (190-191).

Hace algunos años se demostró que durante los procesos alérgicos se produce una acumulación significativa de LT CD8⁺ en el pulmón del tipo TC2. En ratones CD8^{-/-} sensibilizados y desafiados con OVA, se pudo observar una reducción en la hiperreactividad bronquial e inflamación de las vías aéreas como así también una disminución de los niveles de la IL-13 en el lavado bronquial y en sobrenadantes de cultivos de nódulos linfáticos peribronquiales, al comparar con los ratones controles (192). Además, mediante experimentos de transferencia adoptiva se demostró que los LT CD8⁺ primados con OVA, pero no los vírgenes ni tampoco los primados con OVA provenientes de ratones deficientes en IL-13, lograron in vivo re-establecer los niveles de IL-13 necesarios para la aparición de esa sintomatología. Por lo tanto, los LT CD8⁺ Ag específicos, capaces de producir IL-13, tendrían un rol crítico en la

hiperactividad bronquial e inflamación de las vías aéreas inducidas por alérgenos, siendo requeridos para el desarrollo de estas respuestas (192).

4.4 Rol de la histamina en la alergia

Con la identificación del H4R y el hecho de que éste se encuentre expresado en células íntimamente ligadas al desarrollo y perpetuación de las respuestas alérgicas, se sugirió que este receptor podía mediar los efectos de la HIS en el asma y otras enfermedades alérgicas. A partir de un modelo de inflamación alérgica de las vías aéreas inducida por OVA, desarrollado en ratones deficientes en el H4R, se encontró que este receptor estaría involucrado en la quimiotaxis de mastocitos, eosinófilos y CD₄⁺ y también en la modulación de la producción de citoquinas en células T y CD₄⁺ (193-198). La HIS actuando a través del H4R desencadena las señales necesarias para la activación de los LT CD₄⁺ mediada por las CD₄⁺ (199).

En el pulmón, el H4R se expresa, principalmente en células del sistema inmune y en el epitelio bronquial a bajas proporciones (198). La estimulación de este receptor en células T humanas induce la secreción de IL-16, un quimioattractante de los LT CD₄⁺, siendo este efecto similar al que se observa por estimulación del H2R. Dado que en un modelo murino de asma alérgica, se encontró que la IL-16 inhibiría la inflamación y la hiperreactividad bronquial, Morgan y col. (200) investigaron cómo la liberación de IL-16 a través de la estimulación del H4R resultaría en ese mismo efecto inhibitorio, para lo cual utilizaron un modelo de asma murino. En éste (201) los ratones recibieron instilaciones intratraqueales de un agonista del H4R (4MH). Este tratamiento condujo a la atenuación de la inflamación en las vías aéreas y de la hiperreactividad bronquial y este efecto fue independiente de la acción de la IL-16, como lo demostraron los ensayos con ratones que no expresaban la IL-16 respecto a los controles. Además, se registró un incremento de las células T y como era esperado también de eosinófilos en los pulmones de estos ratones. Al analizar el fluido bronquial se encontraron aumentados los niveles de INF- γ e IL-10 y disminuidos los de IL-13. Por otro lado, se observó que a través de la estimulación del H4R con el agonista 4MH se reclutaron células T_R CD25⁺FoxP3⁺, éstas cumplen con la función de inhibir la actividad de

proliferativa de los LT, siendo este efecto dependiente de IL-10 e independiente de TGF β - o IL-6 (200).

Estos hallazgos indicarían que la administración de antagonistas para los receptores H1R y H4R podría representar una nueva metodología terapéutica para la supresión de las respuestas alérgicas inflamatorias. Sin embargo el uso de un agonista para el H4R, como fue mencionado, también podría contribuir en la atenuación de la inflamación asmática.

OBJETIVOS

Durante la génesis de la respuesta inflamatoria la histamina es liberada por los mastocitos ubicados en las superficies mucosas y la piel. A pesar de la estrecha proximidad de estas células con las CDs, es poco lo que se conoce de la influencia ejercida por la amina sobre muchos de los mecanismos desarrollados por las CDs, más allá de la regulación del perfil de citoquinas. Teniendo en cuenta estos antecedentes es que el objetivo central de este trabajo de Tesis fue estudiar la modulación ejercida por la histamina sobre la funcionalidad de las CDs murinas.

Para dilucidar este objetivo central en primer lugar evaluamos los siguientes objetivos generales sobre las CDs murinas:

- a. Determinación de la expresión de los receptores histaminérgicos
- b. Producción de histamina endógena.

Una vez estudiadas las condiciones basales de las CDs, evaluamos la acción de la histamina exógena, a través del estudio de los siguientes objetivos particulares:

- 1) Modulación de la capacidad endocítica, mecanismos involucrados y receptores histaminérgicos involucrados.
- 2) Análisis fenotípico y modulación del cultivo mixto linfocitario.
- 3) Impacto del microambiente
- 4) Presentación de antígenos exógenos a través del CMH de clase I. Mecanismos involucrados en la modulación de la presentación cruzada de antígenos. Análisis de la captación de Ags. solubles vs. Ags. particulados.
- 5) Finalmente, se evaluó in vivo usando un modelo de asma murino inducido por ovoalbúmina, las consecuencias de la modulación ejercida por la histamina sobre las CDs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ratones

Se utilizaron ratones hembras endocriados C57BL/6 y BALB/C provenientes del bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires. Los ratones fueron utilizados entre los 2-3 meses de edad. Los mismos, fueron mantenidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ bajo un régimen automatizado de luz-oscuridad de 12 horas, de acuerdo a la reglamentación institucional.

2. Obtención de células dendríticas murinas

Las CDs se obtuvieron de precursores de MO de ratones C57BL/6 y BALB/C según lo descrito previamente por Inaba y col. (202) con modificaciones menores (203). Las epífisis del fémur y de la tibia fueron seccionadas, y luego la MO fue extraída mediante perfusión del canal medular con medio RPMI 1640 (Invitrogen). A continuación, se lisaron los eritrocitos utilizando cloruro de amonio al 0,083%. Las células se lavaron y se suspendieron a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio completo (MC): RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), $5,5 \times 10^{-5}$ M de mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y 1% de penicilina-estreptomicina (Invitrogen).

A éste se le adicionó 30% de medio condicionado proveniente de la línea celular J588-GM productora del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Macrófagos (GM-CSF). Las células se cultivaron durante 9 días, realizando cambios de medio cada 48 hs. Al noveno día de cultivo, más del 85% de las células recolectadas expresaban moléculas del CMH de clase II, CD40, CD86 y CD11c, pero no expresaban Gr-1.

3. Estudio de la expresión del H1R y H2R mediante el ensayo de unión de ligandos a receptores.

Para este ensayo se emplearon los ligandos [^3H]-Mepiramina y [^3H]-Tiotidina los cuales se unen a los receptores H1R y H2R, respectivamente. Los estudios se hicieron por duplicado en tubos de polietileno en Tris-HCl

50mM, pH7,4 como fue descrito previamente (204,205). En los ensayos de saturación se emplearon concentraciones crecientes de [³H]-Mepiramina en un rango de 0,01 a 15 nM, y de [³H]-Tiotidina en un rango de 0,4 a 130 nM. Las células (10⁶/tubo) se incubaron 40min con o sin 10μM de radioligando en un volumen final de 100μl, la reacción se frenó con 50 mM frío de Tris-HCl a pH7,4 y filtración rápida bajo presión reducida en filtros de fibra de vidrio GF/B Whatman, seguido por tres lavados con 3 ml de tampón frío. Los experimentos se desarrollaron a 4° C para eliminar la internalización del ligando. La concentración de los receptores se expresó en sitios por célula.

En todos los casos, la unión específica fue calculada mediante la resta de las sitios por célula del ligando unido inespecíficamente a los del ligando unido total. El análisis de datos del radioligando unido se hizo con el programa GraphPad Prism3.00 para Windows. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA de un factor con el test de Dunnett's post con el programa GraphPad InStat versión 3.01.

4. Análisis de la expresión del H3R y H4R por RT-PCR

Como controles positivos se utilizaron ARN total de cerebro (para el H3R), MO (para el H4R). Asimismo, se extrajo el ARN total de las CDs de ratón. Las extracciones se llevaron a cabo utilizando el reactivo Trizol (Gibco-Life Technologies). La reacción de transcripción reversa (RT) se realizó empleando 3 μg de ARN total y 50 U de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega). Los cebadores o *primers* fueron provistos por Invitrogen. *Primers* de sentido directo para el H3R y el H4R: **TAC AAG GGC CTG GCC GTA GAA GG** y **CGT GTT GTT TAA CTG GAA TTT TGG AAG TGG AAT CTG CAT G**, respectivamente. *Primers* anti-sentido para el H3R y el H4R: **GCT GTC GCG GGA CAA GAA GG** y **ACC AAG AAA GCC AGT ATC CAA ACA GCC ACC ATT TGA GC**, respectivamente. Las reacciones de PCR fueron realizadas con un equipo GeneAmp (Applied Biosystems). Para el H3R: se efectuó un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1minuto, 61°C por 40 segundos y 72°C por 1 min. Finalmente, se realizó un paso final de elongación a 72°C durante 7 min. Para el H4R: se realizó un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min,

seguido por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos y 72°C por 2 min. Finalmente, se realizó un paso final de elongación a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1,5%, teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados a través de un transiluminador ultravioleta.

5. Producción de histamina

La producción endógena de HIS fue determinada en sobrenadantes de CDs murinas empleando un Kit de ELISA comercial (IBL), siguiendo el protocolo del fabricante.

6. Endocitosis de OVA-FITC

Las CDs fueron suspendidas en MC en una concentración de $1,0 \times 10^6$ /ml y se incubaron con 100 µg/ml de OVA conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 min a 37°C en medio RPMI 1640. Por último se lavaron tres veces con tampón fosfato (PBS) frío conteniendo suero fetal bovino al 1%. La captación de OVA-FITC se analizó utilizando un citómetro FACScan y el software CellQuest (BD Biosciences). El nivel basal de fluorescencia (células incubadas con OVA-FITC a 4°C) fue sustraído de los valores obtenidos. En algunos experimentos, las muestras fueron adquiridas en presencia de 200 µg/ml de azul tripán para eliminar la fluorescencia extracelular, como fuera descrito previamente (203, 206). La eficacia del mismo para eliminar la fluorescencia extracelular fue controlada en experimentos en los cuales las CDs se marcaron con un Ac monoclonal-FITC dirigido a Ags de la superficie celular (30min a 4°C). En todos los casos, se observó que cuando la adquisición se llevó a cabo con el azul tripán, la intensidad de fluorescencia disminuyó en más de un 85%. En algunos experimentos se adicionaron, 15min antes de la OVA-FITC, inhibidores de la macropinocitosis: Citocalasina B (Cit B) (5 µg/ml) que lleva a la desorganización de los microfilamentos de actina, Wortmanina (Wort) (200 nM) que inhibe a la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), o el competidor del receptor de manosa (RM); manano (Man) (1mg/ml). El análisis fue realizado utilizando un

citómetro FACScan y el software CellQuest (BD Biosciences). Los resultados se expresan como la intensidad media de la de fluorescencia (IMF).

7. Endocitosis de HRP

El ensayo de endocitosis de la enzima peroxidasa de rábano (HRP) se desarrolló de acuerdo con la técnica previamente descrita (68). Las CDs se suspendieron con MC hasta una concentración de 1×10^6 /ml y se incubaron con HRP 150µg/ml durante 30min a 37°C. Luego, se lavaron cuatro veces con PBS conteniendo SFB al 1% y otras cuatro veces con PBS frío, finalmente se lisaron durante 30min con Tritón X-100 (0,05%) en 10 mM de tampón Tris, pH 7,4. En algunos experimentos, se adicionó previamente a la enzima, un competidor del RM, el Man (1mg/ml), por 15 min a 37° C.

La actividad enzimática en los sobrenadantes resultantes de la lisis celular se determinó mediante el agregado de O-phenylendiamina (OPD) como sustrato y la posterior lectura de la absorbancia a 492nm. La captación de HRP por las CDs se determinó como la diferencia entre las actividades de HRP en células permeabilizadas y no permeabilizadas. La actividad de HRP en CDs no permeabilizadas fue siempre <15% comparada con las permeabilizadas. Los resultados se expresan como valores de densidad óptica (DO).

8. Adsorción de OVA a perlas de látex

OVA u OVA-FITC (200µg/ml) se acoplaron a la superficie de perlas de látex, de 3 µm, mediante adsorción pasiva y un lavado posterior intensivo, siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Polysciences).

9. Fagocitosis de perlas de látex adsorbidas a OVA-FITC

Las CDs (1×10^6 /ml) se incubaron en 200µl de MC con 50µl de perlas de látex (10^9 partículas/ml) conjugadas a OVA-FITC durante 3hs a 37°C. La adquisición de las muestras se llevó a cabo en presencia de azul tripán (200µg/ml) para eliminar la fluorescencia extracelular. La captación de perlas de látex conjugadas a OVA-FITC se cuantificó por citometría de flujo. Los

resultados se expresan como IMF. Asimismo, se analizó por microscopía de fluorescencia la fagocitosis de las partículas por las CDs.

10. Análisis fenotípico de las células dendríticas mediante citometría de flujo

Para evaluar la expresión de moléculas en la superficie de las CDs se utilizaron los siguientes Acs conjugados a FITC: anti-CD11c, anti-CD40, anti-CD86, y conjugados a ficoeritrina (PE): anti H-2K^b (CMH de clase I), anti-IA^b y anti-IA^d (CMH de clase II) y anti-GR-1 (BD, Pharmingen, San Diego, CA). Las suspensiones celulares (5×10^5 células) fueron incubadas a 4°C durante 30 min con 1 µg de los Acs indicados, diluidos en PBS con 1% de SFB. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y finalmente suspendidas en 400 µl de tampón Isoflow (Beckman). Los controles de isotipo se utilizaron como controles negativos de marcación específica. El análisis fue realizado por citometría de flujo utilizando un citómetro FACScan y el software CellQuest (Becton Dickinson). Los resultados se expresan como la IMF.

11. Estimulación de la proliferación de linfocitos T por células dendríticas

La capacidad de las CDs tratadas con HIS de estimular la proliferación de los LT, fue evaluada *in vitro* mediante la realización de un cultivo mixto linfocitario (CML). Para lo cual, esplenocitos ($2,5 \times 10^5$ ó 5×10^5) provenientes de ratones BALB/c normales fueron co-cultivados en placas de 96 pocillos con 5×10^4 CDs (provenientes de ratones C57BL/6) tratadas o no con 0,1 µM de HIS. Las células fueron co-cultivadas durante 96 hs en MC. A las 72 hs, las células fueron pulsadas con [³H] timidina (1µCi/pocillo, DuPont).

Luego, las células fueron recolectadas utilizando un cosechador semiautomático (Skaron Instruments), y la cantidad de [³H] timidina incorporada fue determinada en un contador de centelleo (Wallac 14, Perkin Elmer Life Sciences).

12. Determinación intracitoplasmática de la producción de citoquinas: IL-10, IL-12 e INF- γ .

Para la determinación intracitoplasmática de las diferentes citoquinas las CDs, previamente estimuladas, fueron incubadas de 6 a 18 hs, dependiendo de la citoquina a evaluar, con brefeldina para bloquear la secreción de las citoquinas del citoplasma. Luego de ese período, se llevo a cabo la fijación de las células con paraformaldehído al 0,5% en PBS, se procedió luego a la permeabilización con saponina 0,1% en PBS, y finalmente a la marcación de las citoquinas intracitoplasmáticas con los Acs correspondientes.

Una vez realizada la marcación, las células se resuspendieron en tampón isoflow y se adquirieron en un citómetro FACScan. Los resultados se expresan como la media del % de células positivas productoras de la citoquina estudiada.

13. ELISA para la determinación de la concentración de citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares.

La producción de citoquinas fue determinada en los sobrenadantes de CDs en ausencia o presencia de esplenocitos a las 24 o 48 hs, según se indique, luego de iniciados los cultivos. La presencia de citoquinas fue detectada mediante la realización de un ELISA *sandwich*. Las placas de ELISA (CellStart, Greiner-bio-one)) fueron cubiertas con Acs de rata anti IL-10, IL-12 (Pharmingen), o IFN- γ (eBioscience) diluidos en buffer carbonato-bicarbonato (0,05 M; pH 9,6) e incubadas durante una noche a 37°C. Las placas fueron luego lavadas tres veces con PBS adicionado con 0,05% Tween 20 (PBST) y bloqueadas con PBS suplementado con 0,5% de seroalbúmina bovina (BSA) durante 2 hs a TA. Los sobrenadantes de cultivo y los estándares de cada citoquina fueron agregados a las placas en duplicados e incubados durante 2 horas a TA. Luego de lavar tres veces como se indicó anteriormente, el correspondiente anticuerpo anti-citoquina conjugado con biotina fue agregado e incubado por 1 h a TA. Las placas fueron luego lavadas e incubadas con estreptoavidina conjugada con HRP durante 1 hora a TA. Luego de lavar, el sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) fue agregado.

La absorbancia a 450 nm fue medida en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystems). Las concentraciones de las citoquinas fueron calculadas en base a las densidades ópticas (DO) obtenidas con los estándares.

14. ELISAs para la evaluación de las respuestas de anticuerpos anti OVA de isotipos IgG e IgE.

A fin de medir los títulos de Acs totales contra OVA, un ELISA de fase líquida fue realizado. Brevemente, placas para ELISA (CellStar, Greiner-Bio-one) se pegaron durante una noche a 4°C con 1ug OVA diluido a la concentración óptima en buffer carbonato-bicarbonato (pH 9.6). Luego de lavar las placas tres veces con PBST, las mismas fueron bloqueadas con PBST adicionado con 1% BSA (buffer de bloqueo) por 30 minutos a 37°C. Las muestras de sueros de los ratones fueron diluidas en forma seriada en diluyente (PBS con 0,1 % de BSA), e incubadas por 2 hs a TA. Luego del tiempo de incubación, se lavaron exhaustivamente, y una dilución óptima de anti-IgG ó anti-IgE biotinilado de ratón en diluyente fue adicionado por 1 hora a TA. Las placas fueron lavadas y se agregó el sustrato OPD-H₂O₂ y las absorbancias a 492 nm fueron medidas en un espectrofotómetro (Multiskan EX, Labsystem). Sueros controles positivos y negativos fueron incluidos en cada ensayo. Los resultados se expresan como valores de la DO obtenida.

15. Ensayo de presentación cruzada de antígenos

Para evaluar si la HIS estimula la presentación a través del CMH de clase I, estudiamos la presentación de OVA a células TCD8⁺, específico para un epítopo de la OVA 257-264, utilizando el hibridoma de células T, B3Z que lleva una construcción β-galactosidasa que está bajo regulación del promotor de la IL-2 (71), que permite el análisis de la activación de células T a través de la medición de la actividad de β-galactosidasa en los lisados celulares por medio de una reacción colorimétrica. Para lo cual, las CDs se expusieron a diferentes concentraciones de OVA (según se indica) durante 3hs a 37°C, luego se lavaron, se suspendieron en MC y se cultivaron en presencia del hibridoma. A las 18hs de cultivo, las células se lavaron con PBS y la actividad de LacZ en los lisados de B3Z, fue detectada a partir de un ensayo

colorimétrico usando o-nitro-fenil-p-D-galactosido (ONPG) (SIGMA) como sustrato. Los resultados se expresan como valores de la DO obtenida en un lector de ELISA a 492nm.

16. Modelo de asma alérgico

Para inducir el modelo asmático se siguió un protocolo previamente descrito (171). Para ello, se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/C, vírgenes, de 7 a 10 semanas de edad. Éstos fueron inoculados intraperitonealmente (i.p) con 10 µg/ratón de una suspensión con OVA y 0,2% de aluminato de sodio en PBS, en los días 0 y 7. A los 14 días se instilaron intranasalmente durante 5 días con OVA en PBS (1mg/ml) / ratón y al término de ese período se evidenció el desarrollo del proceso a través de: la observación de rinitis nasal, determinación de los niveles de IgE sérica por ELISA, y del porcentaje de eosinófilos en los pulmones, por citometría de flujo. En el día 6, los ratones se instilaron intranasalmente o no con CDs que habían sido tratadas con PBS, HIS (0,1 µM), o Ti (10 µM). A los 7 días, se analizaron en algunos ratones de cada grupo las poblaciones que estaban siendo reclutadas al pulmón en lavados bronquiales (LB), obtenidos mediante perfusión traqueal de PBS. A los 15 días, se obtuvieron los pulmones provenientes de los ratones previamente instilados con CDs tratadas o no. Para la obtención de las distintas poblaciones celulares presentes en pulmón, los mismos fueron escindidos en pequeños trozos y tratados con una solución de colagenasa Tipo I (250U/ml), durante 30 min. a 37°C. Luego del tiempo de incubación, se frenó la reacción por incorporación de PBS suplementado con 5% SFB. Posteriormente, los fragmentos se incubaron con DNasa I (50U/ml), durante 40 min 37°C. Finalmente, se recolectaron las suspensiones celulares resultantes del tratamiento y se lavaron en PBS. Las poblaciones celulares obtenidas se resuspendieron en MC.

17. Análisis de las poblaciones presentes en lavado bronquial y pulmón por citometría de flujo

Para estudiar las poblaciones presentes en LB y P, de los ratones alérgicos instilados con CDs incubadas o no con distintos estímulos, las

células obtenidas se marcaron fenotípicamente con Acs anti-B220 para LB, anti-GR1 para neutrófilos, anti-CD4 y anti-CD8 para LT, anti-CD8 α para CDs linfoides, anti-CD25, anti-CD11c, anti-CD40L (BD, Pharmingen, San Diego, CA). Las células (5×10^5 células) fueron incubadas a 4°C durante 30 min con 1 μ g de dos de los Acs indicados acoplados a FIT-C o PE, diluidos en PBS con 1% de SFB. Luego, las células fueron lavadas dos veces con PBS frío y finalmente suspendidas en 400 μ l de tampón Isoflow (Beckman). Los controles de isotipo se utilizaron como controles negativos de marcación específica. El análisis fue realizado por citometría de flujo. El análisis fue realizado utilizando un citómetro FACScan de 2 colores y software CellQuest (Becton Dickinson). Los resultados se expresan como la media del % de células positivas para cada marcador.

18. Purificación de CDs y linfocitos T a través de columnas de afinidad.

Luego del tratamiento de los pulmones con DNAsa, se obtuvieron suspensiones celulares (4 pulmones/ tratamiento) que fueron incubadas con perlas magnéticas acopladas a un anti-CD11c (Miltenyi). Luego, estas células se pasaron a través de columnas (MACs, Miltenyi) con el propósito de colectar dos fracciones: células CD11c⁺ (CDs) y células CD11c⁻ (LT, macrófagos, granulocitos, células NK). Ambas poblaciones fueron o no re-estimuladas in vitro con OVA. Luego de 5 días, se colectaron los sobrenadantes y se dosaron las concentraciones de IL-10, IL-12 e INF γ por ELISA (según se detalló en el punto 13).

Además, se purificó la población total de LT (CD4⁺ y CD8⁺) por selección negativa utilizando un Pan T (MACS, Miltenyi). Posteriormente a la re-estimulación de las células T con OVA, se evaluó la presencia de IFN- γ intracitoplasmático. Asimismo, en algunos casos la población total de LT, se re-purificaron mediante el empleo de un kit de enriquecimiento y detección de la IL-5 (MACS, Miltenyi). Todas las purificaciones realizadas, se llevaron a cabo utilizando un imán y columnas Mini (Miltenyi) y siguiendo los protocolos del fabricante (Miltenyi Biotec, Hamburgo).

19. Análisis estadístico

La significancia estadística entre las medias se determinó mediante el t-Test de Student. La $p < 0,05$ fue considerada como estadísticamente significativa.

RESULTADOS

1. Expresión de receptores histaminérgicos por las CDs murinas.

La HIS ejerce efectos moduladores en diversos tejidos y células a través de su interacción con receptores bien caracterizados: H1R, H2R, H3R y H4R (2). Nuestro objetivo, en primer lugar, fue evaluar la expresión de los mismos en CDs obtenidas de precursores de MO murina. Teniendo en cuenta que trabajos previos demostraron que las CDs expresan el H1R y el H2R (16),(207) respectivamente, llevamos a cabo su cuantificación a través de un ensayo de unión de ligandos a receptores. Para ello se emplearon [³H]-mepiramina como radioligando del H1R y [³H]-tiotidina como radioligando del H2R. Finalmente, se caracterizaron los sitios específicos de unión sobre la membrana celular. Los resultados se encuentran expresados en radioligando unido (sitios/célula) vs. radioligando no unido (sitios/célula). Como se muestra en la **FIGURA 1A y 1B** la utilización de esta técnica de cuantificación nos permitió conocer características no analizadas en trabajos previos (2), en relación a su distribución celular. Así, en CDs inmaduras pudimos establecer que ambos receptores se expresan, siendo la expresión del H1R 10 veces mayor respecto a la del H2R. Además, mediante el análisis de scatchard se determinó que éstos presentan un único sitio de unión saturable, siendo sus valores de Kd (Kd: $1,1 \pm 0,1\text{nM}$; $10 \pm 0,8\text{nM}$, H1R y H2R; respectivamente).

Por otro lado, teniendo en cuenta que los receptores H3R y H4R no han sido caracterizados en CDs murinas, nos propusimos estudiar si también ellos se encontraban expresados en estas células a través de la técnica de RT-PCR. Como controles positivos se utilizaron los ARNs extraídos de cerebro para el H3R y de MO para el H4R. En la **FIGURA 1C y 1D** se observan los fragmentos amplificados de ADN cuyo tamaño era el esperado para cada receptor.

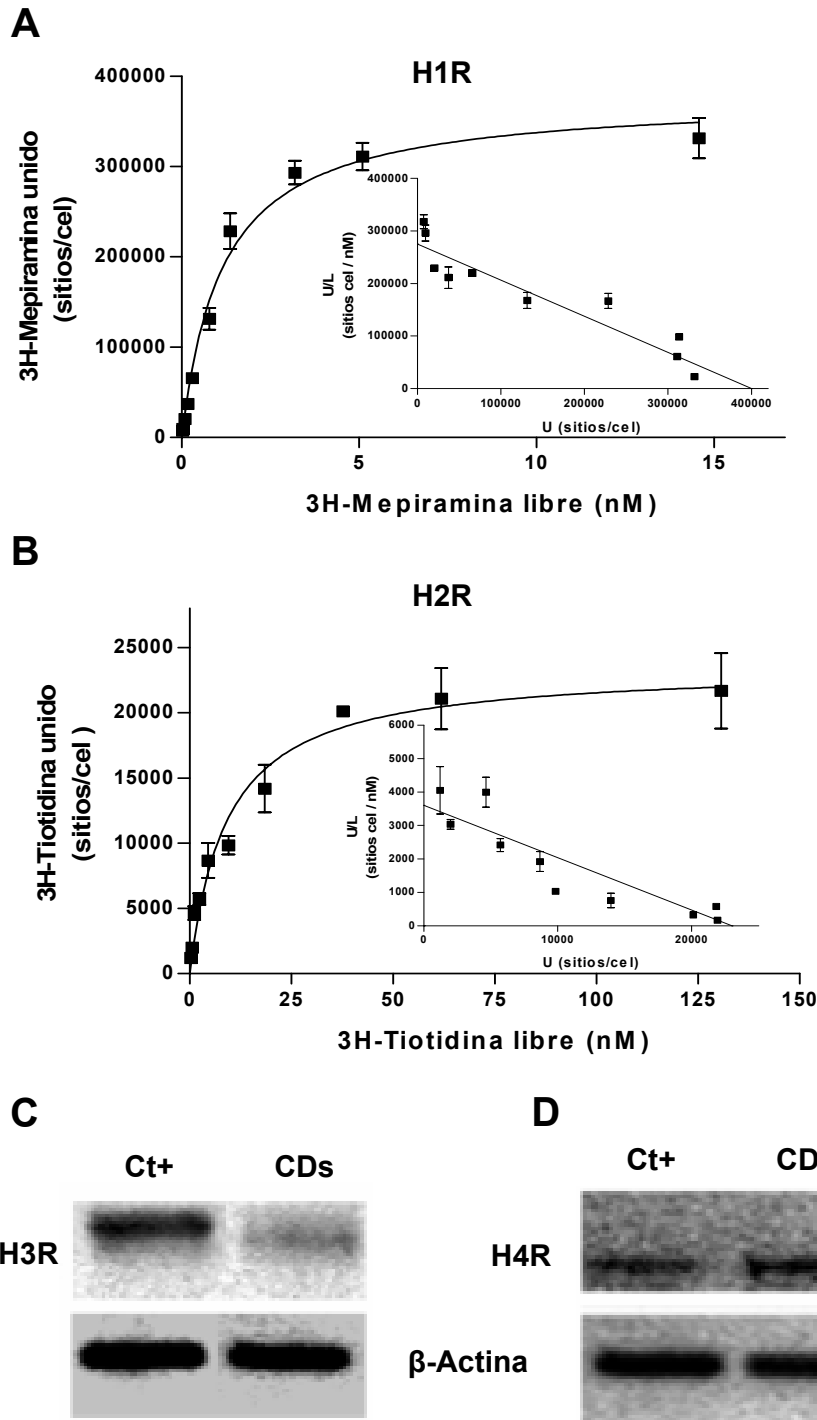
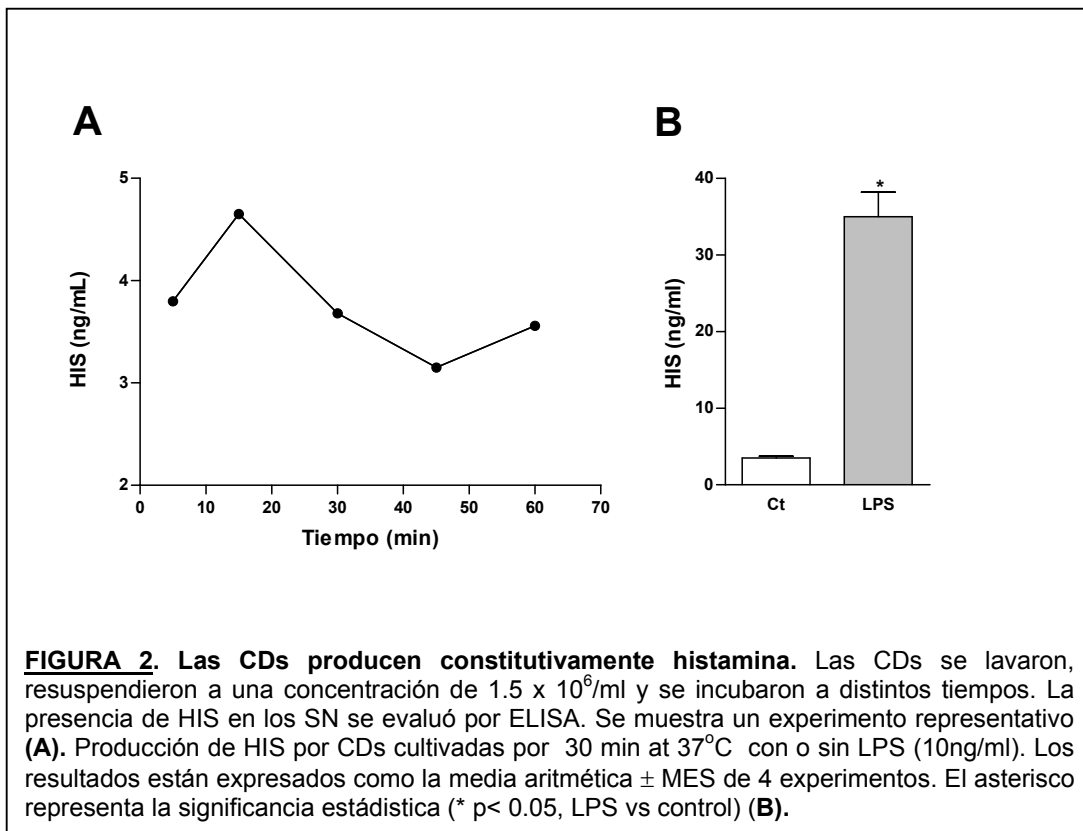


FIGURA 1. *Expresión de los receptores de histamina en CDs murinas.* Los receptores H1R y H2R se cuantificaron mediante un ensayo de unión de receptores. Se emplearon [³H]-Mepiramina como radioligando del H1R (A) y [³H]-tiotidina como radioligando del H2R (B). Finalmente, se caracterizaron sobre la membrana celular los sitios específicos de unión. Los resultados están expresados como radioligando unido (sitios/célula) vs. radioligando no unido (sitios/célula) de 2 experimentos. H3R y H4R se caracterizaron por RT-PCR. Ct⁺: cerebro y médula ósea para H3R (C) y H4R (D) respectivamente.

Como mencionamos previamente, muchas células inmunes tienen la capacidad frente a diferentes estímulos de producir HIS, entre ellas los neutrófilos (208), macrófagos (209) y los LT (7). En la **FIGURA 2A** se muestra que las CDs murinas también producen HIS. La cantidad de HIS hallada en los sobrenadantes de los cultivos celulares ($1,5 \times 10^6$ CDs/ml) se encontraron en el rango de 3,2-4,6 ng/ml. Esta concentración no se vio incrementada a tiempos largos de incubación de las CDs, indicando posiblemente que la HIS neosintetizada es rápidamente catabolizada. En la **FIGURA 2B** se observa que frente a un estímulo madurativo de las CDs, como el LPS, los niveles de HIS detectados en los sobrenadantes se incrementaron en tres órdenes de magnitud.

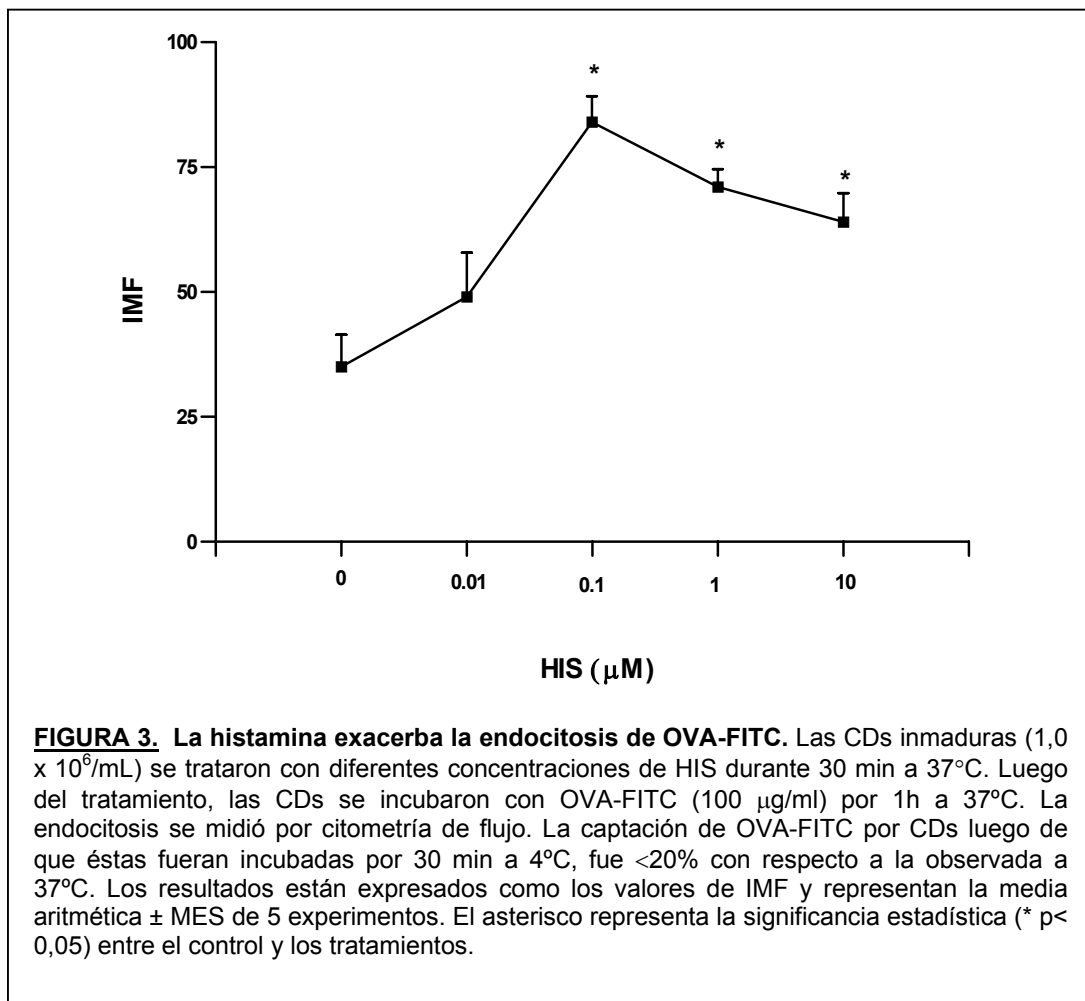


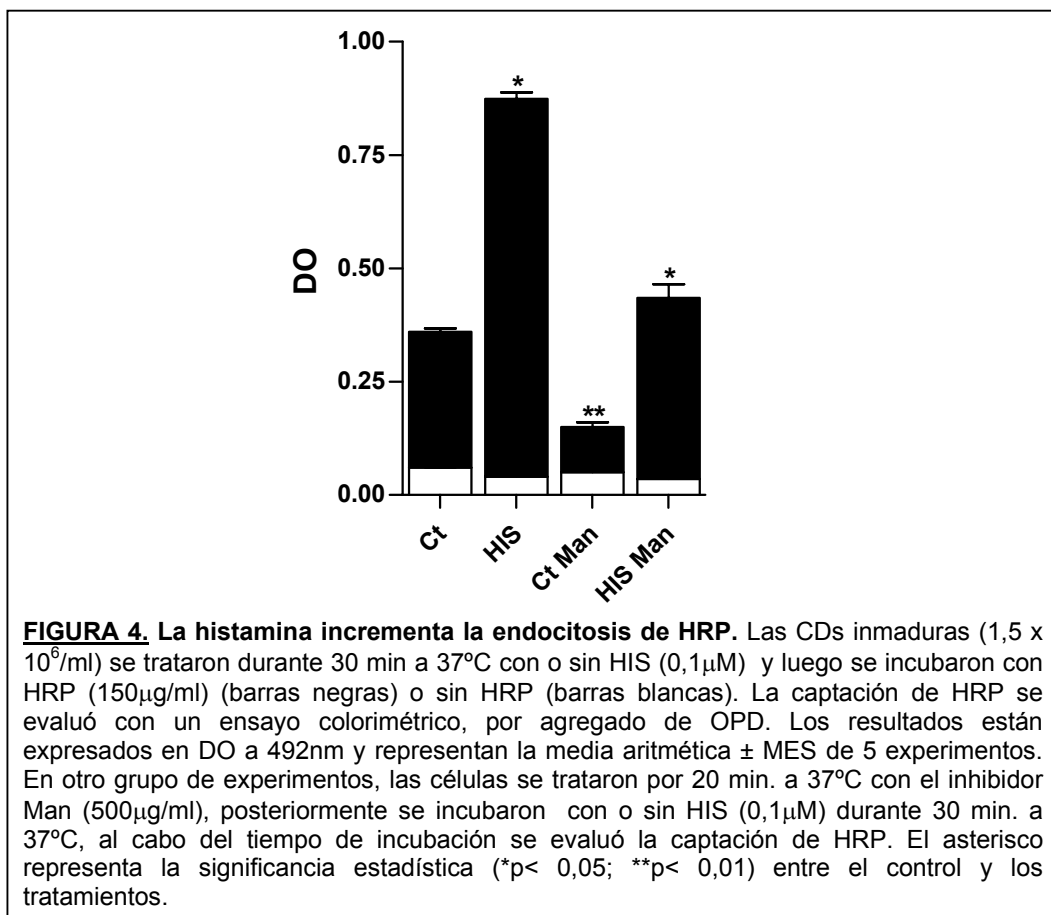
2. La histamina potencia la endocitosis por las CDs.

Las CDs como células inmaduras, se localizan en los tejidos periféricos (piel y mucosas) y son las encargadas de sensar el entorno y capturar el Ag frente a la aparición de procesos infecciosos o inflamatorios nacientes. Esto conduce a la migración de las CDs a los ganglios linfáticos zonales donde como CDs maduras, presentan el Ag a los LT vírgenes, iniciando así la respuesta inmune adaptativa. Nuestro interés, se centró en evaluar si la HIS era capaz de afectar la capacidad endocítica de las CDs inmaduras. Ésta ocurre fundamentalmente a través de dos mecanismos: la macropinocitosis por medio de la cual internalizan continuamente Ags presentes en la fase fluida, o bien la endocitosis mediada por receptores a través de la vía de las clatrininas (68). En un primer momento, analizamos la endocitosis de OVA-FITC por citometría de flujo. Así, las CDs se estimularon (HIS) o no (Ct) con diferentes concentraciones de HIS por 30 min a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se incubaron por 30 min con 100 µg/ml de OVA-FITC y luego se lavaron exhaustivamente. Finalmente se evaluó la captación de este Ag por citometría de flujo. Los valores de la misma se encuentran expresados como la intensidad media de fluorescencia (IMF). En la **FIGURA 3**, se muestra que la HIS indujo un incremento de la endocitosis de OVA-FITC, en concentraciones que se hayan comprendidas entre 10µM y 0,1µM. Asimismo, dentro del rango de concentración comprendido entre 1µM - 0,1µM se pudo registrar el mayor aumento de la endocitosis al comparar con las CDs controles. Esta curva, nos permitió definir la concentración de HIS que utilizaríamos a partir de aquí en todos nuestros ensayos, 0,1 µM.

Seguidamente, evaluamos la captación de HRP, mediada por el RM (RM). Las CDs tratadas (HIS) o no (Ct) con HIS 0,1 µM durante 30 min a 37°C, se incubaron durante 40 min a 37°C con HRP 150 µg/ml. Al cabo del tiempo de incubación, las CDs se lavaron 6 veces con PBS frío y se permeabilizaron con PBS-Tween 0,5%. Posteriormente, se evaluó la actividad enzimática en los sobrenadantes por un ensayo colorimétrico mediante el agregado de OPD y la posterior lectura de la DO a 492 nm. Para descartar la producción endógena de peroxidasa por las CDs, realizamos el ensayo sin el agregado de la enzima. Como se observa en la **FIGURA 4**, los valores obtenidos para la actividad de

peroxidasa endógena de las CDs se encuentran por debajo del 10% para el Ct y del 5% para las tratadas con HIS. Asimismo, como se observa en la misma figura, el tratamiento con HIS condujo a un incremento significativo de la endocitosis de HRP en más de un 60% comparado con las CDs sin estimular. Como mencionáramos previamente, la internalización de HRP involucra al RM, evaluamos entonces la captación de la enzima en presencia de Manano (Man), un inhibidor competitivo de este receptor. Como se muestra en la **FIGURA 4**, las CDs que estuvieron en presencia de Man presentan una inhibición importante de los niveles de endocitosis de HRP independientemente de su post-exposición a HIS.

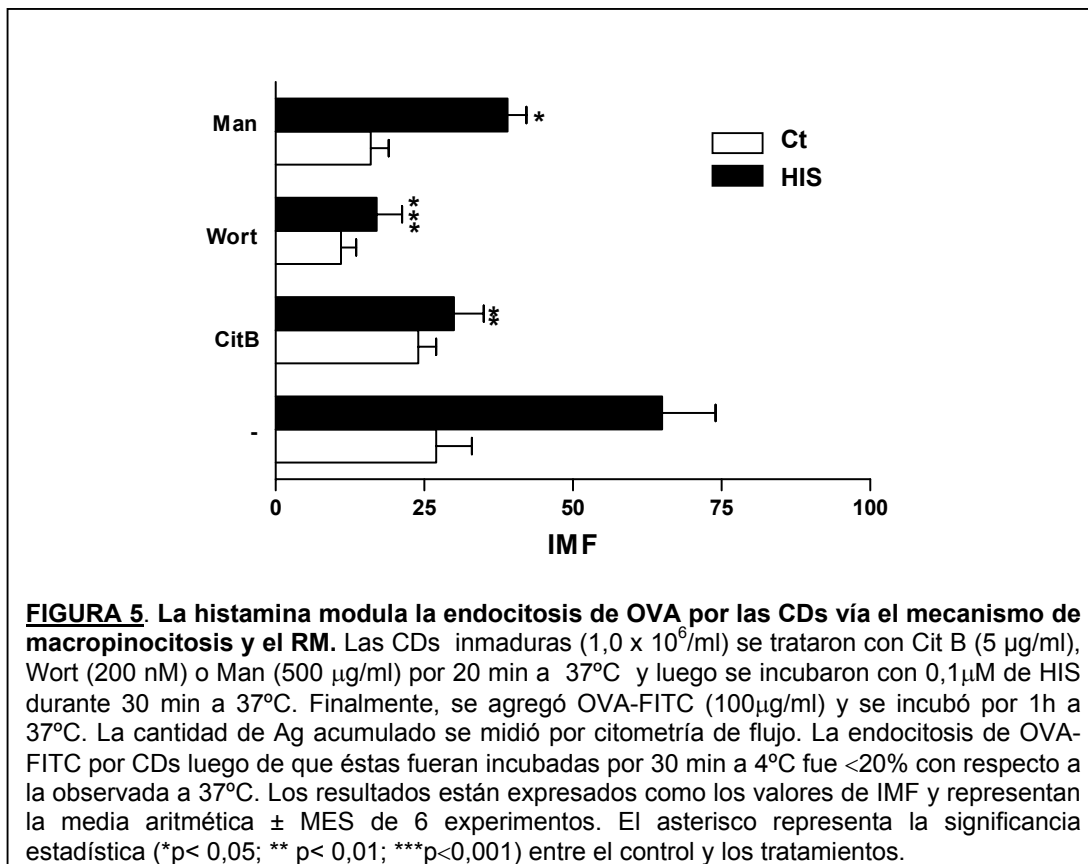




3. La histamina estimula la endocitosis de OVA por macropinocitosis y en menor medida por el receptor de manosa.

Como demostramos previamente, la HIS incrementa la captación de HRP a través del RM, como lo evidencian los experimentos de la **FIGURA 4**. Teniendo en cuenta, que la HIS estimuló asimismo la endocitosis de OVA, la cual es mediada fundamentalmente por macropinocitosis, evaluamos la captación de este Ag en presencia de inhibidores de esta vía. Para lo cual, las CDs fueron pre-tratadas con: Cit B que lleva a la desorganización de los microfilamentos de actina (65) y Wort que inhibe la vía transduccional de la PI3K (67). A partir de lo observado en la **FIGURA 5**, se puede deducir que la HIS modula la macropinocitosis actuando tanto sobre el citoesqueleto, como también sobre la PI3K. Evidencia de esto es que la captación de OVA-FITC en las CDs expuestas a los inhibidores y luego tratadas con HIS, disminuyó

significativamente respecto a las no expuestas, así los porcentajes de inhibición fueron mayores al 50% (54% y 74%, para la Cit B y Wort, respectivamente). Recientemente, se demostró que la OVA podría ser internalizada por las CDs no solo a través de la vía de macropinocitosis sino también a través del RM (210), es decir involucrando la vía mediada por receptores. Teniendo en cuenta esta observación, evaluamos la captación de OVA en CDs estimuladas con HIS, en presencia de Man. Nuestros resultados indican que la HIS también favorecería el ingreso de la OVA a través del RM, ya que las células que fueron tratadas con Man previamente al tratamiento con HIS mostraron una disminución significativa de aproximadamente el 40% en su capacidad para captar OVA respecto a los controles (**FIGURA 5**). En conjunto, nuestros resultados demuestran que la HIS incrementa la endocitosis de OVA fundamentalmente a través de la macropinocitosis, y en menor medida a través del RM, ya que la inhibición de la endocitosis de OVA por las CDs tratadas con HIS fue mayor en presencia de los inhibidores de la macropinocitosis.



4. La histamina potencia la endocitosis de OVA actuando a través del receptor H2R.

Como demostramos previamente, las CD_s murinas presentan los receptores, H1R; H2R; H3R y H4R. Decidimos evaluar entonces, a través de cuál de ellos la HIS afectaba la endocitosis de OVA. Para lo cual, bloqueamos previamente los receptores de HIS con antagonistas específicos, ketotifeno (Kt): H1R, Cimetidina (Ci): H2R, Tioperamida (Ti): H3R/H4R. Luego de 20 min a 37°C, las CD_s se trataron con o sin HIS (0,1µM) 30 min a 37°C y finalmente se adicionó la OVA-FITC (100 µg/ml). Como se observa en la **FIGURA 6**, el bloqueo del H2R con Ci previno completamente la endocitosis de OVA por las CD_s estimuladas con HIS. Por el contrario, la endocitosis no se vio afectada al bloquear los receptores H1R y H3R/H4R con Kt y Ti, respectivamente.

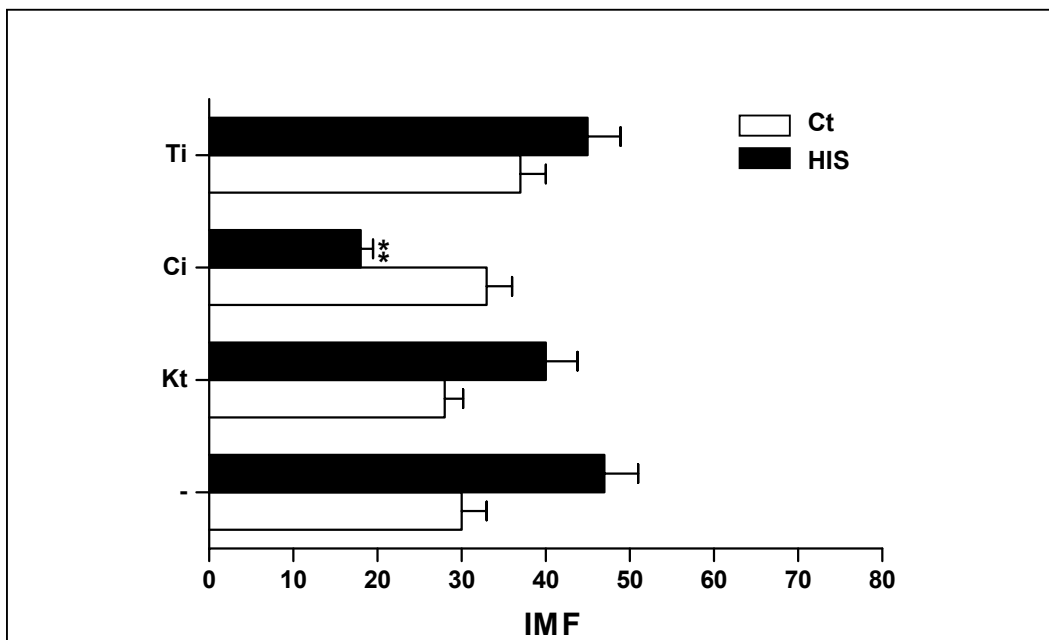
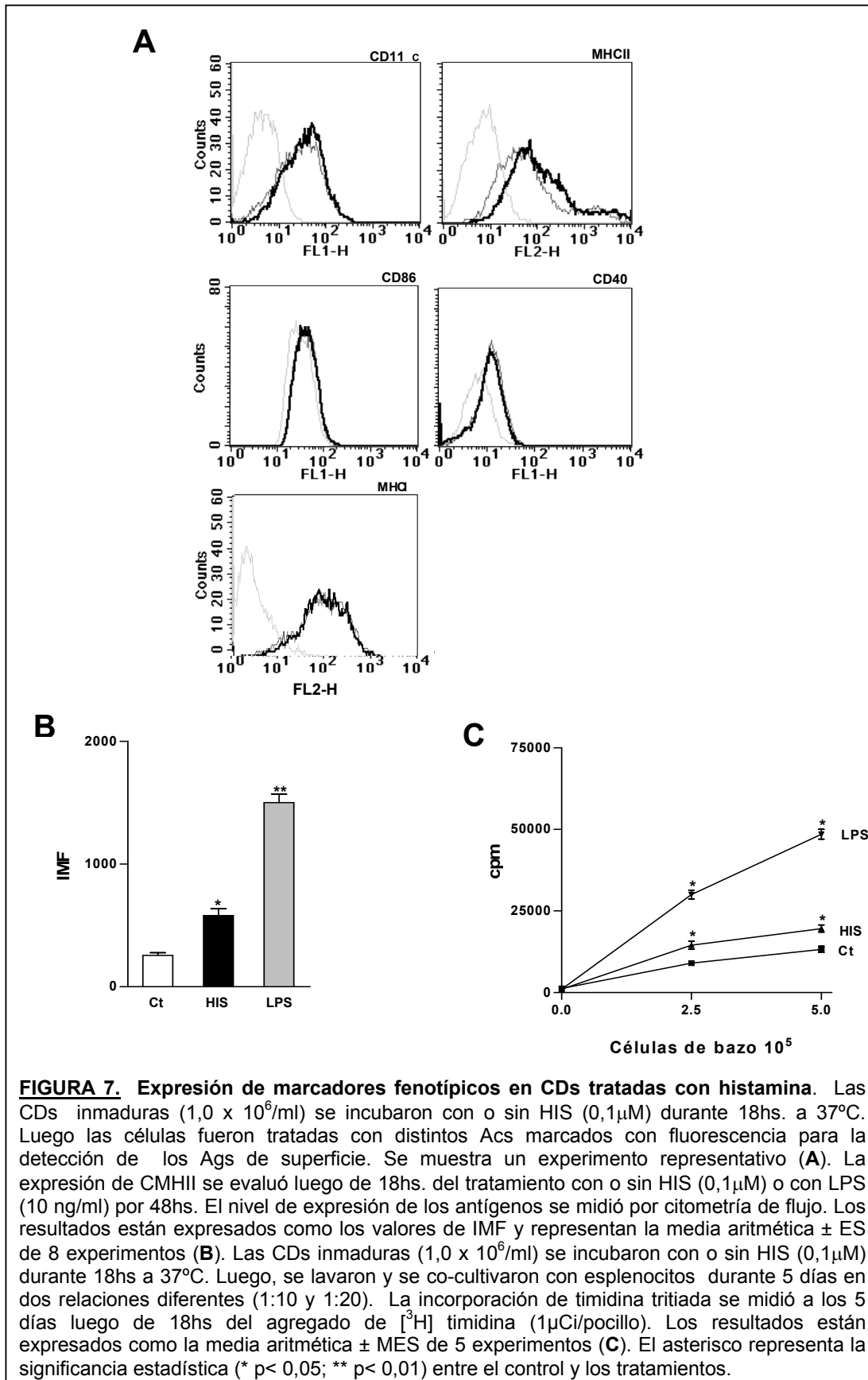


FIGURA 6. La histamina estimula la endocitosis de OVA por las CD_s vía el H2R. Las CD_s inmaduras ($1,0 \times 10^6$ /ml) se trataron durante 15 min con 100µM de los antagonistas específicos de los receptores de HIS: Kt: (H1R), Ci: H2R y Ti: H3R y H4R y luego se incubaron 30 min a 37°C con o sin HIS (0,1µM). Luego de los tratamientos, las CD_s se incubaron con OVA-FITC (100µg/mL) por 1h a 37°C. La cantidad del ligando acumulado se midió por citometría de flujo. La endocitosis de OVA-FITC por CD_s luego de que éstas fueran incubadas por 30 min a 0°C fue <20% con respecto a la dosada a 37°C. Los resultados están expresados como los valores de IMF y representan la media aritmética \pm MES de 8 experimentos. El asterisco representa la significancia estadística (** p< 0,01) entre el control y los tratamientos.

5. La histamina aumenta la expresión de las moléculas del CMH de clase II y favorece la presentación de antígenos por las CDs.

Teniendo en cuenta que, existen muchas divergencias respecto al rol de la HIS sobre la maduración-activación de las CDs (211), evaluamos a continuación si la HIS imponía cambios fenotípicos a las CDs. Para lo cual, analizamos marcadores fenotípicos y moléculas coestimuladoras vinculados con la activación y la maduración de estas células. Para ello, empleamos Acs dirigidos contra las moléculas CD11c, CD40, CD86, CMHII y CMHI. Las CDs se trataron con 0.1 μ M de HIS 30 min a 37°C, posteriormente las células se lavaron y se resuspendieron en MC. A las 18 hs. se marcaron y se analizó su fenotipo por citometría de flujo. En la **FIGURA 7A** y **7B** se observa que la HIS solamente indujo un aumento leve pero significativo en la expresión de las moléculas del CMH de clase II, ya que en presencia de un estímulo madurativo para las CDs, como es el LPS, el incremento de esta molécula fue 3 veces mayor (Figura 7B). Por otro lado, la HIS no modificó el nivel de expresión de las otras moléculas estudiadas. Debido a este aumento en la expresión de las moléculas del CMH de clase II, nos preguntamos si estas células serían mejores presentadoras. Para estudiar este hecho, realizamos un cultivo mixto linfocitario (CML) entre las CDs estimuladas (HIS) o no (Ct) con HIS 0,1 μ M y esplenocitos alogeneicos provenientes de ratones BALB/C durante 96 hs. En la **FIGURA 7C** se observa que la respuesta linfocitaria inducida en el cultivo mixto por las CDs tratadas con HIS, fue mayor que la observada para las Ct, pero la misma fue mucho menor a la observada por las CDs estimuladas con LPS. Es decir, que el leve incremento observado para la expresión de las moléculas CMH de clase II sería el responsable de la mayor capacidad presentadora que desarrollan las CDs estimuladas con HIS.



6. Efecto del microambiente en la modulación de la funcionalidad de las células dendríticas por histamina.

6. a Análisis de la capacidad endocítica

Es conocido que los procesos inflamatorios transcurren en la mayoría de los casos a valores de pH francamente ácidos (rango: pH 5-6,5) (212). En este sentido, nuestro grupo ha demostrado previamente, que la acidosis favorece la captación de Ags y la presentación de ellos a través del CMH de clase I (203). Teniendo en cuenta, que en la periferia los mastocitos, células responsables de la liberación de HIS durante la respuesta inflamatoria, y las CDs se hallan en íntimo contacto, quisimos evaluar si las condiciones de acidosis en las cuales ocurre la génesis de los procesos inflamatorios imponía modificaciones a la acción de la HIS sobre las CDs. En primer lugar, las CDs se expusieron durante 1h a pH 6,5 previo al tratamiento con HIS (0,1 μ M). Posteriormente, se analizó la endocitosis de OVA por citometría de flujo. Como se observa en la **FIGURA 8A**, las células expuestas a pH 6,5 y tratadas con HIS captaron un 20 % más OVA que las CDs a pH 6.5, y en más de un 40 % si se compara con los valores de endocitosis de las células a pH 7.3. Esto último indica que la HIS actuando sobre CDs que estuvieron en un microambiente ácido, favorece notablemente la capacidad de estas células para captar Ags.

Posteriormente, evaluamos los receptores involucrados en dicho efecto. En la **FIGURA 8B** se muestra que a diferencia de lo que observamos en CDs tratadas con HIS pero no expuestas previamente a pH6,5, la HIS incrementó la endocitosis de OVA-FITC actuando a través del H1R y en mayor medida a través de los H3/4R, ya que se registró una disminución significativa en los porcentajes de endocitosis del 45% y del 65% cuando se bloqueó con los antagonistas Kt y Ti , respectivamente.

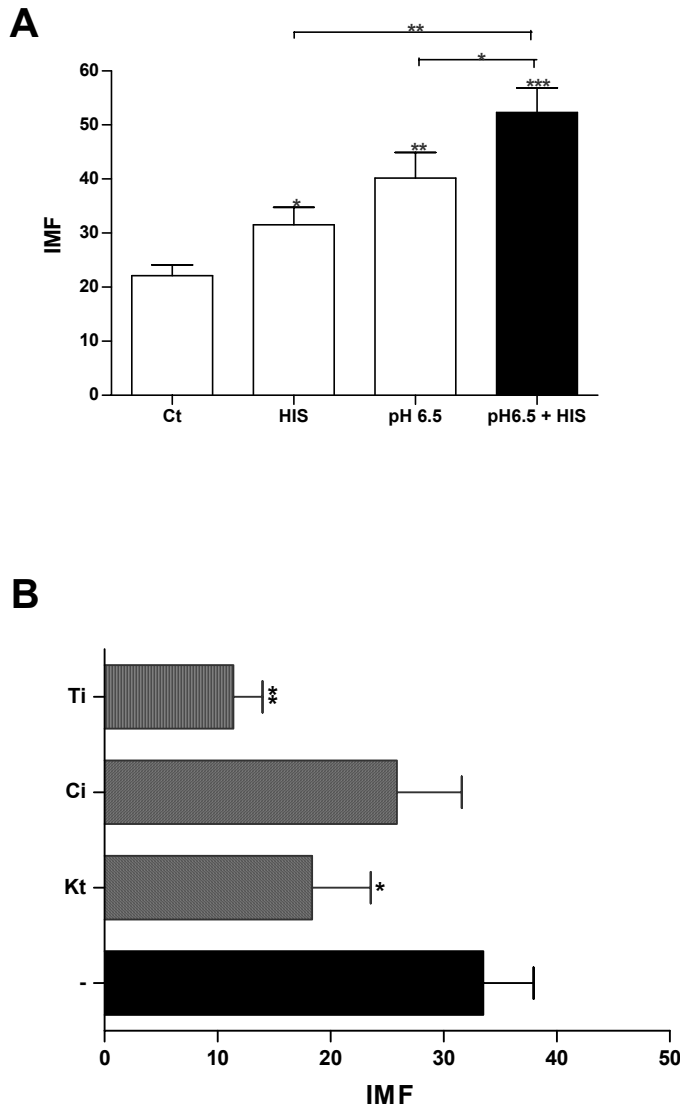


FIGURA 8. La histamina incrementa la endocitosis de OVA en CDs pre-expuestas a pH 6.5.

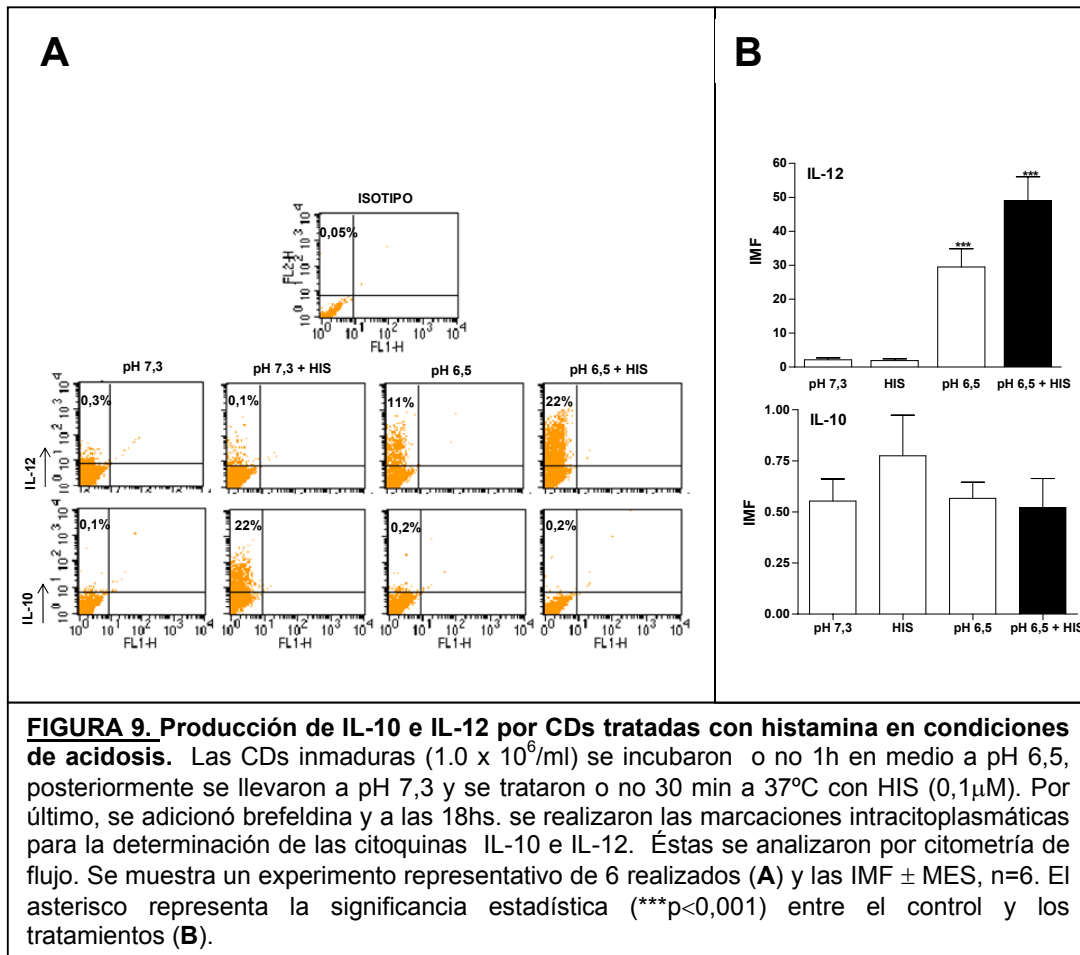
Las CDs inmaduras ($1.0 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron o no 1h en medio a pH 6,5, luego se llevó a pH 7,3 y se trataron o no 30 min a 37°C con HIS $0,1\mu\text{M}$ (A). Las CDs inmaduras ($1.0 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron 1h en medio a pH 6,5, luego se llevó a pH 7,3 y se trataron o no durante 15 min con antagonistas de los receptores de HIS ($100\mu\text{M}$): Kt: H1R; Ci: H2R y Ti: H3R/H4R y finalmente se incubaron 30 min a 37°C con o sin HIS $0,1\mu\text{M}$ (B). Luego de los tratamientos, las CDs se incubaron con OVA-FITC ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) por 1h a 37°C . La cantidad del ligando acumulado se midió por citometría de flujo. La endocitosis de OVA-FITC por CDs luego de que éstas fueran incubadas por 30 min a 0°C fue $<20\%$ con respecto a la dosada a 37°C . Los resultados están expresados como los valores de IMF y representan la media aritmética \pm MES de 8-10 experimentos. El asterisco representa la significancia estadística (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$) entre el control y los tratamientos.

6. b En condiciones ácidas la histamina induce la producción de IL-12 por las células dendríticas.

Es bien sabido, que la diferenciación de las células TCD4⁺ en un perfil Th1 depende fundamentalmente de un grupo de citoquinas producidas por las CDs (IL-12, IL-18, IL-23 e IL-27) (213), siendo la IL-12 la que representaría un papel de mayor relevancia.

En relación a la HIS, la bibliografía propone que ésta favorece la producción de IL-10 e inhibe la de IL-12, orientando de esta manera la diferenciación de las células TCD4⁺ hacia un perfil T_H2 (22, 214). Además, se sugiere que las CDs maduradas con LPS y estimuladas con HIS inhiben la producción de INF- γ de los LT, citoquina que contribuye con el perfil T_H1 (215). Teniendo en cuenta estos datos, quisimos estudiar qué ocurría con la producción de IL-10 e IL-12 en CDs tratadas con HIS y expuestas previamente a pH ácido. Para ello, realizamos una marcación intracitoplasmática luego de tratar a las células con brefeldina (inhibe la exocitosis de proteínas, impidiendo su tránsito desde el RE hacia el aparato de Golgi).

En la **FIGURA 9 A y B** se puede observar que mientras que la HIS a pH 7,3 incrementa la producción de la IL-10, a pH 6,5 sorpresivamente incrementa la producción de IL-12, mientras que la producción de la IL-10 se vio inhibida. Es decir, que en un microambiente ácido, la HIS conduciría a un cambio de perfil de T_H2 a T_H1, orientando de esta manera la diferenciación de las células TCD4⁺ hacia un perfil T_H1.

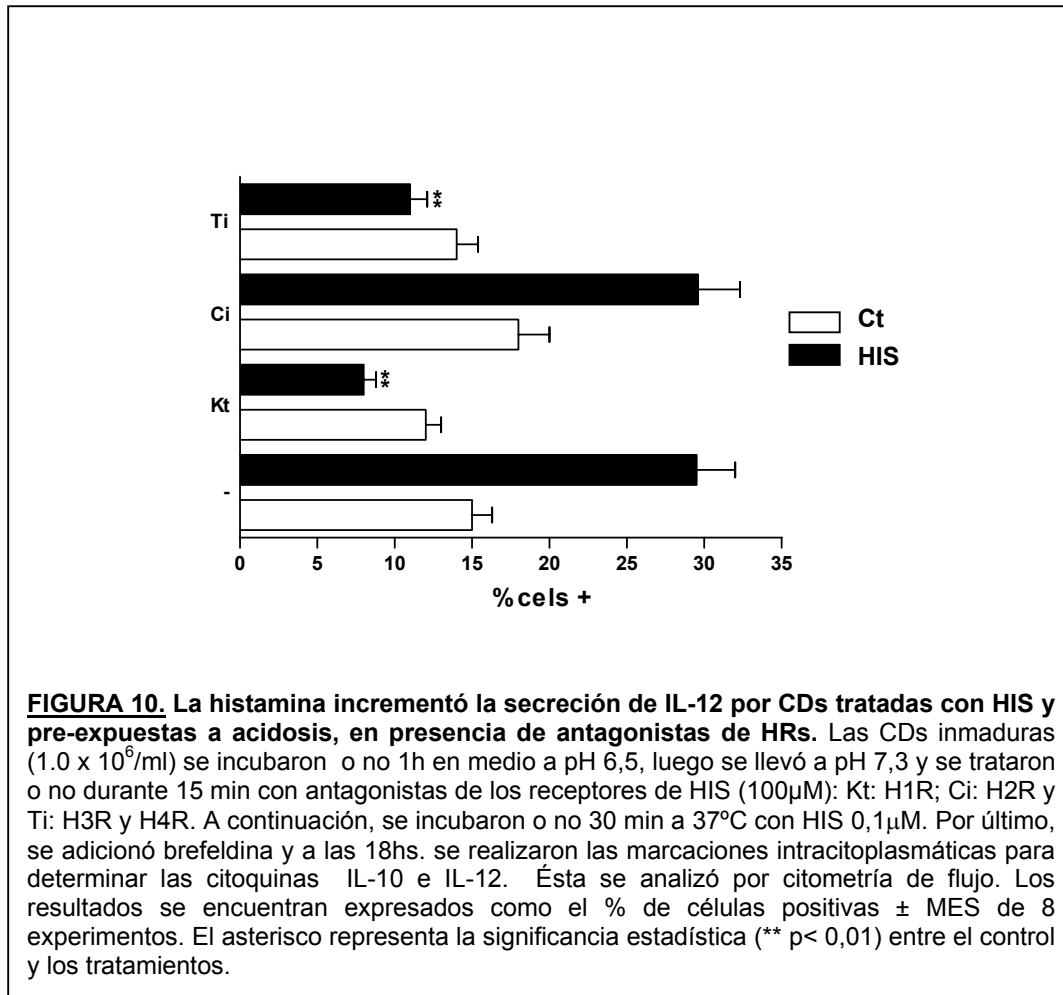


6. c La producción de IL-12 por células dendríticas estimuladas con HIS involucra a los receptores H1R y H3R/H4R.

Hasta el momento, nuestros experimentos demostraron que la HIS estimula en mayor medida la endocitosis en las CDs pre-expuestas a pH ácido que en las expuestas a pH 7.3. Un hecho interesante de destacar es que mientras en éstas últimas lo hacía a través de su interacción con el H2R, en las CDs expuestas a pH 6,5 actúa vía los receptores H3R/ H4R y en menor medida a través del H1R. Asimismo, cabe resaltar, que mientras que en condiciones normales la HIS induce la producción de un perfil del tipo T_H2, cuando las CDs fueron expuestas a condiciones ácidas de pH, notoriamente la HIS fue capaz de cambiar el perfil de citoquinas de T_H2 a T_H1, conduciendo a la producción de IL-12 e inhibiendo la producción de IL-10. Evaluamos entonces, si la producción de IL-12 involucraba algún receptor histaminérgico particular, para lo cual empleamos los antagonistas específicos de los mismos. Como se

observa en la **FIGURA 10**, tanto el H1R como el H3R/4R estarían involucrados en este evento, ya que la producción de IL-12 disminuyó significativamente en los tratamientos con sus antagonistas respecto al control.

De acuerdo con nuestros resultados, la HIS actuaría en condiciones de acidosis potenciando la captación de Ags y favoreciendo la producción de IL-12 a través de los receptores HR1, HR3/HR4.



7. La histamina potencia la presentación cruzada de antígenos.

Las CDs no sólo tienen la particularidad de ser las únicas CPA capaces de activar a los LT vírgenes, sino que además, tienen la capacidad de presentar Ags exógenos en el contexto de las moléculas del CMH de clase I (104). Debido a la importancia que tiene esta función en el desarrollo de la

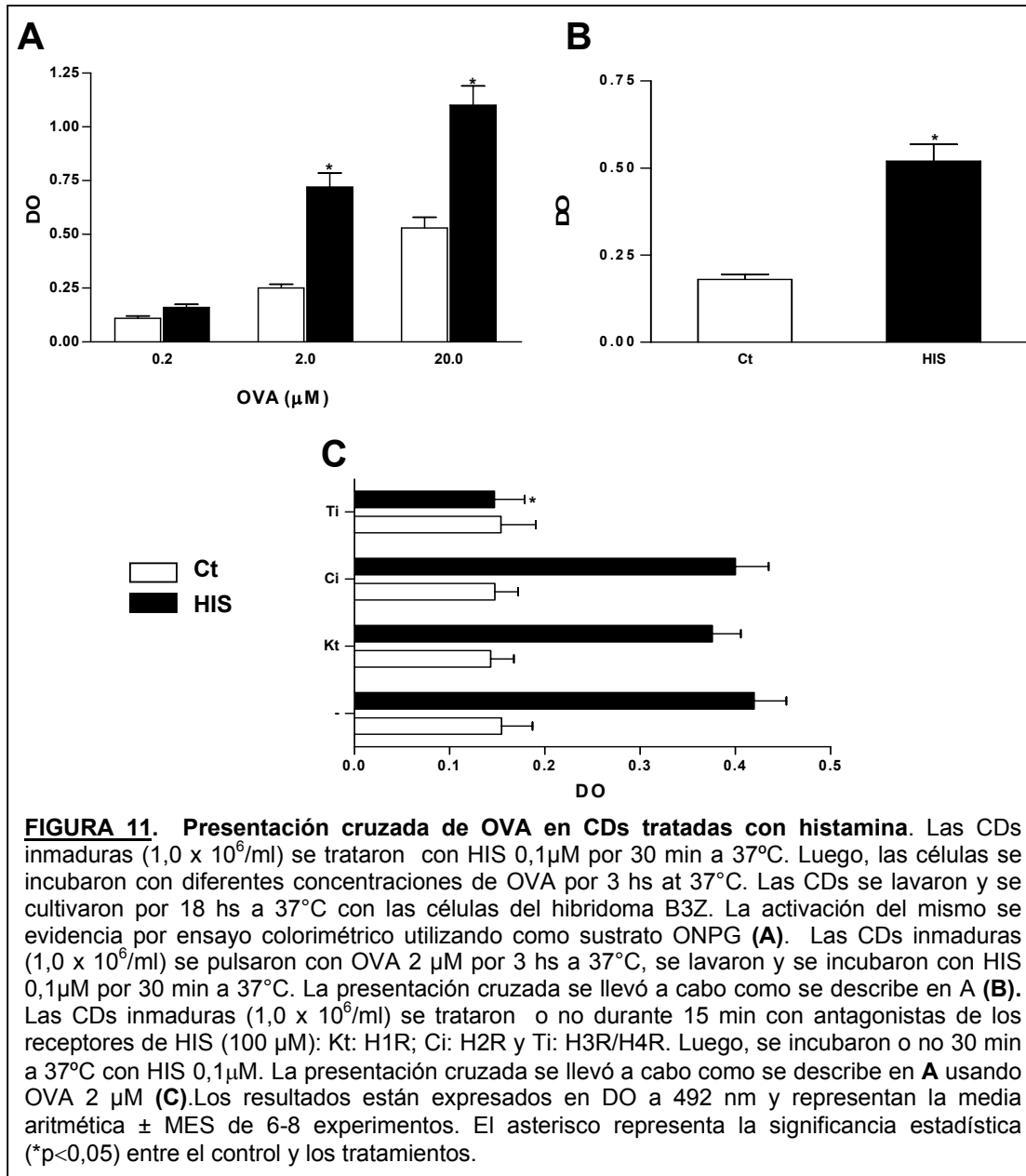
respuesta inmune adaptativa, decidimos estudiar si la HIS modulaba este mecanismo. Para ello, las CDs fueron tratadas con 0,1 μ M de HIS durante 30 min a 37°C, y posteriormente se incubaron por el lapso de 3 hs con diferentes concentraciones de OVA. Finalmente, se lavaron, se suspendieron en MC y se pusieron en contacto con un hibridoma de células T (B3Z), específico para reconocer un epítotope de la OVA (OVA 257-264) en el contexto de las moléculas del CMH de clase I. Como muestra la **FIGURA 11A**, la HIS incrementó significativamente la presentación cruzada para las concentraciones de OVA de 2 μ M y 20 μ M. Sin embargo, cuando evaluamos esta función en CDs expuestas a pH 6,5, la HIS no indujo modulación alguna de la presentación cruzada de Ags a través del CMH de clase I. A pesar de, que en estas condiciones se estimulaba la producción de la IL-12.

Como vimos anteriormente, la HIS aumentó la capacidad de las CDs para endocitar OVA. Esto nos llevó a plantearnos, sí el incremento observado en la presentación cruzada no sería sólo el reflejo de la mayor captación de OVA inducida por la HIS en las CDs. Por lo tanto, evaluamos la presentación cruzada en CDs pulsadas en primer término con 2 μ M de OVA, para asegurarnos que todas las células tuviesen igual carga antigénica y posteriormente una parte de las CDs fue tratada con 0,1 μ M de HIS durante 30 min a 37°C. Finalmente, se llevó a cabo la reacción. En la **FIGURA 11B** se muestra que la HIS estimula la presentación cruzada de OVA independientemente del momento en que fue captado el Ag.

8. El incremento de la presentación cruzada por la histamina involucra el H3R/H4R.

Seguidamente, estudiamos qué receptores histaminérgicos estaban involucrados en el mecanismo de presentación cruzada. De forma tal que, previo a la incubación con 0,1 μ M de HIS, las CDs fueron tratadas con los antagonistas específicos de sus receptores en una concentración de 100 μ M durante 15 min a 37° C. Posteriormente, las células fueron pulsadas con 2 μ M de OVA. Como se muestra en la **FIGURA 11C**, el bloqueo de los receptores H3R/H4R con Ti inhibió en un 65 % la presentación de OVA a través de la molécula del CMH de clase I observada en CDs tratadas con HIS versus los Ct

no tratados. Es decir, que la modulación de la presentación cruzada por la HIS ocurre a través de su interacción con los H3R/H4R, sin participación de los receptores H1R y H2R.



9. La histamina no afecta la presentación cruzada de antígenos particulados.

Como ya fuera mencionado, los Ags particulados que ingresan por fagocitosis fomentan con mayor intensidad su presentación a través de las moléculas del CMH de clase I, respecto a los Ags solubles captados por macropinocitosis o a través de receptores (103, 134, 216). De forma tal, que quisimos analizar este punto. Para lo cual, estudiamos la presentación cruzada, por las CDs, de partículas de látex a las cuales se les adsorbió OVA como Ag. En primer término, adsorbimos OVA-FITC a las partículas para evaluar si las CDs eran capaces de fagocitar la OVA particulada (OVAp). Esto fue analizado tanto por citometría de flujo como por microscopía. La **FIGURA 12A** demuestra que las CDs tratadas con HIS y las Ct son capaces de captar OVAp y además, no se observan diferencias significativas entre ambos grupos en relación a la cantidad de Ag incorporado.

Una vez que demostramos que las CDs fagocitaban el Ag adsorbido a las partículas, estudiamos si la HIS también era capaz de modular la presentación cruzada del mismo por estas células. En la **FIGURA 12B**, se observa que si bien, como era de esperarse las CDs Ct incrementaron su capacidad de presentar en forma cruzada OVAp a diferencia de lo observado para la OVA soluble (OVAs), la HIS inesperadamente no tuvo efecto alguno sobre la presentación cruzada de OVAp. Como ya indicamos, las vías utilizadas por las CDs para la internalización del antígeno dependen de la naturaleza del mismo, nuestros datos sugerirían que la HIS activaría mecanismos que operan sobre la presentación cruzada de los Ags solubles.

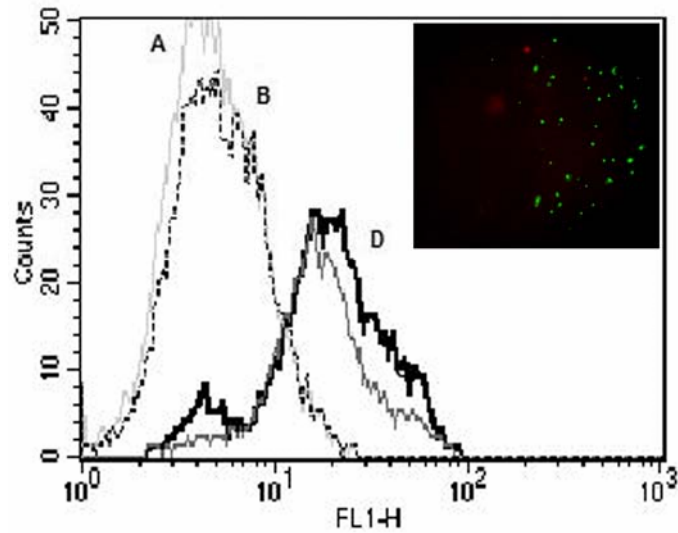
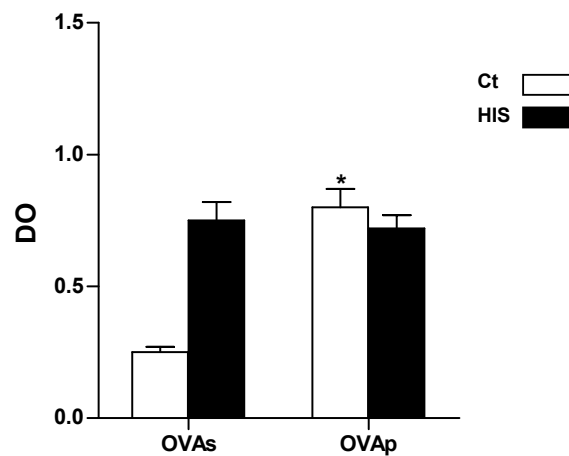
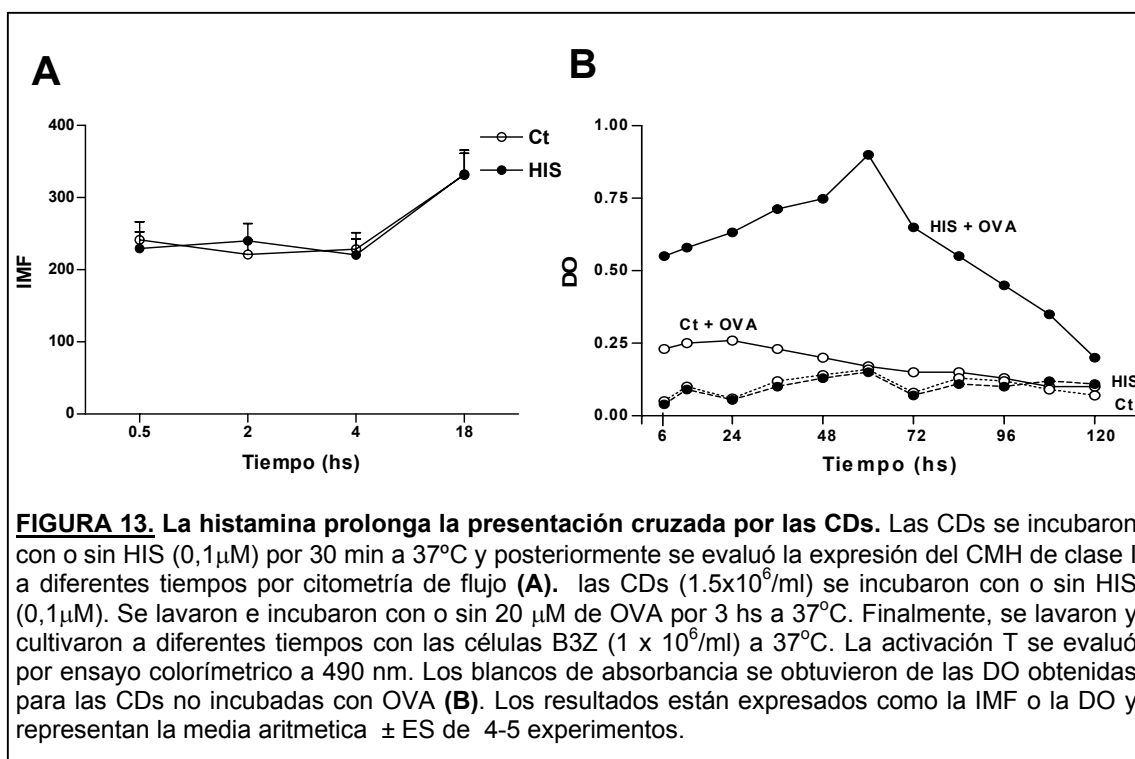
A**B**

FIGURA 12. La histamina no afecta la presentación cruzada de OVAp por las CDs. Las CDs inmaduras ($1,0 \times 10^6/\text{ml}$) se trataron con HIS $0,1\mu\text{M}$ (**histograma B y D**) o no (**histograma A y C**) por 30 min a 37°C y luego se incubaron con OVAp-FITC (10^9 perlas/ml) durante 3h a 37°C . La captación de OVAp se cuantificó por citometría de flujo. La adquisición de las muestras se realizó en presencia de azul tripán para eliminar la fluorescencia extracelular. **Histogramas A y B:** células incubadas sin OVAp. **Histogramas C y D:** células incubadas con OVAp. Experimento representativo de 4 realizados. Se muestra una fotografía de fluorescencia de la captación de OVAp-FITC por CDsHIS y marcación en rojo del CMH de clase I intracitoplasmática (**A**). Las CDs inmaduras ($1,0 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron con o sin HIS $0,1\mu\text{M}$ por 30 min a 37°C . Luego se incubaron con OVAs ($2\mu\text{M}$) u OVAp en una relación 1:50, durante 3h a 37°C . Por último, las CDs se lavaron y se desarrolló el ensayo de presentación cruzada. Los resultados están expresados en DO a 492 nm y representan la media aritmética \pm MES de 3-5 experimentos. El asterisco representa la significancia estadística ($*p<0,05$) entre el control y los tratamientos (**B**).

10. La histamina aumenta la estabilidad del complejo CMH I-péptido sobre la superficie de la célula dendrítica.

Más allá de las diferencias observadas en CDs tratadas con HIS en relación a la presentación cruzada de Ags solubles versus particulados, que indicarían una activación diferencial a nivel interno de las vías encargadas de procesar y presentar el Ag en el contexto de las moléculas del CMH de clase I, el hecho de que la HIS potencie la presentación cruzada de Ags solubles puede resultar de su accionar sobre dos puntos importantes, que redundarían en una mayor presentación. En primer lugar, la HIS podría inducir un incremento de las moléculas de clase I, sin embargo, como demostramos en la **FIGURA 7A**, la expresión no variaba luego de 18 hs de cultivo. Cabía entonces preguntarse si esta molécula variaba su expresión a tiempos cortos, ya que el ensayo de presentación cruzada se evaluaba a las 3 hs. Como se observa en la **FIGURA 13A**, no se observaron cambios en la expresión de esta molécula en las CDs tratadas con HIS comparadas con el Ct sin estimular, a ningún tiempo evaluado.

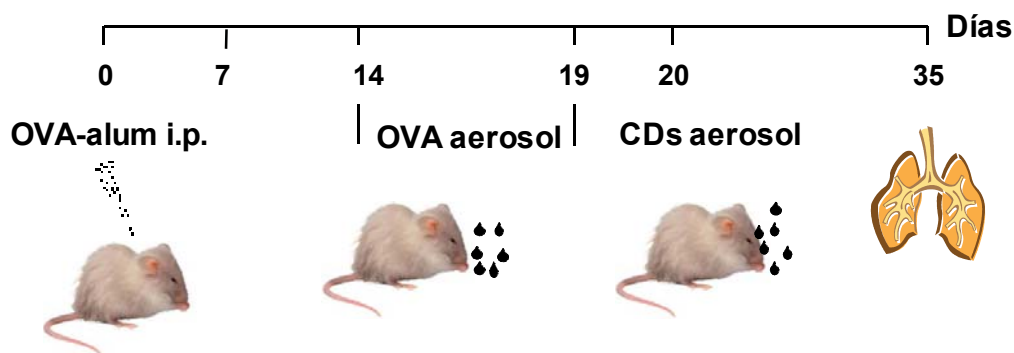
En segundo lugar, analizamos si la HIS inducía un incremento en el lapso de tiempo en el cual se hallaba el complejo péptido-CMH en la superficie de la CD. Para lo cual, las CDs tratadas o no con OVA por 3 hs a 37°C, se lavaron exhaustivamente y se pusieron en contacto a distintos tiempos con la línea B3Z, ensayándose luego la presentación cruzada. Como se observa en la **FIGURA 13B**, la HIS potenció el tiempo de exposición de los complejos sobre la superficie de las CDs más allá de las 72 hs mientras que en las CDs sin estimular la expresión del complejo comienzan a declinar a las 48 hs.



11. Modulación de la presentación cruzada de antígenos por histamina: su probable rol *in vivo*

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la HIS impone profundos cambios en la funcionalidad de las CDs murinas, particularmente a nivel de la presentación cruzada de Ags. Sorpresivamente, este efecto fue sólo mediado para Ags solubles no así para Ags particulados. Teniendo en cuenta que las reacciones de hipersensibilidad del tipo I son disparadas por Ags inocuos solubles y, que recientemente Miyahara y col. (192),(217) demostraron la importancia de las células T CD8⁺ alérgeno específicas en la cronicidad de los procesos alérgicos, nos propusimos evaluar el rol de la HIS en un modelo *in vivo*. Para ello, desarrollamos un modelo de asma en ratones como se describió previamente (171).

MODELO DE ASMA



Para lo cual, como se muestra en el esquema, se inocularon intraperitonealmente (i.p) ratones BALB/C con 10 $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de una suspensión de OVA en 0,2% de aluminato de sodio los días 0 y 7, dicho adyuvante se utiliza por su capacidad de inducir respuestas del tipo T_H2 . A los 14 días de la segunda sensibilización, los ratones se instilaron intranasalmente durante 5 días con OVA (1mg/ml) / ratón. Al término de ese período, se evaluaron los siguientes parámetros para demostrar la génesis del proceso alérgico: rinitis nasal, niveles séricos de IgE, y eosinofilia.

Como se observa en la **FIGURA 14A**, una vez desarrollado el proceso alérgico, los ratones presentaban un incremento en la población de eosinófilos, cuyos valores oscilaban entre un 40% a un 50% (A=alérgico o posteriormente denominado PBS), mientras que en los ratones normales (N) estos valores eran inferiores al 0,5%. Asimismo, como se muestra en la **FIGURA 14B** los sueros de los ratones A presentaron Acs IgE específicos para la OVA, la cual no se detectó, como era de esperarse en los ratones N. Este hecho entonces, era indicativo de la génesis de un proceso asmático en los ratones sensibilizados con OVA. En este punto, los ratones se instilaron (día 6) nasalmente con o sin 2×10^5 CDs, siendo el volumen de inóculo de 0,2 ml. Los tratamientos se denominaron: PBS, CDsCt (Ct) , CDs tratadas con HIS (0,1 μM) (HIS), o CDs tratadas con Ti (100 μM) (Ti). A los 7 y 15 días post-tratamiento, se estudiaron por citometría de flujo, las diferentes poblaciones celulares presentes en el lavado bronquial (LB) y en el pulmón (P) obtenido de estos animales. Asimismo, se obtuvieron los sueros de cada grupo para dosar

los niveles de IgE. Al analizar la población de eosinófilos, luego de los tratamientos, se evidenció una disminución muy significativa de estas células en los pulmones de los ratones tratados con CD_sTi, respecto a los otros tratamientos (**FIGURA 14 A**). Además, como se observa en la **FIGURA 14C**, la concentración de IgE fue significativamente mayor en el suero de los ratones tratados con CD_sHIS respecto a los no tratados con CDs (PBS), mientras que para los otros tratamientos no se obtuvieron diferencias significativas.

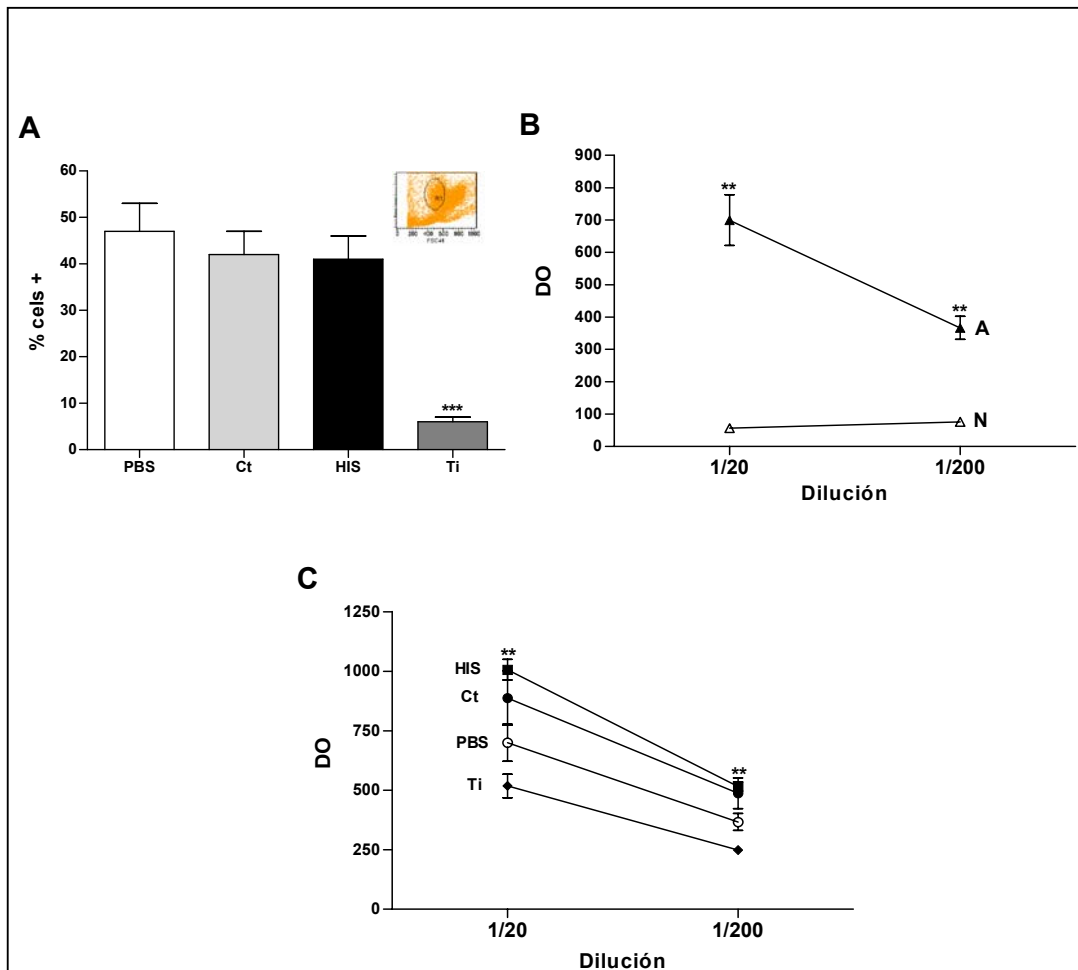


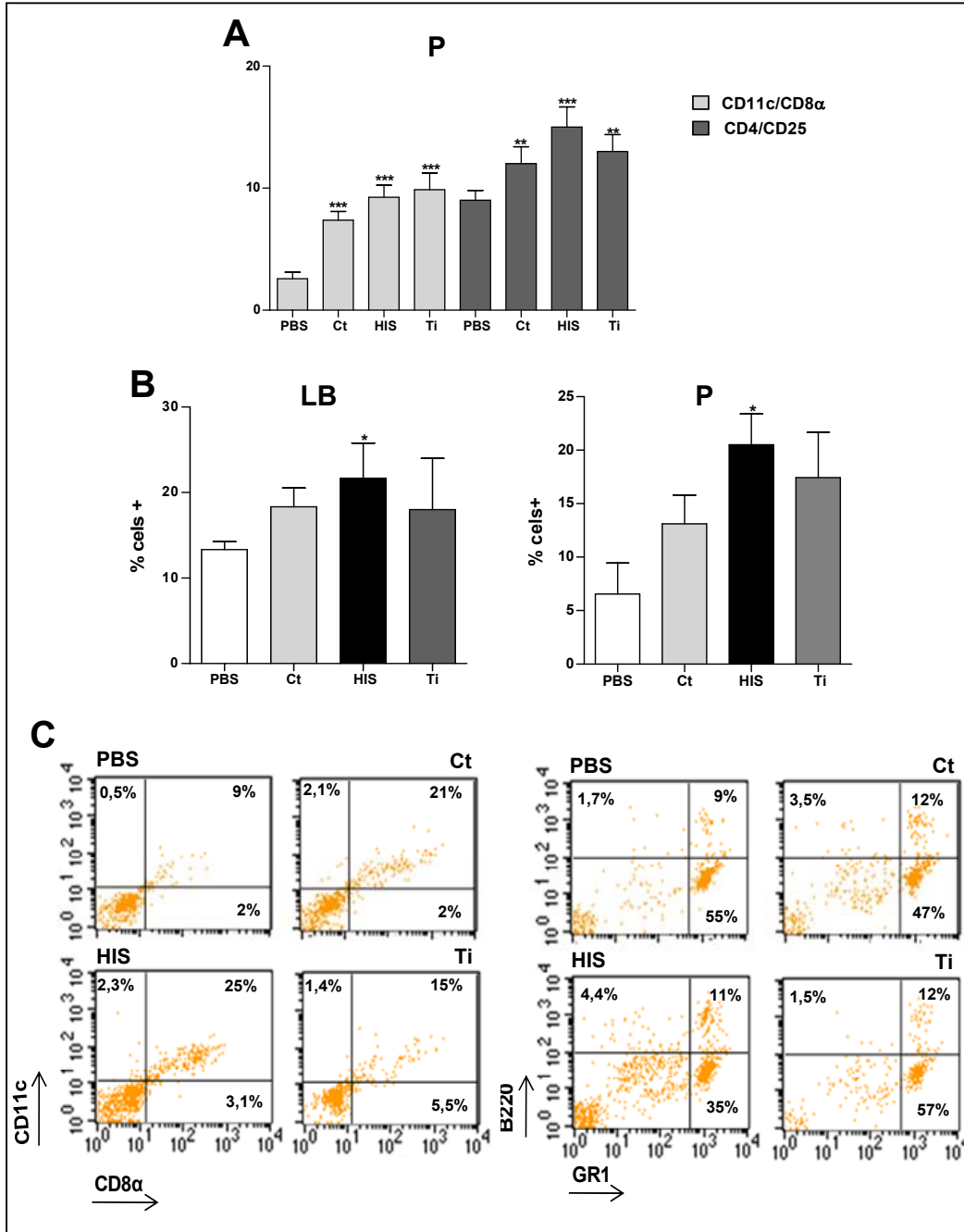
FIGURA 14. Parámetros determinantes del desarrollo del proceso asmático: Eosinofilia y niveles de IgE. Las poblaciones celulares de pulmón (P) se obtuvieron por tratamiento con colagenasa y DNAasa, como fuera descripto en el pto 16 de materiales y métodos. R1: % de eosinófilos. El % de eosinófilos se determinó por citometría de flujo. Los resultados están expresados como el % de células positivas \pm ES de 8 experimentos para cada tratamiento. El asterisco representa la significancia estadística ($***p < 0,001$) entre el control (PBS) y los tratamientos (**A**). La determinación de los niveles de IgE anti-OVA en sueros de ratones N y A (**B**). Dosaje de IgE específica en sueros de ratones alérgicos tratados con: PBS, CD_sCt, CD_sHIS o CD_sTi. Los niveles de IgE se realizaron por la técnica de ELISA y lectura a 490 nm. Los valores se encuentran expresados como la media aritmética de la DO \pm MES de 4 experimentos. El asterisco representa la significancia estadística ($**p < 0,01$) entre el control (PBS) y los tratamientos (**C**).

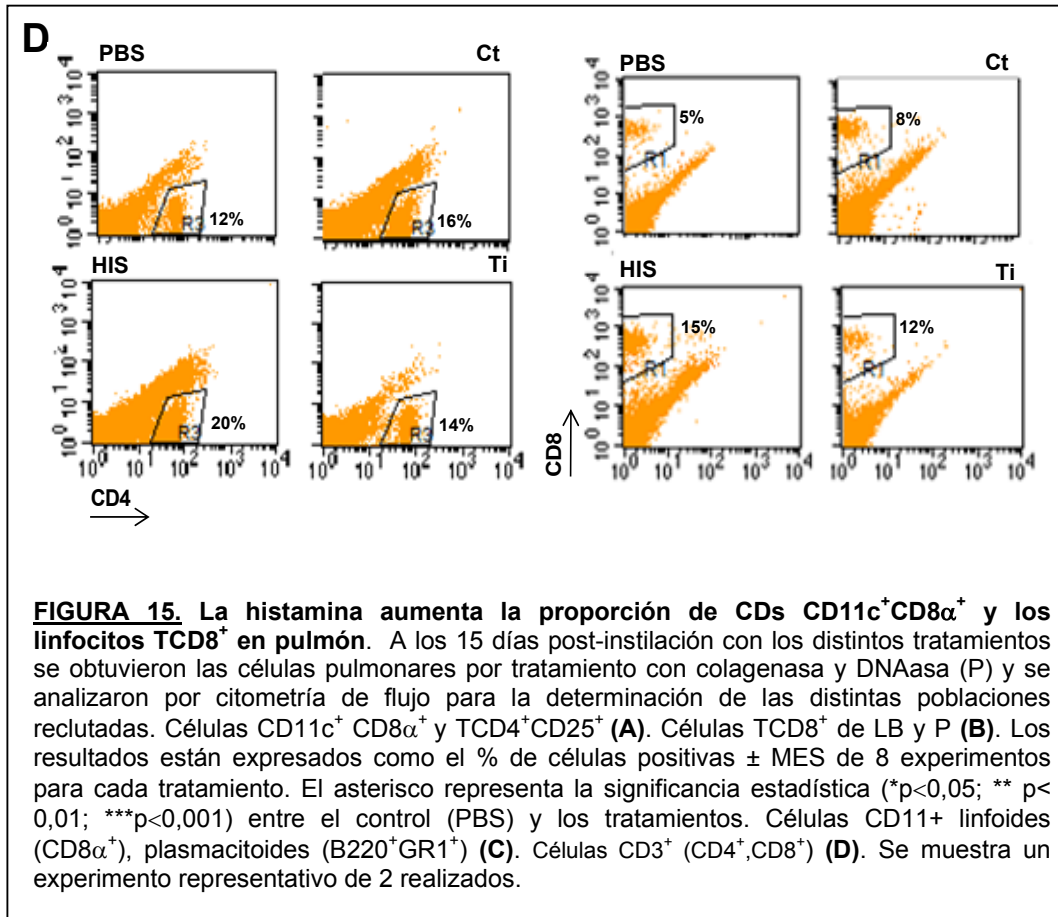
12. La histamina promueve el reclutamiento de CD^s “ linfoides” y de linfocitos CD8⁺ en el pulmón de los ratones alérgicos.

Al analizar, al cabo de 12 a 15 días las células reclutadas en el pulmón de los ratones alérgicos, se encontró un incremento en los P de ratones tratados con CD^sCt, CD^sHIS y CD^sTi de linfocitos TCD4⁺ activados (**FIGURA 15A**). Como lo demuestra el hecho que marcan la cadena α del receptor para la IL-2 (CD25), podriamos pensar también que fuesen células T regulatorias que expresan constitutivamente la molécula CD25. Asimismo, se observó un aumento de las CD^s linfoides (CD11c⁺CD8 α ⁺) con todos los tratamientos que involucraron a las CD^s, (Figura 15A). Cabe mencionar, que un efecto similar había sido observado cuando se evaluaron las células reclutadas a los 5 días en LB de los ratones tratados, encontrándose también un aumento en las CD^s linfoides en ratones tratados con CD^sCt, CD^sHIS y CD^sTi (3%, 10, 5% vs. PBS, respectivamente). Sin embargo, el hecho más importante de resaltar, como se muestra en la **FIGURA 15B**, fue hallar un incremento importante en los niveles de linfocitos T CD8⁺, tanto en LB como en P, en los ratones tratados con CD^sHIS.

Posteriormente, para confirmar estos resultados procedimos a la purificación de las suspensiones celulares obtenidas de pulmón. Para lo cual, la población de CD^s se seleccionó positivamente con un Ac-anti CD11c y pasaje a través de una columna magnética. Como se muestra en la **FIGURA 15C** los diferentes tratamientos con CD^s indujeron un incremento significativo del reclutamiento de CD^s linfoides en los pulmones de los ratones alérgicos, siendo mayor el aumento cuando los ratones recibieron CD^sHIS. Asimismo, analizamos la población de CD^s plasmacitoides (B220/GR1) ya que la misma está en general asociada al desarrollo de tolerancia a nivel pulmonar (177). Sin embargo, no encontramos alteración de esta población con ninguno de los tratamientos evaluados (**FIGURA 15C**). Finalmente, analizamos la proporción de linfocitos, luego de la purificación de los mismos por selección negativa con un PanT . Como se puede ver en la **FIGURA 15D**, como ya habiamos demostrado al evaluar la población pulmonar total, todos los tratamientos con CD^s inducen un aumento de los linfocitos TCD4⁺ comparado con los ratones alérgicos tratados con PBS. Sin embargo, el hecho más destacado fue encontrar que el tratamiento con CD^sHIS incrementó la población de linfocitos

TCD8⁺ en un orden de 3 veces comparado tanto con los ratones alérgicos instilados con PBS, CDsCt o CDsTi.





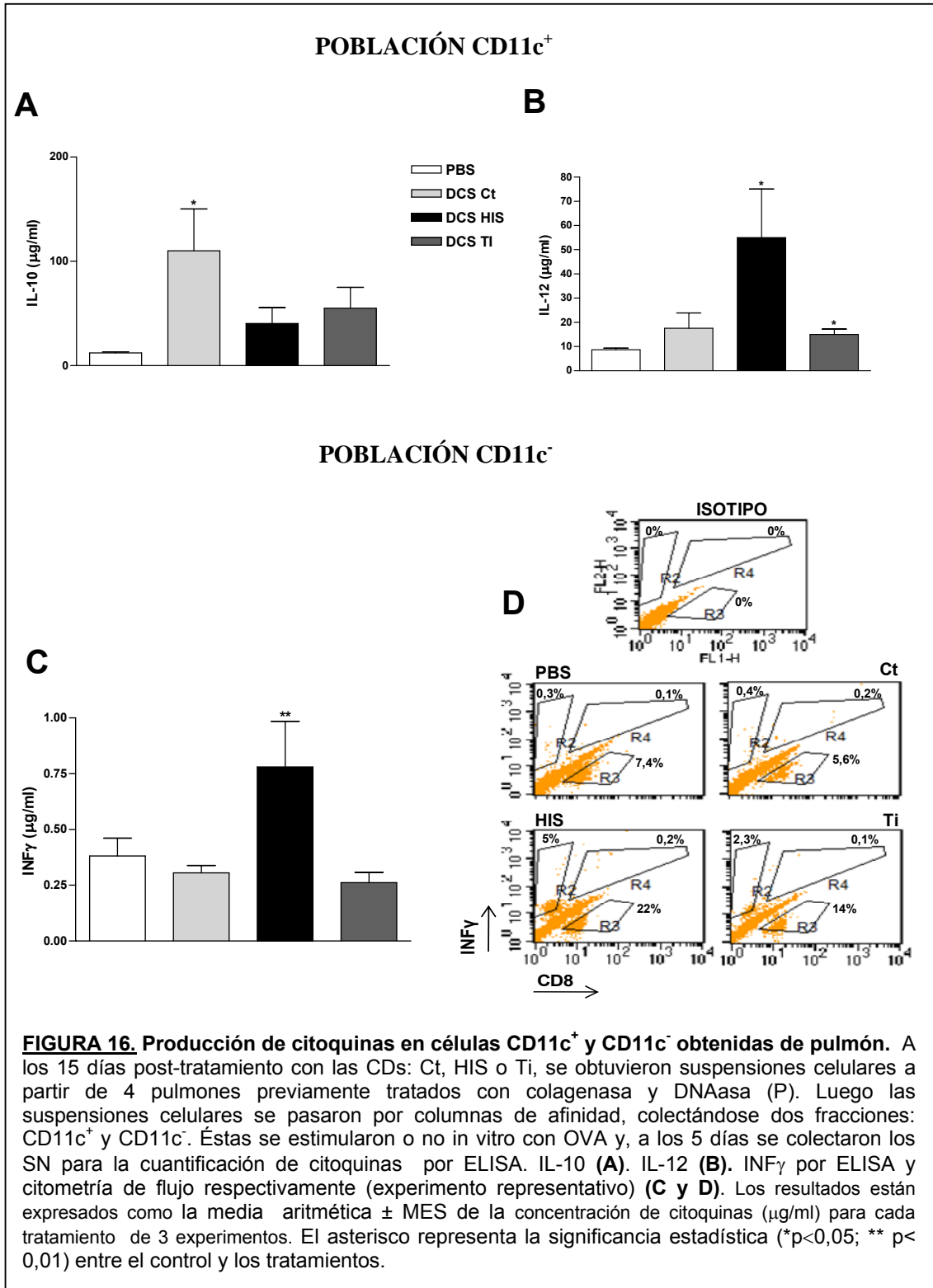
13. La histamina incrementa la producción de IL-12 e INF-γ en el pulmón.

Habiendo encontrado que las CDs tratadas con HIS promovieron un aumento de las CDs linfoides, que en ratón son las únicas con capacidad de activar clones de LT CD8⁺, los que también fueron notablemente aumentados por la HIS, evaluamos a continuación las citoquinas plausibles de ser producidas por estas poblaciones celulares. Para lo cual, luego de la obtención de las suspensiones celulares (4 pulmones/ tratamiento), las mismas se purificaron por selección positiva con un anti-CD11c. Luego de su transferencia a una columna de afinidad, se colectaron dos fracciones: la positiva: células CD11c⁺ y la negativa: células CD11c⁻, las que fueron o no re-estimuladas in vitro con 10 μg/ml de OVA. Al cabo de 24 hs, se colectaron los sobrenadantes (SN) y se cuantificaron las concentraciones de IL-10, IL-12 e INF-γ por ELISA.

Como se muestra en la **FIGURA 16A** los SN de células CD11^c provenientes de ratones alérgicos tratados con CDsCt, estimularon de manera notable la producción de IL-10. Por el contrario, al cuantificar la producción de IL-12 en los SN de la población pulmonar CD11c⁺, encontramos que como se muestra en la **FIGURA 16B**, la misma se vio incrementada de forma inesperada en SN provenientes de ratones alérgicos tratados con CDsHIS, por otra parte, en presencia de CDsTi esta producción de IL-12 fue completamente inhibida, lo que estaría indicando que la acción de la HIS en la modulación de la IL-12 por las CDs murinas depende de su accionar vía el H4R.

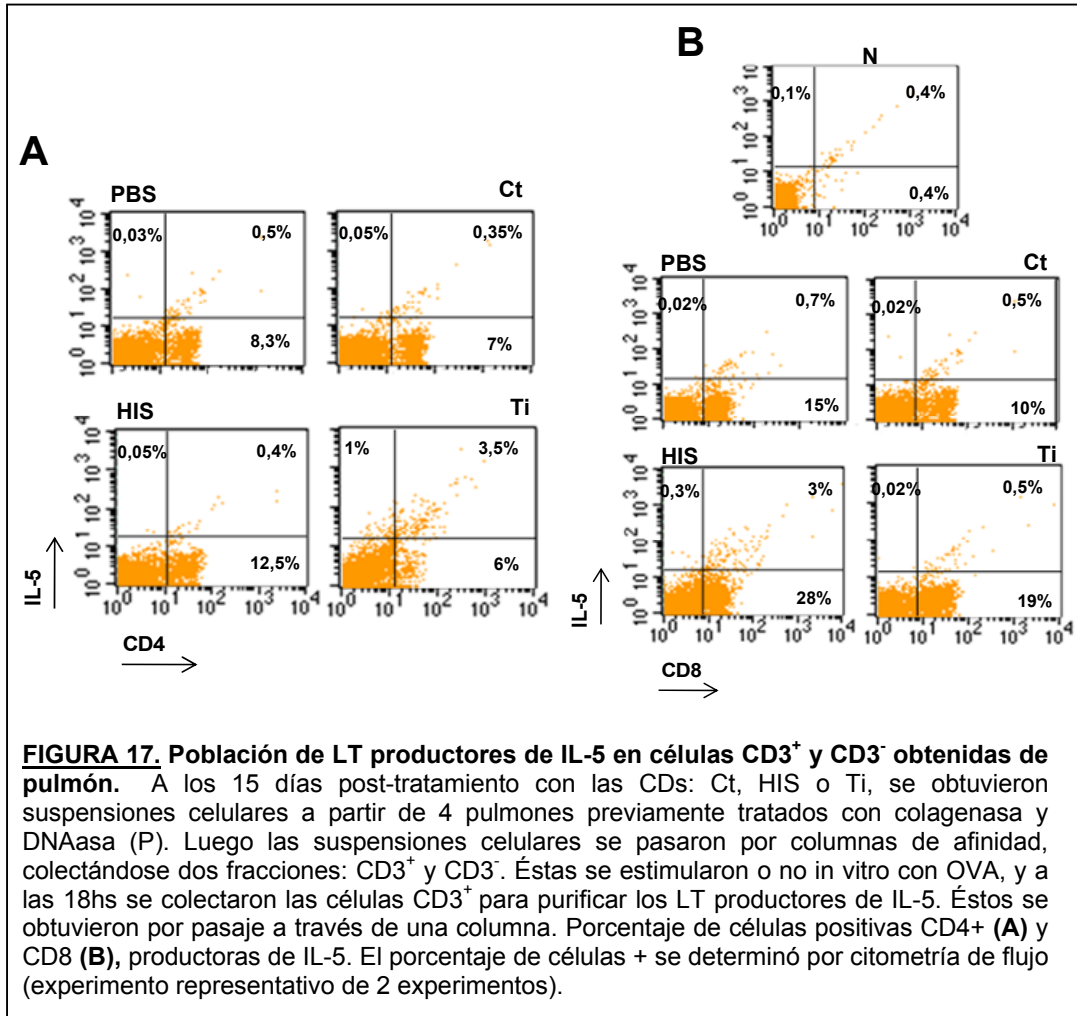
Por otro lado, la fracción celular CD11c⁻ proveniente de los ratones tratados con CDsHIS, también mostró un incremento de la concentración de INF- γ , como se observa en la **Figura 16C**. Contrariamente a lo esperado, éste aumento no fue a expensas de los LT CD8⁺ reclutados en el pulmón por el tratamiento de los ratones alérgicos con CDsHIS (**Figura 16D**).

Estos resultados indicarían que en el pulmón se estarían liberando citoquinas que orientarían el perfil de la respuesta inmune adaptativa hacia el tipo T_H1, como la IL-12, y otras que promoverían la activación de clones TCD8⁺, como el INF γ . Por otra parte, como se mencionó antes, debemos destacar que el INF γ no fue producido por los LT CD8⁺ presentes en el pulmón, por lo que en esta instancia de los experimentos no es posible establecer el rol que cumplirían dichas células en este órgano.



14. La histamina promueve en pulmón la producción de IL-5 en LT CD8⁺

A continuación, analizamos la producción de IL-5 en los LT purificados de los pulmones de los ratones tratados y luego re-estimulados in vitro con OVA. Para ello se obtuvieron suspensiones celulares de un pool de 4 pulmones/ tratamiento y luego éstas se pasaron a través de columnas de afinidad para el marcador CD3. Se colectaron dos fracciones: células CD3⁺ y células CD3⁻, las que fueron o no re-estimuladas in vitro con OVA. A las 18hs, se colectaron las células para luego efectuar la purificación de los LT productores de IL-5. Se estudió el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ productoras de esta citoquina por citometría de flujo. En la **FIGURA 17A** se observa que el tratamiento con CDSTi condujo a un aumento en el porcentaje de LT CD4⁺ productores de IL-5, en el pulmón. Más interesante aún es el incremento que encontramos en la población de LT CD8⁺ productores de IL-5, proveniente de pulmones de ratones tratados con CDSHIS (**FIGURA 17B**). Este dato podría estar indicando que los LT CD8⁺ que se ven incrementados por acción del tratamiento con CDSHIS, los cuales no producirían INF γ (**FIGURA 16D**), podrían tratarse de los TC2. Como ya se mencionó, estos secretan preferentemente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, mientras que los TC1 secretan principalmente INF γ . (190-191).



DISCUSIÓN

La histamina liberada por los mastocitos y basófilos, desempeña un rol fundamental en las reacciones alérgicas e inflamatorias (1). Los efectos agudos de la histamina, como la vasoconstricción, vasodilatación y el incremento en la permeabilidad vascular, son los responsables de la mayoría de los síntomas observados en la rinitis, asma, urticaria y anafilaxis (218). Además, la histamina ejerce un rol inmunorregulatorio al actuar sobre diversas células inmunes, entre ellas los LT, monocitos, macrófagos y las CDs, que juegan un papel primordial en iniciar y mantener las respuestas inflamatorias (9). En particular, tiene influencia en el perfil de citoquinas pro y anti-inflamatorias producidas por los monocitos, macrófagos y las CDs (3). Los efectos biológicos de la histamina son llevados a cabo a través de su acción sobre 4 receptores (H1R, H2R, H3R y H4R). Sin embargo, muchos de los efectos inmunorregulatorios de la histamina descritos hasta el momento dependen de su interacción con los receptores H1R y H2R (219, 220). Teniendo en cuenta que, la acción de la histamina con los mismos origina respuestas divergentes, siendo el H1R predominantemente estimulador y el H2R inhibitorio en la mayoría de los casos (221). Por lo tanto, la expresión de receptores para la histamina en las diferentes células, podría ser un mecanismo por el cual se modulan las funciones efectoras de este mediador, lo que explicaría en parte los efectos tan disímiles observados para la histamina sobre las células inflamatorias e inmunes.

A lo largo de esta tesis, nos centramos en profundizar los efectos de la histamina sobre la funcionalidad de las CDs murinas, células clave en captar y presentar el Ag a los LT vírgenes. Los resultados obtenidos pueden ser divididos en 5 grandes grupos:

1. Expresión de receptores histaminérgicos por CDs murinas y producción de histamina.
2. Modulación de la captación de antígenos.
3. Activación o maduración. Efecto del microambiente sobre la respuesta a la histamina.
4. Presentación cruzada de Ags.
5. Modulación del proceso alérgico

1. Características de las células dendríticas murinas: Análisis de receptores histaminérgicos.

En trabajos previos, se demostró que tanto las CDs humanas inmaduras como maduras expresan el ARNm para los receptores histaminérgicos H1R, H2R, H3R y H4R (16, 207). Nosotros encontramos que las CDs inmaduras murinas expresan los receptores H1R y H2R en la membrana celular. Sorpresivamente, el receptor H1 tiene una mayor expresión que el H2. En general, en las células del sistema inmune no existen estudios que permitan caracterizar estos receptores en relación a su cantidad ni a los sitios de unión. Hasta el momento, sólo un trabajo previo usando ensayos de competencia con histamina marcada, pudo establecer en CDs humanas una relación entre las cantidades relativas de los mismos a nivel de la membrana plasmática (222). Un hecho interesante, es que para el estudio de estos dos receptores utilizamos la técnica de RIA, la que nos permitió determinar la existencia de un único sitio de unión para ambos receptores, asimismo pudimos establecer también la constante de disociación (K_d) la cual fue similar a la obtenida por diversos grupos en diferentes tipos celulares para estos receptores (211). Contrariamente a lo observado en humanos, en ratones hasta el momento, debido a la alta homología existente entre los receptores H3 y H4, no se desarrollaron Acs específicos para cada uno de ellos y sólo fue detectada la expresión del ARNm para el receptor H3 (223) a nivel del sistema nervioso central y para el H4 en las células de la médula ósea y del bazo (224), lo que indicaría un posible rol de este último en la regulación de la respuesta inmune (193, 225). Al analizar la expresión de ambos receptores por RT-PCR demostramos la presencia del ARNm para el H3R y el H4R en las CDs murinas. Al evaluar los niveles de expresión de ambos receptores, utilizando como control de carga la actina, pudimos determinar una mayor expresión para el ARNm del H4R (Ct^+ 0,95; CDs 0,5; Ct^+ 0,6; CDs 0,7, para el H3R y H4R, respectivamente). Si bien no pudimos demostrar que estos ARNm son efectivamente traducidos a proteínas, ya que hasta el momento no existen los Acs específicos en ratón, creemos que los mismos están expresados a nivel de la membrana de las CDs murinas, debido a que el bloqueo de los mismos tuvo

gran impacto en muchas de las funciones evaluadas a lo largo de este trabajo de tesis.

Los mastocitos y basófilos son la fuente principal de histamina la cual está contenida en sus gránulos, hace algunos años se sugirió que los leucocitos eran capaces de producirla a través de una vía inducible (211). En una publicación reciente, Dunford y colaboradores (199) demostraron que las CDs murinas cocultivadas con esplenocitos son capaces de producir histamina. Sin embargo, hasta el momento se demostró la producción constitutiva de histamina en los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos humanos (208, 209). Nosotros encontramos, que las CDs inmaduras producen histamina en forma constitutiva. En un trabajo previo del grupo de Falus (6), se demostró un incremento en el contenido del ARNm para la histamina durante la diferenciación de CDs en presencia de GM-CSF e IL-4 a partir de monocitos de sangre periférica. Dicho efecto, era máximo a los 5 días y estaba asociado a la presencia en el cultivo de GM-CSF, el cual induce un incremento en el contenido citoplasmático de HDC, enzima clave en la síntesis de histamina. Por el contrario, nuestros ensayos fueron realizados en sobrenadantes obtenidos del cultivo de CDs inmaduras en presencia de medio completo sin factor GM-CSF. En este sentido, fue demostrado que la histamina actuando sobre los receptores H1 de los queratinocitos induce la producción de GM-CSF (226) y a nivel bronquial la de IL-6 y del GM-CSF, interaccionando con los receptores H1 y H2, simultáneamente (227). Nuestros resultados y los previos indicarían la existencia de una retroalimentación positiva entre la histamina y el GM-CSF por la cual la diferenciación de las CDs en presencia de este factor determinaría la producción endógena de histamina.

2. Modulación de la captación de antígenos por histamina

En relación a la modulación ejercida por la histamina sobre la internalización antigénica sólo ha sido evaluada sobre las células fagocíticas. En ese sentido, se demostró que la amina, generalmente reduce la pinocitosis de grandes partículas del tipo bacteriano. Asimismo, se demostró que la fagocitosis de bacterias por granulocitos polimorfonucleares y macrófagos es inhibida por la histamina, además esta acción está asociada a un retraso del

clareado de la bacteria (228). Sin embargo, cuando evaluamos la fagocitosis de un Ag soluble adsorbido a partículas de látex por CDs, no hallamos efecto alguno de la amina. Por el contrario, encontramos que la histamina incrementa la capacidad de las CDs de internalizar Ags solubles como la OVA y HRP. Este hecho es muy importante, teniendo en cuenta que en la periferia las CDs son las únicas células con capacidad para sensar el microambiente y detectar una infección, capturar los productos del patógeno y transportarlos al ganglio linfático dando inicio a la respuesta adaptativa.

La estimulación de la endocitosis ocurre a través de la interacción de la histamina con el receptor H₂, ya que sólo el bloqueo con el antagonista cimetidina inhibió esta función. Cabe señalar, que la inhibición en la fagocitosis inducida por la histamina en los procesos de periodontitis (229) y colitis (230) de partículas bacterianas es también a expensas de su acción sobre el receptor H₂ y está generalmente asociada a la activación de la adenilatociclasa así como a la estimulación de proteína-quinasa dependientes del AMP-cíclico. A diferencia de la fagocitosis, la macropinocitosis no está solamente regulada por la desorganización de la membrana y del citoesqueleto de actina, sino que depende también de la activación de la fosfolipasa C (PLC), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y de la actividad la bomba Na⁺/H⁺ (77, 71). En nuestro caso, encontramos que esta regulación de la endocitosis de OVA por la histamina a través del receptor H₂, induce la desorganización del citoesqueleto así como activación de la PI3K, ya que la captación de OVA fue reducida en presencia de inhibidores de estas vías de activación, la citocalasina B y la wortmanina, respectivamente. Asimismo, encontramos que en la endocitosis de OVA por las CDs también está involucrado parcialmente el receptor de manosa. En este sentido, recientemente Burgdorf y col. (210) demostraron que la captación de OVA soluble depende exclusivamente del receptor de manosa, ya que en las CDs se inhibe completamente su internalización si la misma es bloqueada por el inhibidor manano, lo mismo demostraron utilizando CDs provenientes de ratones deficientes para dicho receptor. Por el contrario, ellos encontraron que la endocitosis de OVA particulada depende de receptores diferentes a éste. Sin embargo, como lo demuestran nuestros resultados, nosotros no pudimos inhibir completamente la internalización de OVA con manano. Este polímero se une a estructuras ricas en manosa, actualmente se sabe que las CDs poseen otros

receptores con afinidad por grupos manosilados, como el DC-SIGN, por lo cual, no es posible considerarlo un verdadero inhibidor del receptor de manosa sino más bien un competidor del mismo. De todas formas, como describimos anteriormente, en nuestro sistema la captación de OVA ocurre fundamentalmente mediada a través del mecanismo de macropinocitosis.

Cabe señalar que, debido a que tanto las CDs inmaduras como los mastocitos se encuentran en íntima proximidad en las superficies de las mucosas y la piel donde existe gran exposición antigénica, el hecho que la histamina active el mecanismo de endocitosis nos permite inferir que podría incrementar la capacidad de captar el Ag. por las CDs inmaduras in vivo. En este sentido, las concentraciones utilizadas por nosotros en nuestros ensayos (0.1 μ M) son similares a las descritas en las respuestas inflamatorias observadas en los procesos de etiología alérgica (47,57).

3. Activación o maduración. Efecto del microambiente sobre la respuesta a la histamina.

a. *Activación o maduración de la CD:* La activación de las CDs inmaduras ocurre a través de la interacción de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) con sus co-receptores sobre la CD o receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Las CDs expresan los dos miembros más importantes de RRP. Los receptores del tipo Toll o TLRs que reconocen PAMPs lipídicos, proteicos, lipoproteicos, LPS ó ácidos nucleicos lo que lleva a la activación de las cascadas de señalización conducentes a la activación de las CDs y posterior secreción de citoquinas inflamatorias (89). Entre las principales vías se encuentran el NF- κ B, MAP-quinasas y los factores reguladores del IFN (IRFs). Por otra parte, los receptores para lectinas del tipo C (RLC), reconocen estructuras del tipo carbohidrato presentes en la superficie de los patógenos e inducen principalmente su internalización, procesamiento y presentación por las CDs. Además las CDs, expresan receptores para numerosas quimioquinas y citoquinas, así como múltiples receptores para el reconocimiento de una variedad de estructuras que son producidas en respuesta a alteraciones del entorno (231).

Es justamente el conjunto de interacciones producidas por el reconocimiento de PAMPs, citoquinas, mediadores inflamatorios y señales de stress, lo que conduce a la maduración de la CD y es lo que determina que las mismas sean capaces de activar a los linfocitos T vírgenes.

La histamina fue descrita como un estímulo que lleva a la activación de las CDs, en este sentido la mayoría de los trabajos se centraron en el análisis fenotípico y la inducción de citoquinas. Así se demostró que la histamina induce un aumento en la expresión del CD86 y de la molécula CMH de clase II en CDs humanas (21, 24). Por otra parte, en CDs maduras con LPS incrementa la síntesis y liberación de IL-10, mientras que inhibe la producción de IL-12 (22, 214). Además, induce la migración de las células de Langerhans debido a que modula la expresión de las quimioquinas CCR7 y CCR5 (232, 233).

Nosotros evaluamos el efecto de la histamina sobre la activación de las CDs murinas. En este sentido, y coincidentemente con lo observado por otros grupos, la histamina no provoca un gran impacto en los principales marcadores fenotípicos de las CDs, es decir que no estaría involucrada en nuestro sistema con la maduración de las CDs, proceso que sí es observado con el LPS, donde el cultivo de las CDs con éste induce un incremento significativo de las moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), del CD40 y de las moléculas CMH de clase II. Paradójicamente, las CDs pre-tratadas con histamina mostraron un incremento pequeño pero consistente de la molécula del MHC de clase II comparadas con las CDs sin estimular con la amina. En este sentido, Jelinek et al (220), encontraron que en ratones genéticamente libres de histamina no existen alteraciones a nivel del fenotipo de las CDs. Sin embargo, en nuestro caso, esta alteración a nivel de la expresión de la molécula MHC de clase II, indujo una mayor capacidad en la presentación por estas CDs lo que pudo ser demostrado en los ensayos de cultivo mixto linfocitario. Sin embargo, como puede observarse la “activación” inducida por la histamina fue menos importante que la observada en CDs maduras con LPS. Asimismo, este incremento en la molécula de clase II y en la presentación fue corroborado in vivo. En este sentido, cuando inmunizamos ratones con CDs pre-tratadas con histamina y cargadas con OVA, se observó un incremento de aproximadamente un 25% en relación a los ratones inmunizados con CDs

cargadas con OVA, en la respuesta de Acs anti-OVA, de isotipos IgG1, IgG2a (resultados no mostrados).

b. *Efecto del microambiente*: La acidosis extracelular es una condición frecuentemente asociada a una variedad de condiciones patológicas y fisiológicas. En este sentido, se sabe que la mayoría de los procesos infecciosos bacterianos, así como extensas zonas tumorales están expuestas a valores acídicos (rango pH5-pH 6,7). Teniendo en cuenta, que además nosotros habíamos demostrado previamente que la acidosis extracelular tiene gran impacto sobre la fisiología de las CDs (203), nos preguntamos si la histamina liberada por los mastocitos en la génesis del proceso inflamatorio, que generalmente está acompañado por un descenso del pH, modificaba en forma diferente la funcionalidad de las CDs. Así, encontramos que lo observado *in vitro* por nosotros, es decir el incremento de la captación antigénica y up-regulación del MHC de clase II eran potenciados por la histamina si las CDs habían estado previamente expuestas a pH 6,5. En estas condiciones, la histamina modulaba la endocitosis actuando también a través del receptor H₂. Es conocido que la histamina, induce la polarización de las respuestas T hacia un perfil T_{H2}, efecto que es determinante en la inducción de respuestas de Acs del tipo IgE (7). Observaciones realizadas por Hunt y colaboradores (234), indican que los procesos agudos de asma están asociados a la acidificación dramática del pulmón (pH <5-5,5). Sin embargo, cuando nosotros evaluamos la producción de citoquinas en CDs incubadas a pH 6,5, la histamina indujo la liberación de IL-12, citoquina asociada a la génesis de los perfiles T_{H1} e inhibitoria de los perfiles T_{H2}, este hecho fue sorprendente ya que en general la histamina inhibe la producción de IL-12 e incrementa la producción de IL-10 en CDs tratadas con un estímulo madurativo como el LPS (21, 22). Sin embargo, habría que indicar que en la mayoría de los estudios realizados, se trabaja en condiciones neutras de cultivo. Cabe señalar, que en un trabajo realizado en CDs murinas se observó un incremento no significativo en la expresión del ARNm para la IL-12 mediado por la histamina (193). Estos hallazgos sugieren que quizás muchos resultados obtenidos hasta el momento se realizaron *in vitro* en condiciones neutras de pH, sin tener en cuenta que muchos procesos

fisiológicos y/o patológicos se desarrollan en microambientes de naturaleza acídica.

4. Presentación cruzada

Nosotros encontramos que la histamina fue capaz de potenciar la presentación de Ags a través de la vía endógena, induciendo la generación de péptidos para ser presentados a través de las moléculas del CMH de clase I a los LT CD8⁺. Este inesperado efecto de la histamina, teniendo en cuenta que la misma es generalmente asociada a la inducción de perfiles T_H2, se induce cuando la amina actúa sobre los receptores H3R/H4R de las CDs sin intervención de los receptores H1R y H2R.

Como se mencionó anteriormente, la histamina incrementa la captación de OVA por las CDs, lo que nos llevó a pensar si era esta mayor captación del antígeno lo que determinaba un aumento en la presentación cruzada, sin embargo los ensayos en los cuales se cargó a las CDs con la misma cantidad de OVA y posteriormente las mismas se estimularon con histamina, reveló que la potenciación en la presentación a través de clase I fue un mecanismo inducido por la amina, independientemente del momento de carga antigénica. Este hecho, es muy importante ya que en general los Ags solubles que ingresan a las CPA, particularmente, CDs y macrófagos por macropinocitosis acceden a la vía de presentación cruzada ineficientemente, lo que se observa cuando se inmunizan ratones con Ags solubles los cuales fallan en inducir inmunidad citotóxica (235). Este mecanismo puede ser incrementado al aumentar las concentraciones de Ags solubles exógenos con los que se incuban a las CPA (76). En esta línea de razonamiento, es conocido que los Ags particulados, es decir, aquellos que ingresan por fagocitosis desarrollan respuestas TCD8⁺ más vigorosas, ya que hay una mayor disponibilidad del antígeno captado para ser presentado a través de las moléculas del CMH de clase I (103). Existen muchas razones para explicar este efecto diferencial observado entre los Ags solubles y los particulados. Una de ellas, justamente tiene en cuenta que los Ags particulados son internalizados en mayor cantidad por el mecanismo de fagocitosis (134), mientras que la cantidad de proteínas solubles que ingresan a las CPA por endocitosis son mucho menores (216). En

este sentido, Reis e Sousa y colaboradores demostraron que cuando la cantidad de antígeno captado es constante, los Ags proteicos solubles internalizados por fagocitosis son presentados en forma cruzada más eficientemente que los internalizados por endocitosis (236). Este hecho es consecuencia, de que los Ags son más accesibles a ser acomodados en moléculas del CMH de clase I, desde los fagosomas o macropinosomas, que desde otros compartimentos endocíticos (237).

Paradójicamente, en nuestro sistema nosotros encontramos que la histamina incrementa la endocitosis de OVA a través del mecanismo de macropinocitosis como lo demuestra el hecho que la misma fue inhibida por citocalasina B (66) y wortmanina (238), dos inhibidores de esta vía de internalización de Ags, y en menor medida por la endocitosis mediada por receptores como lo demuestra el hecho que la misma se inhibió en aproximadamente un 30-40 % en presencia de manano, un competidor del receptor de manosa. Burgdorf y col. (210) demostraron que la captación de OVA soluble a través del RM, induce un incremento de la presentación cruzada del antígeno. Sin embargo, cuando nosotros evaluamos este mecanismo en CDs bloqueadas con manano, sólo disminuyó la presentación cruzada de OVA en un 20-30 % respecto a la observada para las CDs estimuladas con histamina (resultado no mostrado). Es decir, que otro u otros mecanismos estarían involucrados en la potenciación de la presentación cruzada de Ags solubles por histamina, que no involucrarían a la forma en que es captado el mismo.

Nosotros no habíamos encontrado que la histamina indujese cambios en los niveles de expresión de las moléculas de clase I en relación a las CDs sin estimular a las 18 hs. Sin embargo, teniendo en cuenta que en los estudios de presentación cruzada, las CDs eran puestas en contacto con la línea B3Z a las tres horas de ser tratadas con histamina realizamos una cinética de esta molécula. Los resultados, indicaron que la expresión de la molécula CMH de clase I no se modificaba por histamina a ningún tiempo evaluado, por lo cual el incremento en la presentación cruzada no estaría relacionado a una mayor síntesis de las moléculas de clase I. En esta línea de pensamiento, es conocido que lo más importante es la cantidad de péptidos que quedan disponibles para ser presentados así como la estabilidad de los complejos formados entre estos péptidos y las moléculas del CMH de clase I (239). Esta última vía de

transporte retrógrado constitutivo ha sido recientemente descrita por Shen y colaboradores (240) y explica en gran medida como las proteínas solubles incorporadas en macropinosomas pueden adquirir membranas del RE durante su formación y acceder directamente a la maquinaria de procesamiento y presentación. Nosotros demostramos que la histamina incrementa la presentación cruzada por las CDs sólo de OVA soluble, contrariamente a lo esperado fue incapaz de modular la de la OVA asociada a partículas de látex. Cabe hacer hincapié en el hecho, que los estudios encarados hasta el momento por nosotros, no nos permiten saber que tipo de transporte sigue la OVA en la CD, es decir de qué manera se generan los péptidos que son presentados por la vía cruzada. Si embargo las diferencias observadas frente a ambos tipos de antígeno, probablemente reflejen la capacidad de la histamina para inducir la activación del transporte retrógrado de Ags solubles en las CDs, sin afectar la vía fagocítica. En este sentido, observamos una mayor disponibilidad del antígeno por más de 48 hs. con capacidad de formar complejos CMH-péptido, expresados a nivel de la membrana de las CDs, esto se tradujo en una mayor capacidad temporal de activar a LT CD8⁺ específicos. Esto podría indicar, que la histamina actuando sobre las CDs, protegería una fracción importante del Ag internalizado de la acción de la maquinaria proteolítica, por secuestro en el RE. De esta manera, el Ag quedaría disponible para su unión a las moléculas del CMH de clase I.

Independientemente de los mecanismos intracelulares inducidos por la histamina para potenciar la presentación cruzada de Ags, debemos mencionar que, el hecho que la histamina module este mecanismo es un evento de crucial importancia, ya que como mencionáramos a lo largo de este trabajo de Tesis, esta vía de presentación es el mayor mecanismo de vigilancia inmune en los tejidos (241). Para el huésped, es primordial tanto mantener la tolerancia a las proteínas propias presentes en el medio extracelular, al cual las CDs inmaduras están expuestas en la periferia. Así como, la generación de linfocitos TCD8⁺ citotóxicos para el control de infecciones virales (216), por patógenos intracelulares (242), y en la protección frente a células tumorales (103).

Cabe señalar que el hecho que ni la estimulación de la endocitosis ni de la presentación cruzada fueran afectadas por los antagonistas de los receptores histaminérgicos en CDs cultivadas en ausencia de histamina exógena, sugiere que la producción autócrina de histamina observada por nosotros no ejerce un efecto modulador sobre las CDs en condiciones normales. Sin embargo luego de la activación con un estímulo como el LPS la cantidad de histamina liberada por las CDs se incrementó marcadamente llegando a niveles de 0,1 μM , una concentración que incrementó la endocitosis y la presentación cruzada por las CDs (Figuras 3 y 11A). Lo que sugiere la existencia de un control autócrino a través de la histamina la cual regularía la funcionalidad de las CDs bajo condiciones inflamatorias.

5. Modulación del procesos alérgico.

Ha sido demostrado, que las células T CD8⁺ alérgico específicas son muy importantes en la fase tardía de los procesos alérgicos para mantener la cronicidad de los mismos, a través del desarrollo tanto de eosinofilia e inflamación a nivel bronquial y pulmonar (192, 217). En este punto, con los resultados obtenidos in vitro podríamos pensar que la histamina a través de la presentación cruzada de alérgenos representaría uno de los mecanismos por el cual los mastocitos a nivel de mucosas y en estrecha proximidad con las CDs contribuirían al desarrollo de las respuestas alérgicas a través de la activación de clones T CD8⁺ específicos. Teniendo en cuenta además, que la histamina es un mediador inflamatorio liberado en el árbol respiratorio durante los procesos asmáticos. En este sentido, ha sido demostrada una correlación positiva entre los niveles de histamina en los fluidos del lavado alveolar en pacientes asmáticos y el grado de obstrucción a nivel pulmonar (243).

Como mencionáramos previamente, en las reacciones alérgicas se pueden definir dos fases: la 1° de sensibilización y la 2° de re-exposición antigénica que lleva al desarrollo de la patología. Hace unos años, se demostró la importancia de los linfocitos TCD8⁺ específicos en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria crónica a nivel pulmonar (192). En este sentido, ha sido demostrada su presencia en lavados bronquiales tanto en pacientes asmáticos

(169), así como en ratones. Nosotros demostramos que la histamina actuando vía el H3/H4R potencia la presentación de la OVA por las CDs a través de la molécula del CMH de clase I. Al evaluar en un modelo in vivo, la acción de las CDs estimuladas in vitro con histamina, observamos que las mismas inducen un reclutamiento de linfocitos TCD8⁺ a nivel del tejido pulmonar. Sin embargo, cuando evaluamos las citoquinas producidas por cada población celular, encontramos que los linfocitos CD8⁺ activados por estas células eran secretores de IL-5, no de IFN- γ . Es decir, que efectivamente la potenciación de la presentación cruzada en CDs por histamina condujo a un aumento importante de las CD8⁺ alérgeno-específicas del tipo TC2, es decir, Th2 “*like*” productores de citoquinas IL-5 e IL-13 fundamentalmente.

Sin embargo, nosotros también encontramos células productoras de IFN- γ correspondientes a LT CD4⁺ o bien las células NK reclutadas en pulmón. Este hecho no es contradictorio, ya que existen varios trabajos, que han demostrado la producción de citoquinas del tipo T_{H1} y T_{H2} en los exudados obtenidos del lavado bronquial de pacientes asmáticos, correspondientes tanto a los linfocitos TCD4⁺ como CD8⁺ (244, 245). Asimismo, el INF- γ es considerado en los casos agudos de asma como un marcador de la severidad del proceso inflamatorio.

Cabe señalar así mismo, que nosotros encontramos también un aumento significativo en la producción de IL-12, citoquina fundamental en la génesis de las respuestas del tipo T_{H1}, en la población CD11c⁺. Este hecho fue inesperado, ya que como dijimos la histamina regula negativamente a la IL-12 en CDs maduradas con LPS. Sin embargo, nosotros encontramos un fuerte aumento de la población de CDs linfoides en los pulmones de los ratones alérgicos y tratados con CDsHIS. Como es sabido, esta población en ratón se caracteriza por su capacidad de activar clones T CD8⁺ (63) y secretar principalmente IL-12. Asimismo, cabe mencionar que cuando nosotros estudiamos la acción de los ambientes ácidos en las respuestas disparadas por la amina sobre las CDs murinas, inexplicablemente encontramos que la misma estimulaba la producción de esta citoquina, es decir que se comportó como un estímulo efector de respuestas T_{H1} y no T_{H2}. Justamente, como indicáramos previamente, existe una gran cantidad de antecedentes de las características

ácidas del proceso asmático (246), en gran parte debido a la intensa actividad metabólica de las células (247, 248). De manera que, tal vez la coexistencia de CDs en un microambiente de características acídicas, promuevan la liberación de esta citoquina, que favorecería también la activación de respuestas del tipo T_H1 , con la consiguiente liberación de $IFN-\gamma$, que induciría asimismo activación de linfocitos T $CD8^+$.

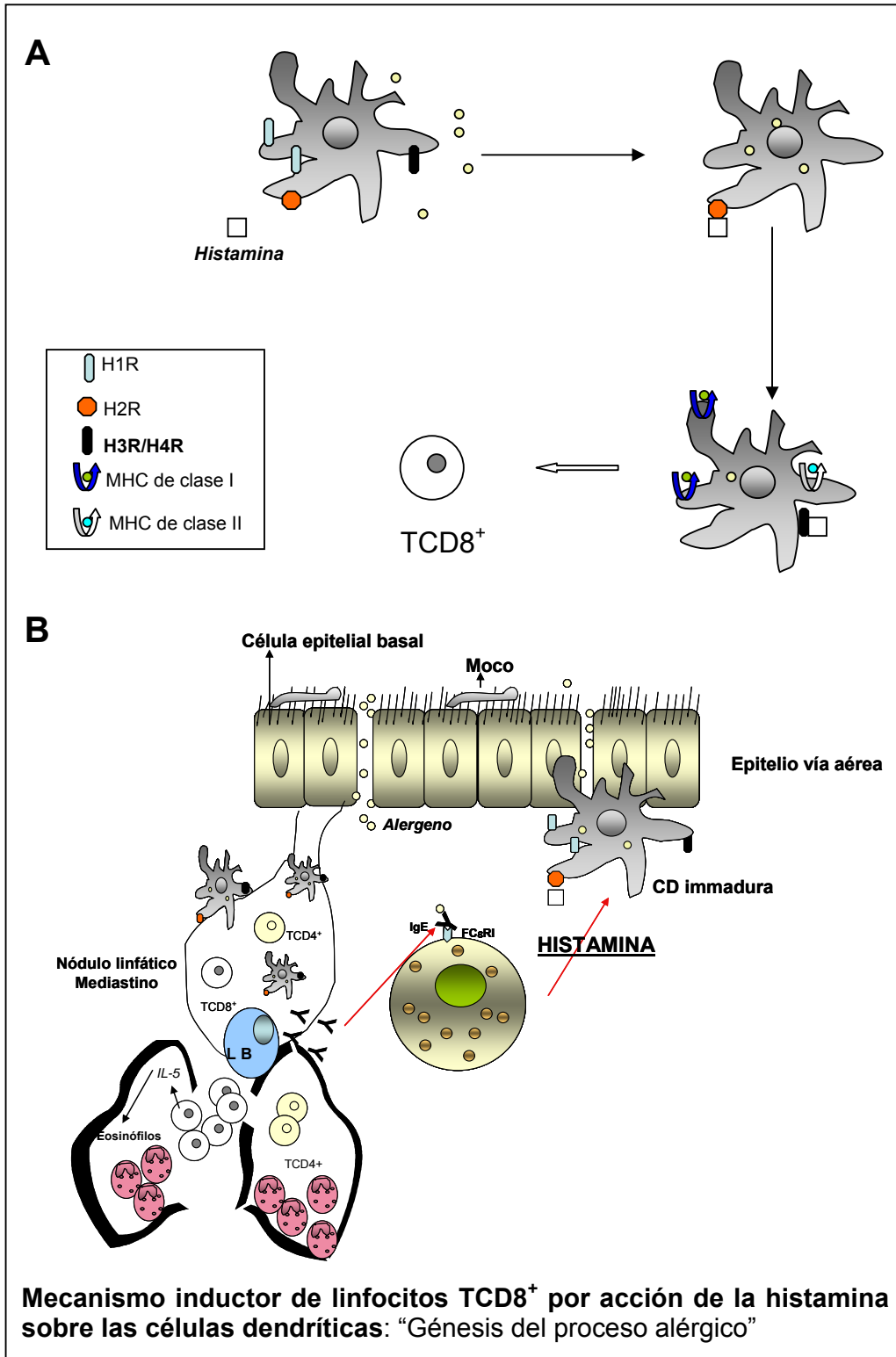
Como mencionáramos a lo largo de este trabajo de tesis, existe una correlación importante entre los niveles de histamina a nivel de las vías respiratorias y la severidad de los procesos asmáticos. Es por ello, que hace muchos años es usual el empleo de drogas anti-histamínicas, las cuales hasta el momento, no han probado ser efectivas en controlar la enfermedad. En general, se utilizan antagonistas del $H1R$ con los cuales se observa una mejoría de varios de los procesos fisiológicos de la rinitis alérgica, como el edema en la vasodilatación; sin embargo los mismos no mejoran sustancialmente las fases tempranas y tardías de la bronco constricción en respuesta al desafío antigénico. Esto puede deberse justamente a la existencia de cuatro receptores histaminérgicos, de forma tal que otros distintos del $H1R$ podrían ser más relevantes en a patología del asma. En este sentido, es justamente el $H4R$ uno de los considerados como mediadores de este proceso ya que se halla expresado en las células de origen hematopoyético (12). Recientemente, Dunford y colaboradores (199) demostraron en ratones deficientes para el $H4R$ una disminución de las respuestas alérgicas en relación a los ratones normales, en un modelo murino de asma. Esto era consecuencia de la disminución en las proporciones de eosinófilos y linfocitos infiltrantes en el tejido pulmonar, lo que estaba asociado a una disminución de las respuestas T_H2 así como a los niveles de IgE sistémica. Lo mismo fue observado en un modelo de HDC deficientes, donde la histamina está ausente totalmente.

Nosotros encontramos una disminución marcada de los eosinófilos en pulmón, cuando tratamos los ratones asmáticos con CDs que fueron pre-incubadas con tioperamida, (de un 46% en ratones alérgicos disminuye a un 6% cuando los mismos son tratados con CDsTi). Sin embargo, cuando evaluamos los niveles plasmáticos de IgE, si bien como se observa en la Figura

14C los niveles para los ratones que recibieron CDsTi son un poco inferiores que los ratones instilados con PBS, esta disminución no fue significativa. Paradójicamente, a lo demostrado por Dunford (199) que observaba un bloqueo de las respuestas de tipo T_H2 , nosotros encontramos que el tratamiento de las CDs con tioperamida no afectaba a la población de linfocitos $TCD4^+$ reclutados en los pulmones de los ratones alérgicos, además estos eran productores de IL-5. Por el contrario, no se encontró un incremento de los linfocitos $TCD8^+$, lo que era de esperarse debido a que el bloqueo del H3R/H4R en las CDs murinas inhibió el efecto aumentador ejercido por la histamina sobre la presentación cruzada. Estos resultados, sugieren que el uso de antagonistas del H3R/H4R tendría beneficios en el tratamiento del asma. Sin embargo, no debe descartarse la probabilidad de que otros receptores estén involucrados, ya que nuestros resultados muestran una mejoría de algunos aspectos de la sintomatología del asma, pero no un bloqueo total de los mismos.

Los datos presentados en este trabajo demuestran importantes acciones ejercidas por la histamina a nivel de la captación y de la presentación antigénica de las CDs murinas. Sorpresivamente, encontramos que la amina es capaz de potenciar fuertemente la presentación cruzada de Ags solubles mientras que no modifica la de Ags particulados. Asimismo, pudimos demostrar que la histamina cumpliría un rol crucial al ser liberada por los mastocitos presentes en el pulmón y en la proximidad de las CDs, ya que luego de la sensibilización, induciría un incremento en la presentación cruzada de los alergenos que activaron la vía aérea, lo que permitiría el reclutamiento de clones $TCD8^+$ alergenico específicos a nivel pulmonar del tipo TC2, secretores de IL-5 e IL-13, los cuales son centrales en el mantenimiento de la respuesta inflamatoria de la fase tardía del asma.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos permitieron plantear un modelo hipotético de rol ejercido por la histamina sobre la fisiología de las CDs y la génesis del proceso alérgico.



Las primeras células que reconocen el alérgeno a nivel del árbol respiratorio son las CD4 y los mastocitos. Estos últimos, al unir el complejo inmune (IgE-alérgeno), liberan mediadores como histamina que a su vez incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo el ingreso de CD4 a la mucosa desde la membrana basal. Éstas, en contacto con la histamina, captan el alérgeno vía el H2R. A continuación, en el ganglio zonal mediastino, presentarán el alérgeno en el contexto de las moléculas del CMH de clase I, mecanismo dependiente del H3R/H4R. Así se activarán clones de LT CD8⁺ que serán reclutados en el pulmón donde secretarán IL-5, favoreciendo de esta manera el reclutamiento de eosinófilos y la liberación de IL-13, vital en la bronco constricción y producción de moco. En el panel A se ha representado la acción de la histamina sobre las células dendríticas de acuerdo con los resultados obtenidos *in vitro*, mientras que en el panel B el modelo hipotético de acción.

CONCLUSIONES

Nosotros demostramos que las CDs murinas expresan los cuatro receptores histaminérgicos: H1R, H2R, H3R y H4R y además producen constitutivamente histamina. Particularmente, pudimos demostrar que la histamina exógena vía su acción sobre las CDs in vitro moduló:

- 1) La endocitosis de OVA y HRP
- 2) La captación de OVA ocurrió vía el H2R y a través de macropinocitosis y el RM.
- 3) Indujo un aumento leve pero significativo de la expresión del CMH de clase II, lo que correlacionó con el incremento del CML.
- 4) En microambientes ácidos potencia con mayor intensidad la captación de OVA pero vía su acción a través de los H1R y H3R/H4R. Inesperadamente, en estas condiciones induciría un cambio de perfil de T_H2 a T_H1 , como lo demuestra la estimulación de la IL-12 en CDs pre-expuestas a pH 6,5.
- 5) Incrementó la presentación cruzada de Ags independientemente de la captación del mismo actuando a través del H3R/H4R, pero sólo para Ags solubles.
- 6) Este incremento depende en gran medida de su capacidad de optimizar el tiempo durante el cual el complejo péptido-CMH de clase I se haya disponible a nivel de la membrana celular.

Asimismo, observamos que la histamina actuando sobre las CDs fue capaz in vivo de:

- 7) Incrementar la población de LT $CD8^+$ alérgeno-específicos a nivel del tejido pulmonar en un modelo de asma murino.
- 8) Notoriamente estas células $TC8^+$ reclutadas a nivel pulmonar, eran del tipo TC2 productoras de IL-5.
- 9) Contrariamente, el antagonista del H3R/H4R fue capaz de bloquear parcialmente el reclutamiento de LT $CD8^+$.
- 10) Paradójicamente, el Ti actuando sobre las CDs disminuyó el número total de LT $CD4^+$, siendo ésta la población responsable de la secreción de IL-5.

De manera general, los resultados obtenidos a través de este trabajo de Tesis, nos permiten sugerir que la histamina fue capaz de modular la funcionalidad de las CD_s murinas, tanto a nivel de la captación como a nivel de la presentación antigénica. Asimismo, demostramos in vivo, que la histamina al potenciar la presentación cruzada por las CD_s, favoreció la cronicidad del proceso alérgico al incrementar el número de los LT CD₈⁺ específicos secretores de IL-5, a nivel del tejido pulmonar.

Lic. María Marta Amaral
Doctorando

Dra. Mónica Vermeulen
Director de Tesis

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pearce, F. L. 1991. Biological effects of histamine: an overview. *Agents Actions* 33:4-7.
2. Leurs, R., M. J. Smit, and H. Timmerman. 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther* 66:413-463.
3. Jutel, M., T. Watanabe, M. Akdis, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2002. Immune regulation by histamine. *Curr Opin Immunol* 14:735-740.
4. Schneider, E., H. Pollard, F. Lepault, D. Guy-Grand, M. Minkowski, and M. Dy. 1987. Histamine-producing cell-stimulating activity. Interleukin 3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induce de novo synthesis of histidine decarboxylase in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 139:3710-3717.
5. Saxena, S. P., L. J. Brandes, A. B. Becker, K. J. Simons, F. S. LaBella, and J. M. Gerrard. 1989. Histamine is an intracellular messenger mediating platelet aggregation. *Science* 243:1596-1599.
6. Szeberenyi, J. B., E. Pallinger, M. Zsinko, Z. Pos, G. Rothe, E. Orso, S. Szeberenyi, G. Schmitz, A. Falus, and V. Laszlo. 2001. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol Lett* 76:175-182.
7. Kubo, Y., and K. Nakano. 1999. Regulation of histamine synthesis in mouse CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Inflamm Res* 48:149-153.
8. Hill, S. J. 1991. Histamine receptors and interactions between second messenger transduction systems. *Agents Actions Suppl* 33:145-159.
9. Schneider, E., M. Rolli-Derkinderen, M. Arock, and M. Dy. 2002. Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 23:255-263.
10. Jutel, M., T. Watanabe, S. Klunker, M. Akdis, O. A. Thomet, J. Malolepszy, T. Zak-Nejmark, R. Koga, T. Kobayashi, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2001. Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413:420-425.
11. Lovenberg, T. W., B. L. Roland, S. J. Wilson, X. Jiang, J. Pyati, A. Huvar, M. R. Jackson, and M. G. Erlander. 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 55:1101-1107.
12. Liu, C., X. Ma, X. Jiang, S. J. Wilson, C. L. Hofstra, J. Blevitt, J. Pyati, X. Li, W. Chai, N. Carruthers, and T. W. Lovenberg. 2001. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H(4)) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 59:420-426.
13. Zhu, Y., D. Michalovich, H. Wu, K. B. Tan, G. M. Dytko, I. J. Mannan, R. Boyce, J. Alston, L. A. Tierney, X. Li, N. C. Herrity, L. Vawter, H. M. Sarau, R. S. Ames, C. M. Davenport, J. P. Hieble, S. Wilson, D. J. Bergsma, and L. R. Fitzgerald. 2001. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol* 59:434-441.
14. Takagishi, T., Y. Sasaguri, R. Nakano, N. Arima, A. Tanimoto, H. Fukui, and M. Morimatsu. 1995. Expression of the histamine H1 receptor gene in relation to atherosclerosis. *Am J Pathol* 146:981-988.

15. Hirata, N., K. Takeuchi, K. Ukai, C. Jin, T. Yoshida, and Y. Sakakura. 1999. Expression and localization of histamine H2 receptor messenger RNA in human nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 103:944-949.
16. Gutzmer, R., K. Langer, M. Lisewski, S. Mommert, D. Rieckborn, A. Kapp, and T. Werfel. 2002. Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 109:524-531.
17. Vannier, E., and C. A. Dinarello. 1993. Histamine enhances interleukin (IL)-1-induced IL-1 gene expression and protein synthesis via H2 receptors in peripheral blood mononuclear cells. Comparison with IL-1 receptor antagonist. *J Clin Invest* 92:281-287.
18. Elenkov, I. J., E. Webster, D. A. Papanicolaou, T. A. Fleisher, G. P. Chrousos, and R. L. Wilder. 1998. Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *J Immunol* 161:2586-2593.
19. van der Pouw Kraan, T. C., A. Snijders, L. C. Boeije, E. R. de Groot, A. E. Alewijnse, R. Leurs, and L. A. Aarden. 1998. Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *J Clin Invest* 102:1866-1873.
20. Mazzoni, A., H. A. Young, J. H. Spitzer, A. Visintin, and D. M. Segal. 2001. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J Clin Invest* 108:1865-1873.
21. Caron, G., Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, and P. Jeannin. 2001. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J Immunol* 167:3682-3686.
22. Pavlinkova, G., Y. Yanagawa, K. Kikuchi, K. Iwabuchi, and K. Onoe. 2003. Effects of histamine on functional maturation of dendritic cells. *Immunobiology* 207:315-325.
23. Kalinski, P., and M. Moser. 2005. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol* 5:251-260.
24. Caron, G., Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, N. Herbault, G. Magistrelli, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, and P. Jeannin. 2001. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J Immunol* 166:6000-6006.
25. Idzko, M., A. la Sala, D. Ferrari, E. Panther, Y. Herouy, S. Dichmann, M. Mockenhaupt, F. Di Virgilio, G. Girolomoni, and J. Norgauer. 2002. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 109:839-846.
26. Jutel, M., M. Akdis, K. Blaser, and C. A. Akdis. 2006. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. *Allergy* 61:796-807.
27. Osna, N., K. Elliott, and M. M. Khan. 2001. Regulation of interleukin-10 secretion by histamine in TH2 cells and splenocytes. *Int Immunopharmacol* 1:85-96.
28. Vannier, E., L. C. Miller, and C. A. Dinarello. 1991. Histamine suppresses gene expression and synthesis of tumor necrosis factor alpha via histamine H2 receptors. *J Exp Med* 174:281-284.

29. Bissonnette, E. Y. 1996. Histamine inhibits tumor necrosis factor alpha release by mast cells through H2 and H3 receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:620-626.
30. Banu, Y., and T. Watanabe. 1999. Augmentation of antigen receptor-mediated responses by histamine H1 receptor signaling. *J Exp Med* 189:673-682.
31. Kunzmann, S., P. Y. Mantel, J. G. Wohlfahrt, M. Akdis, K. Blaser, and C. B. Schmidt-Weber. 2003. Histamine enhances TGF-beta1-mediated suppression of Th2 responses. *FASEB J* 17:1089-1095.
32. Takahashi, K., S. Tanaka, and A. Ichikawa. 2001. Effect of cimetidine on intratumoral cytokine expression in an experimental tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 281:1113-1119.
33. Takahashi, K., S. Tanaka, K. Furuta, and A. Ichikawa. 2002. Histamine H(2) receptor-mediated modulation of local cytokine expression in a mouse experimental tumor model. *Biochem Biophys Res Commun* 297:1205-1210.
34. Kanda, N., and S. Watanabe. 2002. Histamine inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in human squamous cell carcinoma and melanoma. *J Invest Dermatol* 119:1411-1419.
35. Takayama, K., H. Yokozeki, M. Ghoreishi, T. Satoh, I. Katayama, T. Umeda, and K. Nishioka. 1999. IL-4 inhibits the migration of human Langerhans cells through the downregulation of TNF receptor II expression. *J Invest Dermatol* 113:541-546.
36. Matsumoto, S. 1995. Cimetidine and survival with colorectal cancer. *Lancet* 346:115.
37. Morris, D. L., and W. J. Adams. 1995. Cimetidine and colorectal cancer--old drug, new use? *Nat Med* 1:1243-1244.
38. Creagan, E. T., D. L. Ahmann, S. J. Green, H. J. Long, S. Frytak, and L. M. Itri. 1985. Phase II study of recombinant leukocyte A interferon (IFN-rA) plus cimetidine in disseminated malignant melanoma. *J Clin Oncol* 3:977-981.
39. Sagaster, P., M. Micksche, J. Flamm, and H. Ludwig. 1995. Randomised study using IFN-alpha versus IFN-alpha plus coumarin and cimetidine for treatment of advanced renal cell cancer. *Ann Oncol* 6:999-1003.
40. Fujikawa, T., H. Shiraha, Y. Nakanishi, N. Takaoka, N. Ueda, M. Suzuki, and Y. Shiratori. 2007. Cimetidine inhibits epidermal growth factor-induced cell signaling. *J Gastroenterol Hepatol* 22:436-443.
41. Lawson, J. A., W. J. Adams, and D. L. Morris. 1996. Ranitidine and cimetidine differ in their in vitro and in vivo effects on human colonic cancer growth. *Br J Cancer* 73:872-876.
42. Reynolds, J. L., J. Akhter, and D. L. Morris. 1996. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res* 6:95-99.
43. Hahm, K. B., W. H. Kim, S. I. Lee, J. K. Kang, and I. S. Park. 1995. Comparison of immunomodulative effects of the histamine-2 receptor antagonists cimetidine, ranitidine, and famotidine on peripheral blood mononuclear cells in gastric cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 30:265-271.

44. Zhang, M., R. L. Thurmond, and P. J. Dunford. 2007. The histamine H(4) receptor: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Pharmacol Ther* 113:594-606.
45. Tanda, S., Y. Mori, T. Kimura, K. Sonomura, T. Kusaba, N. Kishimoto, H. Kameyama, K. Tamagaki, M. Okigaki, T. Hatta, S. Sasaki, K. Takeda, Y. Sado, N. Adachi, and H. Matsubara. 2007. Histamine ameliorates anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis in rats. *Kidney Int* 72:608-613.
46. Simons, F. E. 2004. Advances in H1-antihistamines. *N Engl J Med* 351:2203-2217.
47. Bayram, H., J. L. Devalia, O. A. Khair, M. M. Abdelaziz, R. J. Sapsford, W. Czarlewski, A. M. Campbell, J. Bousquet, and R. J. Davies. 1999. Effect of loratadine on nitrogen dioxide-induced changes in electrical resistance and release of inflammatory mediators from cultured human bronchial epithelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 104:93-99.
48. Jeannin, P., Y. Delneste, P. Gosset, S. Molet, P. Lassalle, Q. Hamid, A. Tscicopoulos, and A. B. Tonnel. 1994. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. *Blood* 84:2229-2233.
49. Meretey, K., A. Falus, T. Taga, and T. Kishimoto. 1991. Histamine influences the expression of the interleukin-6 receptor on human lymphoid, monocytoïd and hepatoma cell lines. *Agents Actions* 33:189-191.
50. Kubes, P., and S. Kanwar. 1994. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *J Immunol* 152:3570-3577.
51. Lo, W. W., and T. P. Fan. 1987. Histamine stimulates inositol phosphate accumulation via the H1-receptor in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 148:47-53.
52. Yamaki, K., H. Thorlacius, X. Xie, L. Lindbom, P. Hedqvist, and J. Raud. 1998. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br J Pharmacol* 123:390-399.
53. Fadel, R., N. Herpin-Richard, J. P. Rihoux, and E. Henocq. 1987. Inhibitory effect of cetirizine 2HCl on eosinophil migration in vivo. *Clin Allergy* 17:373-379.
54. Clark, R. A., J. A. Sandler, J. I. Gallin, and A. P. Kaplan. 1977. Histamine modulation of eosinophil migration. *J Immunol* 118:137-145.
55. Baena-Cagnani, C. E., W. E. Berger, L. M. DuBuske, S. E. Gurne, P. Stryszak, R. Lorber, and M. Danzig. 2003. Comparative effects of desloratadine versus montelukast on asthma symptoms and use of beta 2-agonists in patients with seasonal allergic rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 130:307-313.
56. Simons, F. E. 1999. Is antihistamine (H1-receptor antagonist) therapy useful in clinical asthma? *Clin Exp Allergy* 29 Suppl 3:98-104.
57. Simons, F. E. 1999. Allergic rhinobronchitis: the asthma-allergic rhinitis link. *J Allergy Clin Immunol* 104:534-540.
58. Warner, J. O. 2001. A double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of cetirizine in preventing the onset of asthma in children with atopic dermatitis: 18 months' treatment and 18 months' posttreatment follow-up. *J Allergy Clin Immunol* 108:929-937.

59. Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3:582-590.
60. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2:1144-1150.
61. Martin, P., G. M. Del Hoyo, F. Anjuere, C. F. Arias, H. H. Vargas, L. A. Fernandez, V. Parrillas, and C. Ardavin. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100:383-390.
62. Bilsborough, J., T. C. George, A. Norment, and J. L. Viney. 2003. Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties. *Immunology* 108:481-492.
63. Villadangos, J. A., and P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7:543-555.
64. Wu, L., and Y. J. Liu. 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26:741-750.
65. Lamaze, C., L. M. Fujimoto, H. L. Yin, and S. L. Schmid. 1997. The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem* 272:20332-20335.
66. Terebiznik, M. R., O. V. Vieira, S. L. Marcus, A. Slade, C. M. Yip, W. S. Trimble, T. Meyer, B. B. Finlay, and S. Grinstein. 2002. Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by Salmonella. *Nat Cell Biol* 4:766-773.
67. Amyere, M., B. Payrastre, U. Krause, P. Van Der Smissen, A. Veithen, and P. J. Courtoy. 2000. Constitutive macropinocytosis in oncogene-transformed fibroblasts depends on sequential permanent activation of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C. *Mol Biol Cell* 11:3453-3467.
68. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-400.
69. Steinman, R. M., and J. Swanson. 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182:283-288.
70. Morelli, A. E., A. T. Larregina, W. J. Shufesky, A. F. Zahorchak, A. J. Logar, G. D. Papworth, Z. Wang, S. C. Watkins, L. D. Falo, Jr., and A. W. Thomson. 2003. Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood* 101:611-620.
71. Vermeulen, M. E., R. Gamberale, A. S. Trevani, D. Martinez, A. Ceballos, J. Sabatte, M. Giordano, and J. R. Geffner. 2004. The impact of extracellular acidosis on dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* 24:363-384.
72. Kaisho, T., and S. Akira. 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 22:78-83.

73. Vabulas, R. M., P. Ahmad-Nejad, S. Ghose, C. J. Kirschning, R. D. Issels, and H. Wagner. 2002. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem* 277:15107-15112.
74. Becker, T., F. U. Hartl, and F. Wieland. 2002. CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J Cell Biol* 158:1277-1285.
75. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272.
76. Thery, C., and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 13:45-51.
77. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
78. De Smedt, T., B. Pajak, G. G. Klaus, R. J. Noelle, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1998. Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J Immunol* 161:4476-4479.
79. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, I. Durand, M. Cella, A. Lanzavecchia, and J. Banchereau. 1997. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 90:1458-1470.
80. Jego, G., A. K. Palucka, J. P. Blanck, C. Chalouni, V. Pascual, and J. Banchereau. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19:225-234.
81. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
82. Keir, M. E., and A. H. Sharpe. 2005. The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity. *Immunol Rev* 204:128-143.
83. Kearney, E. R., K. A. Pape, D. Y. Loh, and M. K. Jenkins. 1994. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1:327-339.
84. Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20:561-567.
85. Curtsinger, J. M., D. C. Lins, and M. F. Mescher. 2003. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197:1141-1151.
86. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3:133-146.
87. Amsen, D., J. M. Blander, G. R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R. A. Flavell. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526.

88. Tu, L., T. C. Fang, D. Artis, O. Shestova, S. E. Pross, I. Maillard, and W. S. Pear. 2005. Notch signaling is an important regulator of type 2 immunity. *J Exp Med* 202:1037-1042.
89. Reis e Sousa, C. 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* 16:21-25.
90. Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2002. 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* 196:1627-1638.
91. Lutz, M. B., and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 23:445-449.
92. Wiertz, E. J., D. Tortorella, M. Bogyo, J. Yu, W. Mothes, T. R. Jones, T. A. Rapoport, and H. L. Ploegh. 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384:432-438.
93. Baumann, S., A. Nasser Eddine, and S. H. Kaufmann. 2006. Progress in tuberculosis vaccine development. *Curr Opin Immunol* 18:438-448.
94. Belkaid, Y., C. M. Sun, and N. Bouladoux. 2006. Parasites and immunoregulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 18:406-412.
95. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19:683-765.
96. Mills, K. H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4:841-855.
97. Hiltbold, E. M., and P. A. Roche. 2002. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol* 14:30-35.
98. Goldberg, A. L., and K. L. Rock. 1992. Proteolysis, proteasomes and antigen presentation. *Nature* 357:375-379.
99. Sant, A. J., and J. Miller. 1994. MHC class II antigen processing: biology of invariant chain. *Curr Opin Immunol* 6:57-63.
100. Mellman, I., and R. M. Steinman. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106:255-258.
101. Bevan, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143:1283-1288.
102. Bevan, M. J. 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117:2233-2238.
103. Rock, K. L., and L. Shen. 2005. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207:166-183.
104. Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, G. M. Davey, N. S. Wilson, F. R. Carbone, and J. A. Villadangos. 2004. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199:9-26.
105. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47-64.

106. Shortman, K., and Y. J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
107. Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman, and R. A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
108. Bevan, M. J. 1977. Priming for a cytotoxic response to minor histocompatibility antigens: antigen specificity and failure to demonstrate a carrier effect. *J Immunol* 118:1370-1374.
109. Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-771.
110. Hershko, A., and A. Ciechanover. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807.
111. Hershko, A., and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425-479.
112. Pickart, C. M., and M. J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695:55-72.
113. Rock, K. L., and A. L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17:739-779.
114. Kisselev, A. F., T. N. Akopian, K. M. Woo, and A. L. Goldberg. 1999. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274:3363-3371.
115. York, I. A., S. C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg, and K. L. Rock. 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 3:1177-1184.
116. Saric, T., S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, and A. L. Goldberg. 2002. An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3:1169-1176.
117. Serwold, T., F. Gonzalez, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-483.
118. Goldberg, A. L., P. Cascio, T. Saric, and K. L. Rock. 2002. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol* 39:147-164.
119. Harding, C. V., and R. Song. 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* 153:4925-4933.
120. Rock, K. L., and K. Clark. 1996. Analysis of the role of MHC class II presentation in the stimulation of cytotoxic T lymphocytes by antigens targeted into the exogenous antigen-MHC class I presentation pathway. *J Immunol* 156:3721-3726.
121. Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf, and K. L. Rock. 1993. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of

- exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4942-4946.
122. Pfeifer, J. D., M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, and C. V. Harding. 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361:359-362.
 123. Shen, Z., G. Reznikoff, G. Dranoff, and K. L. Rock. 1997. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J Immunol* 158:2723-2730.
 124. Norbury, C. C., L. J. Hewlett, A. R. Prescott, N. Shastri, and C. Watts. 1995. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* 3:783-791.
 125. Desjardins, M. 2003. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat Rev Immunol* 3:280-291.
 126. Rock, K. L. 2003. The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol* 4:941-943.
 127. Roy, C. R. 2003. Immunology: professional secrets. *Nature* 425:351-352.
 128. Kopito, R. R. 1997. ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* 88:427-430.
 129. Gagnon, E., S. Duclos, C. Rondeau, E. Chevet, P. H. Cameron, O. Steele-Mortimer, J. Paiement, J. J. Bergeron, and M. Desjardins. 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110:119-131.
 130. Touret, N., P. Paroutis, and S. Grinstein. 2005. The nature of the phagosomal membrane: endoplasmic reticulum versus plasmalemma. *J Leukoc Biol* 77:878-885.
 131. Ackerman, A. L., and P. Cresswell. 2004. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5:678-684.
 132. York, I. A., and K. L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14:369-396.
 133. Kovacsovics-Bankowski, M., and K. L. Rock. 1995. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267:243-246.
 134. Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe, and P. Cresswell. 2005. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* 6:107-113.
 135. Rock, K. L. 1996. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* 17:131-137.
 136. Shen, L., L. J. Sigal, M. Boes, and K. L. Rock. 2004. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21:155-165.
 137. Song, R., and C. V. Harding. 1996. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* 156:4182-4190.
 138. Chiu, I., D. M. Davis, and J. L. Strominger. 1999. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13944-13949.

139. Reid, P. A., and C. Watts. 1990. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* 346:655-657.
140. Trombetta, E. S., M. Ebersold, W. Garrett, M. Pypaert, and I. Mellman. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* 299:1400-1403.
141. den Haan, J. M., S. M. Lehar, and M. J. Bevan. 2000. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192:1685-1696.
142. Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, C. G. Fathman, S. N. Mueller, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2002. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196:1099-1104.
143. den Haan, J. M., and M. J. Bevan. 2002. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 196:817-827.
144. Smith, C. M., G. T. Belz, N. S. Wilson, J. A. Villadangos, K. Shortman, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2003. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J Immunol* 170:4437-4440.
145. Belz, G. T., C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172:1996-2000.
146. Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 2003. Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301:1925-1928.
147. Pooley, J. L., W. R. Heath, and K. Shortman. 2001. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8-dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166:5327-5330.
148. Huang, A. Y., P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll, and H. Levitsky. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264:961-965.
149. Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino, and K. L. Rock. 1999. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398:77-80.
150. Sigal, L. J., and K. L. Rock. 2000. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J Exp Med* 192:1143-1150.
151. Norbury, C. C., M. F. Princiotta, I. Bacik, R. R. Brutkiewicz, P. Wood, T. Elliott, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2001. Multiple antigen-specific processing pathways for activating naive CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 166:4355-4362.

152. Tindle, R. W., and I. H. Frazer. 1994. Immune response to human papillomaviruses and the prospects for human papillomavirus-specific immunisation. *Curr Top Microbiol Immunol* 186:217-253.
153. Ahn, K., A. Angulo, P. Ghazal, P. A. Peterson, Y. Yang, and K. Fruh. 1996. Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10990-10995.
154. Hill, A., P. Jugovic, I. York, G. Russ, J. Bennink, J. Yewdell, H. Ploegh, and D. Johnson. 1995. Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* 375:411-415.
155. Gilbert, M. J., S. R. Riddell, B. Plachter, and P. D. Greenberg. 1996. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383:720-722.
156. Salio, M., M. Cella, M. Suter, and A. Lanzavecchia. 1999. Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol* 29:3245-3253.
157. Engelmayer, J., M. Larsson, M. Subklewe, A. Chahroudi, W. I. Cox, R. M. Steinman, and N. Bhardwaj. 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* 163:6762-6768.
158. Ochsenbein, A. F., S. Sierro, B. Odermatt, M. Pericin, U. Karrer, J. Hermans, S. Hemmi, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411:1058-1064.
159. von Boehmer, H., and K. Hafen. 1986. Minor but not major histocompatibility antigens of thymus epithelium tolerize precursors of cytolytic T cells. *Nature* 320:626-628.
160. Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1997. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186:239-245.
161. Adler, A. J., D. W. Marsh, G. S. Yochum, J. L. Guzzo, A. Nigam, W. G. Nelson, and D. M. Pardoll. 1998. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187:1555-1564.
162. Merckenschlager, M., M. O. Power, H. Pircher, and A. G. Fisher. 1999. Intrathymic deletion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell precursors by constitutive cross-presentation of exogenous antigen. *Eur J Immunol* 29:1477-1486.
163. Kurts, C., W. R. Heath, F. R. Carbone, J. Allison, J. F. Miller, and H. Kosaka. 1996. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184:923-930.
164. Kurts, C., R. M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A. M. Lew, E. Blanas, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath. 1999. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12703-12707.
165. Morgan, D. J., H. T. Kreuzel, and L. A. Sherman. 1999. Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J Immunol* 163:723-727.
166. Hoglund, P., J. Mintern, C. Waltzinger, W. Heath, C. Benoist, and D. Mathis. 1999. Initiation of autoimmune diabetes by developmentally

- regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes. *J Exp Med* 189:331-339.
167. Morgan, D. J., C. Kurts, H. T. Kruwel, K. L. Holst, W. R. Heath, and L. A. Sherman. 1999. Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3854-3858.
 168. Rajan, T. V. 2003. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol* 24:376-379.
 169. Cohn, L., J. A. Elias, and G. L. Chupp. 2004. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol* 22:789-815.
 170. Kay, A. B. 2001. Allergy and allergic diseases. First of two parts. *N Engl J Med* 344:30-37.
 171. Lambrecht, B. N., and H. Hammad. 2003. Taking our breath away: dendritic cells in the pathogenesis of asthma. *Nat Rev Immunol* 3:994-1003.
 172. Robinson, D. S. 2000. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull* 56:956-968.
 173. Romagnani, S. 1994. Regulation of the development of type 2 T-helper cells in allergy. *Curr Opin Immunol* 6:838-846.
 174. Lloyd, C. M., J. A. Gonzalo, A. J. Coyle, and J. C. Gutierrez-Ramos. 2001. Mouse models of allergic airway disease. *Adv Immunol* 77:263-295.
 175. Ostroukhova, M., C. Seguin-Devaux, T. B. Oriss, B. Dixon-McCarthy, L. Yang, B. T. Ameredes, T. E. Corcoran, and A. Ray. 2004. Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *J Clin Invest* 114:28-38.
 176. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2:725-731.
 177. de Heer, H. J., H. Hammad, T. Soullie, D. Hijdra, N. Vos, M. A. Willart, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2004. Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med* 200:89-98.
 178. Hammad, H., and B. N. Lambrecht. 2006. Recent progress in the biology of airway dendritic cells and implications for understanding the regulation of asthmatic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 118:331-336.
 179. van Rijt, L. S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. 2005. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med* 201:981-991.
 180. Taube, C., A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Insights into the pathogenesis of asthma utilizing murine models. *Int Arch Allergy Immunol* 135:173-186.
 181. Taube, C., C. Duez, Z. H. Cui, K. Takeda, Y. H. Rha, J. W. Park, A. Balhorn, D. D. Donaldson, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2002. The role of IL-13 in established allergic airway disease. *J Immunol* 169:6482-6489.
 182. Grunig, G., M. Warnock, A. E. Wakil, R. Venkayya, F. Brombacher, D. M. Rennick, D. Sheppard, M. Mohrs, D. D. Donaldson, R. M. Locksley, and D. B. Corry. 1998. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282:2261-2263.

183. Erard, F., M. T. Wild, J. A. Garcia-Sanz, and G. Le Gros. 1993. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* 260:1802-1805.
184. Sad, S., R. Marcotte, and T. R. Mosmann. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279.
185. Cerwenka, A., L. L. Carter, J. B. Reome, S. L. Swain, and R. W. Dutton. 1998. In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines. *J Immunol* 161:97-105.
186. Hamelmann, E., A. Oshiba, J. Paluh, K. Bradley, J. Loader, T. A. Potter, G. L. Larsen, and E. W. Gelfand. 1996. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med* 183:1719-1729.
187. Nazaruk, R. A., R. Rochford, M. V. Hobbs, and M. J. Cannon. 1998. Functional diversity of the CD8(+) T-cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the pathogenesis of EBV-associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 91:3875-3883.
188. Akdis, M., H. U. Simon, L. Weigl, O. Kreyden, K. Blaser, and C. A. Akdis. 1999. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 163:466-475.
189. Seneviratne, S. L., L. Jones, A. S. King, A. Black, S. Powell, A. J. McMichael, and G. S. Ogg. 2002. Allergen-specific CD8(+) T cells and atopic disease. *J Clin Invest* 110:1283-1291.
190. Sad, S., D. Kagi, and T. R. Mosmann. 1996. Perforin and Fas killing by CD8+ T cells limits their cytokine synthesis and proliferation. *J Exp Med* 184:1543-1547.
191. Carter, L. L., and R. W. Dutton. 1995. Relative perforin- and Fas-mediated lysis in T1 and T2 CD8 effector populations. *J Immunol* 155:1028-1031.
192. Miyahara, N., K. Takeda, T. Kodama, A. Joetham, C. Taube, J. W. Park, S. Miyahara, A. Balhorn, A. Dakhama, and E. W. Gelfand. 2004. Contribution of antigen-primed CD8+ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J Immunol* 172:2549-2558.
193. Gutzmer, R., C. Diestel, S. Mommert, B. Kother, H. Stark, M. Wittmann, and T. Werfel. 2005. Histamine H4 receptor stimulation suppresses IL-12p70 production and mediates chemotaxis in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 174:5224-5232.
194. O'Reilly, M., R. Alpert, S. Jenkinson, R. P. Gladue, S. Foo, S. Trim, B. Peter, M. Trevethick, and M. Fidock. 2002. Identification of a histamine H4 receptor on human eosinophils--role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res* 22:431-448.
195. Ling, P., K. Ngo, S. Nguyen, R. L. Thurmond, J. P. Edwards, L. Karlsson, and W. P. Fung-Leung. 2004. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol* 142:161-171.
196. Hofstra, C. L., P. J. Desai, R. L. Thurmond, and W. P. Fung-Leung. 2003. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1212-1221.

197. Buckland, K. F., T. J. Williams, and D. M. Conroy. 2003. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. *Br J Pharmacol* 140:1117-1127.
198. Gantner, F., K. Sakai, M. W. Tusche, W. W. Cruikshank, D. M. Center, and K. B. Bacon. 2002. Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303:300-307.
199. Dunford, P. J., N. O'Donnell, J. P. Riley, K. N. Williams, L. Karlsson, and R. L. Thurmond. 2006. The histamine H4 receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4+ T cells. *J Immunol* 176:7062-7070.
200. Morgan, R. K., B. McAllister, L. Cross, D. S. Green, H. Kornfeld, D. M. Center, and W. W. Cruikshank. 2007. Histamine 4 receptor activation induces recruitment of FoxP3+ T cells and inhibits allergic asthma in a murine model. *J Immunol* 178:8081-8089.
201. Little, F. F., J. de Bie, A. van Oosterhout, H. Kornfeld, D. M. Center, and W. W. Cruikshank. 2003. Immunomodulatory effect of interleukin-16 on allergic airway inflammation. *Chest* 123:431S-432S.
202. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176:1693-1702.
203. Vermeulen, M., M. Giordano, A. S. Trevani, C. Sedlik, R. Gamberale, P. Fernandez-Calotti, G. Salamone, S. Raiden, J. Sanjurjo, and J. R. Geffner. 2004. Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. *J Immunol* 172:3196-3204.
204. Matsuyama, K., T. Ichikawa, Y. Nitta, Y. Ikoma, K. Ishimura, S. Horio, and H. Fukui. 2006. Localized expression of histamine H1 receptors in syncytiotrophoblast cells of human placenta. *J Pharmacol Sci* 102:331-337.
205. Monczor, F., N. Fernandez, B. L. Legnazzi, M. E. Riveiro, A. Baldi, C. Shayo, and C. Davio. 2003. Tiotidine, a histamine H2 receptor inverse agonist that binds with high affinity to an inactive G-protein-coupled form of the receptor. Experimental support for the cubic ternary complex model. *Mol Pharmacol* 64:512-520.
206. Sahlin, S., J. Hed, and I. Rundquist. 1983. Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J Immunol Methods* 60:115-124.
207. Repka-Ramirez, M. S. 2003. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep* 3:227-231.
208. Tanaka, S., K. Deai, A. Konomi, K. Takahashi, H. Yamane, Y. Sugimoto, and A. Ichikawa. 2004. Expression of L-histidine decarboxylase in granules of elicited mouse polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 34:1472-1482.
209. Takamatsu, S., I. Nakashima, and K. Nakano. 1996. Modulation of endotoxin-induced histamine synthesis by cytokines in mouse bone marrow-derived macrophages. *J Immunol* 156:778-785.

210. Burgdorf, S., V. Lukacs-Kornek, and C. Kurts. 2006. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176:6770-6776.
211. Akdis, C. A., and F. E. Simons. 2006. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol* 533:69-76.
212. Dubos, R. J. 1955. The micro-environment of inflammation or Metchnikoff revisited. *Lancet* 269:1-5.
213. Kastelein, R. A., C. A. Hunter, and D. J. Cua. 2007. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annu Rev Immunol* 25:221-242.
214. Igaz, P., I. Novak, E. Lazaar, B. Horvath, E. Heninger, and A. Falus. 2001. Bidirectional communication between histamine and cytokines. *Inflamm Res* 50:123-128.
215. Itoh, H., H. K. Takahashi, H. Iwagaki, T. Yoshino, Y. Morimoto, S. Saito, T. Yagi, T. Akagi, M. Nishibori, and N. Tanaka. 2002. Effect of histamine on intercellular adhesion molecule-1 expression and production of interferon-gamma and interleukin-12 in mixed lymphocyte reaction stimulated with interleukin-18. *Transplantation* 74:864-870.
216. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126-134.
217. Miyahara, N., K. Takeda, S. Miyahara, C. Taube, A. Joetham, T. Koya, S. Matsubara, A. Dakhama, A. M. Tager, A. D. Luster, and E. W. Gelfand. 2005. Leukotriene B4 receptor-1 is essential for allergen-mediated recruitment of CD8+ T cells and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 174:4979-4984.
218. Rosenwasser, L. 2007. New insights into the pathophysiology of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Proc* 28:10-15.
219. Kitawaki, T., N. Kadowaki, N. Sugimoto, N. Kambe, T. Hori, Y. Miyachi, T. Nakahata, and T. Uchiyama. 2006. IgE-activated mast cells in combination with pro-inflammatory factors induce Th2-promoting dendritic cells. *Int Immunol* 18:1789-1799.
220. Jelinek, I., V. Laszlo, E. Buzas, E. Pallinger, B. Hangya, Z. Horvath, and A. Falus. 2007. Increased antigen presentation and T(h)1 polarization in genetically histamine-free mice. *Int Immunol* 19:51-58.
221. Takaishi, S., G. Cui, D. M. Frederick, J. E. Carlson, J. Houghton, A. Varro, G. J. Dockray, Z. Ge, M. T. Whary, A. B. Rogers, J. G. Fox, and T. C. Wang. 2005. Synergistic inhibitory effects of gastrin and histamine receptor antagonists on Helicobacter-induced gastric cancer. *Gastroenterology* 128:1965-1983.
222. Ohtani, T., S. Aiba, M. Mizuashi, Z. U. Mollah, S. Nakagawa, and H. Tagami. 2003. H1 and H2 histamine receptors are absent on Langerhans cells and present on dermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 121:1073-1079.
223. Chen, J., C. Liu, and T. W. Lovenberg. 2003. Molecular and pharmacological characterization of the mouse histamine H3 receptor. *Eur J Pharmacol* 467:57-65.
224. Liu, C., S. J. Wilson, C. Kuei, and T. W. Lovenberg. 2001. Comparison of human, mouse, rat, and guinea pig histamine H4 receptors reveals substantial pharmacological species variation. *J Pharmacol Exp Ther* 299:121-130.

225. Sugata, Y., M. Okano, T. Fujiwara, R. Matsumoto, H. Hattori, M. Yamamoto, M. Nishibori, and K. Nishizaki. 2007. Histamine H4 receptor agonists have more activities than H4 agonism in antigen-specific human T-cell responses. *Immunology* 121:266-275.
226. Giustizieri, M. L., C. Albanesi, J. Fluhr, P. Gisondi, J. Norgauer, and G. Girolomoni. 2004. H1 histamine receptor mediates inflammatory responses in human keratinocytes. *J Allergy Clin Immunol* 114:1176-1182.
227. Tonnel, A. B., P. Gosset, S. Molet, I. Tillie-Leblond, P. Jeannin, and M. Joseph. 1996. Interactions between endothelial cells and effector cells in allergic inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 796:9-20.
228. Hori, Y., Y. Nihei, Y. Kurokawa, A. Kuramasu, Y. Makabe-Kobayashi, T. Terui, H. Doi, S. Satomi, E. Sakurai, A. Nagy, T. Watanabe, and H. Ohtsu. 2002. Accelerated clearance of *Escherichia coli* in experimental peritonitis of histamine-deficient mice. *J Immunol* 169:1978-1983.
229. Gisbert, J. P. 2005. Potent gastric acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. *Drugs* 65 Suppl 1:83-96.
230. Okayama, M., R. Tsubouchi, S. Kato, and K. Takeuchi. 2004. Protective effect of lafutidine, a novel histamine H2-receptor antagonist, on dextran sulfate sodium-induced colonic inflammation through capsaicin-sensitive afferent neurons in rats. *Dig Dis Sci* 49:1696-1704.
231. Sabatte, J., J. Maggini, K. Nahmod, M. M. Amaral, D. Martinez, G. Salamone, A. Ceballos, M. Giordano, M. Vermeulen, and J. Geffner. 2007. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:5-17.
232. Nakayama, T., Y. Kato, K. Hieshima, D. Nagakubo, Y. Kunori, T. Fujisawa, and O. Yoshie. 2004. Liver-expressed chemokine/CC chemokine ligand 16 attracts eosinophils by interacting with histamine H4 receptor. *J Immunol* 173:2078-2083.
233. Jawdat, D. M., G. Rowden, and J. S. Marshall. 2006. Mast cells have a pivotal role in TNF-independent lymph node hypertrophy and the mobilization of Langerhans cells in response to bacterial peptidoglycan. *J Immunol* 177:1755-1762.
234. Hunt, J. F., K. Fang, R. Malik, A. Snyder, N. Malhotra, T. A. Platts-Mills, and B. Gaston. 2000. Endogenous airway acidification. Implications for asthma pathophysiology. *Am J Respir Crit Care Med* 161:694-699.
235. Carbone, F. R., G. T. Belz, and W. R. Heath. 2004. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends Immunol* 25:655-658.
236. Sporri, R., and C. Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* 6:163-170.
237. Ackerman, A. L., A. Giodini, and P. Cresswell. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25:607-617.
238. Araki, N., M. T. Johnson, and J. A. Swanson. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135:1249-1260.

239. Cresswell, P., A. L. Ackerman, A. Giodini, D. R. Peaper, and P. A. Wearsch. 2005. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207:145-157.
240. Shen, H., A. L. Ackerman, V. Cody, A. Giodini, E. R. Hinson, P. Cresswell, R. L. Edelson, W. M. Saltzman, and D. J. Hanlon. 2006. Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology* 117:78-88.
241. Bevan, M. J. 2006. Cross-priming. *Nat Immunol* 7:363-365.
242. Datta, S. K., S. Okamoto, T. Hayashi, S. S. Shin, I. Mihajlov, A. Fermin, D. G. Guiney, J. Fierer, and E. Raz. 2006. Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity* 25:143-152.
243. Jarjour, N. N., W. J. Calhoun, L. B. Schwartz, and W. W. Busse. 1991. Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with increased airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 144:83-87.
244. Cho, S. H., L. A. Stanciu, S. T. Holgate, and S. L. Johnston. 2005. Increased interleukin-4, interleukin-5, and interferon-gamma in airway CD4+ and CD8+ T cells in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 171:224-230.
245. Krug, N., J. Madden, A. E. Redington, P. Lackie, R. Djukanovic, U. Schauer, S. T. Holgate, A. J. Frew, and P. H. Howarth. 1996. T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14:319-326.
246. Walsh, B. K., D. J. Mackey, T. Pajewski, Y. Yu, B. M. Gaston, and J. F. Hunt. 2006. Exhaled-breath condensate pH can be safely and continuously monitored in mechanically ventilated patients. *Respir Care* 51:1125-1131.
247. van Zwieten, R., R. Wever, M. N. Hamers, R. S. Weening, and D. Roos. 1981. Extracellular proton release by stimulated neutrophils. *J Clin Invest* 68:310-313.
248. Borregaard, N., J. H. Schwartz, and A. I. Tauber. 1984. Proton secretion by stimulated neutrophils. Significance of hexose monophosphate shunt activity as source of electrons and protons for the respiratory burst. *J Clin Invest* 74:455-459.