



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS**

**FOLICULARES DENDRÍTICAS HUMANAS**

Memoria presentada por Raquel Muñoz Fernández para optar al grado de doctor  
por la Universidad de Granada.

Granada, Febrero 2007



## **AUTORIZACIÓN PARA LA PRESENTACIÓN DE LA TESIS**

**D. ENRIQUE GARCIA OLIVARES**, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**D<sup>a</sup>. ANA CLARA ABADÍA MOLINA**, PROFESORA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

**CERTIFICAN:** que la presente tesis titulada “**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS HUMANAS**”, de la que es autora RAQUEL MUÑOZ FERNÁNDEZ, superó el programa de doctorado “Inmunología Celular y Molecular” y que ha sido dirigida bajo su dirección en la Unidad de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada.

Revisado el presente trabajo, los directores consideran que tiene la calidad científica necesaria para ser defendido ante el Tribunal que se designe al efecto, por lo que:

**AUTORIZAN** la presentación de la referida Tesis para su defensa y mantenimiento de acuerdo con lo previsto en la legislación vigente.

Y para que conste y surta sus efectos en el expediente correspondiente, expedimos la presente certificación en Granada,

Dr. Enrique García Olivares.

Dra. Ana Clara Abadía Molina.

**A mi familia**

## **Agradecimientos**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que me han permitido llegar hasta aquí.

Al Dr. García Olivares, por la dirección de este trabajo, por la confianza depositada, así como el tiempo y la dedicación que ha invertido en mí. Muchísimas gracias por todo.

A la Dra. Abadía Molina, por su inestimable ayuda en este trabajo y por su gran calidad humana. Gracias.

A todos mis compañeros, por vuestro apoyo, compañerismo y por hacer más ameno el lugar de trabajo. Suerte a todos. Especialmente quiero agradecer a Irene, Pili, Osmany y Jorge, lo mucho que me habeis ayudado, pero sobretodo vuestra amistad, os debo tanto, Gracias.

A mis amigos, por todos los buenos momentos vividos y por vuestro ánimo y apoyo en los malos. Gracias por estar ahí.

A mi familia, por su apoyo incondicional, de no ser así nada de esto hubiera sido posible. Gracias papá y mamá por todo lo que me habéis enseñado pero sobretodo, por lo que habéis luchado para que haya podido llegar hasta aquí, os quiero mucho. A mis hermanos, Franjo, Roberto, Inma y Rosa María, por estar siempre conmigo. Gracias Señor por todo cuanto tengo.

A la Fundación Hospital Clínico, por su colaboración.

## Indice

Introducción	7
1. Órganos linfoides	9
2. Centro germinal	12
2.1. Formación del centro germinal	12
3. Células Foliculares Dendríticas	15
3.1. Icosomas	17
3.2. Origen y linaje de las células foliculares dendríticas	18
3.3. Diferenciación de las células foliculares dendríticas	20
3.4. Fenotipo de las células foliculares dendríticas	22
3.5. Relación entre las células foliculares dendríticas y las células deciduales estromales	26
3.6. Producción de citocinas por las células foliculares dendríticas	27
3.7. Papel de las células foliculares dendríticas en enfermedades	30
3.7.1. Función de las células foliculares dendríticas en la infección por HIV	30
3.7.2. Linfoma	32
3.7.3. Encefalopatía espongiforme transmisibles	34
3.7.4. Artritis reumatoide	36
Bibliografía	39
Objetivos	56
Las Células Foliculares Dendríticas están relacionadas con precursores estromales de la médula ósea y con los miofibroblastos	58
Contractilidad de las células foliculares dendríticas. Efecto de las citocinas	104
Discusión	117
Bibliografía	125
Apéndice	131

## **Abreviaturas comúnmente utilizadas**

$\alpha$ -SM-actina:  $\alpha$ -Smooth Muscle-actina

AcMo: Anticuerpo Monoclonal

Ag: antigen

ALP: Alkaline Phosphatase

APC: Antigen Presenting Cell

BMSPC: Bone Marrow Stromal Cell Progenitors

BSE: Bovine Spongiform Encephalopathy

HLA: Human Leucocyte Antigen

DC: Dendritic Cell

DSC: Decidual Stromal Cell

FBS: Fetal Bovine Serum

FCS: Fetal Calf Serum

FDC: Follicular Dendritic Cell

FDC-SM: FDC-signaling molecule

IFN: Interferon

IL: Interleuquina

LT: lymphotoxin

MSC: Mesenchymal Stem Cell)

PDGF: Platelet-Derived-Growth Factor

TGF: Transforming Growth Factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

# INTRODUCCIÓN



## **Introducción**

El sistema inmunitario está constituido por una serie de órganos, células y moléculas cuya función fisiológica es la de defender al organismo de la infección. Son las células y moléculas del sistema inmunitario las que de forma coordinada y conjunta llevan a cabo la respuesta inmunológica encargada de eliminar al microorganismo invasor o antígeno (Ag). En los órganos linfoides primarios se originan y maduran las células del sistema inmune y es en los órganos linfoides secundarios donde se elabora la respuesta inmunológica.

La respuesta inmunológica primaria, se produce en los dos o tres días siguientes a la estimulación con el antígeno, como resultado, se secretan inmunoglobulinas M (IgM) (Kelsoe et al., 1996; Toellner, et al., 1996). Pasados diez aproximadamente, se produce la migración de las células B al interior de los folículos primarios dando lugar a la aparición de los centros germinales, donde se acumulan en las extensas prolongaciones celulares de las células foliculares dendríticas (follicular dendritic cells, FDC). Las células B entran en contacto con las FDC, y estas últimas, proporcionan señales de rescate de apoptosis a las células B e inducen la proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas y células B memoria (ParK et al., 2004).

Como consecuencia de esa proliferación, ocurre una reorganización de esos genes y la hipermutación somática de los genes que codifican para la región variable (v) de las inmunoglobulinas (Ig), lo que provoca el cambio de isotipo

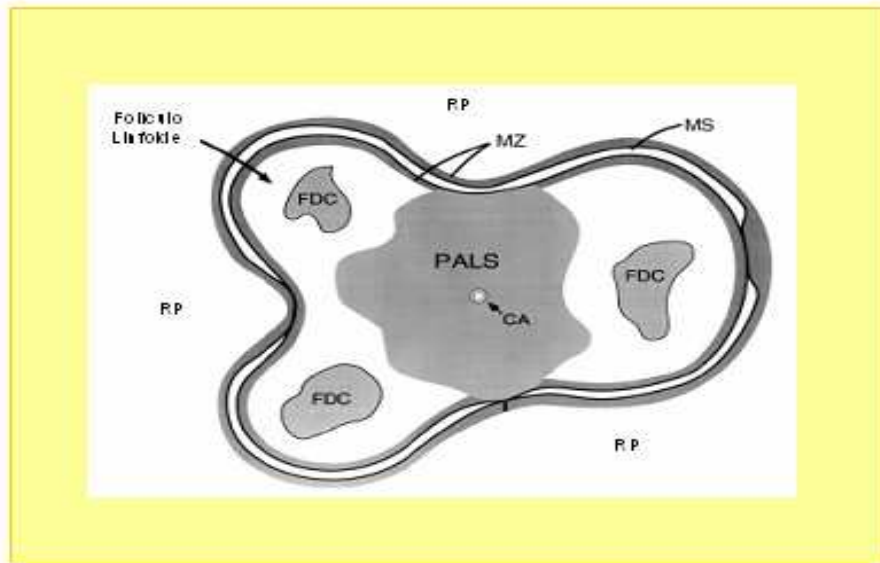
(producción de los demás tipos de Ig), de afinidad y cambios celulares drásticos (Pascual et al., 1994; Kimoti et al., 1997)

En todo este proceso, las FDC tienen una función muy importante, seleccionar células B durante las reacciones del centro germinal. Sólo aquellas células B que tengan un receptor (B cell receptor, BCR) con alta afinidad y no autoreactivo, serán capaces de unirse a las FDC y por tanto serán seleccionadas positivamente, mientras que las que presenten baja afinidad morirán por apoptosis (Nierop et al., 2002)

## **1. Órganos linfoides**

Los órganos linfoides, en base a su funcionalidad se dividen en dos grandes grupos, los órganos linfoides primarios y los órganos linfoides secundarios. En los órganos linfoides primarios, se produce la formación de células inmunocompetentes capaces de llevar a cabo su función inmunológica. En los órganos linfoides secundarios como, ganglios linfoides, bazo y tejidos linfoides asociados a superficies mucosas como las amígdalas, las placas de Peyer, los tejidos linfoides asociados al tracto génitourinario, gastrointestinal y respiratorio, se van a llevar a cabo las respuestas inmunológicas frente a los antígenos. Para poder realizar su función de manera eficiente, estos órganos se encuentran localizados de forma estratégica. La estructura de los distintos órganos linfoides secundarios es semejante entre sí (Fun et al., 1999). La compartimentación del órgano linfoide se realiza en base a las distintas poblaciones celulares presentes.

Por ejemplo, en el caso del bazo, en la pulpa blanca o región de tejido linfoide, se distinguen principalmente zonas constituidas por células T y zonas constituidas por células B, que a su vez forman los folículos linfoides primarios o secundarios (Figura 1).

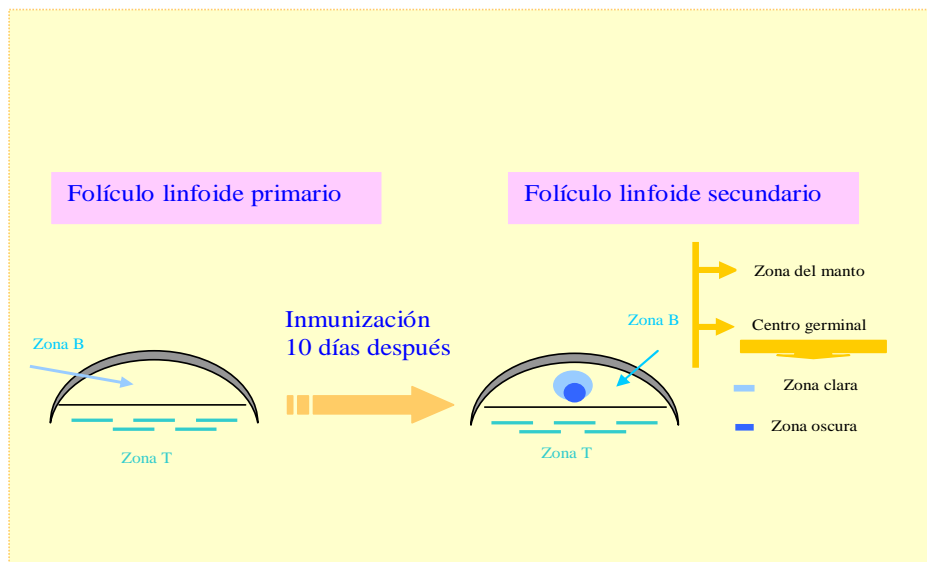


**Figura 1. Tejido linfoides del bazo (pulpa blanca)**

El nódulo de la pulpa blanca está separada en una zona rica en células T (periarteriolar lymphoide sheath, PALS) alrededor de la arteriola central (CA) rodeadas por una zona rica de células B (folículo linfoides primario o secundario). Dentro de cada folículo hay un cluster de FDC. La pulpa blanca está separada de la pulpa roja (red pulp, RP) por el seno marginal, el cual está dentro de la capa de la zona marginal (MZ) (Fun et al., 1999).

La zona constituida mayoritariamente por células T, contiene algunas células B y células dendríticas (células presentadoras de antígeno, que tienen un papel en el inicio de la activación de las células T; Manser, 2004). La zona de células B, contiene los llamados folículos linfoides que pueden ser primarios o secundarios, la relación entre ellos radica en la presencia de centro germinales (Cyster et al., 2000; Figura 2). En el caso de los folículos linfoides primarios, nos vamos a encontrar células B vírgenes (aún no han sido estimuladas) y en los

folículos linfoides secundarios nos vamos a encontrar células B vírgenes y células B estimuladas que dan lugar a los centros germinales. Por otro lado, en los centros germinales además de células B activadas hay macrófagos, y FDC. Las FDC son capaces de capturar y retener de manera eficaz complejos inmunológicos y antígenos nativos y sirven de apoyo a las células B y células T, estas últimas responsables de la activación de las células B y su diferenciación (Manser, 2004).



**Figura 2. Folículo linfóide primario y secundario.**

En el folículo primario se van a distinguir claramente dos zonas, una zona de células B y una zona de células T, en el caso de un folículo secundario, como consecuencia de un estímulo, se produce una reordenación de las zonas, dando lugar a una zona de células T y la zona de células B caracterizada por la presencia de estructuras llamadas centros germinales formadas por centrocitos, centroblastos y FDC (Cyster et al., 2000)

En ausencia de estímulo se produce circulación continua de linfocitos desde los órganos linfoides hacia la sangre. En caso de estímulo se origina una migración dirigida de los linfocitos, marcándose claramente las áreas celulares y dando lugar a la formación de los centros germinales dentro de los folículos linfoides (Tarlinton, 1998).

## **2. Centro germinal**

El centro germinal es un microambiente específico, que se forma dentro de los folículos de los órganos linfoides, como consecuencia de una migración y reorganización de los linfocitos. Dentro de esta estructura se generan las células memoria y las células plasmáticas, productoras de anticuerpos específicos necesarios para la protección frente a organismos que invaden al hospedador (Park et al, 2004).

La producción de los anticuerpos por parte de las células plasmáticas, viene regulada por la interacción de las distintas poblaciones celulares existentes en los centros germinales (células B, células T y FDCs; Park et al., 2004).

### **2.1. Formación del centro germinal**

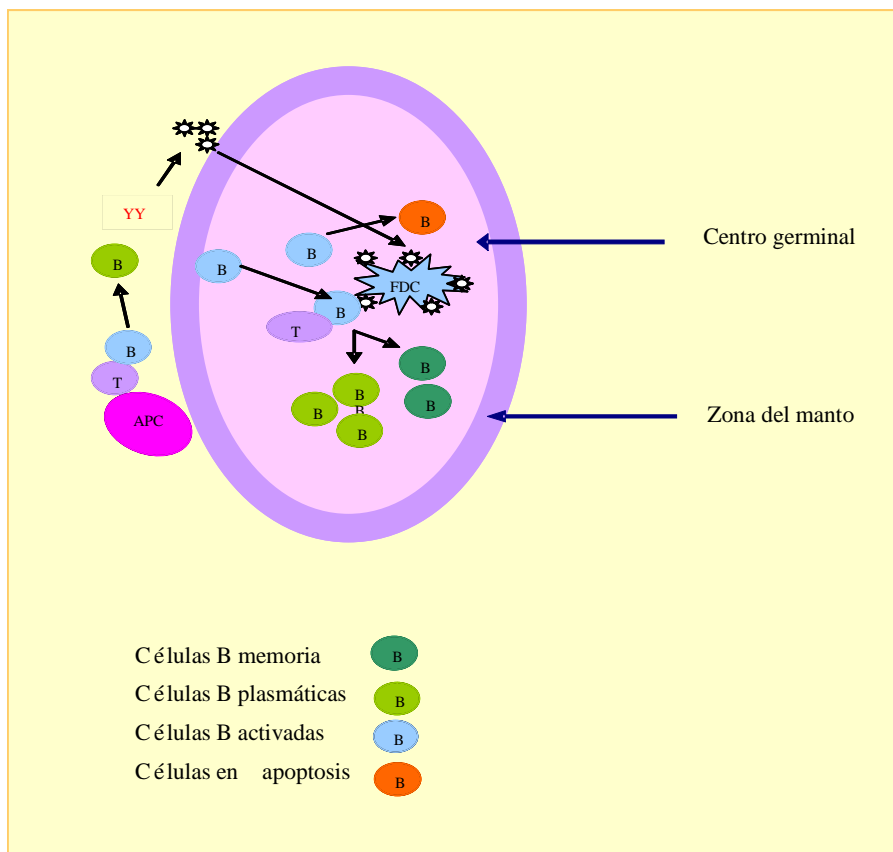
La formación del centro germinal es un proceso llevado a cabo durante una respuesta inmunológica humoral que involucra las interacciones de las diferentes poblaciones celulares linfoides (Schriever et al., 1992; figura 3). Como consecuencia de un estímulo antigénico, se produce un cambio en la pauta de migración de las células linfoides dentro del propio tejido linfoide (Kearney et al., 1994). El antígeno es presentado a las células T por las células dendríticas, provocando la activación de las células T, así como su proliferación. Las células T activarían a las células B, provocando su diferenciación a células plasmáticas productoras de anticuerpos. Se produce una migración de las células B y T hacia los folículos linfoides primarios, donde las células B entran en contacto con el

antígeno retenido por las FDC. Ésta interacción proporciona a las células B señales de rescate de apoptosis, permitiendo su proliferación y diferenciación a células plasmáticas y células memoria. La formación de los centros germinales dentro de los folículos linfoides primarios, determina su cambio a folículos linfoides secundarios (Tarlinton, 1998).

Los centros germinales presentan una forma redondeada. Mediante estudios de inmunomarcaje, utilizando anticuerpos monoclonales, se determinó la existencia de tres zonas en base a la expresión de antígenos de superficie (Johnson et al., 1989)

- a) Zona del manto: parte más externa del centro germinal, formada por células B no reactivas.
- b) Zona oscura del centro germinal: parte intermedia del centro germinal, formada por centroblastos, células B activadas tras el contacto con el antígeno y en proliferación.
- c) Zona clara del centro germinal: parte interior del centro germinal, formada por centrocitos y una compleja red de FDC.

El hecho de que presenten diferente expresión antigénica en los correspondientes compartimentos del centro germinal, puede deberse al papel que ejercen los distintos compartimentos en la respuesta inmunológica humoral (Schriever et al., 1992)



**Figura 3. Centro germinal.**

Las células B son activadas en la zona exterior del centro germinal, donde se encuentran las células T y células presentadoras de antígeno (Antigen presenting cells, APC), parte de estas células B activadas se diferencian a células plasmáticas produciendo anticuerpos que pasarán a circulación. En el caso de existir antígenos en circulación, podrán ser opsonizados por los anticuerpos o por el complemento, formando complejos inmunológicos. A su vez, estos complejos inmunológicos son retenidos en la superficie de las FDC de los folículos linfoides, de tal forma que, aquellas células B que entren en contacto con las FDC, reciban las señales de rescate y dependiendo de los factores secretados por las células T, se diferenciarán a células plasmáticas o células B memoria y aquellas células B que no entren en contacto con las FDC mueren por apoptosis (Nierop et al, 2002)

Para que se produzca el correcto desarrollo, y por tanto funcionamiento, de las diferentes poblaciones celulares que constituyen el centro germinal, es necesario que se cree el microambiente y los factores necesarios para el desarrollo y diferenciación de los mismos (Ritter et al., 1994; Fuchs et al., 1994).

### **3. Células Foliculares Dendríticas**

Las FDC se encuentran en los folículos de los órganos linfoides, dentro del microambiente generado en los centros germinales (Nierop et al., 2002). Constituyen la principal parte no linfoide de la zona del folículo en los tejidos linfoides periféricos (Tew et al., 1990), y representan aproximadamente el 1% de la población total de células presentes en el centro germinal (Schnizlein et al., 1985). A primera vista, las FDC recuerdan morfológicamente a las neuronas, por sus grandes extensiones citoplasmáticas (dendritas), las cuales forman una densa red en los centros germinales y en íntimo contacto con las células B, lo que dificulta su aislamiento (Kosco, 2003). El término de célula folicular dendrítica fue introducido para poder distinguir a las FDC de otro tipo celular llamado células dendríticas interdigitantes (IDC), que también presentan una morfología dendrítica y se pueden encontrar presentes en las zonas T de los tejidos linfoides (Tew et al., 1982).

Durante mucho tiempo, se ha considerado a las FDC, como células auxiliares, capaces de retener antígenos durante largos periodos de tiempo, y almacenarlos relativamente de forma inerte (Nossal et al., 1964). En los últimos años se ha descubierto que estas células son capaces de rescatar de la apoptosis a las células B presentes en los centros germinales de los folículos linfoides, propiciando la formación y expansión de clones de células B memoria y células productoras de anticuerpos (Park et al., 2004).



A las FDC se les podría considerar células con capacidad de presentar antígenos, cuya peculiaridad es, que dichos antígenos son presentados de forma intacta en su superficie celular (hay ausencia de internalización, procesamiento antigénico y presentación en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II; MHC II) (Nierop et al., 2002)

La habilidad de atrapar y retener complejos inmunológicos en la superficie celular durante largos periodos de tiempo (meses e incluso años), está relacionada con la expresión de receptores del complemento (CD21 y CD35) y receptores de Fc (CD23 y CD32) en estas células (Tew J. G., et al 1979). Hecho que parece ser esencial, para la supervivencia de las células B del centro germinal, así como, para la formación del centro germinal y para la generación de células B memoria (Cormann et al., 1986; Szakal et al., 1992; Tew et al., 1997; Grouard et al., 1996).

Esos complejos inmunológicos retenidos en la superficie de las FDC, son un instrumento para promover una expansión clonal y una maduración de afinidad de las células B de los centros germinales (MacLennan, 1994), realizando una selección positiva de manera indirecta, ya que aquellas células B que puedan unirse a los complejos, reciben la señal positiva de supervivencia y proliferan, dando lugar a las células productoras de anticuerpos o a células memoria. De esta forma se desarrolla la respuesta secundaria en los centros germinales (Szakal et al., 1989; Tew et al., 1990; Tew et al., 1992; Tew et al., 1997). Las interacciones entre las células B y los complejos inmunológicos, son facilitadas por las FDC mediante señales coestimuladoras y quimiotácticas (Tew et al., 2001)

Los complejos inmunológicos retenidos por las FDC (que depende de la fuerza de deposición de los antígenos en las FDC) desarrollan un papel esencial en la génesis y maduración del centro germinal, en el aumento de la proliferación de células B (Wu et al., 1996), en la afinidad de respuesta (Nie et al., 1997) y en la supervivencia de las células memoria. Se ha podido demostrar, mediante ensayos de presentación de antígeno *in vitro*, que los complejos inmunológicos presentes en la superficie de las FDC, parecen ser mucho más eficientes en la estimulación de las células B, que los antígenos que se encuentra en forma soluble (Kosco et al., 1988; Wu et al., 1996).

### **3.1. Icosomas**

Como consecuencia de la acumulación de los complejos inmunológicos en la superficie celular de las FDC, se producen unos engrosamientos dando lugar a unos cuerpos llamados icosomas (immune complex – coated bodies, iccosomes). Básicamente los icosomas son extensiones citoplasmáticas que consisten principalmente en procesos de las FDC asociados a los complejos inmunológicos (antígeno-anticuerpo), formando unas complejas estructuras lamelares parecidas a laberintos (Terashima et al., 1992). La membrana del icosoma, que es una prolongación de la membrana de la FDC, contiene receptores para factores del complemento o para la región Fc, que le permiten la captación de los inmunocomplejos.

Durante el desarrollo de los centros germinales, las FDC van a liberar los antígenos, pero en forma de icosomas. Algunos de los icosomas liberados por las

FDC, serán endocitados por las células B de los centros germinales, procesados, y los péptidos derivados del procesamiento, serán presentados en el contexto del MHC II a las células T presentes en el centro germinal. De esta forma, las células T se activan, produciendo las citocinas necesarias para la activación de las células B, proliferación y diferenciación hacia células productoras de anticuerpos (células plasmáticas), los cuales serán específicos frente al antígeno icosomal que las estimuló (Wu et al., 1996).

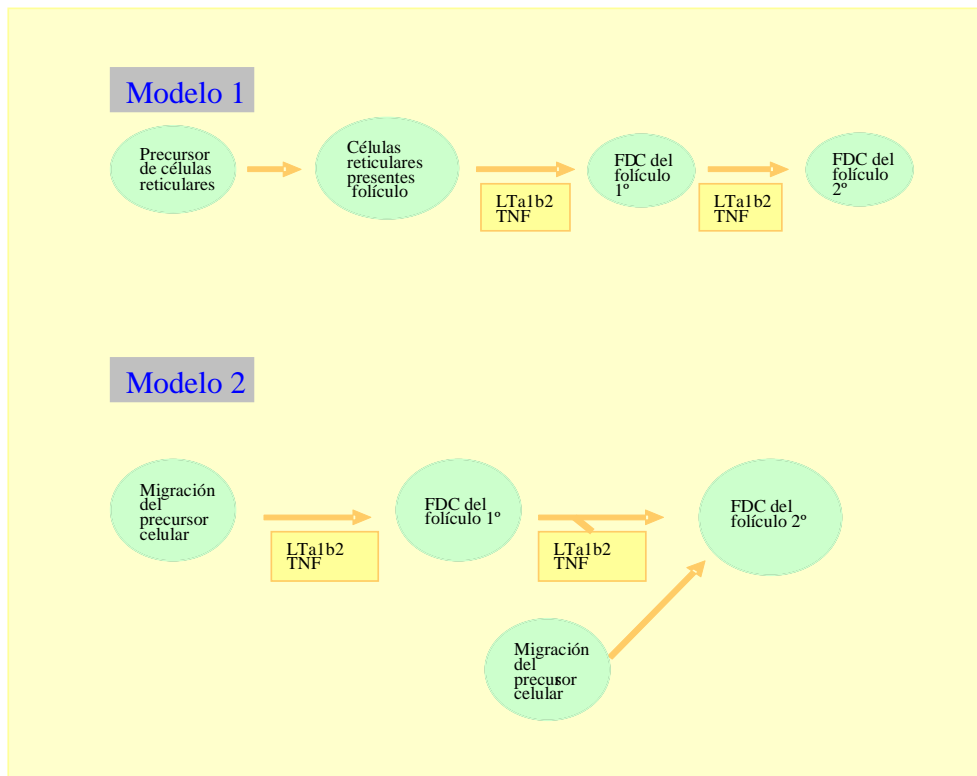
### **3.2. Origen y linaje de las células foliculares dendríticas**

El origen y linaje del precursor de estas células no está muy claro. Hay autores que proponen un origen hematopoyético por la expresión de antígenos asociados a células hematopoyéticas y por sus funciones inmunológicas (Kapasi et al, 1998), mientras que otros proponen un origen mesenquimal, avalado por la morfología fibroblástica que presentan *in vitro*, expresión de antígenos asociados a los fibroblastos (Lindhout and Groot,1995) y la falta de expresión de CD45. Se ha comprobado que las FDC también expresan varias moléculas típicas de células mesenquimales, como vimentina y desmina (Rademarkers, 1991).

Estudios realizados con ratones, que fueron irradiados y posteriormente reconstituidos con médula ósea de donantes alélicamente distintos, se observó que las FDC de los ratones transplantados tenían el alotipo del receptor, lo que implicaba un origen no hematopoyético (Humphrey et al., 1984; Yoshida et al., 1995; Ahearn et al., 1996; Fang et al., 1998). Pero el hecho que estas células son altamente resistentes a la irradiación, podría explicar la presencia de FDC

procedentes del hospedador, que impedirían su reemplazo (Kinet-Denoel et al., 1982). En el caso irradiación y trasplante de médula ósea, en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Severe Combined Immunodeficiency, SCID), deficientes para FDC, tras cuatro o seis meses aparecían FDC del donante. Estos resultados sugerían un origen hematopoyético. De todas formas no se puede descartar un origen mesenquimal, puesto que en el trasplante de células de la médula ósea, junto con las células hematopoyéticas podrían ir células mesenquimales, (Kapasi et al., 1998)

Las FDC han sido relacionadas con otros tipos celulares como, células musculares, astrocitos, células endoteliales, hepatocitos y células deciduales estromales (Ferrari et al., 1998; Kopen et al., 1999; Pittenger et al., 1999; Theise et al., 2000; García-Pacheco et al., 2001), lo que ha hecho sugerir que las FDC puedan derivar de la migración del precursor. En base a esto, se han propuesto dos modelos, donde la mayoría de las FDC se desarrollarían a partir de células reticulares con un origen no hematopoyético. El primer modelo (figura 4), considera que las FDC se desarrollan localmente, mientras que el segundo modelo (figura 4), considera un proceso migratorio previo, de otros lugares o incluso desde circulación. Propiciando incluso que otras células de origen hematopoyético podrían entrar al folículo, durante determinadas respuestas inmunológicas, y contribuir con las FDC a presentar complejos inmunológicos (Cyster et al., 2000).



**Figura 4. Modelos del origen de las células foliculares dendríticas.**

Modelo 1: En el primer modelo, el origen y desarrollo de las FDC se establece a partir de la célula precursora reticular localizada en el folículo, la cuál tiene la capacidad de expresar CXCL13 (quimiocina), atrae a células B.  $LT\alpha_1\beta_2$  ( $LT\alpha_1\beta_2$ ) y TNF y otras señales son también necesarias para el desarrollo de las células reticulares a FDC. Modelo 2: en el segundo modelo, se propone el origen de las FDC a partir de la migración de células precursoras hacia el folículo, debido al microambiente existente en el centro germinal se produce la estimulación de estas células precursoras migratorias, dando lugar a las FDC (Cyster et al., 2000).

Estudios in vitro del microambiente hematopoyético (MH), han puesto de manifiesto la importancia de las interacciones entre las células estromales del tejido de la médula ósea y los progenitores hematopoyéticos (Bentley, 1981; Dexter, 1982).

### 3.3. Diferenciación de las células foliculares dendríticas

La diferenciación de las FDC depende del correcto funcionamiento de los folículos linfoides primario y secundario, que a su vez depende de las complejas

interacciones entre las células que lo forman (T, células B y FDC), siendo clave las señales mediadas por TNF/LT (Fu et al., 1998; González et al., 1998). A través de las interacciones antígeno específicas, citocinas y de señales procedentes del contacto célula-célula, se produce el desarrollo de las FDC, así como su función, cuyo papel es clave en el desarrollo de la respuesta inmunológica secundaria (Husson et al., 2000)

Estudios en ratones han puesto de manifiesto que, tanto las células B como las T parecen tener un papel en la formación y mantenimiento de las FDC, que se ve reflejado en la formación del centro germinal. La presencia de células B es necesaria para el desarrollo de las FDC en los ganglios linfoides. Estudios en ganglios linfáticos de ratones con delección de células B por tratamiento con anti-IgM, puso de manifiesto la falta de desarrollo de las FDC. Una restauración posterior de las células B, supuso la expresión de las FDC dentro del folículo linfoide (Cerny et al., 1988). En el caso de las células T, su presencia no parece ser tan importante para el desarrollo de las FDC. En ratones SCID (deficientes en células T y B) se produce la ausencia de desarrollo de las FDC (Kapasi et al., 1993; Yoshida et al., 1995). Por otro lado se ha demostrado en ratones deficientes para CD40 o su ligando, la importancia de la activación de las células B, por parte de las T, para la formación correcta del centro germinal y por tanto el desarrollo normal de la red de FDC (Jacobson et al., 1974; Renshaw et al., 1989; Kawabe et al., 1994; Yoshida et al., 1995)

En ratones deficientes para miembros de la familia del TNF, como por ejemplo TNF- $\alpha$ , o linfoxina (LT), y para sus respectivos receptores, se realizaron ensayos que permitieron comprobar la necesidad de dichos factores en el desarrollo de los tejidos linfoides, así como en el propio desarrollo y funcionalidad de las FDC. Estos ratones deficientes, mostraron defectos en la formación de los tejidos linfoides, fallo en la formación del centro germinal y ausencia de FDC (Pasparakis et al., 1996; Rennert et al., 1998). Hechos que sugirieron la importancia de miembros de la familia del TNF en el mantenimiento y función de las FDC, a nivel de la capacidad de atrapar y retener antígenos.

#### **3.4. Fenotipo de las células foliculares dendríticas**

Las FDC se caracterizan por la expresión de determinados antígenos, dentro de los cuales se pueden distinguir, antígenos relacionados con células hematopoyéticas, entre los que destaca el CD21 (receptor del complemento 2, CR2). Se trata de una glicoproteína de membrana de 145 kD, que consta de una región extracelular de unos 15-16 aminoácidos, una región transmembrana de unos 60 aminoácidos, y una región citoplasmática de 34 aminoácidos (Lowell et al., 1989; Barclay et al., 1997). Este receptor se une a productos de la molécula C3 del complemento (C3d, g y C3d), facilitando el reconocimiento de los antígenos a las células B (Nemerow et al., 1984; Tedder et al., 1986; Carel et al., 1990). El CD21 tiene un papel importante tanto en la respuesta inmunológica innata como la adquirida (Zabel et al., 2000). El gen de CD21 es expresado por linfocitos B y líneas celulares B transformadas, FDC (Reynes et al., 1985; Liu et al., 1997) timocitos y algunas líneas celulares T (Fingerroth et al., 1988; Tsoukas et al.,

1988) En el caso de las FDC, la expresión de este antígeno es constitutiva. La presencia celular de este antígeno puede ser de dos formas: una isoforma larga (CD21L) o también llamada DRC-1, se caracteriza por contener un exon adicional como consecuencia de un procesamiento alternativo, o una isoforma corta (CD21S). Se ha demostrado que las FDC expresan selectivamente la isoforma larga (CD21L), mientras que las células B expresan selectivamente la isoforma corta (CD21S) (Liu et al., 1997).

Otros antígenos expresados por las FDC y comunes con los linfocitos son: la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), necesarias para aumentar el contacto físico entre las FDC y las células B del centro germinal (Balogh et al., 2002); el receptor Fc para la Ig E, el CD23 (FcεRII), el receptor del complemento CD35 (CR1) y el CD40, motivo por el cual hay autores que han propuesto un origen hematopoyético de las FDC (Tew et al., 1990). Sin embargo, la ausencia de CD45 contradice esta posibilidad (Lindhout and Groot, 1995).

Las FDC también se caracterizan por expresar el factor de activación de células B (B cell-activating factor, BAFF); se trata de una molécula relacionada con la familia del TNF e implicada en la supervivencia de las células B en los centros germinales, presentando una función anti-apoptótica sobre las células B (Gavin et al., 2005).



**Tabla I:**

<b>Fenotipo antigénico de las Células Foliculares Dendríticas cultivadas</b>			
<b>Antígeno</b>	<b>Estudio por citometría de flujo</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Estudio por citometría de flujo</b>
CD1a	-	CD35 (CR1)	+
CD1b	-	CD40	+
CD2	-	CD45	-
CD3	-	CD54 (ICAM-1)	+
CD6	-	CD 57 (NKH-1)	-
CD10	-/+	CD63	+
CD11b (CR3)	+	CD73	+
CD14	+	CD90	+
CD15	-	CD106 (VCAM-1)	+
CD20	-	HLA I	+
CD21 (CR2)	+	CNA.42	+
DRC-1 (CD21L)	-	HJ2	+
CD22	-	Vimentina	+
CD23	+	Desmina	-/+
CD29	+	Citoqueratina	-/+
CD33	-		

(Schriever et al., 1992 ; Kosco et al, 1992; Airas et al., 1996)

Parte de las funciones atribuidas a las FDC en los centros germinales es la presentación de antígenos a las células T. Un prerequisite para llevar a cabo esta función es la expresión de antígenos MHC II por las FDC, frente a la cual encontramos ciertas discrepancias. Si bien varios autores han venido describiendo la expresión de moléculas MHC II en las FDC (Tew et al., 1990; Schriever et al., 1992), recientemente Denzer et al., (2000) indican que la expresión de estas moléculas es adquirida de exosomas por las propias FDC. Los exosomas, según esto autores, procedentes de células B vecinas y son captados específicamente por las FDC. Este hecho había sido descrito con anterioridad, pero no se había sido investigado (Gray et al., 1991). Nosotros investigamos la expresión de MHC-II por las FDC aisladas y este punto será discutido posteriormente, ya que es objeto de estudio de la presente tesis.

Las FDC también se caracterizan por expresar antígenos relacionados con los fibroblastos, hecho que sumado a su morfología fusiforme y alargada, (aspecto fibroblástico), hace que a las FDC se las relacione con estos, y por tanto con un origen no hematopoyético (Lindhout and Groot, 1995).

Existen anticuerpos monoclonales que reaccionan casi específicamente con las FDC como DRC-1 (CD21L), CNA.42, HJ2 (Naiem, 1983; Delsol et al., 1993; Butch et al., 1994)

### **3.5. Relación entre las células foliculares dendríticas y las células deciduales estromales**

La decidua es un tejido transitorio que se desarrolla en el endometrio gestante inmediatamente después de la implantación y es el componente materno en más íntimo contacto con el trofoblasto (de origen fetal). Ambos constituyen la llamada interfase materno-fetal (placenta). Está compuesto fundamentalmente de células del tipo estromal, así como de células glandulares y leucocitos. (Bulmer, 1995). Las células deciduales estromales (Decidual Stromal Cell, DSC) constituyen un tipo particular de célula que aparece en el endometrio uterino de los mamíferos durante el embarazo, justo después de la implantación del blastocisto.

Las DSC constituyen el componente celular más abundante de la decidua humana. Al igual que las FDC tienen un origen y linaje incierto y se ha discutido su identificación con células hematopoyéticas y su origen en médula ósea. Diversos trabajos han demostrado recientemente que las DSC son miofibroblastos que derivan de las células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells, MSC) presentes en la médula ósea (García-Pacheco et al., 2001). No obstante, las DSC expresan numerosos antígenos asociados a células hematopoyéticas, y entre ellos algunos característicos de las FDC: CD21, CD23, CD35 y ausencia de CD45 (Tew et al., 1990; Schriever et al., 1992; Montes et al., 1996; Oliver et al., 1999). Así mismo, las DSC expresan antígenos específicos de FDC como DRC-1, HJ2 y CNa.42 (Naiem et al., 1983; Butch et al., 1994; Montes et al., 1996). Al igual que

las FDC, las DSC también secretan IL-15 que en la decidua actúa potenciando la diferenciación y activación de las células NK deciduales (Kitaya et al., 2000).

### **3.6. Producción de citocinas por las células foliculares dendríticas**

Se ha demostrado que las FDC no sólo tienen la capacidad de expresar receptores para citocinas (IL-2, IL-1, TNF, etc.), sino que también secretan determinados factores de crecimiento o citocinas, tales como FDC-SM 8D6 (FDC-signaling molecule 8D6 o CD320); interleucina -15 (IL15) e interleucina -6 (IL6), necesarias para realizar su función (Husson et al., 2000; Li et al., 2000).

La molécula FDC-SM 8D6 es una proteína de 282 aminoácidos, que es expresada intensamente por las FDC. En un principio se pensaba que podía tratarse de un factor anti-apoptótico, pero estudios posteriores indicaron que era un factor con capacidad de aumentar la proliferación de las células B en el centro germinal (Li et al., 2005), así como de inducir la producción de anticuerpos por parte de las células plasmáticas (Li et al., 2000; Park et al., 2004)

La IL-15 es una citocina que en un principio fue considerada como un factor de crecimiento de células T, semejante a la IL-2, presentando las mismas propiedades biológicas (Park et al., 2004). Posteriormente se comprobó que esta citocina era producida por macrófagos, células estromales de médula ósea y las FDC, pero no por los linfocitos (tanto T como B). Esta citocina no sólo va a ser secretada, sino que también puede ser expresada por las FDC en su superficie celular (IL-15 de membrana). La función de la IL-15 parece ser que es promover la

proliferación de las células B de los centros germinales; hecho que se produce como consecuencia de la unión de la IL-15 a su receptor, y la transmisión de señales de proliferación en las células B del centro germinal (Li et al., 2000; Park et al., 2004) provocando de esta forma, la estimulación y la proliferación de los centroblastos.

Las moléculas FDC-SM 8D6 e IL-15 van a formar parte del grupo de moléculas que intervienen en la proliferación de las células B. Este hecho las relaciona directamente con la capacidad de facilitar u originar un linfoma B, puesto que van a permitir la expansión y proliferación de células B malignas (Park et al., 2004)

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina cuyo papel principal es proporcionar las señales necesarias para el término de la diferenciación de las células B, induciendo la producción de anticuerpos e incrementando la diferenciación en las células B activadas (Muraguchi et al., 1988). Estudios realizados sobre esta citocina han puesto de manifiesto su importancia. Al contrario que las anteriores, esta citocina no es un factor pro-proliferación, y su actuación ocurre al término de la diferenciación. Esto se puso de manifiesto en ratones deficientes para IL-6, en los que se observó una alteración en la arquitectura del centro germinal, ya que no se formaba adecuadamente la zona clara y oscura del centro germinal (Kopf et al., 1998)

Las FDC son además productoras de una citocina quimiotáctica (quimiocina) que juega un papel importante en la migración y movimiento celular dentro de los órganos linfoides (Cyster et al., 2000). A esta quimiocina se le conoce como BCL (B-lymphocyte quimioattractant) o también como BCA-1 (B cells attracting chemokine-1), aunque el nombre de clasificación es CXCL13. Es una proteína constituida por 88 aminoácidos, similar a otras quimiocinas, como interleucina - 8 (IL-8), factor-1 derivado de células estromales (Gunn et al., 1998). El receptor de esta quimiocina se encuentra presente en las células B y se le conoce como CXCR5. Las células B CXCR5+ van a responder al estímulo del CXCL13 y se produce la emigración de las células B hacia el folículo linfoide (Cyster et al., 2000). También se ha observado la expresión del receptor del CXCL13 (CXCR5) en células T activadas y células memoria (Förster et al., 1994; Ansel et al., 1999).

Para que se produzca la formación correcta del folículo linfoide, es necesaria la presencia de los linfocitos B, por lo que esta quimiocina tiene un papel importante en la formación de los órganos linfoides secundarios (Cyster et al., 2000).

Estudios de doble marcaje CXCL13/CD2 en secciones de amígdalas humanas, demostraron la presencia de esta quimiocina en el folículo, pero no en la zona T. Dentro del folículo mediante marcaje CXCL13/ CD35, mostraron la existencia de células que expresaban CXCL13 pero no CD35, lo que hizo sugerir que la producción de esta quimiocina no está restringida a las FDC (Casamayor-Palleja et al., 2001)

### **3.7. Papel de las células foliculares dendríticas en enfermedades**

El estudio de las FDC ha permitido establecer una relación entre estas células y el avance o progresión de determinadas enfermedades, tales como linfomas, infección por HIV, priones o enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide. En el caso de enfermedades víricas (HIV) o por priones, las FDC actúan como un potente reservorio, almacenando estos factores patógenos en la membrana, y en el caso de linfoma o de enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide) crean el microambiente necesario para el rescate y proliferación de células tumorales o autoreactivas (Park et al., 2004)

#### **3.7.1. Función de las células foliculares dendríticas en la infección por HIV**

Varios estudios han demostrado que las FDC tiene un papel en la patogénesis del HIV. Estas células parecen ser importantes tras la infección inicial, así como, en la diseminación de las partículas virales por los tejidos linfoides secundarios.

La existencia de partículas virales en pacientes infectados con HIV en las FDC de los ganglios linfáticos, fue confirmada mediante inmunohistoquímica, por la presencia de las proteínas del virus (p15, p24 y gp41) (Biberfeld et al., 1988; Parmertier et al., 1990). Estudios posteriores de hibridación *in situ*, demostraron la positividad para el ARN del HIV en la superficie celular de las FDC, y por microscopía electrónica se determinó que las partículas virales estaban pegadas a la red dendrítica, pero que en ningún caso habían infectado a las FDC (Schmitz et al, 1997).

Los tejidos linfoides constituyen el mayor reservorio de partículas virales del HIV por su acumulación ( $1.5 \times 10^8$  de copias de RNA viral por gramo de tejido linfoide), aunque esta sea de forma neutralizada, en los procesos dendríticos de la superficie celular de la red de FDC (Racz et al., 1988; Fox et al., 1991; Racz et al., 1989; Pantaleo et al., 1991; Cavert et al., 1997)

El hecho de que las FDC retengan las partículas HIV en su forma nativa conlleva que el virus mantenga su conformación durante meses (Mandel T. E., et al 1980). Es una forma indirecta de protegerlo del deterioro o acción de los elementos existentes en el microambiente del centro germinal, convirtiendo a las FDC en potentes reservorios de partículas virales del HIV (Burton et al., 2002). El almacenamiento puede llegar a ser indefinido, transformando la red folicular dendrítica en un reservorio de replicación viral de por vida (Beverly et al., 2001). Pero las FDC no solo van a constituir un potente reservorio del HIV, sino que van a actuar como un amplificador de las células infectadas por el virus en la etapa inicial de la infección (Taruishi et al., 2004). Además, no solo tienen capacidad de captar y retener partículas virales HIV, sino que parece ser que pueden llegar a ser infectadas por el propio virus (Schriever et al., 1992)

Puesto que las FDC son negativas para CD4, se ha sugerido que la unión con el HIV-1 y por tanto, una vía de infección viral puede ser a través de los receptores del complemento o complejos complemento-anticuerpo-antígeno (Sellheyer et al., 1989). Los complejos complemento-anticuerpo-HIV retenidos por las FDC son liberados en los centros germinales; estos complejos



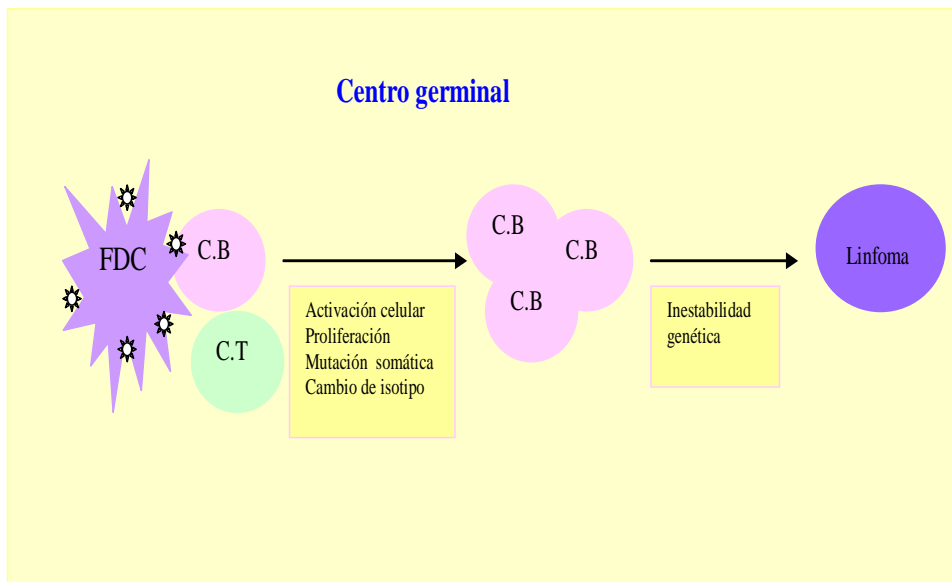
inmunológicos entrarían en contacto con las células T CD4+, que previamente habían migrado al centro germinal, siendo posteriormente infectadas por dicho contacto. Algunas de las células T CD4+ infectadas, entrarían en contacto celular directo con FDC, lo que conllevaría a la infección de las FDC, degeneración, muerte y destrucción de la red folicular dendrítica, así como la progresión del HIV (Spiegel et al., 1992). Por tanto, la inmunodeficiencia en el SIDA puede ser consecuencia no solo de la inoperancia de las células T CD4+, sino de la falta de la función del centro germinal, ocasionada por la lisis del folículo linfóide, así como de la destrucción de la red de FDC (Parravicini et al., 1986).

La infección por HIV lidera un cambio en la estructura antigénica del centro germinal (Janossy et al., 1991). Durante la progresión de la enfermedad del HIV, van a ocurrir cambios a nivel celular y estructural. En el comienzo de la infección, las células T CD4+ son las más afectadas, su número se va a ver disminuido, y no todos los centros germinales se van a ver afectados, hecho que va a cambiar en la etapa final, donde todos los centros germinales se van a encontrar destruidos y la población de células T CD4+ muy reducida (Grouard et al., 1997)

### **3.7.2. Linfoma**

La mayor parte de los linfomas B se originan en el centro germinal (Stevenson et al., 1998; Kuppers et al., 1999). Dentro del centro germinal se produce el microambiente necesario y adecuado para el origen y avance de tumores. La red formada por las FDC en un linfoma folicular B va a ser igual que la formada por las FDC en un centro germinal normal (Schriever et al., 1992). La

formación de células B malignas (figura 5), y por consiguiente el origen de un linfoma B, ocurre cuando después de la estimulación antigénica, se produce la proliferación de las células B. Durante este proceso, en condiciones normales, se producen hipermutaciones somáticas en la región V y cambio de isotipo, actividades que podrían originar una inestabilidad genética causante de una transformación de células B hacia células B malignizadas (tumoraes) (Klein et al., 1998).



**Figura 5. Formación de células B malignizadas.**

Las células B presentes en el centro germinal interactúan con las FDC, y estas les proporcionan señales de rescate de apoptosis. Como consecuencia de la actividad genética durante la proliferación, cambio de isotipo, etc, pueden ocurrir mutaciones que den lugar a células malignizadas, originando un tumor de células B.

El origen de un linfoma folicular B está íntimamente relacionado con las FDC, puesto que estas células se han encargado de rescatar previamente a las células B, que posteriormente originarían un linfoma B o tumor maligno (Li et al., 2002).

La existencia de diferentes tipos de linfomas foliculares B puede ser explicada en base a la heterogeneidad de la población de FDC, de tal forma que cada subpoblación de estas células puede suministrar diferentes señales a través de sus moléculas de señalización (FDC-SM) lo que originaría diferentes tipos de tumores (Imai et al., 1993).

Cómo se produce el desarrollo del tumor o del linfoma B y las correspondientes interacciones entre las células del linfoma y las FDC, son desconocidas. Se ha visto que el patrón antigénico expresado por las FDC de un linfoma es el mismo que el expresado por las FDC de centros germinales normales. Lo que sugiere que el papel que ejercen las estas células en los centros germinales normales puede ser el mismo que el de los linfomas (Schriever et al., 1992)

La presencia de las FDC también está relacionada con la capacidad de progresión de un tumor, puesto que además de rescatar a las células tumorales de la apoptosis, van a permitir su proliferación proporcionándoles factores de crecimiento, bien de forma soluble o por contacto directo célula a célula (Park et al., 2004).

### **3.7.3. Encefalopatía esponjiforme transmisibles**

Las encefalopatías esponjiformes transmisibles o también denominadas enfermedades por priones, son enfermedades neurodegenerativas, que afectan al sistema nervioso central (SNC) y presentan un mal pronóstico. Dentro de este

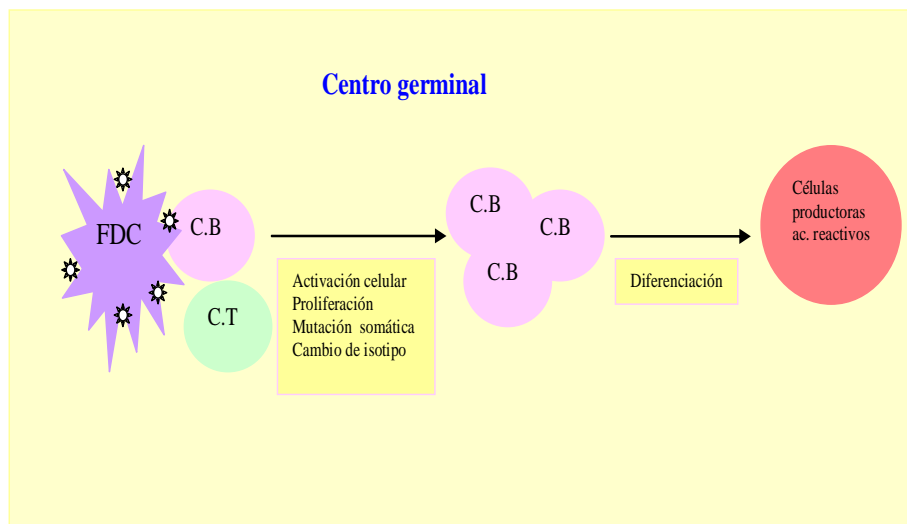
grupo de enfermedades por priones se encuentra la encefalopatía espongiforme bovina (bovine spongiform encephalopathy, BSE) o también conocida como enfermedad de las vacas locas. La característica principal de esta enfermedad es la conversión post- traslocacional de la proteína prion normal del hospedador, PrP, en una proteína prion anormal PrP<sup>Sc</sup>, confiriéndole resistencia parcial a la actividad proteolítica e insolubilidad en detergentes (Wadsworth et al., 1999).

En la encefalopatía espongiforme trasmisible, las FDC intervienen favoreciendo la capacidad de propagación de los priones. Las FDC, de forma semejante a la captación de complejos inmunológicos, van a capturar y retener las proteínas prion. Esto facilita la infección de las células B, por lo que hay autores que sugieren que, más que las FDC, son las células B las principales responsables de la neuroinvasión y propagación del prion (Wadsworth et al, 1999). El papel de las FDC sería meramente retener los priones y proporcionárselos a los linfocitos (Raeber et al., 2000).

Estudios posteriores realizados en ratones deficientes en TNF, caracterizados por la falta o ausencia de FDC maduras, pero con la presencia de células T y células B, mostraron susceptibilidad a los priones administrados, poniendo de manifiesto que las FDC no intervienen en la neuroinvasión (Klein et al.,1997) y avalando a aquellos que indican un papel secundario para las FDC con respecto a esta enfermedad; aunque podría ocurrir que las diferentes encefalopatías presentasen distintas células diana y por tanto, que hubiese otros rangos de acción del prion (Raeber et al., 2000).

### 3.7.4. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide se trata de una enfermedad autoinmune de carácter crónico. Se origina por la producción de auto-anticuerpos (figura 6), afectándose especialmente las articulaciones, fundamentalmente a nivel del tejido sinovial.



**Figura 6. Formación de células plasmáticas productoras de auto-anticuerpos (enfermedad autoinmune).** Las células B presentes en el centro germinal interaccionan con las FDC, y estas les proporcionan señales de rescate de apoptosis. Como consecuencia de la actividad genética durante la proliferación, cambio de isotipo, etc, pueden ocurrir mutaciones que den lugar a células autoreactivas, productoras de auto-anticuerpos y dando lugar al desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Como consecuencia de la inflamación del tejido sinovial, se produce la infiltración y acumulación de poblaciones celulares (células T, células B, monocitos, células mieloides, etc.) (Shi et al., 2001)

Normalmente los folículos linfoides se producen en los órganos linfoides secundarios (bazo, amígdalas, etc), pero pueden aparecer folículos linfoides en zonas de inflamación crónica, pero de manera ectópica (Shi et al, 2001) Dentro de los folículos linfoides ectópicos, se van a producir los centros germinales

presentando la misma función (seleccionar, activar, expandir y clonar poblaciones celulares B) (Schroder et al., 1996; Klimiuk et al., 1997; Wagner et al., 1998; Kim et al., 1999), aunque va a variar el lugar de proliferación. Mientras que la proliferación de las células B del centro germinal de las amígdalas se realiza en la zona oscura y una pequeña cantidad de centroblastos están dividiéndose en la región de la red de FDC, que se encuentra en la zona clara del centro germinal (Küppers et al., 1993); en el caso de los centros germinales sinoviales, la proliferación de las células B se produce principalmente dentro de la red de las FDC (Kim et al., 1999)

Se ha comprobado que para la formación de estos centros germinales sinoviales, también son necesarias las FDC (Lindhout et al., 1997) por su capacidad de secretar CXCL13. Las FDC van a atraer a las células B hacia el tejido sinovial y van a contribuir a la formación y mantenimiento de los centros germinales en ese tejido. Este hecho ha sido constatado por la presencia de CXCL-13 en los sitios crónicos de inflamación, reiterando el papel de las FDC en la formación y progresión de la enfermedad, y argumentando que la quimiocina CXCL13, puede tener un papel importante en la inducción de respuestas inmunológicas en enfermedades con inflamaciones crónicas como la artritis reumatoide, de carácter autoinmune (Shi et al., 2001).

Por otro lado se ha observado que los sinoviocitos de artritis reumatoide (células del tejido sinovial) son productores de factores pro-inflamatorios IL-8, y que cuando son estimulados con TNF y LT presentan cierta similitud con las FDC,

pero con la peculiaridad de que no son capaces de secretar el CXCL13, lo que pone de manifiesto la necesidad de las FDC en la formación de los centros germinales sinoviales, para atraer a las células B mediante CXCL13.

## **Bibliografía**

1. Ahearn JM. Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1 a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*. 1996; 4: 251-262.
2. Amilzhanov M, Kuprash D, Kosco-Vilbois M, Luz A, Turetskaya R, Tarakhovsky A, Rajewsky K, Nedospasov S and Pfeffer K. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1997; 94: 9302.
3. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, Mch-Williams MG and Cyster JG. In vivo activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med*. 1999; 190: 1123-1134.
4. Balogh P, Kselaydar Yu, TEW JG and Szakal AK. Appearance and Phenotype of Murine Follicular Dendritic Cells Expressing VCAM-1. *Anat Rec*. 2002; 268:160–168.
5. Barclay AN, Brown AH, Law SKA, Mcknight AJ, Tomlinson MG, Van der Merwe PA. *The leucocyte antigen facts book*, 2nd edn. Acad. Press. 1997: 183-5.
6. Bentley SA. A close range cell-cell interaction required for stem cell maintenance in continuous culture. *Exp Hematol*. 1981; 9: 303.
7. Beverly A, Smith, Suzanne Gartner, Yiling Liu, Alan S. Perelson, Nikolaos I. Stilianakis, Brandon F. Keele, Thomas M. Kerkerling, Andrea Ferreira-Gonzalez, Andras K. Szakal, John G. Tew, and Gregory F. Burton.



- Persistence of Infectious HIV on Follicular Dendritic Cells. *J. Immunol.* 2001, 166: 690–696.
8. Biberfeld P, Porwit A, Biberfeld G, Harper M, Bodner A and Gallo R. *Cancer Detect. Prev.* 1998; 12: 217.
  9. Bulmer JN, Rodeck C and Adinolfi M. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 1995; 15: 1143-53.
  10. Burton GF, Keele BF, Estes JD, Tyler C. Thacker and Suzanne Gartner. Follicular dendritic cell contributions to HIV pathogenesis. *Sem Immunol.* 2002: 275–284.
  11. Butch AW, Hug BA, Nahm MH. Properties of human follicular dendritic cells purified with HJ2, a new monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1994; 155: 27-41.
  12. Carel JC, Myones BL, Frazier B, Holers VM. Structural requirements for C3d, gr Epstein-Barr virus receptor (CR2r) CD21. ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem.* 1990 ;265:12293–9.
  13. Casamayor-Palleja M, Mondiere P, Amara A, Bella C, Dieu-Nosjean MC, Caux X, Defrance T. Expression of macrophage inflammatory protein-3alpha, stromal cell- derived factor-1, and B-cell-attracting chemokine-1 identifies the tonsil crypt as an attractive site for B cells. *Blood.* 2001; 97: 3992–3994.
  14. Cavert W, Notermans DW, Staskus K, Wietgreffe SW, Zupancic M, Gebhard K, Henry K, Zhang ZQ, Mills R, McDade H, Schuwirth CM, Goudsmit J,

- Danner SA and Haase AT. Kinetics of response in lymphoid tissues to antiretroviral therapy of HIV-1 infection. *Science*. 1997; 276: 960–964
15. Cerny A, Zinkernagel RM and Groscurth P. *Cell Tissue Res*. 1988; 254: 449.
  16. Cormann N. et al. Isolation of follicular dendritic cells from human tonsils and adenoids. V. Effect on lymphocyte proliferation and differentiation. *Immunol Lett*. 1986; 14: 29–35.
  17. Cyster J.G., K. Mark Ansel, Karin Reif, Eric H. Eklund, Paul L. Hyman, H. Lucy Tang, Sanjiv A. Luther, Vu N. Ngo. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* 2000; 176: 181-193.
  18. Delsol G, Meggetto F, Brousset P, Cohen-Knafo E, al Saati T, Rochaix P, Gorguet B, Voigt JJ and Chittal S. Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am. J. Pathol*. 1993; 142: 1729–1738.
  19. Denzer, K., M. Van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol*. 165: 1259–1265.
  20. Dexter TM. Stromal cell associated hemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl*. 1982; 1:87
  21. Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, Stevens RM and Shaw T. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2004; 350: 2572–81.

22. Fang I, Xu C, Fu YX, Hoters VM and Molina H. Expresión of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol* 1998; 160: 5273-5279.
23. Ferrari G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279: 1528-1530.
24. Fingeroth JD, Clabby ML, Strominger JD. Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virusC3d receptor\_CD21. *J Virol* 1988; 62: 1442–7.
25. Förster R, Emrich T, Créeme E and Lipp M. Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood*. 1994; 84: 830-840.
26. Fox CH, Tenner-Racz K, Racz P, Firpo A, Rizzo PA and Fauci AS. Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Infect Dis*. 1991; 164: 1051–1057.
27. Fu YX, Molina H, Matsumoto M, Huang G, Min J and Chaplin, D. Lymphotoxin-alpha (LTalpha) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J Exp Med*. 1997; 185: 2111-20.
28. Fu YX, Huang G, Matsumoto, M, Molina H and Chaplin D. Independent signals regulate development of primary and secondary follicle structure in spleen and mesenteric lymph node. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1997; 94; 5739-43.
29. Fu YX, Huang G, Wang Y and Chaplin DD. B lymphocytes induce the formation of follicular dendritic cell clusters in a lymphotoxin a-dependent fashion. *J Exp Med*. 1998; 187: 1009–1018.

30. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004; 116:769–78.
31. García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco F.J and Olivares E.G. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod*. 2001; 7:1151-7.
32. Gavin A.L, Duong B, Skog P, Ait-Azzouzene D, Greaves DR, Scott ML, and Nemazee D.  $\Delta$ BAFF, a Splice Isoform of BAFF, Opposes Full-Length BAFF Activity In Vivo in Transgenic Mouse Models. *J Immunol*. 2005; 175: 319–328.
33. González M, Mackay F, Browning JL, Kosco-Vilbois MH and Noelle RJ. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J. Exp. Med.* 1998; 187, 997–1007.
34. Gray D, Kosco M, Stockinger B.. Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *Int. Immunol*. 1991. 3: 141.
35. Grouard G, de Bouteiller O, Barthelemy C, Banchereau J & Liu, YJ. Human follicular dendritic cells promote both proliferation and differentiation of CD40 activated B cells. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1995; 378: 337–340.
36. Grouard G and Clark EA. Role of dendritic and follicular dendritic cells in HIV infection and pathogenesis. *Immunology*. 1997; 9: 563-567.
37. Gunn MD, Ngo VN, Ansel KM, Ekland EH, Cyster JG and Williams LT. A B-cell-homing chemokine made in lymphoid follicles activates Busskitt's lymphoma receptor-1. *Nature*. 1998; 391: 799-803.

38. Humphrey JH, Grennan D, Sundaram V. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur J Immunol.* 1984; 14: 859-864.
39. Husson H, Lugli SM, Ghia P, Cardoso A, Roth A, Brohmi K, Carideo EG, Choi YS, Browning J and Freedman AS. Functional effects of TNF and lymphotoxin alpha1beta2 on FDC-like cells. *Cell Immunol.* 2000; 203: 134-143.
40. Imai Y, Maeda K, Yamakawa M, Karube Y, Matsuda M, Dobashi M, Sato H and Terashima K. Heterogeneity and cellular origin of follicular dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 329: 339–44.
41. Jacobson EB, Caporale LH and Thorbecke GJ. Effect of thymus cell injections on germinal center formation in lymphoid tissues of nude (thymusless) mice. *Cell Immunol.* 1974; 13: 416–30.
42. Janossy G, Bofill M, Johnson M and Racz P. In accessory cells in HIV and other retroviral infections. 111.
43. Johnson GD, Malennan IC, Khan M, Hardie DL and Richardson PR. In *Leukocyte typing IV.* Oxford Univ. Press, London and New York. 1989. 183.
44. Kapasi ZF, Burton GF, Shultz LD, Tew JG, Szakal AK. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice. Influence of B and T cells. *J Immunol* 1993; 150: 2648–58.
45. Kapasi ZF. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol.* 1998; 160: 1078-1084.

46. Kawabe T, Naka T, Yoshida K. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. 1994;1: 167–78.
47. Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1994, 1:327-339.
48. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (Redux). *Immunity*. 1996; 4:107–11.
49. Klein, M.A. et al. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*. 1997; 390: 687–690.
50. Kim HJ, Krenn V, Steinhauser G and Berek C. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J. Immunol*. 1999; 162: 3053.
51. Kimoti H, Nagaoka H, Adachi Y, et al. Accumulation of somatic hypermutation and antigen-driven selection in rapidly cycling surface Ig+ germinal center (GC) B cells which occupy GC at a high frequency during the primary anti-hapten response in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27:268–79.
52. Kinet- Denoel C, Heinen E, Radoux D, Simar LJ. Follicular dendritic cells in lymph nodes alter x-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1982; 42: 121-130.
53. Kitaya KL, Yasuda I, Yagi Y, Tada S, Fushiki H, Honjo. IL15 expression at human endometrium and decidua. *Biol Reprod*. 2000; 63: 683.

54. Klein U, Rajewsky K and Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998; 188:1679–1689.
55. Klimiuk PA, Goronzy JJ, Bjornsson J, Beckenbaugh RD and Weyand CM. Tissue cytokine patterns distinguish variants of rheumatoid synovitis. *Am. J. Pathol.* 1997; 151:1311.
56. Kopf M, Herren Z, Wiles MV, Pepys MB and Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med.* 1998; 188:1895–906.
57. Koni P, Sacca R, Lawton P, Browning J, Ruddle N. and Flavell R. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity.* 1997; 6: 491-500.
58. Kopen GC, Prockop DJ and Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 10711-10716.
59. Kosco MH, Szakal AK and Tew JG. In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to cells T in vitro. *J Immunol.* 1988; 140: 354-60.
60. Kosco MH, Scheidegger D. Follicular dendritic cells: antigen retention, B cell activation, and cytokine production. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 201:69–82.

61. Kosco MH. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nature*. 2003; 3: 764- 769.
62. Küppers R, Zhao M, Hansmann ML and Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J*. 1993; 12: 4955.
63. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewsky K. Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med*. 1999; 341:1520–9.
64. Le Hir M, Bluethmann H, Kosco-Vilbois M, Muller M, di Padova F, Moore M, Ryffel B and Eugster H. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J Exp Med*. 1996; 183; 2367-75.
65. Li L, Zhang X, Kovacic S, Long AJ, Bourque K, Wood CR and Choi YS. Identification of a human follicular dendritic cell molecule that stimulates germinal center B cell growth. *J Exp Med*. 2000; 191:1077–84.
66. Li Li and Yong Sung Choi. Follicular dendritic cell-signaling molecules required for proliferation and differentiation of GC-B cells. *Sem Immunol*. 2002; 14: 259-266.
67. Lindhout E, De Groot C. Follicular dendritic cells and apoptosis: life and death in the germinal center. *Histochem J*. 1995; 27: 167–183
68. Lindhout E, Koopman G, Pals ST and de Groot C. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol. Today*. 1997; 18: 573.



69. Liu YJ, Xu J, de Bouteiller O, Parham CL, Grouard G, Djossou O, et al. Follicular dendritic cells specifically express the long CR2rCD21 isoform. *J Exp Med.* 1997; 185: 165–70.
70. Lowell CA, Klickstein LB, Carter RH, Mitchell JA, Fearon DT and Ahearn JM. Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J Exp Med.* 1989; 170: 1931-46.
71. Mackay F, Majeau G, Lawton P, Hochman P, and Browning J. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur. J. Immunol.* 1997; 27: 2033-42.
72. MacLennan IC. Germinal centers. *Ann. Rev. Immunol.* 1994;12: 117–139.
73. Mandel TE, Phipps RP, Abbot A and Tew JG. The follicular dendritic cell: long-term antigen retention during immunity. *Immunol Rev.* 1980; 53:29–59
74. Matsumoto M, Fu YX, Molina H, Huang G, Kim J, Thomas D, Nahm M, and Chaplin D. Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. *J Exp Med.* 1997; 186:1997-2004.
75. Manser T. Textbook Germinal Centers? *J Immunol.* 2004, 172: 3369–3375.
76. Montes MJ, Alemán P, Tortosa CG, et al. Cultured human decidual stromal cells Express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *J Reprod Immunol.* 1996; 30: 53-66.

77. Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, Kishimoto T. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF/IL-6) for the terminal differentiation of cells. *J. Exp. Med.* 1998; 167: 332-44.
78. Naiem M, Gerdes J, Abdulaziz Z, Stein H, Mason DY. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J Clin Pathol.* 1983; 36: 167-75.
79. Nemerow GR, Cooper NR. Early events in the infection of human B lymphocytes by Epstein-Barr virus: the internalization process. *Virology* 1984; 132:186–98.
80. Nie X, Basu S and Cerny J. Immunization with immune complex alters the repertoire of antigene-reactive B cells in the germinal centers. *Eur J Immunol.*1997; 27: 3517-3525.
81. Nierop KV and Groot C. 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin. Immunol.* 14: 251–257.
82. Nossal GJV, Ada GL, Austin CM. Antigens in immunity. IV. Cellular localization of 125I-and 131I-labelled flagella in lymph nodes. *Aust J Exp Biol.* 1964; 42: 311–30.
83. Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruíz C and Olivares EG. Human decidual stromal cells Express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod.* 1999; 14: 1599-605.
84. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP and Fauci AS. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88: 9838–9842.

85. Park CS, Yoon So, Armitage RJ and Choi YS. Follicular Dendritic Cells Produce IL-15 That Enhances Germinal Center B Cell Proliferation in Membrane-Bound Form. *J Immunol.* 2004; 173: 6676-83.
86. Parmertier HK, Van Wichen D, Sie-Go DM, Goudsmit J, Borleff JC, and Schuurman HJ. *Am. J. Pathol.* 1990; 137: 247.
87. Parravacini CL, Vago L, Constanzi GL, Gluckman JC, Klatzmann D, Nonnenmacher L, Raphael M, Berti E, Lazzarin A and Moroni M. Follicle lysis in lymph nodes from homosexual men. *Blood.* 1986; 68: 595-599.
88. Pascual V, Liu YJ, Magalski A, de Bouteiller O, Banchereau J, Capra JD. Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J Exp Med* 1994; 180: 329–39.
89. Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, and Kollias G. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 1996;184:1397.
90. Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, Pzizenmaier K, Bluethmann H and Kollias G. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 6319-23.
91. Pittenger MFI. Multilineage potencial of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284; 143-147.

92. Racz P. Molecular, biologic, immunohistochemical, and ultrastructural aspects of lymphatic spread of the human immunodeficiency virus. *Lymphology*. 1988; 21:28–35.
93. Racz P, Tenner-Racz K, Schmidt H. Follicular dendritic cells in HIV-induced lymphadenopathy and AIDS. *Acta Pathol, Microbiol Immunol Scand*. 1989; Suppl 8:16–23.
94. Rademakers LPHM. Follicular dendritic cells in germinal center development. *Res Immunol*. 1991; 142: 257-260.
95. Raebler AJ and Aguzzi A. Engulfment of prions in the germinal centre. *Immunol today*. 2000; 21: 66-67.
96. Rennert P, James D, Mackay F, Browning J and Hochman P. *Immunity*. 1998; 9: 71.
97. Renshaw BR, Fanslow WC III, Armitage RJ, Campbell KA, Liggett D, Wright B, Davison BL and Maliszewski CR. Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice. *J Exp Med*. 1994; 180:1889–900.
98. Reynes M, Aubert JP, Cohen JH, Audouin J, Tricottet V, Diebold J, et al. Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol*. 1985; 135:2687–94.
99. Ritter MA, Boyd RL. Development in the thymus: it takes two to tango. *Immunol Today* 1993; 14:462–9.
100. Sacca R, Turley S, Soong L, Mellman I and Ruddle N. Transgenic expression of lymphotoxin restores lymph nodes to lymphotoxin-alpha-deficient mice. *J. Immunol*. 1997; 159:4252-60.

101. Schmitz J, van-Luzen J, Tenner-Racz K, Grossschupff G, Racz P, Schmitz H, Dietrich M and Hufert FT. Follicular dendritic cells retain HIV-1 particles on their plasma membrane, but are not productively infected in asymptomatic patients with follicular hyperplasia. *J Immunol.* 1994, 153:1352-1359.
102. Schnizlein CT, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells in suspension. Identification, enrichment, and initial characterization indicating immune complex trapping and lack of adherence and phagocytic activity. *J Immunol.* 1985; 134:1360.
103. Schriever F. and Nadler M. L. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv immunol.* 1992; 51. 243-282.
104. Schroder AE, Greiner A, Seyfert C and Berek C. Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1996; 93: 221.
105. Sellheyer K, Schwarting R, and Stein H. Isolation and antigenic profile of follicular dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 1989; 78: 431 -6.
106. Shi K, Hayashida K, Kaneko M, Hashimoto J, Tomita T, Lipsky PE, Yoshikawa H, and Ochi T. Lymphoid Chemokine B Cell-Attracting Chemokine-1 (CXCL13) is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles Within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *J Immunol.* 2001; 166: 650–655.
107. Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss H-D and Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type

- 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am J. Pathol.* 1992; 140: 15- 22.
108. Stevenson F, Sahota S, Zhu D, Ottensmeier C, Oscier D, Hamblin T. Insight into the origin and clonal history of B-cell tumors as revealed by analysis of immunoglobulin variable region genes. *Immunol Rev* .1998; 162: 247–59.
109. Szakal AK, Kosco, MH and Tew, JG. Microanatomy of lymphoid tissue during the induction and maintenance of humoral immune responses: structure function relationships. *Annu. Rev. Immunol.* 1989; 7: 91–109.
110. Szakal AK and Tew, JG. Follicular dendritic cells: B-cell proliferation and maturation. *Cancer Res.* 1991; 52: 5554– 56.
111. Tarlinton D. Germinal centers: form and function. *Immunology.* 1998; 10. 245-251.
112. Taruishi M, Terashima K, Dewan Z, Yamamoto N, Ikeda S, Kobayashi D, Eishi Y, Yamazaki M, Furusaka T, Sugimoto M, Ishii M, Kitamura K, Yamamoto N. Role of follicular dendritic cells in the early HIV-1 infection: in vitro model without specific antibody. *Microbiol Immunol.* 2004; 48:693-702.
113. Tedder TF, Goldmacher VS, Lambert JM, Schlossman SF. Epstein Barr virus binding induces internalization of the C3d receptor: a novel immunotoxin delivery system. *J Immunol.* 1986; 137:1387–91.
114. Terashima K, Dobashi M, Maeda K and Imai Y. Follicular dendritic cell and ICCOSOMES in germinal center reactions. *Semin immunol.* 1992; 4:267-74.

115. Tew JG, Mandel TE, Burgess AW. Retention of intact HSA for prolonged periods in the popliteal lymph nodes of specifically immunized mice. *Cell Immunol.* 1979; 45:207–12.
116. Tew JG, Thorbecke GJ, Steinman RM. Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (a report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). *J Reticuloendothel Soc.* 1982; 31: 371-380.
117. Tew JG, Kosco MH, Burton GF and Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 1990; 117:185–211.
118. Tew JG, DiLosa RM, Burton GF, Kosco MH, Kupp LI, Masuda A and Szakal AK, Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunol. Rev.* 1992; 126: 1–14.
119. Tew JG, Wu J, Qin D, Helm S, Burton GF and Szakal AK. Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. *Immunol. Rev.* 1997; 156: 39–52.
120. Theise ND, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology.* 2000; 31: 235-240.
121. Toellner KM, Gulbranson-Judge A, Taylor DR, Sze DM-Y, MacLennan ICM. Immunoglobulin switch transcript production in vivo related to the site and time of antigen-specific B cell activation. *J Exp Med* 1996; 183:2303–12.
122. Tsoukas CD, Lambris JD. Expression of CR2rEBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol.* 1988; 18:1299–302.

123. Wadsworth J, Jackson GS, Hill AF and Collinge J. Molecular biology of prion propagation *Current Opinion in Genetics & Development*. 1999; 9: 338–345
124. Wagner UG, Kurtin PJ, Wahner A, Brackertz M, Berry DJ, Goronzy JJ, and Weyand CM. The role of CD81CD40L1 T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis. *J. Immunol*. 1998 ;161: 6390.
125. Wu J, Qin D, Burton GF, Szakal AK and Tew JG. Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J Immunol*. 1996; 157: 3404-11.
126. Yoshida K, Kaji M, Takahashi T, van den Berg TK and Dijkstra CD. Host origin of follicular dendritic cells induced in the spleen of SCID mice after transfer of allogeneic lymphocytes. *Immunology*. 1995; 84:117–26.
127. Zabel Mark D and John H. Weis. Cell-specific 2000 regulation of the CD21 gene. *International Immunopharmacology*. 2001; 1: 483-493.
128. Zhang X, Li L, Jung J, Xiang S, Hollmann C, Choi YS. The distinct roles of T cell-derived cytokines and a novel follicular dendritic cell-signaling molecule 8D6 in germinal center-B cell differentiation. *J Immunol*. 2001;167:49-56.



# OBJETIVOS

**Los objetivos a desarrollar en esta tesis serían:**

1. **Conseguir líneas de células foliculares dentríticas que mantengan un fenotipo estable en cultivo.**

El hecho de que estas células se encuentren en una baja proporción en los tejidos linfoides, y asociadas con otras células, ha dificultado enormemente su estudio, por tanto, la obtención de líneas FDC estables en cultivo, abre el camino a su estudio y caracterización.

2. **Estudiar el origen y linaje de las células foliculares humanas.**

Una vez que hayamos conseguido líneas estables de FDC, estudiaremos su fenotipo antigénico para dilucidar acerca de su posible origen hematopoyético o mesenquimal.

3. **Estudiar la capacidad contráctil de las FDC.**

Hemos decidido estudiar las FDC partiendo de las DSC, al observar que estas últimas expresaban numerosos antígenos característicos de FDC. Puesto que las DSC, expresan  $\alpha$ -SM-actina, y tienen capacidad contráctil, estudiaremos estas propiedades en las FDC.

4. **Estudiar la diferenciación de las células foliculares dentríticas.**

Cultivaremos las líneas FDC con citocinas implicadas en la diferenciación de FDC y observaremos los cambios fenotípicos y funcionales.

**Las Células Foliculares Dendríticas están  
relacionadas con precursores estromales de  
la médula ósea y con los miofibroblastos**

## **Las Células Foliculares Dendríticas están relacionadas con precursores estromales de la médula ósea y con los miofibroblastos**

---

Raquel Muñoz-Fernández<sup>\*</sup>, Francisco Javier Blanco<sup>\*</sup>, Cecilia Frecha<sup>\*</sup>, Francisco Martín<sup>†</sup>, María Kimatrai<sup>\*</sup>, Ana Clara Abadía-Molina<sup>\*</sup>, José Marcos García-Pacheco<sup>\*\*</sup> y Enrique G.Olivares<sup>\*2</sup>

Las células foliculares dendríticas (FDC) están involucradas en la presentación de antígenos nativos a las células B durante la respuesta inmunológica secundaria. Algunos autores consideran a las FDC como células hematopoyéticas, mientras otros proponen que son células mesenquimales. La baja proporción de FDC en el folículo linfóide, unido a los problemas técnicos para su aislamiento, hacen difícil el estudio de estas células. Nosotros demostramos que el medio para fibroblastos puede ser utilizado para realizar el aislamiento y mantenimiento de líneas celulares FDC. En este medio de cultivo, obtuvimos 18 líneas de FDC procedentes de amígdalas humanas que proliferaron durante 18 semanas y mostraron un fenotipo antigénico estable detectado por citometría de flujo y RT – PCR. Las líneas FDC fueron negativas para el CD45 y expresan antígenos asociados a FDC (CD21, CD23, CD35, CD40, CD73, BAFF, ICAM- 1 y VCAM- 1) y antígenos específicos para FDC (DRC – 1, CNA.42 y HJ.2). Estas células también se unen a las células B y secretan CXCL13, característica de la actividad funcional de las FDC. Sin embargo, la expresión añadida de STRO-1 junto con CD10, CD13, CD29, CD34, CD63, CD73, CD90, ICAM-1, VCAM-1 y HLA-DR, fosfatasa alcalina y  $\alpha$ -actina del músculo liso ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SM-actina) indicaron que las FDC están íntimamente relacionadas con precursores celulares estromales de la médula ósea. La expresión de  $\alpha$ -SM-actina del músculo liso también las relaciona con los miofibroblastos. Al igual que los miofibroblastos, las líneas de FDC expresaron fibras de estrés que contienen la  $\alpha$ -SM-actina y fueron capaces de contraer geles de colágeno bajo el efecto del TGF $\beta$ 1 y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived growth factor, PDGF). Estos resultados sugieren que las FDC son formas especializadas de miofibroblastos y derivan de precursores celulares estromales de la médula ósea. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 280-289.

\*Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital Universitario San Cecilio, Universidad de Granada, España.+ Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada, España.\*\* Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro, Vigo, España.

## INTRODUCCIÓN

Las células foliculares dendríticas (FDC) (revisión, ver Ref. 1 y 2) están localizadas en el microambiente de los centros germinales de los folículos linfoides. Estas células retienen en su membrana antígenos nativos en forma de inmunocomplejos durante meses, y presentan estos antígenos a las células B durante la respuesta secundaria. Las FDC rescatan a las células B adheridas de la apoptosis, e inducen la diferenciación de las células B en clones de células B memoria de vida larga (3). Además las FDC están relacionadas con la patogénesis del SIDA (4), con las formas transmisibles de las encefalopatías espongiiformes (5) y artritis (6). El origen y linaje celular de las FDC es controvertido. Mientras sus funciones inmunológicas y la expresión de antígenos asociados con células hematopoyéticas sugieren que pertenecen a un linaje hematopoyético (7), su morfología de forma alargada *in vitro*, la falta de CD45 y la presencia en las FDC de antígenos expresados en fibroblastos (8) indican que las FDC pueden ser células mesenquimales (no hematopoyéticas).

Basados en estudios sobre quimeras de ratón irradiadas, Humphrey et al., 1984 (9) concluyeron que las FDC no derivan de la médula ósea, pero derivan de un precursor local mesenquimal. Sin embargo, Kapasi et al. (7), usando ratones

homocigotos para la inmunodeficiencia combinada severa (*prkdc<sup>scid</sup>*), los cuales carecen de células T, B y FDC, demostraron que después de la reconstitución con médula ósea de ratones donantes, las FDC del ratón reconstituido presentaban el fenotipo del donante. Estos autores concluyeron que los precursores de las FDC proceden de la médula ósea. Estudios con ratones deficientes en miembros de la familia del TNF, como TNF, linfotóxina  $\alpha$  o  $\beta$  (LT $\alpha$ , LT $\beta$ ) o en sus receptores TNF tipo I (55 kDa), o el receptor de LT $\beta$ , carecen de FDC, ha aportado información muy relevante acerca del desarrollo de este tipo de células (10).

Para estudiar el origen, fenotipo o funciones de las FDC, la mayoría de los autores obtienen estas células de amígdalas humanas o ganglios linfoides de ratón. Sin embargo, las FDC son difíciles de investigar debido a la dificultad de un aislamiento homogéneo significativo y su mantenimiento en cultivo. El aislamiento de las FDC para su estudio *in vitro* es difícil porque constituyen sólo un 1% de las células del tejido linfoide, y forman además clusters compactos que atrapan células B dentro de sus procesos dendríticos. El método más común para su estudio es la digestión enzimática de los tejidos seguida de una centrifugación en gradiente de Percoll. Esto produce un enriquecimiento de la población de FDC que es además purificada mediante separación con anticuerpos monoclonales (monoclonal antibodies, mAb) frente a CD14 (11) o anti-antígenos específicos de FDC (12). Estos métodos para obtener FDC frescas tienen varios inconvenientes. Es difícil disociar las células B de las FDC unidas *in vivo* (11), y la presencia de células B contaminantes puede llevar a falsos resultados cuando se estudia el fenotipo de las FDC. El uso de mAb anti-CD14 para la separación puede

contaminar la preparación de las FDC con macrófagos. Cuando se usa un anticuerpo anti-FDC específico para evitar la contaminación con macrófagos, el número de FDC purificadas es insuficiente para llevar a cabo experimentos amplios. Para resolver este problema, algunos autores han enriquecido y purificado las FDC mediante cultivo. No obstante, obtener una línea de células FDC no es un logro muy común y en las células resultantes la expresión de ciertos antígenos desaparece progresivamente (13-15). En este artículo demostramos que el medio para fibroblastos es un medio apropiado para obtener líneas de células FDC, las cuales mantienen un fenotipo estable. Observamos que las FDC están relacionadas con células progenitoras estromales de la médula ósea (bone marrow stromal cell progenitors, BMSPC) (16,17), expresan fibras de estrés que contienen “ $\alpha$ -smooth muscle-actin” ( $\alpha$ -SM-actina) y muestran actividad contráctil como los miofibroblastos. La obtención de líneas de FDC es muy importante porque facilita el estudio de las FDC.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Muestras*

Las muestras de amígdala fueron obtenidas de pacientes con amigdalitis del Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, España). Los pacientes (de 3 a 10 años de edad) estaban en remisión completa antes de la intervención. Los padres o tutores de los pacientes fueron convenientemente informados concediendo el correspondiente permiso para la utilización de las muestras. Este estudio ha sido

aprobado por el comité ético de investigación del Hospital Universitario de San Cecilio.

#### *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales (monoclonal antibodies, mAb) utilizados aparecen detalladamente en la Tabla I.

#### *Citocinas*

TGF $\beta$ 1, factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF), TNF y LT $\alpha_1$   $\beta_2$  procedían de Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

#### *Líneas celulares tumorales*

Las células Ramos, una línea de linfoma B humano, JEG-3, una línea tumoral humana de coriocarcinoma trofoblástico extravellositario, y Meth-A, una línea celular de fibrosarcoma de ratón, fueron cultivadas en RPMI-1640 (Sigma) con 100 U/ml de Penicilina, 50 $\mu$ g/ml de Gentamicina y 10% de FCS (fetal calf serum). Todas estas líneas tumorales se utilizaron cuando se encontraban en fase exponencial de crecimiento.

#### *Medio para fibroblastos*

De acuerdo a la información indicada por el proveedor (Sigma – Aldrich), el medio para fibroblastos consiste en un medio basal para fibroblastos (una versión modificada del medio de cultivo MCDB 105) y un suplemento que contiene FCS (concentración final del 2%) y cantidades no especificadas de factor de crecimiento para fibroblastos, heparina, factor de crecimiento epidérmico e hidrocortisona. Aunque el medio para fibroblastos no está actualmente disponible en Sigma – Aldrich, con el medio de crecimiento para fibroblastos (Promocell),



otro medio bajo en proteínas, obtuvimos líneas celulares similares fenotípicamente a las descritas en el presente trabajo.

**Tabla I.** mAb utilizados en el estudio

mAb	Especificidad	Ig Subclases	Marcados con*	Procedente de†
Control Isotipo	---	IgG1	FITC or PE	Sigma-Aldrich
Control Isotipo	---	IgG2a	FITC or PE	Caltag
Control Isotipo	---	IgM	Unconjugated	Sigma-Aldrich
Control Isotipo	---	IgM	FITC	Caltag
OKT3	CD3	IgG2a	PE	Ortho-Diagnostic System
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	Dako Cytomation
CD13	CD13	IgG1	FITC	Caltag
CD14	CD14	IgG2a	PE	Sigma-Aldrich
CD15	CD15	IgM	FITC	Caltag
CD21	CD21(isoforma corta)	IgG1	PE	Caltag
DRC-1	CD21(isoforma larga)	IgM	---	Dako Cytomation
BU38	CD23	IgG1	FITC	The Binding Site
CD29	CD29	IgG1	FITC	Caltag
CD34	CD34	IgG1	FITC	Caltag
Anti-CR1 humano	CD35	IgG1	FITC	Biosource
CD40	CD40	IgG1	FITC	Caltag
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma-Aldrich
ICAM-1	CD54	IgG2a	FITC	Caltag
CD63	CD63	IgG1	FITC	Caltag
CD73	CD73	IgG1	PE	BD Biosciences
Anti-Thy-1 humano	CD90	IgG1	FITC	Serotec
VCAM-1	CD106	IgG2a	FITC	R&D systems
BAFF	CD257	IgG1	FITC	R&D systems
anti- $\alpha$ -SM actina	$\alpha$ -SM actina	IgG2a	FITC	Sigma
B4-78	Fosfatasa Alcalina Isoenzimas Hueso/hígado/riñón	IgG1	---	DHSB
Anti-FDC humanas	CNA.42	IgM	---	Dakocytomation
OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	Ortho-Diagnostic System
Anti-FDC humanas	HJ2	IgM	FITC	Sigma-Aldrich
STRO-1	STRO-1	IgM	---	DHSB

\*FITC: Fluorescein isothiocyanate; PE: Phycoerythrin.

†Sigma, Saint Louis, Missouri, USA; Ortho-Diagnostic System, Raritan, NJ; DAKO, Glostrup, Denmark; CALTAG, San Francisco, CA; The Binding Site, Birmingham, UK; Biosource, Camarillo, CA; BD Biosciences, Erembodegem, Belgium; Serotec, Oxford, UK; R&D Systems, Minneapolis, MN; DHSB, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA.

### *Aislamiento y cultivo de las líneas de FDC*

Para establecer las líneas de FDC, seguimos el método descrito por Kim et al., (15) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras de amígdala humanas frescas obtenidas de extracciones rutinarias fueron minuciosamente lavadas con PBS y cortadas en pequeños trozos y desmenuzadas con bisturí en un volumen pequeño de medio RPMI 1640 con 100U/ml de penicilina y 50µg/ml de gentamicina. La suspensión se puso en una solución de tripsina al 0.25% y 0.5 mM EDTA (Sigma) durante 15 minutos a 37°C, y la reacción se detuvo añadiendo RPMI 1640 frío y con 20% de FCS. La suspensión se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 425 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el *pellet* fue resuspendido en RPMI y centrifugado sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech), durante 20 minutos a 600 x g. Las células fueron recogidas de la interfase, suspendidas en PBS, y lavadas. La suspensión se incubó con RPMI 1640 al 20% de FCS durante 1 h a 37°C para permitir que macrófagos y granulocitos se adhirieran al frasco de cultivo. Las células del sobrenadante se recogieron, se lavaron y se incubaron en medio para fibroblastos suplementado con 100UI/ml de penicilina y 50mg/ml de gentamicina. Tras toda la noche de incubación, que permitió que las células adherentes se adhieran al frasco de cultivo, se desecharon los linfocitos del sobrenadante. El medio para fibroblastos se cambiaba dos veces a la semana. Tras 2-4 semanas, las células adheridas eran morfológicamente uniformes y cubrían por completo la superficie de 25 cm<sup>2</sup> del frasco de cultivo. La viabilidad celular se determinó por exclusión de células

mueras con el azul tripan antes de hacer los experimentos. Solo se utilizaron las preparaciones con una viabilidad > 95%.

#### *Aislamiento de FDC frescas*

Para la obtención de la suspensión celular que contiene a las FDC se utilizó un protocolo similar al utilizado por Montes et al, (18) para células deciduales estromales frescas (decidual stromal cells, DCS). Las amígdalas fueron lavadas con PBS y minuciosamente desmenuzadas con un bisturí en un volumen pequeño de RPMI 1640 con un 10% de FCS. La muestra fue filtrada por una gasa estéril, lavada por centrifugación, y resuspendida en medio de cultivo. Esta suspensión fue centrifugada a 650 x g durante 30 minutos bajo un gradiente discontinuo de 20% y 30% de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals). Las células de la interfase 20-30% fueron recogidas y lavadas con PBS. La viabilidad celular se determinó por exclusión con azul tripan. Solo las preparación con un 95% de viabilidad fueron utilizadas. Cinco muestras procedentes de amígdalas fueron estudiadas de forma independiente por citometría de flujo.

#### *Tratamiento con citocinas de las FDC en cultivo*

Las células FDC fueron incubadas por espacio de 1, 3 o 7 días con TNF,  $LT\alpha_1\beta_2$  o ambas a concentraciones de 10 o 100 ng/ml, y después el fenotipo antigénico fue determinado por citometría de flujo.

#### *Análisis de los sobrenadantes procedentes de los cultivos*

Para determinar la concentración de prolactina (PRL) y la osteocalcina, los sobrenadantes procedentes de cultivos confluentes de FDC fueron recogidos y se concentraron 10 veces en un concentrador Miniplus (Amicon). La

osteoprogesterina y el CXCL13 fueron analizados sin concentrar el sobrenadante. La presencia de prolactina (PRL) se estudió mediante un inmunoanálisis de electroquimioluminiscencia (Roche), la de osteocalcina con un *kit* de RIA (DiaSorin), y la osteoprotegerina mediante ELISA (Immundiagnostik). CXCL13 (BLC/BCA-1) fue medida con un ELISA de R&D Systems.

#### *Análisis por citometría de flujo*

Las FDC se despegaron del frasco de cultivo con una solución de 0.04% EDTA a 37°C. Las células fueron centrifugadas, el sobrenadante se desechó y el *pellet* se resuspendió en PBS a una concentración de  $10^6$  cel/ml. Para el marcaje directo, 100  $\mu$ l de la suspensión celular fueron incubados con 10  $\mu$ l del correspondiente mAb en la oscuridad durante 30 minutos a 4°C. Después las células fueron lavadas con PBS y se resuspendieron en un volumen de 0.5 ml de PBS e inmediatamente analizadas en el citómetro de flujo (Ortho-Cytoron, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA). Para identificar las células muertas incubamos las FDC con yoduro de propidio (Sigma Aldrich). El porcentaje de células positivas para cada anticuerpo fue calculado comparando con el apropiado control isotipo (Tabla I). Para el marcaje doble, seguimos el mismo proceso salvo que se añadió un segundo anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente distinta del primero. Para el marcaje indirecto, después del primer anticuerpo se añadió un anticuerpo de cabra frente a inmunoglobulina (Ig) de ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para el marcaje intracelular, las FDC fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min a 4°C y permeabilizadas con

acetona fría durante 10 minutos antes de añadir el anticuerpo monoclonal. Las FDC frescas fueron localizadas en base a la expresión del antígeno CD10.

*Cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Los cebadores usados en este estudio aparecen en la Tabla II,. Fueron diseñados de acuerdo a las secuencias disponibles en el Genbank ([www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank](http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank)) y sintetizados por Genset (Paris, Francia). Para prevenir cualquier amplificación de ADN contaminante, cuando fue posible, se diseñaron cebadores sentido y anti-sentido de secuencias localizadas bastante alejadas de los diferentes exones, y fueron probados en reacciones de PCR con ARN usado para la síntesis del ADN complementario (ADNc).

**Tabla II.** Secuencias de los cebadores empleados en la RT- PC.

mRNA	Cebadores	Tamaño producto PCR (bp)
CD10	5'-AACATGGATGCCACCACTGAG-3' 5'-CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	525
CD13	5'-AAGCTCAACTACACCCTCAGC-3' 5'-GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	600
$\alpha$ -SM actina	5'-ACTGTGTTATGTAGCTCTGGAC-3' 5'-ACAATGGAAGGCCCGCTTC-3'	465
ALP	5'-GGACAAGTTCCCCTTCGTGG-3' 5'-GCATGAGCTGGTAGGCGATG-3'	362
Osteocalcina	5'-AGGCGCTACCTGTATCAATGG-3' 5'-TAGACCGGGCCGTAGAAGC-3'	155
CD34	5'-ACAACCTTGAAGCCTAGCCTG-3' 5'-CAAGACCAGCAGTAGACACTG-3'	348
CD21	5'-GGAGAGAGCACCATCCGTTG-3' 5'-GCAGCGAGTCACAGGAGGAG-3'	CD21 isoforma larga: 834 CD21 isoforma corta: 657
CD45	5'-ACCAGGGGTTGAAAAGTTTCAG-3' 5'-GGGATTCCAGGTAATTACTCC-3'	343
Prolactina	5'-GGGTTTCATTACCAAGGCCATC-3' 5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	276
HLA-DRB	5'-CCTACTGCAGACACAACACTACG-3' 5'-TCAATGCTGCCTGGATAGAAAC-3'	154

*Reacción en cadena de polimerasa de la transcriptasa inversa (RT)-PCR.*

El ARN total se extrajo usando el kit Ultraspec™, de acuerdo al protocolo proporcionado por la casa comercial (Biotex Laboratories Inc., Houston, TX, USA). La cadena simple de ADNc se obtuvo partiendo de ARN total y usando hexámeros aleatorios (Pharmacy Biotech, Uppsala, Sweden) y la ARNasa transcriptasa inversa M-MLV H (Promega, Madison, WI, USA). Para la desnaturalización se calentó (65°C) la muestra durante 5 minutos y se enfrió acto seguido en un termociclador (Geneamp PCR System 9600, Perkin-Elmer, Cetus, Norwalk, CT, USA). La transcripción inversa se realizó con la transcriptasa inversa por espacio de 1 h a 37°C. Empezando con una cantidad de ADNc equivalente a los 75 ng de ARN, la amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 12,5 µl de la mezcla de amplificación, 10 mmol/l Tris-Cl (pH 8.4), 50 mmol/l KCl, 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub>, gelatina al 0.01%, 0.2 mmol/l dNTPs, glicerol al 5%, 0.25 mmol/l de cada cebador y 0.02 UI/ml de ADN Taq polimerasa (Promega). Después de la incubación durante 5 min a 96°C, cada ciclo consistió en 94°C durante 30 s, 57°C por 30 s y 72°C por 30 s, en un total de 32 ciclos. Un total de 1 µl procedente de la primera ronda se usó para una ronda posterior de 32 ciclos. Los productos de la PCR se separaron por tamaño en geles de agarosa al 2%, y en cada gel corrido se incluyó un patrón de 100 pb de DNA en escalera. La visualización fue llevada a cabo mediante tinción con bromuro de etidio.

### *Microscopía de inmunofluorescencia*

Se cultivaron FDC en placas adecuadas con medio para fibroblastos. Tras 24 h se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C, y se permeabilizaron con acetona fría durante 10 minutos antes de añadir el anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína anti- $\alpha$ -SM-actina (Sigma-Aldrich). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal Leica (Leica Microsystems).

### *Ensayo de contractilidad en gel*

El ensayo de contractilidad celular se realizó según lo previamente descrito (19). Una solución estéril y purificada de colágeno bovino solubilizado en pepsina (Vitrogen, Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) se preparó de acuerdo a las instrucciones suplementadas con el producto comercial y fue mezclada con  $25 \times 10^4$  FDC. La mezcla de colágeno/células (100  $\mu$ l/pocillo) se depositó en una placa de seis pocillos y se dejó polimerizar por espacio de 30 minutos en estufa sin CO<sub>2</sub> a 37°C. Inmediatamente después de la polimerización se añadió 2 ml de medio para fibroblastos (con o sin citocinas) en cada pocillo. Después de 24 h de incubación la altura ( $l$ ) y el diámetro ( $d$ ) de cada burbuja de colágeno se determinó haciendo uso del tornillo micrométrico del microscopio, y el volumen ( $V$ ) se determinó aplicando los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$V = 1/24 \times \pi \times l \times (3 \times d^2 + l^2)$$

La media de las medidas tomadas ( $n=3$  para cada muestra) en cada tipo de concentración se usaron para determinar el volumen. Los datos se presentan como el porcentaje de contracción de gel con FDC tratadas con citocinas

comparado con el volumen de las células cultivadas sin tratar, calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Contractilidad celular (\%)} = 100 \times (\text{V sin citocinas} - \text{V con citocinas}) / \text{V sin citocinas}$$

Como control negativo para la contracción celular se usaron células Ramos. Estas células son incapaces de adherirse a la superficie de plástico o del gel. Por lo tanto, estas células no son capaces de contraer las matrices de colágeno, ya que esta actividad depende de la adhesión a la matriz del gel.

#### *Ensayo de Adherencia*

El método usado estaba basado en el descrito por Clark et al., 1992 (14) con algunas modificaciones. Las células Ramos, empleadas para testar las células adheridas, y las células Meth-A como control de células adheridas, fueron marcadas cultivando  $10^5$  cel/ml durante 20h a  $37^\circ\text{C}$  con  $10 \mu\text{Ci/ml}$  [ $\text{H}^3$ ]-timidina (Amersham Biosciences), se lavaron y se resuspendieron en un total de  $5 \times 10^5$  cel/ml en RPMI 1640. Las FDC cultivadas se testaron como células adherentes y las células JEG-3 como control de células adherentes, se trataron con tripsina al 0.05% y EDTA 5mM, se resuspendieron en medio de fibroblatos y medio RPMI respectivamente y se pusieron por cuadruplicado para cada valor experimental en placas de 96 pocillos a  $10^4$  cel/pocillo. Después de 20 h a  $37^\circ\text{C}$ , las placas se lavaron con PBS y se añadieron 200 $\mu\text{l}$  de células marcadas con [ $\text{H}^3$ ]-timidina a cada pocillo. Las placas se centrifugaron a 5g durante 4 minutos, se incubaron



durante 6h a 37°C y se lavaron a continuación con PBS cuatro veces a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 200µl de tripsina y se procedió a recoger las células para lavarlas en un contador de centelleo. El porcentaje de células unidas se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

Adherencia (%) = 100x media experimental cpm/ media total cpm añadidos.

### ***Análisis estadístico***

Los ensayos cuantitativos se realizaron por triplicado o cuadruplicado ± SD. La t-Student se utilizó para comparar los resultados obtenidos en el ensayo de adhesión.

## **RESULTADOS**

### *Fenotipo antigénico de las FDC obtenido en Medio para Fibroblastos.*

Tras 24 horas de cultivo las células adherentes aparecían con células linfoides asociadas (Fig. 1). Durante la primera semana de cultivo, las células linfoides murieron y sólo permaneció una población de células adherentes con características morfológicas de células fibroblásticas (Fig. 1). Con el medio para fibroblastos obtuvimos 18 líneas celulares las cuales, con un pase semanal, proliferaron durante 7-18 semanas. Pasado este periodo, las células empezaron a morir. Durante el extenso periodo de cultivo las células en proliferación crecen sobre otras posibles células contaminantes. La figura 2A y la Tabla III muestran el fenotipo antigénico (determinado por citometría de flujo) de estas FDC, y

demuestra la presencia de una población homogénea con un fenotipo consistente. La mayoría de las FDC eran CD13<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup> y  $\alpha$ -SM-actina<sup>+</sup>. Los antígenos CD21, CD29, CD63, fosfatasa alcalina (ALP) y CNA.42 fueron expresados también por la mayoría de las FDC cultivadas. Los antígenos CD14, DRC-1, CD23, CD34, CD35, CD40, CD90, factor de activación de las células B que pertenece a la familia TNF (BAFF), ICAM-1, VCAM-1, HJ2, HLA-DR y STRO-1 también se detectaron en estas células. Sin embargo, algunas de las líneas FDC no expresaron CD14, DRC-1 y HLA-DR en ningún momento del cultivo. Ninguna de las líneas FDC expresaron CD3, CD15 o CD45.



**Figura 1. FDC frescas y en cultivo.** Células FDC frescas formando clusters con células linfoides 24 horas después de su obtención (A y B). Las células FDC cultivadas en el medio para fibroblastos presentan una morfología fibroblástica (tinción de hematoxilina-eosina) (C). (Barra, 50  $\mu$ m).

La ausencia de CD45 y la detección de antígenos asociados con FDC (CD21, CD23, CD35, CD40, CD73, ICAM-1, VCAM-1 y BAFF) (20-23) y antígenos específicos para FDC (DRC-1, CNA.42 y HJ2) (12, 24, 25) relaciona estas líneas

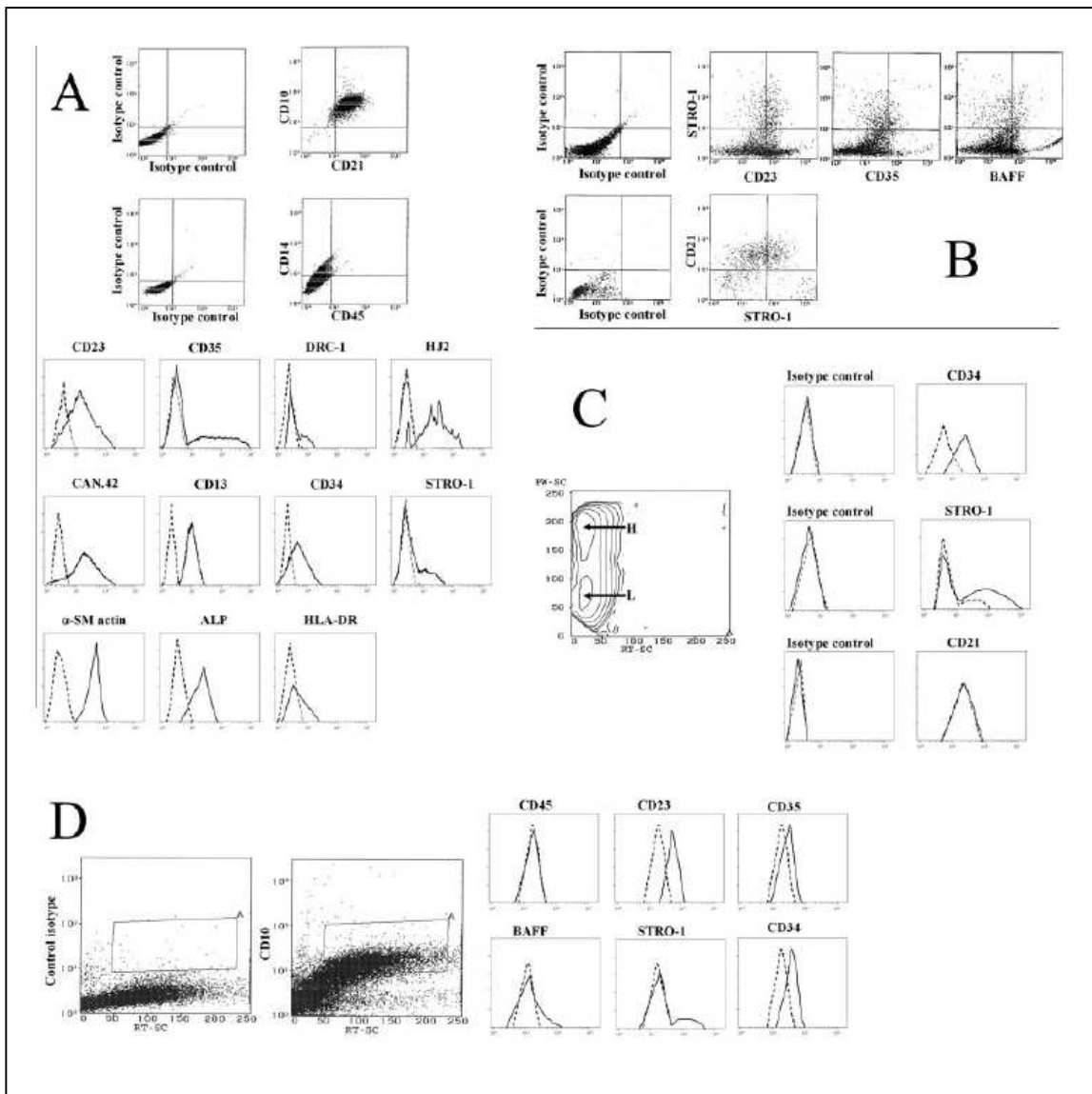
celulares con FDC. Sin embargo, la expresión de STRO-1, un antígeno específico de las células progenitoras estromales asociadas a la médula ósea (bone marrow stromal cell progenitors, BMSCP) (16, 17) relaciona las líneas celulares con estos progenitores celulares estromales, y esta relación es además mayor por la expresión de antígenos asociados a BMSCP ( CD10, CD13 CD23, CD29, CD34, CD63, CD73, ICAM-1, VCAM-1,  $\alpha$ - SM- actina, ALP, y HLA-DR, y la ausencia de CD3, CD15, CD45) (16,17, 26). Este fenotipo antigénico de las FDC esta además relacionado con otras células de carácter mesenquimal, las células deciduales estromales (decidual stromal cells, DSC) (18, 27, 28), los osteoblastos (29), y los adipocitos (30). La expresión de  $\alpha$ -SM-actina sugiere que las FDC están también emparentadas con los miofibroblastos (31).

La morfología fibroblástica de las células cultivadas, la expresión por la mayoría de CD10, CD13, CD73 y  $\alpha$ -SM-actina, y la ausencia de CD3, CD15, CD45 –todas características de BMSCP- sugiere que las líneas celulares constituyen una población homogénea. Sin embargo, la detección de antígenos asociados a BMSCP (STRO-1) o antígenos asociados a FDC (CD23, CD35, BAFF, DRC-1) en algunas pero no en todas las células muestran la presencia de subpoblaciones (Tabla III). La co-expresión de algunas pero no todas las células de STRO-1 con CD21, CD23, CD35 o BAFF (Fig. 2B) confirma la relación entre el “rasgos de BMSCP” y “rasgos de FDC” y sugiere la presencia de diferentes estados de diferenciación entre BMSCP y FDC madura. La presencia de subpoblaciones fue confirmada por la detección en las líneas celulares de células grandes y células

pequeñas (Fig. 2C), las cuales expresan el mismo fenotipo antigénico (Tabla III) pero que difieren en la intensidad de expresión de STRO-1 y CD34. Las células seleccionadas en la región de pequeño tamaño y granulosidad (células pequeñas) lo expresan más intensamente que las que se encuentran en la parte alta (células más grandes) (Fig. 2C).

**Tabla III.** Expresión antigénica de FDC en cultivo (n = 18).

Antígeno	Análisis de Citometría de flujo ( % de células positivas)
CD3	<1
CD10	95-99
CD13	94-97
CD14	<1-45
CD15	<1
CD21	69-99
DRC-1	1-37
CD23	8-74
CD29	74-99
CD34	21-52
CD35	15-32
CD40	24-65
CD45	<1
CD54 (ICAM-1)	30-85
CD63	75-92
CD73	95-99
CD90	42-80
CD106 (VCAM-1)	17-66
CD257 (BAFF)	7-24
Alfa-SM actina	95-99
Isoenzimas de la fosfatasa alcalina hueso/hígado/riñón	79-99
CAN.42	67-93
HLA-DR	<1-23
HJ2	47-89
STRO-1	3-43



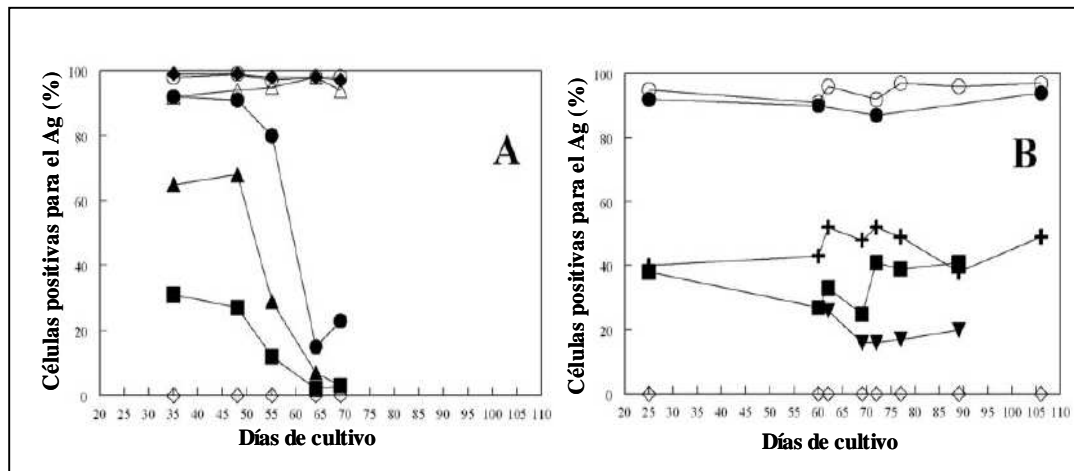
**Figura 2. Análisis de Citometría de Flujo de la expresión de antígenos en FDC** A, Expresión de antígenos en FDC cultivadas en el medio para fibroblastos. Control Isotipo (----); mAb (—). B, Co-expresión de STRO-1 y antígenos asociados a FDC cultivadas en medio para fibroblastos. C, Expresión diferencial de antígenos en las FDC de tamaños diferentes cultivadas en medio para fibroblastos. Para este análisis se estableció una ventana alta (H, High) y otra baja (L, Low) respecto al tamaño (FW-SC, forward scatter). Células en la ventana H (---, células grandes); células pequeñas L (—, células pequeñas). D, Expresión de antígenos en las FDC frescas. Las células son seleccionadas con CD10 frente a Granularidad (RT-SC, side-scatter). Control Isotipo (---); Ac Mo (—).

### *Fenotipo antigénico de las FDC frescas.*

El estudio de las FDC frescas es difícil porque representan aproximadamente el 1% de células del centro germinal. Sin embargo, como hemos encontrado que las DCS cultivadas están íntimamente relacionadas con las FDC, el estudio de FDC frescas fue el mismo que se utilizó para las DCS frescas (18). El análisis por citometría de flujo de células de amígdalas de baja densidad aisladas por gradiente de Percoll, seleccionadas por la expresión de CD10, reveló la presencia de células con un fenotipo similar a las de las FDC cultivadas. Las células CD10<sup>+</sup> fueron negativas para CD45, pero co-expresaron CD23, CD34, CD35, BAFF y STRO-1 (Fig. 2D).

### *Estabilidad del fenotipo antigénico de las FDC obtenidas en medio fibroblástico*

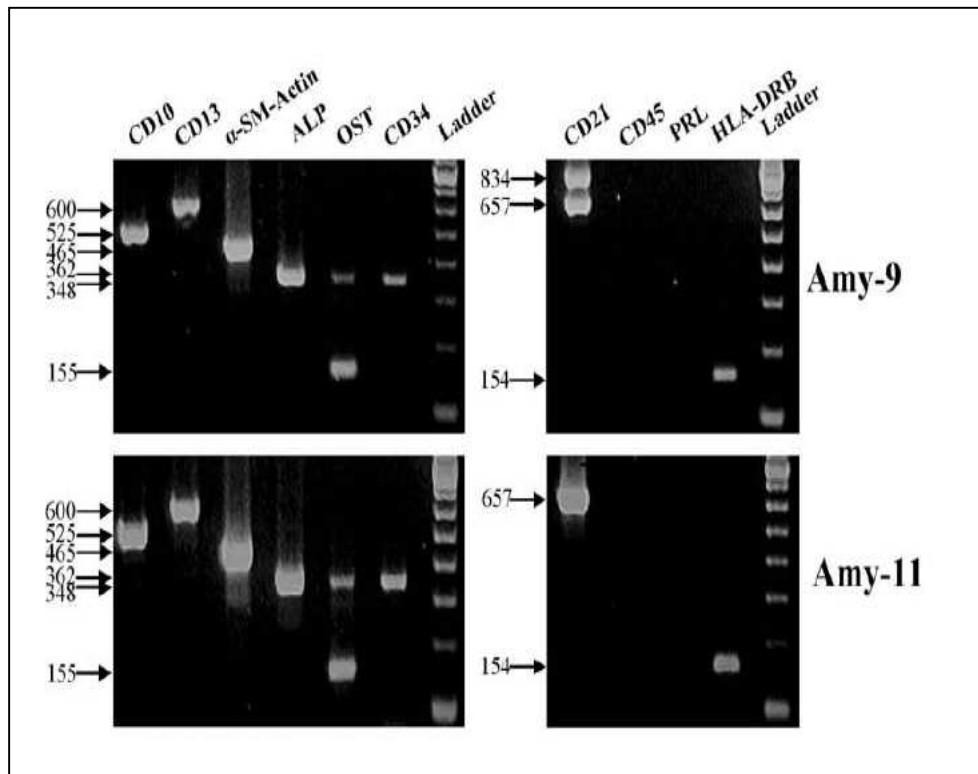
Obtuvimos células FDC en RPMI 1640 con un 20% de FCS, y aunque la estabilidad de los antígenos de superficie era mayor que en otros estudios (13-15), la mayoría de los antígenos con excepción del CD10, CD13 y  $\alpha$ -SM-actina se modulan negativamente después de 7 semanas de cultivo. Sin embargo, las líneas celulares de FDC obtenidas con medio para fibroblastos mantienen un fenotipo estable a lo largo de todo el proceso de cultivo (Fig. 3). Debido a que en intentos anteriores de mantener un fenotipo estable en las células de cultivo fueron infructuosos (13-15), el medio para fibroblastos parece ser una opción adecuada para enriquecer y purificar las FDC para su estudio.



**Figura 3. Variación en la expresión de antígenos en FDC en función del tiempo de cultivo.** Análisis por citometría de flujo sobre el cambio en la expresión de los antígenos CD10 (○), CD13 (Δ), CD21 (●), CD23 (+), CD34 (■), CD35 (▼), CD45 (◆), α-SM actina (◇) y HJ2 (▲) en las FDC obtenidas y cultivadas en RPMI 1640 conteniendo un 20% FCS (A) y en las Líneas FDC obtenidas y cultivadas en el medio para fibroblastos (B).

#### *Detección de mRNAs en las líneas FDC*

La expresión de mRNAs de los antígenos se estudió por RT-PCR en cuatro líneas de FDC obtenidas en medio para fibroblastos. CD10, CD13, α-SM-actina, ALP, osteocalcina, CD34, CD21 y HLA-DRB se detectaron en todas las líneas FDC, mientras que los mRNA de CD45 o PRL no se encontraron en ninguna de las cuatro líneas (Fig. 4). El mRNA para la isoforma corta de CD21 (Fig. 4) se detectó en todas las líneas estudiadas; una línea también expresó la isoforma larga de CD21. Esta isoforma larga corresponde a DRC-1, un antígeno específico de las FDC (24) que fue detectado débilmente por citometría de flujo en algunas aunque no en todas las líneas FDC (Fig. 2A, Tabla III).



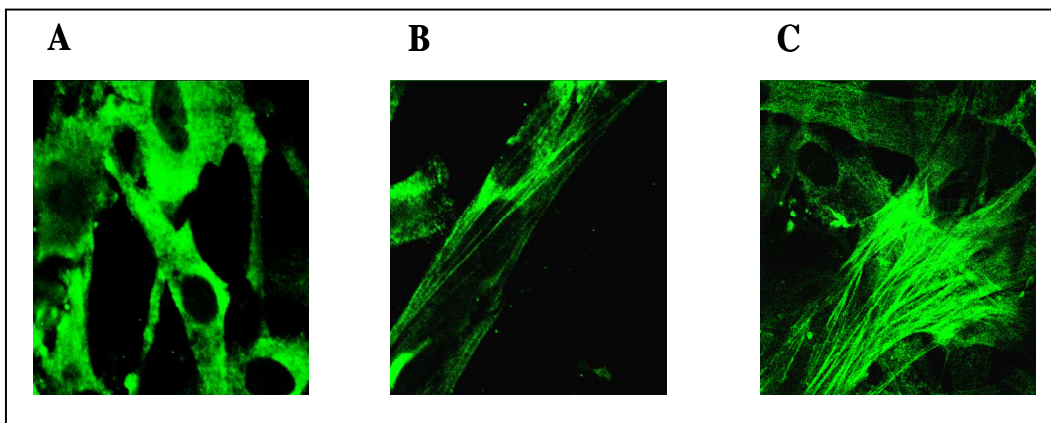
**Figura 4. Expresión de mRNA en las líneas FDC cultivadas en medio para fibroblastos.** Expresión de diferentes mRNA en dos líneas de FDC (Amy-9 and Amy-11) estudiadas mediante RT-PCR.

Aunque las FDC demostraron expresar un fenotipo antigénico de características similares a los BMSCP, DSC y osteoblastos (Tabla IV), encontramos algunas diferencias. Las líneas de FDC no secretaban PRL al sobrenadante del cultivo (Tabla IV) y no expresaban mRNA para PRL (Fig. 4), aunque las DSC producen PRL *in vivo* e *in vitro* (32, 33). Como los osteoblastos y BMSCP, las FDC expresaban mRNA para ALP y osteocalcina (Fig. 4), expresaban la proteína ALP (Fig. 2A, Tabla III), y secretaban osteoprotegerina (Tabla IV), pero a diferencia de los osteoblastos y BMSCP, las FDC no secretaban osteocalcina al sobrenadante (Tabla IV)



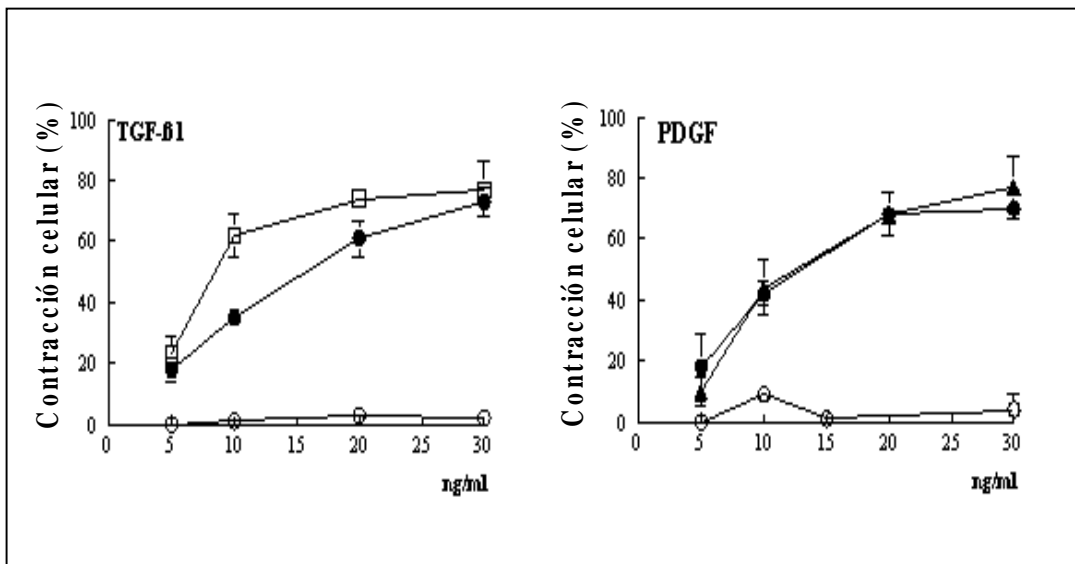
*Las FDC muestran características morfológicas y funcionales de los miofibroblastos.*

Hemos demostrado que las FDC expresan  $\alpha$ -SM-actina, mRNA y la proteína (figuras 2 y 4). Esta proteína es considerada un marcador de miofibroblastos (31), células contráctiles implicadas en la retracción de las heridas, inflamación y fibrosis (34). Los estudios de microscopía por inmunofluorescencia, usando un anticuerpo monoclonal fluoresceinado contra la  $\alpha$ -SM-actina, mostraban un patrón difuso de tinción en el citoplasma de las FDC no tratadas, el cual revelaba la presencia de  $\alpha$ -SM-actina no polimerizada (Fig. 5A). PDGF o TGF $\beta$ 1 aumenta la presencia de  $\alpha$ -SM-actina en las fibras de estrés (Fig. 5B, 5C).



**Figura 5. Expresión de  $\alpha$ -SM actina en Líneas de FDC cultivadas en el medio para .** Detección de  $\alpha$ -SM actina mediante Inmunofluorescencia en el citoplasma de las FDC cultivadas. Experimento representativo de una de las 5 líneas de FDC estudiadas. La  $\alpha$ -SM actina fué detectada mediante un mAb marcado con fluoresceina . En las FDC no tratadas, aparece un patón de marcaje difuso, en el que casi no se observan fibras de estrés (<5% de células presentan fibras de estrés) (A). Tanto PDGF (B) como TGF $\beta$ 1 (C) aumentó el número de células que presentaban fibras de estrés marcadas (42-63% para PDGF y 56-74% para TGF $\beta$ 1). Barra, 50  $\mu$ m.

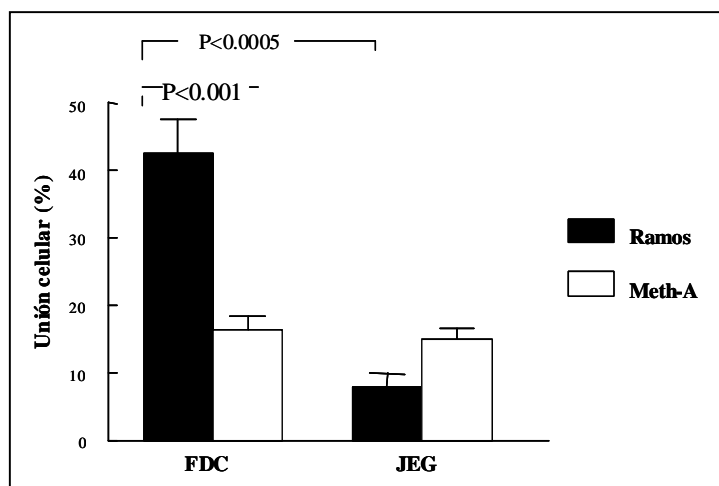
Dado que la expresión de  $\alpha$ -SM-actina en las fibras de estrés incrementa la actividad contráctil de las células fibroblásticas *in vitro* (35), determinamos si las FDC tenían la capacidad de contraer geles de colágeno bajo el efecto de TGF $\beta$  1 o PDGF, citocinas capaces de inducir la contractilidad en las células fibroblásticas (36,37). Encontramos que estas dos citocinas inducen la contractilidad en las FDC de forma dosis dependiente. Ninguna de estas dos citocinas, sin embargo, causan efecto sobre las células RAMOS, que usamos como control negativo (Fig. 6).



**Figura 6. Contractilidad de las FDC cultivadas en el medio para fibroblastos.** La capacidad de inducir contractilidad en las líneas FDC tratadas con TGF $\beta$ 1 y PDGF, fue determinada mediante ensayos de contracción de la matriz de gel de colágeno. Cada curva representa la actividad contráctil de las diferentes líneas de FDC (□, ●, ▲). Como control negativo para la contracción del gel se utilizaron células Ramos (○). La media de las medidas (n = 3 para cada muestra) para cada punto de concentración fue utilizada para calcular la contractilidad. El resultados se representan como el porcentaje de contracción del gel  $\pm$  SD de FDC tratadas con citocinas comparándolas con las células cultivadas en ausencia de citocinas.

### *Adherencia de una línea celular B sobre líneas de FDC.*

La unión de células B es una característica de la FDC (38) que fue mostrada por nuestras líneas FDC obtenidas en el laboratorio. Cuando las líneas de células B humanas Ramos fueron incubadas con las líneas FDC, estas células B se adhirieron fuertemente a las FDC. Las FDC unen en una proporción significativamente mayor de células Ramos que de células Meth-A (usadas como control de células adheridas). Por otro lado, las células JEG-3 (usadas como control de células adherentes) unen significativamente menos células Ramos que las FDC, y no encontramos diferencia alguna en cuanto a la unión de células Ramos o células Meth-A a las células JEG-3, (Fig. 7).



**Figura 7. Unión de células B a las FDC cultivadas en el medio para fibroblastos.** Unión de células B Ramos y control de células A Meth a FDC y el respectivo control de células JEG. Estos resultados representan el porcentaje de unión celular  $\pm$  SD ( $n = 4$  por cada muestra). La unión de células B Ramos a FDC fue significativamente mayor que el control de células JEG, mientras las FDC se unían en un porcentaje mayor a las células B Ramos que el control de células Meth A.

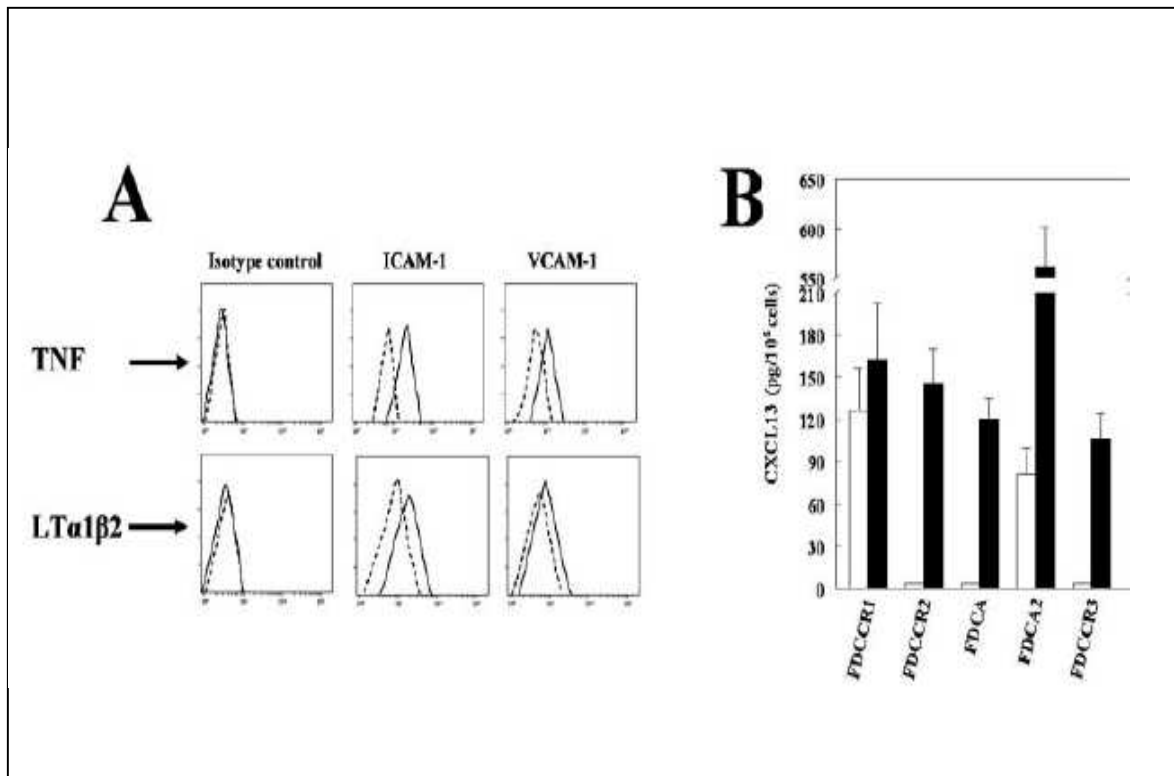


Figura 8. Efectos del TNF y LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 en las FDC cultivadas en medio para fibroblastos. **A**, Análisis de citometría de flujo de la expresión de ICAM y VCAM-1 en las FDC no tratadas en cultivo (---) y FDC tratadas en cultivo con 10 ng/ml de TNF o LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 durante 72 horas (—). **B**, Producción de CLCX13 en células no tratadas en cultivo (□) y en FDC tratadas con 10 ng/ml de LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 durante 72 h (■). Los resultados proceden de 5 líneas diferentes.

#### *Tratamiento de las líneas FDC con TNF y LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2*

Dado que TNF y LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 son citocinas responsables del desarrollo de la FDC y los centros germinales en el ratón (10), tratamos las FDC cultivadas con estas citocinas. Como se ha publicado previamente (39-41), el TNF y LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 incrementaron la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 (Fig. 8A) y la secreción de CXCL13 (Fig. 8B). Aunque el VCAM-1 parece ser un marcador de maduración de

FDC en el centro germinal (40), no observaron modificaciones significativas de otros antígenos que indiquen una maduración completa de FDC (Fig. 8). Esto sugiere que añadido a la acción del TNF y la  $LT\alpha_1\beta_2$ , otras interacciones son necesarias para la diferenciación de las FDC. Evidencias experimentales en ratones y humanos demostraron que las interacciones célula-célula con las células B pueden estar involucradas (42, 43).

## **DISCUSIÓN**

En estudios previos hemos aislados diferentes líneas DSC (células de la decidua, el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal) y las hemos mantenido en cultivo (18). Estas células mostraban un fenotipo de antígenos consistente y relacionado con las BMSCP (28), y como los miofibroblastos, expresaban  $\alpha$ -SM-actina y mostraban contractilidad *in vitro* (27, 44, 45). El hecho de que las DSC expresaran antígenos asociados con las FDC (18,27) nos llevó a establecer líneas FDC para compararlas con las DSC. Este estudio demuestra que las líneas de FDC obtenidas en medio para fibroblastos tienen un fenotipo antigénico muy similar a las líneas DSC, y a su vez relacionado con BMSCP y los miofibroblastos.

**Tabla IV:** Comparación de Marcadores de Fenotipo y Características Funcionales Expresados en las Líneas FDC con estos en otras

Phenotype Marker	BMSCP	Adipocytes	Osteoblasts	DSC	FDC
CD3	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+
CD13	+	+	+	+	+
CD14	-	-	-	-	+
CD15	-	-	-	-	-
CD21	ND <sup>a</sup>	ND	+ <sup>b</sup>	+	+
CD23	ND	ND	+	+	+
CD29	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+
CD35	ND	ND	ND	+	+
CD45	-	-	-	-	-
CD54	+	+	+	+	+
CD63	+	ND	ND	+	+
CD73	+	+	+/(-) <sup>c</sup>	+ <sup>b</sup>	+
CD90	+	+	+	+	+
CD106	+	+	+	+	+
DRC-1	ND	ND	+	+	+
$\alpha$ -SM actin	+	+	+	+	+
ALP	+	+	+	+	+
CAN.42	ND	ND	ND	+	+
HJ2	ND	ND	+	+	+
HLA-DR	+	-	+	+	+
Osteocalcin	-/(+) <sup>c</sup>	+	+	-/mRNA+ <sup>b</sup>	-/mRNA+
Osteoprotegerin	+	ND	+	+ <sup>b</sup>	+
Prolactin	ND	ND	ND	-/(+) <sup>c</sup> /mRNA+	-/mRNA-
STRO-1	+	-/+ <sup>d</sup>	+	+	+
Myofibroblast ultrastructure	+	+	ND	+	+
Cell contractility	ND	ND	ND	+	+
Hemopoietic cells- supportive activity	CFU-GM BFU-E CFU-Mix	Myeloid cells	Osteoclasts	Decidual NK cells	B cells
References	16, 17, 26, 31, 51, 54, 57, 58	30, 31, 51, 54, 59, 60, 61	29, 31, 51, 56, 62, 63, 64, 65, 66	18, 27, 28, 31, 33, 44	This study, 22, 31, 38, 52

<sup>a</sup>ND, Not done; <sup>b</sup>resultados no presentados; <sup>c</sup>En condiciones de diferenciación; <sup>d</sup> Negativo en referencia 30, positivo en referencia 40

El origen, linaje celular y diferenciación de las FDC no está del todo dilucidado, ya que las dificultades técnicas para aislar estas células han impedido su estudio. Sin embargo, nosotros demostramos que el medio para fibroblastos es una herramienta adecuada para el aislamiento de FDC, ya que las 18 líneas de FDC obtenidas mostraban un fenotipo estable (Fig. 2 y 4. Tabla III). Las FDC fueron capaces de unirse a células B (Fig. 7) y secretar CXCL13 (Fig. 8B) –funciones típicas de FDC (38, 41)-, y su fenotipo antigénico (CD21<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD35<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD40<sup>+</sup>, ICAM-1<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup> y BAFF<sup>+</sup>) era compatible con el presentado en previos estudios sobre FDC (20-23). La expresión en las líneas FDC de DRC-1, CNA.42 y HJ2, antígenos específicos de las FDC (12, 24, 25) confirman su identidad. Otros antígenos como  $\alpha$ -SM-actina, CD29, CD63 y HLA-DR se expresan en las FDC (20, 21, 46, 47). Además, células CD10<sup>+</sup> que co-expresaban CD23, CD34, CD35, BAFF y STRO-1, pero negativas para CD45 (fenotipo comparable con el de las FDC cultivadas), fueron encontradas en las preparaciones celulares frescas procedentes de amígdalas (Fig. 2D). En estudios anteriores la expresión de CD10 era, sin embargo, inconsistente (21,48), y el CD14, un antígeno expresado levemente o no aparecía en nuestras líneas (Tabla III), fue detectado claramente en otros estudios (21). Además, CD13 y CD34, expresados por las FDC en nuestros resultados (Fig. 2A y 4, Tabla IV), no fueron detectados en otros dos trabajos previos (11,49). Estas discrepancias pueden deberse al hecho de que la mayoría de los estudios fueron llevados a cabo en FDC frescas no proliferativas, probablemente células diferenciadas a término (aisladas en algunos trabajos con mAb anti-CD14; Ref. 9), mientras que en este estudio, nosotros seleccionábamos células FDC proliferativas,

posiblemente precursoras. Esta posibilidad está sustentada por la expresión en las FDC frescas y en las líneas FDC de STRO-1 (Fig. 2, Tabla III), un antígeno que identifica clones BMSCP (16,17). Aunque STRO-1 no ha sido estudiado con anterioridad, algunos autores han detectado BST-1, un antígeno encontrado en BMSCP, en líneas de FDC (15,16). La ausencia de CD45 y la presencia de otros antígenos en las líneas de FDC son el CD10, CD13, CD29, CD34, ICAM-1, CD63, CD73, CD90, VCAM-1, HLA-DR, ALP,  $\alpha$ -SM-actina, y HLA-DR, refuerza aun más la relación entre las FDC y la BMSCP (16, 17, 26) (Tabla IV). Sin embargo, el STRO-1 expresado en una pequeña proporción de células cultivadas, como los antígenos asociados a FDC (Fig. 2, Tabla III). La coexpresión de STRO-1 con CD21, CD23, CD35 o BAFF por algunas pero no todas las células (fig. 2B) confirma la relación entre BMSCP y FDC, y sugiere la presencia de células en diferentes estadios de diferenciación. La observación de poblaciones de FDC – células pequeñas que expresan más intensamente STRO-1 y CD34 que las más grandes (Fig. 2C) – parece confirmar esta posibilidad. En conexión, también se ha demostrado que STRO-1 y CD34 son antígenos de diferenciación modulados negativamente de manera progresiva a medida que las células se diferencian (17,30). Otros antígenos como CD14 y DRC-1, sin embargo, pueden ser modulados positivamente durante su maduración. Estos dos antígenos son expresados débilmente por algunas líneas FDC en este estudio (Tabla III) y en estudios previos (14, 15), pero fueron más intensamente expresadas por células maduras frescas (21). El hecho de que las líneas de DSC, las cuales tiene un fenotipo similar a las FDC y están también relacionadas con BMSCP, son realmente precursores de DSC (18,28), sugiere que las líneas DSC o FDC son estadios intermedios de



diferenciación entre BMSCP y las DSC y FDC maduras respectivamente. Cuando tratamos para inducir la diferenciación en líneas de FDC con TNF y  $LT\alpha_1\beta_2$  – citocinas involucradas en el desarrollo de las FDC de ratón (10), y en previas publicaciones (39, 40, 41) – nosotros detectamos un incremento de ICAM-1 y VCAM-1 (Fig. 8A) y la secreción de CXCL13 (Fig. 8B), pero no se detectó cambios significativos de otros antígenos expresados por las líneas FDC. Aunque VCAM-1 parece ser un marcador para diferenciación las FDC en el centro germinal (40), la diferenciación no parece ser completa en presencia de TNF y  $LT\alpha_1\beta_2$ , porque los posibles antígenos de maduración (DRC-1, CD14) altamente expresados en FDC frescas, no son positivamente modulados en nuestras líneas de FDC (resultados no mostrados). Los experimentos *in vivo* demostraron que la diferenciación de las FDC requiere la presencia de las células B (42, 43). Por tanto son necesarios experimentos adicionales para determinar si la diferenciación de las FDC puede ser alcanzada en presencia de las células B o a través de antígenos involucrados en la interacción de las células B–FDC.

Las células de la médula ósea STRO-1+ incluyen células formadoras de colonias fibroblásticas, que son similares, si no idénticas, a las células progenitoras mesenquimales (26, 50), como demuestra el hecho de que estas derivan en fibroblastos, adipocitos, osteoblastos, condrocitos y células estromales soporte de hematopoyéticas (51). Curiosamente, líneas de osteoclastos obtenidas en cultivo en condiciones similares a las usadas para las DSC o las FDC (29), y adipocitos diferenciados *in vitro* (30), muestran un fenotipo similar a BMSCP, FDC y DSC (Tabla IV). La expresión de CD10,

CD13, CD29, CD34, CD73, CD90, ICAM-1, VCAM-1, STRO-1,  $\alpha$ -SM-actina y ALP, y la ausencia de CD3, CD15, CD45; y la capacidad de actuar como soporte de células hematopoyéticas son puntos comunes en todos estos tipos de células (Tabla adicional IV). Las líneas FDC y DSC expresan marcadores osteogénicos tales como ALP (mRNA+/proteína+) y osteocalcina (mRNA+/proteína-; Fig. 4) (28). Es más, como las BMSCP y los osteoblastos, las líneas de FDC y DSC secretan osteoprogesterina (52) (Tabla IV). Aunque no podemos asegurar que las condiciones *in vitro* favorezcan la persistencia de los marcadores osteogénicos, el hecho de que la ruta osteogénica predomine en la diferenciación *in vitro* de los clones de las células progenitoras mesenquimales (53), sugiere un posible compromiso intrínseco en todas estas células. No obstante, FDC y DSC no secretaban osteocalcina *in vitro*, mientras que los osteoblastos sí lo hacían (29). Las células deciduales estromales secretan prolactina (18), la cual no fue detectada en las líneas de FDC (Fig. 4); estas últimas células expresaban CD14 (Fig. 2, Tabla III), el cual no se encontró en ninguno de los otros tipos de células enumeradas en la Tabla IV. Estas diferencias se deben probablemente a las distintas vías de diferenciación específicas para cada tipo de célula.

Aunque experimentos anteriores con quimeras de ratón llevan a conclusiones dispares (9), resultados más recientes han demostrado que las FDC derivan de la médula ósea (7). Esto, unido con la expresión de antígenos asociados a células hematopoyéticas por las FDC, lleva a algunos autores a sugerir que estas células pertenecen al linaje hematopoyético (7). No obstante, la relación entre las FDC y BMSCP reconcilia el origen en la médula ósea de

las FDC con sus características mesenquimales (no hematopoyéticas). La estrecha similitud entre las líneas DSC, FDC, osteoblásticas y adipocíticas con BMSCP (Tabla IV) sugiere que existe un precursor común que migra desde la médula ósea hasta el endometrio, órganos linfoides secundarios, hueso y tejido adiposo para diferenciarse en sus linajes respectivos. La presencia de células con un fenotipo antigénico y un potencial multi-linaje similares al de BMSCP localizados en los tejidos periféricos parece avalar esta hipótesis (54). Una corroboración más del origen no hematopoyético de estas células es la ausencia de la proteína WASP, una proteína adaptadora que es expresada solamente en células con origen hematopoyético (55).

Un debate exaltado en relación con las FDC es la expresión de antígenos MHC de clase II. Aunque algunas publicaciones han demostrado que las FDC expresan estos antígenos, otros han demostrado su ausencia en estas células (20,21). Denzer et al., (47) han observado que la expresión de antígenos MHC de clase II por las FDC es debida a la adquisición pasiva de exosomas, posiblemente procedentes de las células B. No obstante, nuestros resultados demuestran que las FDC expresan por si mismas HLA-DR, dado que el largo periodo de cultivo de estas células, en la ausencia de células B, hace que la adquisición pasiva sea poco probable. Así mismo, la presencia mRNA HLA-DR en las líneas FDC (Fig. 4), respalda la expresión de estos antígenos por estas células. Nuestros resultados, sin embargo, no son contradictorios a los obtenidos por Denzer et al. (47), ya que los antígenos MHC de clase II expresados por el precursor FDC pueden ser disminuidos al

diferenciarse las células. Las células foliculares dendríticas pueden entonces adquirirlos pasivamente de células B cercanas.

La  $\alpha$ -SM-actina ha sido considerada un marcador de miofibroblastos (31), células con capacidad contráctil implicadas en la retracción de las heridas (34). Aunque la presencia de  $\alpha$ -SM-actina en las FDC fue descrita con anterioridad (46), nuestros resultados confirman la expresión de la proteína y el mRNA en las líneas de FDC (Fig. 4). Nosotros demostramos que estas células, al igual que los miofibroblastos, expresan fibras de estrés que contienen  $\alpha$ -SM-actina (Fig. 5), y que las FDC son capaces de contraer matrices de gel de colágeno bajo el efecto de TGF $\beta$ 1 y PDGF (Fig. 6), citocinas descritas como inductoras de contractilidad en los miofibroblastos (36,37). El hecho de que la  $\alpha$ -SM-actina se detecte también en BMSCP, osteoblastos, adipocitos y DSC (16, 27, 30, 56), y que la actividad contráctil ha sido igualmente probada en las DSC (44,45) evidencia aun más el parentesco de estas células (Tabla IV). La función contráctil demostrada en las FDC puede favorecer la estimulación de las células B durante la respuesta secundaria (3). Las fuerzas de contracción pueden contribuir al incremento de superficie de membrana de las FDC y mantener la morfología dendrítica, facilitando la interacción entre las FDC y las células B. Como demostrábamos para las DSC (44, 45), las citocinas Th1 y Th2 probablemente modulan la contractilidad de las FDC, y por tanto su interacción con las células B.

Aunque este trabajo documenta la actividad contráctil de las FDC y su relación con BMSCP y otras células mesenquimales, la diferenciación *in vitro* de las líneas FDC está aún por aclararse para determinar los cambios del fenotipo antigénico y sus funciones durante su diferenciación.

## AGRADECIMIENTOS

Estamos agradecidos al Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario San Cecilio de Granada y el Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada por proporcionarnos las muestras de amígdalas. Agradecemos a A K. Shashok por optimizar el inglés utilizado en este manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

1. van Nierop, K., and C. de Groot. 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin. Immunol.* 14: 251–257.
2. Park, C. S., and Y. S. Choi. 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114: 2–10.
3. Lindhout, E., G. Koopman, S. T. Pals, and C. de Groot. 1997. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol. Today* 18: 573–577.

4. Grouard, G., and E. A. Clark. 1997. Role of dendritic and follicular dendritic in HIV infection and pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 563–567.
5. Bruce, M. E., K. L. Brown, N. A. Mabbott, C. F. Farquhar, and M. Jeffrey. 2000. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol. Today* 21: 442–446.
6. Kim, H. J., V. Krenn, G. Steinhauser, and C. Berek. 1999. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J. Immunol.* 162: 3053–3062.
7. Kapasi, Z. F., D. Qin, W. G. Kerr, M. H. Kosco-Vilbois, L. D. Schultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1998. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J. Immunol.* 160: 1078–1084.
8. Lindhout, E., and C. de Groot. 1995. Follicular dendritic cells and apoptosis: life and death in the germinal centre. *Histochem. J.* 27: 167–183.
9. Humphrey, J. H., D. Grennan, and V. Sundaram. 1984. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur. J. Immunol.* 14: 859–864.
10. Fu, Y. X., and D.D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 399–433.

11. Schhiever, F., A.S. Freedman, G. Freeman, E. Messner, G. Lee, J. Daley, and L.M. Nadler. 1989. Isolated follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J. Exp. Med.* 169: 2043–2058.
12. Butch, A. W., B. A. Hung, and M. H. Nahm. 1994. Properties of human follicular dendritic cells purified with HJ2, a new monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 155: 27–41.
13. Tsunoda, R., M. Nakayama, K. Onozaki, E. Heinen, N. Cormann, C. Kinet-Denoel, and M. Kojima. 1990. Isolation and long-term cultivation of human tonsil follicular dendritic cells. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 59: 95–105.
14. Clark, E. A., K. H. Grabstein, and G. L. Shu. 1992. Cultured human follicular dendritic cells: growth, characteristics and interactions with B lymphocytes. *J. Immunol.* 148: 3327–3335.
15. Kim, H. S., X. Zhang, and Y. S. Choi. 1994. Activation and proliferation of follicular dendritic-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 153: 2951–2961.
16. Simmons, P. J., and B. Torok-Storb. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55–62.

17. Simmons, P. J., and B. Torok Storb. 1991. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78: 2848–2853.
18. Montes, M. J., P. Aleman, C. G. Tortosa, C. Borja, C. Ruiz, and E. G. Olivares. 1996. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J. Reprod. Immunol.* 30: 53–66.
19. Kleinman, H., E. B. McGoodwin, S. I. Rennard, and G. R. Martin. 1979. Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal. Biochem.* 94: 308–312.
20. Tew, J. G., M. H. Kosco, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1990. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 117: 185–211.
21. Schriever, F., and L. M. Nadler. 1992. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv. Immunol.* 51: 243–284.
22. Airas, L., and S. Jalkanen. 1996. CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells. *Blood* 88: 1755–1764.
23. Hase, H., Y. Kanno, M. Kojima, K. Hasegawa, D. Sakurai, H. Kojima, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, N. Masawa, M. Azuma, K. Okumura, and T. Kobata. 2004. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood* 103: 2257–2265.



24. Naiem, M., J. Gerdes, Z. Abdulaziz, H. Stein, and D. Y. Mason. 1983. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J. Clin. Pathol.* 36:167–175.
25. Delsol, G., F. Meggetto, P. Brousset, E. Cohen-Knafo, T. al Saati, P. Rochaix, B. Gorguet, J. J. Voigt, and S. Chittal. 1993. Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am. J. Pathol.* 142: 1729–1738.
26. Gronthos, S., A. C. Zannettino, S. J. Hay, S. Shi, S. E. Graves, A. Kortessidis, and P. J. Simmons. 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116: 1827–1835.
27. Oliver, C., M. J. Montes, J. A. Galindo, C. Ruiz, and E. G Olivares. 1999. Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum. Reprod.* 14: 1599–1605.
28. García-Pacheco, J. M., C. Oliver, M. Kimatrai, M., F. J. Blanco, and E. G. Olivares. 2001. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol. Hum. Reprod.* 7:151–157.

29. Reyes-Botella, C., M. J. Montes, M. F. Vallecillo-Capilla, E. G. Olivares, and C. Ruiz. 2002. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 12: 359–364.
30. Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189: 54–63.
31. Foo, I. T., I. L. Naylor, M. J. Timmons, and L. K. Trejdosiewicz. 1992. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab. Invest.* 67: 727–733.
32. Tabanelli, S., B. Tang, and E. Gurside. 1992. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42: 337–344.
33. Olivares, E. G., M. J. Montes, C. Oliver, J. A. Galindo, and C. Ruiz. 1997. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol. Reprod.* 57: 609–615.
34. Gabbiani, G., G. B. Ryan, and G. Maine. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549–550.

35. Hinz, B., G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, and C. Chaponnier. 2001. alpha-Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2730–2741.
36. Clark, R. A., J. M. Folkvord, C. E. Hart, M. J. Murray, and J. M. McPherson. 1989. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J. Clin. Invest.* 84: 1036–1040.
37. Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 349–363.
38. Kosco, M. H., E. Pflugfelder, and D. Gray. 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol.* 148: 2331–2339.
39. Husson, H., S. M. Lugli, P. Ghia, A. Cardoso, A. Roth, K. Brohmi, E. G. Carideo, Y. S. Choi, J. Browning, and A. S. Freedman. 2000. Functional effects of TNF and lymphotoxin  $\alpha_1\alpha_2$  on FDC-like cells. *Cell. Immunol.* 203: 134–143.
40. Balogh, P., Y. Aydar, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 2002. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. *Anat. Rec.* 268: 160–168.

41. Huber, C., C. Thielen, H. Seeger, P. Schwarz, F. Montrasio, M. R. Wilson, E. Heinen, Y. X. Fu, G. Miele, and A. Aguzzi. 2005. Lymphotoxin- $\alpha$  receptor-dependent genes in lymph node and follicular dendritic cell transcriptomes. *J. Immunol.* 174: 5526–5536.
42. Kapasi, Z. F., G. F. Burton, L. D. Shultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1993. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice: influence of B and T cells. *J. Immunol.* 150: 2648–2658.
43. Edwards, J. C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350: 2572–2581.
44. Kimatrai, M., C. Oliver, A. C. Abadía-Molina, J. M. García-Pacheco, and E. G. Olivares. 2003. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88: 844–849.
45. Kimatrai, M., O. Blanco, R. Muñoz-Fernández, I. Tirado, F. Martín, A. C. Abadía-Molina, and E. G. Olivares. 2005. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 6126–6130.

46. Clark, E. A., K. H. Grabstein, A. M. Gown, M. Skelly, T. Kaisho, T. Hirano, and G. L. Shu. 1995. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J. Immunol.* 155: 545–555.
47. Denzer, K., M. Van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol.* 165: 1259–1265.
48. Gerdes, J., H. Stein, D. Y. Mason, and A. Ziegler. 1983. Human dendritic reticulum cells of lymphoid follicles: their antigenic profile and their identification as multinucleated giant cells. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 42: 161–172.
49. Petrasch, S., C. Perez Alvarez, J. Schmitz, M. Kosco, and G. Brittinger. 1990. Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from non-malignant and malignant lymphatic tissue. *Eur. J. Immunol.* 20: 1013–1018.
50. Claplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641–650.
51. Dennis, J. E., J. P. Carillet, A. I. Caplan, and P. Charbord. 2002. The STRO-1<sub>marrow</sub> cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170: 73–82.
52. Yun, T. J., P. M. Chaudhary, G. L. Shu, J. K. Frazer, M. K. Ewings, S. M. Schwartz, V. Pascual, L. E. Hood, and E. A. Clark. 1998. OPG/FDCR-1, a TNF

receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol.* 161: 6113–6121.

53. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell. Sci.* 113: 1161–1166.

54. De Ugarte, D. A., Z. Alfonso, P. A. Zuk, A. Elbarbary, M. Zhu, P. Ashjian, P. Benhaim, M. H. Hedrick, and J. K. Fraser. 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89: 267–270.

55. Martin, F., M. G. Toscano, M. Blundell, C. Frecha, G. K. Srivastava, M. Santamaria, A. J. Thrasher, and I. J. Molina. 2005. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther.* 12: 715–723.

56. Kinner, B., and M. Spector. 2002. Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone. *J. Orthop. Res.* 20: 622–632.

57. Ramalho, A. C., A. Jullienne, P. Couttet, A. M. Graulet, C. Morieux, M. C. de Vernejoul, and M. E. Cohen Solal. 2001. Effect of oestradiol on cytokine production in immortalized human marrow stromal cell lines. *Cytokine* 16: 126–130.

58. Stewart, K., P. Monk, S. Walsh, C. M. Jefferiss, J. Letchford, and J. N. Beresford. 2003. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* 313: 281–290.
59. Gimble, J. M., K. Youkhana, H. Hua, K. Medina, M. Sullivan, J. Greenberger, and C. S. Wang. 1992. Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J. Cell. Biochem.* 50: 73–82.
60. Dorheim, M. A., M. Sullivan, V. Dandapani, X. Wu, J. Hudson, P. R. Segarini, D. M. Rosen, A. L. Aulthouse, and J. M. Gimble. 1993. Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 154: 317–328.
61. Benayahu, D., A. Shamay, and S. Wientroub. 1997. Osteocalcin (BGP), gene expression, and protein production by marrow stromal adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 442–446.
62. Gohel, A. R., A. R. Hand, and G. A. Gronowicz. 1995. Immunogold localization of  $\alpha_1$ -integrin in bone: effect of glucocorticoids and insulin-like growth factor I on integrins and osteocyte formation. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 1085–1096.

63. Chen, X. D., H. Y. Oian, L. Neff, K. Satomura, and M. C. Horowitz. 1999. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J. Bone Miner. Res.* 14: 362–375.
64. Stewart, K., S. Walsh, J. Screen, C. M. Jefferiss, J. Chainey, G. R. Jordan, and J. N. Beresford. 1999. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1345–1356.
65. Hofbauer, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, W. J. Boyle, and B. L. Riggs. 2000. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15: 2–12.
66. Bruder, S. P., M. C. Horowitz, J. D. Mosca, and S. E. Haynesworth. 1997. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21: 225–235. Vol. 177, No. 13



**Contractilidad de las células foliculares  
dendríticas. Efecto de las citocinas**

# **Contractilidad de las células foliculares dendríticas. Efecto de las citocinas**

Raquel Muñoz Fernández, Ana Clara Abadía Molina y Enrique García Olivares

---

## **INTRODUCCIÓN**

Las células foliculares dendríticas (follicular dendritic cells, FDC) se localizan en los folículos linfoides primarios y en los centros germinales de los tejidos linfoides. Almacenan durante largos periodos de tiempo, antígenos con estructura nativa en su superficie celular, y proporcionan una fuente continua de estimulación para las células B específicas (Gray, 1991), contribuyendo a la diferenciación y mantenimiento las células B memoria. Aunque se ha dudado entre la pertenencia de las FDC a un linaje hematopoyético o mesenquimal, la peculiaridad de estas células de presentar una morfología fibroblástica “in vitro”, junto a la expresión de antígenos asociados con los fibroblastos y con otras células mesenquimales, y la relación de las FDC con las células madre mesenquimales (MSC), ha confirmado la adscripción de estas células con el linaje mesenquimal (Muñoz-Fernandez et al., 2006).

Las FDC expresan  $\alpha$  actina de músculo liso ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SM actin), marcador típico de miofibroblastos, fibroblastos especializados en la contracción de tejidos (Martin, 1997) y retracciones de tejido blando típico de enfermedades fibroconectivas (Grinnell, 1994; Serini and Gabbiani, 1999). Recientemente nuestro grupo ha demostrado en las FDC la formación de fibras de estrés que contenían  $\alpha$ -SM actina, confiriéndole capacidad de contraer matrices de colágeno bajo el efecto de TGF $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) y PDGF (platelet-derived growth factor, factor de crecimiento derivado de

plaquetas) (Muñoz et al., 2006), citocinas que también indujeron contractilidad de los miofibroblastos (Clark, 1989; Tomasek et al., 2002).

Estudios realizados en células deciduales estromales (decidual stromal cells, DSC) por nuestro grupo han evidenciado una relación entre DSC y FDC. Las DSC, son miofibroblastos que derivan de las MSC presentes en la médula ósea (García-Pacheco et al., 2001). Se localizan en la decidua, tejido transitorio que procede del endometrio gestante inmediatamente después de la implantación (origen materno) y en íntimo contacto con el trofoblasto (origen fetal), formando la interfase materno-fetal (placenta) (Bulmer, 1995). Las FDC y DSC muestran una morfología similar si no idéntica "in vitro" y presentan un fenotipo antigénico similar. Antígenos característicos de las FDC son expresados por las DSC: CD21, CD23, CD35, HJ2, DRC-1 (Naiem et al., 1983; Tew et al., 1990; Schriever et al., 1992; Butch et al., 1994; Montes et al., 1996; Oliver et al., 1999). Además, ambos tipos celulares expresan la  $\alpha$ -SM actina (Oliver et al., 1999, Muñoz-Fernandez et al., 2006). Ensayos previos de contractilidad en DSC por nuestro grupo, mostraron su capacidad de contraer matrices de colágeno bajo el efecto de citocinas Th1 y Th2 (Kimatrai et al. 2003 y 2005), lo que ha motivado el estudio de esas citoquinas sobre las FDC en el presente trabajo.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### *Muestras*

Las muestras de amígdala fueron obtenidas de pacientes con amigdalitis del Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, España). Los pacientes (de 3 a

10 años de edad) estaban en remisión completa antes de la intervención. Los padres o tutores de los pacientes fueron convenientemente informados concediendo el correspondiente permiso para la utilización de las muestras. Este estudio ha sido aprobado por el comité ético de investigación del Hospital Universitario de San Cecilio.

### *Citocinas*

IL-2, IL-10, INF $\gamma$ , LT $\alpha_1\beta_2$  y TNF $\alpha$ , procedentes de Sigma (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)

### *Aislamiento y cultivo de las líneas de FDC*

Para establecer las líneas de FDC, seguimos el método descrito por Kim et al., (Kim et al, 1994) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras de amígdala humanas frescas obtenidas de extracciones rutinarias fueron minuciosamente lavadas con PBS y cortadas en pequeños trozos y desmenuzadas con bisturí en un volumen pequeño de medio RPMI 1640 con 100 U/ml de penicilina y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La suspensión se puso en una solución de tripsina al 0.25% y 0.5 mM EDTA (Sigma) durante 15 minutos a 37°C, y la reacción se detuvo añadiendo RPMI 1640 frío y con 20% de FCS. La suspensión se filtró a través de una gasa estéril y se centrifugó a 425 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el *pellet* fue resuspendido en RPMI y centrifugado sobre Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), durante 20 minutos a 600 x g. Las células fueron recogidas de la interfase, suspendidas en PBS, y lavadas. La suspensión se incubó con RPMI 1640 al 20% de FCS durante 1 h a 37°C para permitir que macrófagos y

granulocitos se adhirieran al frasco de cultivo. Las células del sobrenadante se recogieron, se lavaron y se incubaron en medio para fibroblastos suplementado con 100UI/ml de penicilina y 50mg/ml de gentamicina. Tras toda la noche de incubación, que permitió que las células adherentes se adhieran al frasco de cultivo, se desecharon los linfocitos del sobrenadante. El medio para fibroblastos se cambiaba dos veces a la semana. Tras 2-4 semanas, las células adheridas eran morfológicamente uniformes y cubrían por completo la superficie de 25 cm<sup>2</sup> del frasco de cultivo. La viabilidad celular se determinó por exclusión de células muertas con el azul tripan antes de hacer los experimentos. Solo se utilizaron las preparaciones con una viabilidad > 95%.

#### *Microscopía de inmunofluorescencia*

Se cultivaron FDC en placas adecuadas con medio para fibroblastos. Tras 24 h se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a 4°C, y se permeabilizaron con acetona fría durante 10 minutos antes de añadir el anticuerpo monoclonal marcado con fluoresceína anti- $\alpha$ -SM-actina (Sigma). Las preparaciones fueron observadas con un microscopio confocal Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### *Ensayo de contractilidad en gel*

El ensayo de contractilidad celular se realizó según lo previamente descrito (Kleinman et al., 1979). Una solución estéril y purificada de colágeno bovino solubilizado en pepsina (Vitrogen, Cohesion Technologies, Inc., Palo Alto, CA) se preparó de acuerdo a las instrucciones suplementadas con el producto comercial y fue mezclada con  $25 \times 10^4$  FDC. La mezcla de

colágeno/células (100µl/pocillo) se depositó en una placa de seis pocillos y se dejó polimerizar por espacio de 30 minutos en estufa sin CO<sub>2</sub> a 37°C. Inmediatamente después de la polimerización se añadió 2 ml de medio para fibroblastos (con o sin citocinas) en cada pocillo. Después de 24 h de incubación la altura (l) y el diámetro (d) de cada burbuja de colágeno se determinó haciendo uso del tornillo micrométrico del microscopio, y el volumen (V) se determinó aplicando los datos obtenidos a la siguiente fórmula:

$$V = 1/24 \times \pi \times l \times (3 \times d^2 + l^2)$$

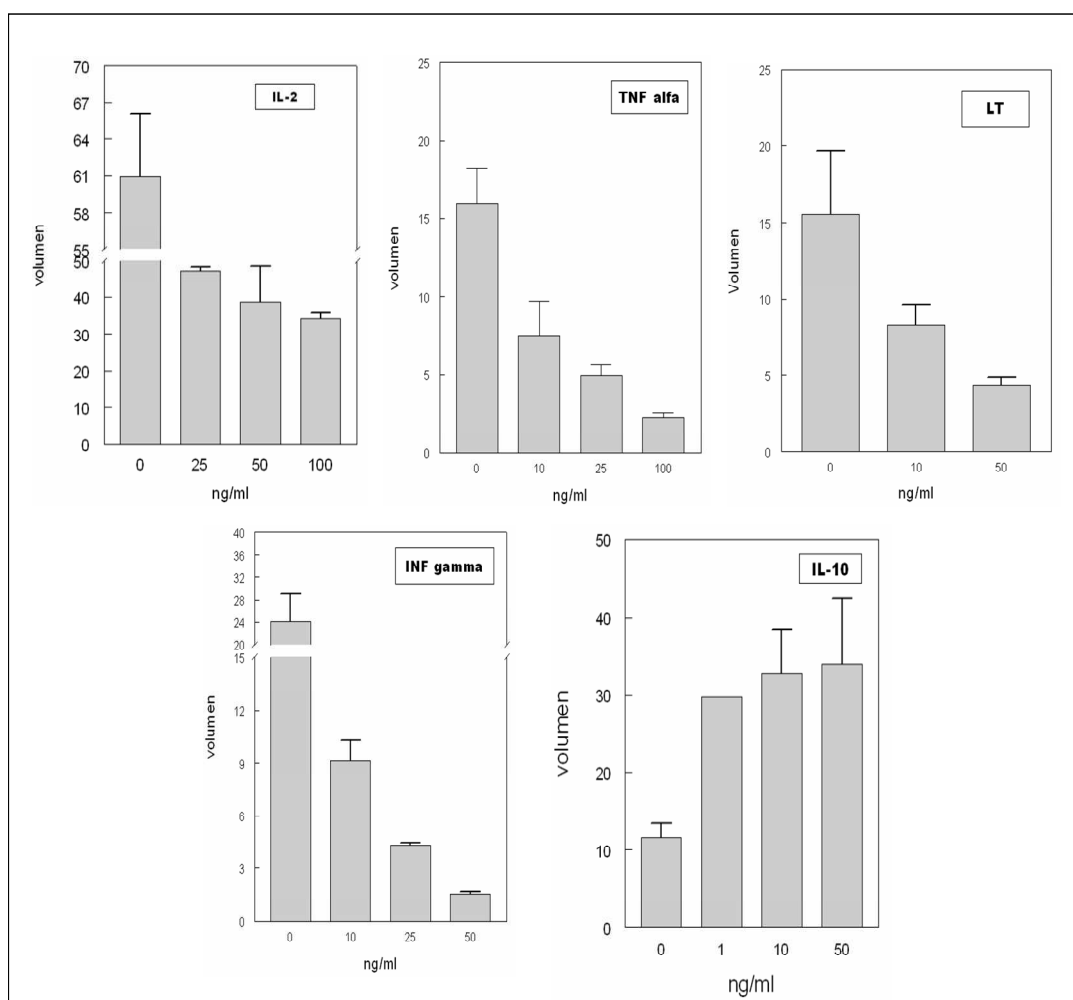
La media de las medidas tomadas (n=3 para cada muestra) en cada tipo de concentración se usaron para determinar el volumen. Los datos se presentan como volumen de gel de FDC tratadas con citocinas, comparado con el volumen de las células cultivadas sin tratar.

## **RESULTADOS**

### *Efecto de las citocinas sobre la contractilidad de líneas FDC*

Los estudios previos de contractilidad realizados en FDC cultivadas, pusieron de manifiesto que estas células tienen la capacidad de contraer geles de colágeno bajo el efecto de TGFβ1 o PDGF, citocinas con capacidad de inducir contractilidad en células fibroblásticas, y de incrementar la presencia de α-SM actina en las fibras de estrés en células tratadas (Muñoz et al., 2006) En el presente trabajo hemos estudiado si, las citocinas IL-2, IL-10, INFγ, LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub> y TNFα, eran capaces de producir contracción o no, de la matriz de colágeno. La interleuquina 2, INFγ, LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub> y TNFα (citocinas Th1), indujeron contracción de

la matriz de colágeno por parte de las células cultivadas de una forma dosis dependiente. En cambio la IL-10 (citocina Th2), no sólo no se inducía contracción, si no incluso, se observa un incremento del volumen de las matrices de colágeno, también de forma dosis dependiente (Fig. 1, Tabla). Este mismo resultado ha sido también observado por nuestro grupo en las DSC (Kimatrai et al., 2005).



**Figura 1. Experimentos de contractilidad.** La capacidad de inducir contractilidad en las líneas FDC tratadas con IL-2, TNF- $\alpha$ , LT $\alpha_1\beta_2$ , INF $\gamma$  e IL-10, fue determinada mediante ensayos de contracción de la matriz de gel de colágeno. Cada barra representa el volumen de la matriz de colágeno expresada en unidades convencionales. Los resultados se representan como el volumen absoluto del gel  $\pm$  SD de FDC tratadas con distintas concentraciones de citocinas. En la tabla se representan los valores de P en las distintas concentraciones de citocina, comparando con el control.

Tabla . Efecto de distintas citocinas sobre el volumen de matrices de colágeno con líneas de FDC.

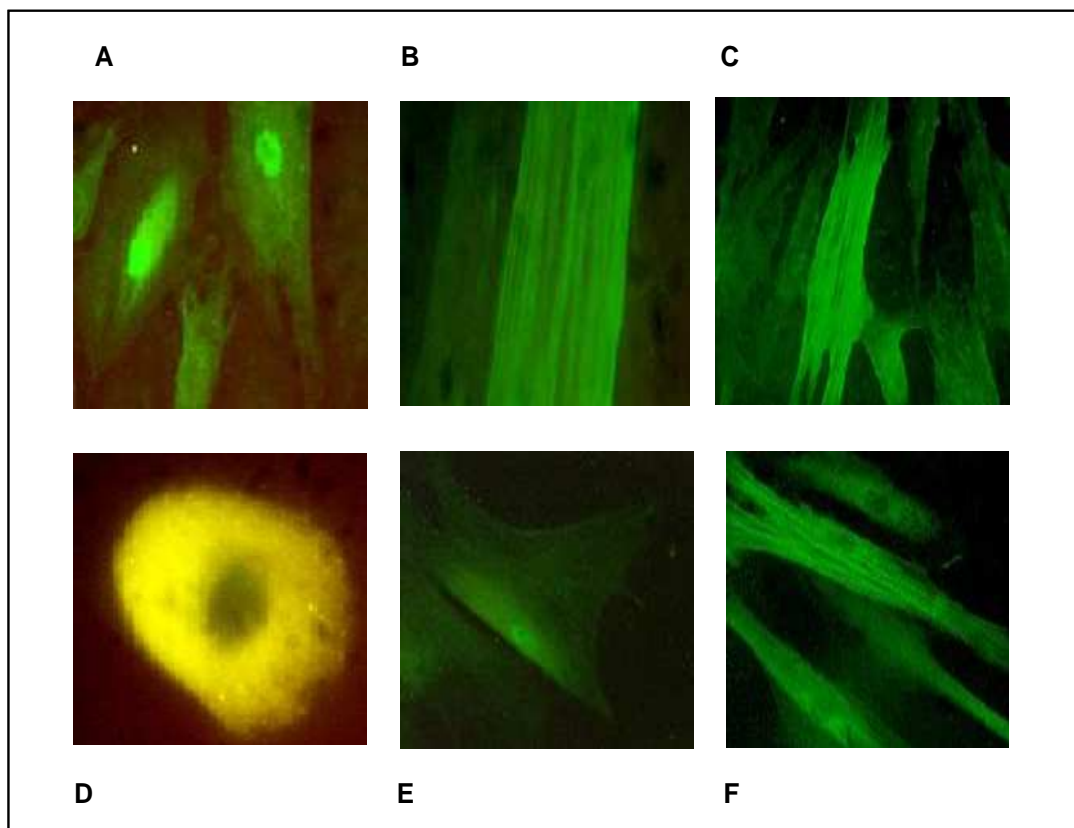
Citocina	ng/ml	Volumen	Valor de P
IL-2	0	60.963 ± 5.062	-
	25	47.116 ± 1.281	0.007681
	50	38.646 ± 9.853	0.035386
	100	34.314 ± 1.36	0.0011169
TNF	0	15.971 ± 2.317	-
	10	7.494 ± 2.244	0.0835
	25	4.936 ± 0.7488	0.00695
	100	2.253 ± 0.287	0.01085
LT	0	15.56 ± 4.12	-
	10	8.2735 ± 1.392	0.016948
	50	4.36 ± 0.5	0.01668
INF	0	24.188 ± 4.988	-
	10	9.138 ± 1.146	0.012
	25	4.295 ± 0.158	0.00441
	50	1.546 ± 0.113	s
IL-10	0	11.6545 ± 1.769	-
	1	29.782 ± 0	0.000254
	10	32.8185 ± 5.676	0.00756
	50	34.001 ± 8.438	0.02083

*Formación de fibras de estrés en FDC cultivadas con citocinas*

Estudios previos realizados por nuestro grupo mostraron que, las FDC bajo la acción de PDGF o TGFβ1 aumenta la presencia de α-SM-actina en las fibras de estrés (Muñoz-Fernández et al., 2006). Una vez estudiada la contractilidad, pasamos a determinar que efecto tenían las citocinas IL-2, IL-10,



TNF $\alpha$ , LT $\alpha_1\beta_2$  e INF $\gamma$  en la incorporación de  $\alpha$ -SM-actina a las fibras de estrés. Los estudios de microscopía por inmunofluorescencia, usando un anticuerpo monoclonal fluoresceinado contra la  $\alpha$ -SM-actina, mostraron un patrón difuso de tinción en el citoplasma de las FDC no tratadas que revelaba la presencia de  $\alpha$ -SM actina no polimerizada (Fig. 2A). La IL-2, TNF $\alpha$ , LT $\alpha_1\beta_2$  e INF $\gamma$  aumentó la presencia de  $\alpha$ -SM-actina en las fibras de estrés (Fig. 2B, 2C, 2E y 2F), mientras que la IL-10, no modificó el patrón observado en las FDC sin tratar (2D).



**Figura 2. Expresión de  $\alpha$ -SM actina en Líneas de FDC cultivadas.** Detección de  $\alpha$ -SM actina mediante Inmunofluorescencia en el citoplasma de las FDC cultivadas. Experimento representativo de una de las líneas de FDC estudiadas. La  $\alpha$ -SM actina fue detectada mediante un mAb marcado con fluoresceína. En las FDC no tratadas, aparece un patrón de marcaje difuso, en el que casi no se observan fibras de estrés (A), de forma similar ocurre en las tratadas con IL-10 (D). En el caso de IL-2 (B), TNF $\alpha$  (C), LT $\alpha_1\beta_2$  (E) e INF $\gamma$  (F) aumentó el número de células que presentaban fibras de estrés con  $\alpha$ -SM-actina.

## DISCUSIÓN

Estudios previos realizados por nuestro grupo en DSC determinaron que estas células expresan  $\alpha$ -SM actina y que tienen capacidad de contraerse, demostrando que las DSC son una forma particular de miofibroblastos (Oliver et al., 1999; Kimatrai et al., 2003 y 2005). Debido a la relación existente entre las DSC y las FDC, nos llevó a determinar la expresión de  $\alpha$ -SM actina en las FDC, así como su capacidad de contraerse y formar las fibras de estrés bajo el efecto TGF y PDGF (Muñoz- Fernández et al., 2006). En el presente trabajo, hemos estudiado el efecto sobre la contractilidad y formación de fibras de estrés en FDC de citocinas previamente utilizadas en las DSC, IL-2 e IL-10, y de citocinas que tienen un papel en el desarrollo y diferenciación de las FDC, TNF $\alpha$  y LT $\alpha_1\beta_2$  (Husson et al, 2000). Las citocinas IL-2, INF $\gamma$ , TNF $\alpha$  y LT $\alpha_1\beta_2$ , produjeron un incremento de la contractilidad (Figura 1, Tabla) y de la incorporación de la  $\alpha$ -SM actina a las fibras de estrés. En las FDC tratadas con IL-10, se produjo un descenso de la contractilidad celular (Figura 1, Tabla), y no se alteró el patrón de marcaje difuso de la  $\alpha$ -SM actina observado en las FDC control (Figura 2). Tanto en el caso de la IL-2 como la IL-10, los resultados de los efectos sobre la contractilidad y la incorporación de las fibras de estrés fueron idénticos a los obtenidos con las DSC (Kimatrai et al, 2003 y 2005).

La capacidad de contracción/relajación de las FDC, puede favorecer la interacción de las FDC con las células B, y por tanto, llevar a cabo su función de rescate de apoptosis. Es difícil adelantar una hipótesis que relacione la contractilidad y la funcionalidad de las FDC, pero esta actividad podría afectar a la morfología de la membrana y a su morfología dendrítica, que está en íntima

relación con la interacción FDC-Célula B. Aunque la interacción célula-célula está establecida por moléculas de membrana, es probable que el acercamiento entre una proteína y su ligando esté determinada por la morfología celular, y ésta a su vez, por el grado de contractilidad celular.

Por otra parte, citocinas como el TNF $\alpha$  y la LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 aumentan la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 e incrementan la secreción de CXCL13 (Muñoz- Fernández et al., 2006), participando probablemente en la diferenciación de las FDC (Fu et al., 1999) y en su capacidad de atraer células B al folículo linfóide. Es probable que la actividad contráctil sea también un fenómeno relevante en la diferenciación de estas células. Otras células del linaje mesenquimal, aparte de las ya comentadas DSC, como el propio MSC, adipocitos y osteoblastos también expresan  $\alpha$ -SM actina, y probablemente tienen contractilidad, por lo que esta función parece ser relevante en el linaje mesenquimal.

## **Bibliografía**

Bulmer JN, Rodeck C and Adinolfi M. Immunohistochemical characterization of cells retrieved by transcervical sampling in early pregnancy. *Prenat Diagn.* 1995; 15: 1143-53.

Butch AW, Hug BA, Nahm MH. Properties of human follicular dendritic cells purified with HJ2, a new monoclonal antibody. *Cell Immunol.* 1994; 155: 27-41.

Clark, R. A., J. M. Folkvord, C. E. Hart, M. J. Murray, and J. M. McPherson. 1989. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J. Clin. Invest.* 84: 1036–1040.

Fu, Y. X., and D.D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 399–433.

García-Pacheco JM, Oliver C, Kimatrai M, Blanco F.J and Olivares E.G. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related to bone marrow stromal precursors. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7:1151-7.

Gray D, Kosco M and Stockinger B. Novel pathways of antigen presentation for the maintenance of memory. *I. Immunol.* 1991. 3; 141-148.

Grinnell, F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J. Cell Biol.* 1994; 124, 401–404.

Husson H, Lugli SM, Ghia P, Cardoso A, Roth A, Brohmi K, Carideo EG, Choi YS, Browning J and Freedman AS. Functional effects of TNF and lymphotoxin alpha1beta2 on FDC-like cells. *Cell Immunol.* 2000; 203: 134-143.

Kim, H. S., X. Zhang, and Y. S. Choi. Activation and proliferation of follicular dendritic-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 1994.153: 2951–2961.

Kimatrai, M., C. Oliver, A. C. Abadía-Molina, J. M. García-Pacheco, and E. G. Olivares. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2003. 88: 844–849.

Kimatrai, M., O. Blanco, R. Muñoz-Fernandez, I. Tirado, F. Martin, A. C. Abadia-Molina, and E. G. Olivares. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005. 90: 6126–6130.

Kleinman, H., E. B. McGoodwin, S. I. Rennard, and G. R. Martin. Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal. Biochem.* 1979. 94: 308–312.

Martin P. Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997. 276: 75-81.

Muñoz-Fernández, R., F.J. Blanco, C. Frecha, F. Martín, M. Kimatrai, A.C. Abadía-Molina, J.M. García-Pacheco and E.G. Olivares EG. Follicular dendritic cells are related with bone marrow stromal cell progenitors and with myofibroblasts. *J. Immunol.* 2006, 177: 280–289.

Naiem M, Gerdes J, Abdulaziz Z, Stein H, Mason DY. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J Clin Pathol.* 1983; 36: 167-75.

Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruíz C and Olivares EG. Human decidual stromal cells Express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod.* 1999; 14: 1599-605.

Serini, G., and Gabbiani, G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 1999. 250: 273–283.

Schriever F. and Nadler M. L. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv immunol.* 1992; 51. 243-282.

Tew JG, Kosco MH, Burton GF and Szakal AK. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 1990; 117:185–211.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chapponier C, Brown R. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. 3:349–363

## **DISCUSIÓN GENERAL**

## **DISCUSIÓN GENERAL: QUE SON, PARA QUE SIRVEN, DE DONDE VIENEN Y ADONDE VAN LAS CÉLULAS FOLICULARES DENTRÍICAS**

### **¿Qué son?**

Hasta la publicación de los resultados de la presente tesis, las FDC eran consideradas células de morfología dendrítica, localizadas en los folículos linfoides, con capacidad de rescatar a las células B de la apoptosis y un fenotipo antigénico caracterizado por la ausencia de CD45 y la expresión, entre otros antígenos, de CD21 (CR2), CD23 (FcεRII), CD35 (CR1) y de antígenos característicos de FDC como CNA.42, HJ2 y DRC-1.

La razón por la que el origen y linaje celular de las FDC no estaba aclarado se debía principalmente a la dificultad que existe en poder aislar estas células (sólo representan aproximadamente el 1% de la población del tejido linfoide) (Schnizlein et al., 1985); hecho que contribuye a que existan ciertas discrepancias sobre su origen y linaje, pues mientras unos autores apuestan por un origen hematopoyético, en base a sus funciones inmunológicas y la expresión de antígenos hematopoyéticos (Kapasi et al, 1998), otros se decantan por un origen mesenquimal, avalado por su morfología fusiforme in vitro, la falta de CD45 y la expresión de antígenos fibroblásticos (Lindhout and Groot, 1995).

### **Líneas FDC**

Nuestro grupo llega a las FDC a través de las DSC (Montes et al., 1996). Según comentamos anteriormente, habíamos observado que las DSC

expresaban antígenos asociados a células hematopoyéticas y algunos de ellos como CD21, CD23 y CD35, también asociados a las FDC. La relación entre DSC y FDC se estrecha si consideramos que las DSC expresan además antígenos específicos de FDC (DRC-1, CNA.42, HJ2), y carecen como las FDC de CD45 (Montes et al., 1996). Estas coincidencias nos determinaron a hacer un estudio de FDC procedentes de amígdalas humanas aplicando la misma metodología empleada con las DSC (Muñoz-Fernández et al., 2006). De forma semejante a las DSC, hemos conseguido distintas líneas FDC, lo que ha constituido una de las contribuciones más importantes de esta tesis, y supone un avance que facilitará futuros estudios, habiéndonos permitido en el presente trabajo, realizar una caracterización fenotípica y funcional de estas células.

### **¿Cómo sabemos que nuestras líneas son FDC?**

Aparte de haber seguido un protocolo equivalente a los propuestos por otros autores que han producido líneas FDC de amígdala, nuestras líneas comparten algunas de las características más definitorias de las FDC: 1) tienen capacidad de unir células B (Figura 7; Muñoz-Fernández et al., 2006) no expresan CD45, pero sí expresan CD21, CD23 y CD35, junto con antígenos característicos de FDC como son DRC-1, CNA.42, HJ2 (Tabla III, Muñoz-Fernández et al., 2006) y 3) secretan CXCL13 (Figura 8B, Muñoz-Fernández et al., 2006).

A pesar de estos datos coincidentes, nuestras líneas presentan una serie de antígenos como CD13 y CD34 que no fueron detectados en FDC en estudios previos de otros autores (Schhiever et al., 1989; Petrasch et al., 1990). Estas discrepancias pueden ser debidas al hecho de que la mayor parte de los estudios previos han sido realizados con células frescas y probablemente



totalmente diferenciadas, mientras que la metodología empleada por nosotros, al ser seleccionadas las células en cultivo, solo sobreviven aquellas con mayor capacidad de proliferación, y, probablemente, más inmaduras. Por otra parte, nuestras líneas FDC, al ser células normales, son policlonales y contienen células en distintas etapas de diferenciación, con pequeñas diferencias fenotípicas y distinto tamaño (Figura 2B, Muñoz-Fernández et al., 2006).

### **¿De donde vienen las FDC?**

Según hemos comentado más arriba, el origen y linaje de las FDC es desconocido, discutiéndose si se trata de una célula hematopoyética o mesenquimal. La detección de STRO-1, un antígeno expresado por el precursor estromal de médula ósea, relacionado con las MSC (mesenchymal stem cell) (Simmons et al., 1991a; Simmons et al., 1991b), fundamenta la posibilidad de que las FDC provengan de las MSC. Además es muy probable que nuestras células se encuentren en etapas de diferenciación cercanas a estas MSC, ya que el STRO-1 es un antígeno de diferenciación que desaparece conforme este proceso de maduración avanza (Simmons et al., 1991; Gronthos et al., 2001). En correspondencia con nuestros resultados, otros autores también han detectado en líneas FDC, otros antígenos característicos de MSC como el BST-1 (Kim et al., 1994; Clark et al., 1995).

Otro antígeno expresado por MSC es el CD34 (Simmons et al., 1991) aunque hay autores que lo consideran equivocadamente un marcador exclusivo de células madre hematopoyéticas. Este antígeno también ha sido detectado en nuestras líneas FDC y se expresa junto con el STRO-1 más intensamente en la subpoblación de células pequeñas, mientras que la

subpoblación de células más grandes expresan CD34 y STRO-1 con menor intensidad (Figura 2C, Muñoz-Fernández et al., 2006). El hecho que ambos antígenos disminuyan su expresión en células del linaje mesenquimal, conforme estas se diferencian (Simmons et al., 1991b, Gronthos et al., 2001), sugiere que las células pequeñas corresponden a etapa más indiferenciadas y cercanas al MSC, mientras que las células grandes podrían ser células más diferenciadas.

### **¿A dónde van las FDC?**

Frente a STRO-1 y CD34, que podrían considerarse marcadores de inmadurez, CD14 y DRC-1, podrían ser marcadores de madurez, ya que estos últimos antígenos se expresan poco o nada por las líneas FDC, y muy intensamente por FDC maduras (Schriever et al., 1992). Sin embargo, no conseguimos aumentar la expresión de CD14 y DRC-1 cuando tratamos nuestras células con TNF y  $LT\alpha 1\beta 2$ , citoquinas implicadas en la diferenciación de FDC murinas (Fu et al., 1999). No obstante, estas líneas FDC tratadas con citocinas incrementaron la expresión VCAM-1 (considerado un antígeno de diferenciación de FDC (Balogh et al., 2002), y la de ICAM-1, y aumentaron la secreción de CXCL13 (Figura 8, Muñoz-Fernández et al., 2006). Es probable que para completar la diferenciación de FDC, junto a la actuación de TNF y  $LT\alpha 1\beta 2$ , sea necesaria la interacción con células B (Kapasi et al., 1993; Edwards et al., 2004) o la activación de moléculas implicadas en esta interacción.

### **¿Actúan las FDC como APC?**

Si las FDC expresan MHC de clase II o no, ha sido un asunto ampliamente debatido, pues diversos autores han aportado resultados contradictorios. Uno de los trabajos más fundamentados (Denzer et al., 2000) demostraba que la expresión de MHC de clase II se debía a la adquisición pasiva de exosomas probablemente provenientes de células B vecinas. Sin embargo, nuestras líneas han expresado HLA-DR, a pesar de haber sido cultivadas en ausencia de células B durante semanas. Y sobre todo, hemos demostrado la presencia de mRNA HLA-DR (Figura 4; Muñoz- Fernández, 2006). No obstante, nuestros resultados no contradicen los de Denzer et al., (Denzer et al., 2000), ya que los MHC de clase II podrían ser expresados por las FDC en etapas iniciales de diferenciación y perderse conforme estas maduran, pudiendo entonces, en contacto con las células B, adquirir los exosomas.

No conocemos que funcionalidad podrían tener los MHC-II en las FDC, aunque una posibilidad podría ser que una parte de los antígenos que normalmente almacenan formando inmunocomplejos en la membrana celular, pudieran ser fagocitados y presentados asociados a MHC-II para ser presentados a células Th.

### **Las FDC como miofibroblastos**

Los miofibroblastos son células mesenquimales que expresan  $\alpha$ -SM-actina y tienen actividad contráctil. Hemos demostrado claramente que nuestras FDC cumplen ambas propiedades (Figura 5, Muñoz-Fernández et al., 2006). En un grupo inicial de experimentos, demostramos que las FDC se contraían con PDGF y TGF $\beta$ 1 (Figura 6, Muñoz-Fernández et al., 2006), citocinas que habían

demostrado su actividad inductora de la contractilidad celular en los miofibroblastos (Clark et al., 1989; Tomasek et al., 2002). En un grupo posterior de experimentos, hemos observado que citocinas Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ , TNF y LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2) aumentan la contractilidad celular de las FDC, mientras que la IL-10, una citocina Th2, inhibe la contractilidad. La contractilidad/relajación de las FDC parece estar relacionada con la mayor o menor incorporación de  $\alpha$ -SM-actina a las fibras de estrés (Figuras 1 y 2, Muñoz-Fernández et al., 2007). De forma paralela, hemos encontrado equivalentes resultados en DSC (Kimatrai et al., 2003; Kimatrai et al., 2005)

Es difícil adelantar una hipótesis que relacione la contractilidad y la funcionalidad de las FDC, pero esta actividad podría afectar a la morfología de la membrana y a su morfología dendrítica, que está en íntima relación con la interacción FDC-Célula B. Aunque la interacción célula-célula está establecida por moléculas de membrana, es probable que el acercamiento entre una proteína y su ligando esté determinada por la morfología celular, y ésta a su vez, por el grado de contractilidad celular.

### **Las FDC y otras células mesenquimales**

Comparando nuestros resultados de las FDC con los de otras líneas mesenquimales: MSC, DSC, osteoblastos, adipocitos (Tabla IV, Muñoz-Fernández et al., 2006), hemos encontrado que estas células comparten numerosas características fenotípicas y funcionales. No expresan CD45, pero sí los siguientes antígenos y proteínas; CD10, CD13, CD21, CD29, CD34, CD54, CD73, CD90, CD106, DRC-1,  $\alpha$ -SM-actina, fosfatasa alcalina, HJ2, osteocalcina, osteoprotegerina, STRO-1. Presentan una ultraestructura

semejante a la del miofibroblasto y tienen una actividad estromal facilitadora de la diferenciación de células hematopoyéticas. Es conocida esta función en el caso de las células estromales de médula ósea, mientras que las DSC favorecen la diferenciación de las células NK deciduales y las FDC, la diferenciación de las células B.

Todas estas propiedades en común sugieren que estas células pertenecen a linajes mesenquimales íntimamente relacionadas entre sí. Es probable que todas ellas procedan de las MSC, que emigran a los tejidos y allí mantienen su capacidad de autorreplicación y de diferenciación específica dependiendo del ambiente citoquínico y de las interacciones con las células vecinas.

### **Perspectivas**

Sí, tal y como hemos comentado anteriormente, las líneas FDC contienen subpoblaciones de células en distintas etapas de diferenciación, algunas de ellas cercanas al MSC. Es probable que a partir de estas líneas podamos conseguir diferenciar hacia otros linajes mesenquimales. Aunque aún no hemos probado con FDC, experimentos preliminares con DSC, células con propiedades muy cercanas a las FDC, han demostrado la capacidad de diferenciarse a osteoblastos y adipocitos. Estos resultados sugieren un potencial enorme en estudios de medicina regenerativa a partir de células adultas.

## **Bibliografía**

Balogh, P., Y. Aydar, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 2002. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. *Anat. Rec.* 268: 160–168.

Clark, E. A., K. H. Grabstein, A. M. Gown, M. Skelly, T. Kaisho, T. Hirano, and G. L. Shu. 1995. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J. Immunol.* 155: 545–555.

Denzer, K., M. Van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol.* 165: 1259–1265.

Edwards, J. C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350: 2572–2581.

Fu, Y. X., and D.D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 399–433.

Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189: 54–63.

Kapasi, Z. F., G. F. Burton, L. D. Shultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1993. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice: influence of B and T cells. *J. Immunol.* 150: 2648–2658.

Kapasi ZF. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J Immunol.* 1998; 160: 1078-1084.

Kim, H. S., X. Zhang, and Y. S. Choi. 1994. Activation and proliferation of follicular dendritic-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 153: 2951–2961.

Kimatrai, M., C. Oliver, A. C. Abadía-Molina, J. M. García-Pacheco, and E. G. Olivares. 2003. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88: 844–849.

Kimatrai, M., O. Blanco, R. Muñoz-Fernandez, I. Tirado, F. Martín, A. C. Abadía-Molina, and E. G. Olivares. 2005. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 6126–6130.

Lindhout E, De Groot C. Follicular dendritic cells and apoptosis: life and death in the germinal center. *Histochem J.* 1995; 27: 167–183

Montes, M.J., P. Aleman, C.G. Tortosa, C. Borja, C. Ruiz, and E.G. Olivares. (1996). Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J. Reprod. Immunol.* 30: 53-66.

Muñoz-Fernández, R., F.J. Blanco, C. Frecha, F. Martín, M. Kimatrai, A.C. Abadía-Molina, J.M. García-Pacheco and E.G. Olivares EG. Follicular dendritic cells are related with bone marrow stromal cell progenitors and with myofibroblasts. *J. Immunol.* 2006, 177: 280–289.

Muñoz- Fernández, R., A.C. Abadía-Molina y E.G. Olivares. Contractilidad de las células foliculares dendríticas. Efecto de las citocinas. 2007. (manuscrito)

Petrasch, S., C. Perez Alvarez, J. Schmitz, M. Kosco, and G. Brittinger. 1990. Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from non-malignant and malignant lymphatic tissue. *Eur. J. Immunol.* 20: 1013–1018.

Schliever, F., A.S. Freedman, G. Freeman, E. Messner, G. Lee, J. Daley, and L.M. Nadler. 1989. Isolated follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J. Exp. Med.* 169: 2043–2058.

Schriever, F., and L. M. Nadler. 1992. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv. Immunol.* 51: 243–284.

Schnizlein CT, Kosco MH, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells in suspension. Identification, enrichment, and initial characterization indicating immune complex trapping and lack of adherence and phagocytic activity. *J Immunol.* 1985; 134:1360.

Simmons, P. J., and B. Torok-Storb. 1991a. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55–62. (a)

Simmons, P. J., and B. Torok Storb. 1991b. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78: 2848–2853. (b)

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chapponier, and R. Brown. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. 3: 349–363.



# **CONCLUSIONES**

## Conclusiones

1. Mediante medios pobres en suero fetal es posible obtener distintas líneas de FDC con un fenotipo estable, lo que supone un importante potencial en el estudio de estas células.
2. Las FDC pertenecen al linaje mesenquimal y derivan de las MSC.
3. Las FDC expresan MHC de clase II.
4. Las FDC tienen capacidad contráctil regulada por citocinas.

### **Publicaciones originales de esta tesis**

Muñoz-Fernández R, Blanco FJ, Frecha C, Martín F, Kimatrai M, Abadía-Molina AC, García-Pacheco JM, Olivares EG. **Follicular Dendritic Cells are Related to Bone Marrow Stromal Cell Progenitors and to Myofibroblasts.** J Immunol. 2006; 176: 280-9

# Follicular Dendritic Cells Are Related to Bone Marrow Stromal Cell Progenitors and to Myofibroblasts<sup>1</sup>

Raquel Muñoz-Fernández,\* Francisco Javier Blanco,\* Cecilia Frecha,† Francisco Martín,† Maria Kimatrai,\* Ana Clara Abadía-Molina,\* José Marcos García-Pacheco,‡ and Enrique G. Olivares<sup>2\*</sup>

Follicular dendritic cells (FDC) are involved in the presentation of native Ags to B cells during the secondary immune response. Some authors consider FDC to be hemopoietic cells, whereas others believe them to be mesenchymal cells. The low proportion of FDC in the lymphoid follicle, together with technical difficulties in their isolation, make these cells difficult to study. We show that Fibroblast Medium can be used successfully to isolate and maintain FDC lines. In this culture medium, we obtained 18 FDC lines from human tonsils, which proliferated for as long as 18 wk and showed a stable Ag phenotype as detected by flow cytometry and RT-PCR. FDC lines were CD45-negative and expressed Ags associated to FDC (CD21, CD23, CD35, CD40, CD73, BAFF, ICAM-1, and VCAM-1) and Ags specific for FDC (DRC-1, CNA.42, and HJ2). These cell lines were also able to bind B cells and secrete CXCL13, functional activities characteristic of FDC. Nevertheless, the additional expression of STRO-1, together with CD10, CD13, CD29, CD34, CD63, CD73, CD90, ICAM-1, VCAM-1, HLA-DR, alkaline phosphatase, and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM actin) indicated that FDC are closely related to bone marrow stromal cell progenitors. The expression of  $\alpha$ -SM actin also relates FDC with myofibroblasts. Like myofibroblasts, FDC lines expressed stress fibers containing  $\alpha$ -SM actin and were able to contract collagen gels under the effect of TGF $\beta$ 1 and platelet-derived growth factor. These findings suggest that FDC are a specialized form of myofibroblast and derive from bone marrow stromal cell progenitors. *The Journal of Immunology*, 2006, 177: 280–289.

Follicular dendritic cells (FDC)<sup>3</sup> (for review, see Refs. 1 and 2) are located in lymphoid follicles within the micro-environment of germinal centers. These cells retain native Ags in the form of immune complexes on their membrane for months, and present these Ags to B cells during the secondary response. FDC rescue bound B cells from apoptosis, and induce the differentiation of B cells into long-term memory B cell clones (3). Furthermore, FDC are involved in the pathogenesis of AIDS (4), of transmissible spongiform encephalopathies (5), and arthritis (6). The origin and cell lineage of FDC are controversial. Whereas their immune functions and expression of Ags associated with hemopoietic cells suggest that they belong to the hemopoietic lineage (7), their spindle-shaped morphology “in vitro,” lack of CD45, and presence on FDC of Ags expressed by fibroblasts (8) indicate that FDC may be mesenchymal (nonhemopoietic) cells. Based on stud-

ies with mouse radiation chimeras, Humphrey et al. (9) concluded that FDC were not derived from the bone marrow, but came from a local mesenchymal precursor. However, Kapasi et al. (7), using mice homozygous for the SCID (*prkdc<sup>scid</sup>*) mutation, which lack T, B lymphocytes, and FDC, demonstrated that after reconstitution with bone marrow from donor mice, the FDC of the reconstituted mice expressed the donor phenotype. These authors concluded that FDC precursors came from bone marrow. Studies with mice deficient in members of the TNF family such as TNF, lymphotoxin  $\alpha$  (LT $\alpha$ ) or LT $\beta$ , and their receptors such as TNF receptor type I (55 kDa) and LT $\beta$  receptor, which lack FDC, have provided important insights into the development of FDC (10).

To study the origin, phenotype, or functions of FDC, most authors obtain these cells from human tonsils and from mouse lymph nodes. However, FDC have been difficult to investigate because of problems with isolating cells to significant homogeneity or maintaining them in culture. The isolation of FDC for in vitro studies is difficult because they constitute only ~1% of the cells in lymphoid tissue, and form tight clusters that entrap B lymphocytes within their dendritic processes. The most common method is enzymatic digestion of the tissues followed by gradient centrifugation through Percoll. This produces an enriched population of FDC that is further purified by cell sorting with mAbs against CD14 (11) or against an FDC-specific Ag (12). These methods to obtain fresh FDC have several problems. It is difficult to dissociate bound B cells from FDC in vivo (11), and the presence of contaminating B cells may lead to spurious results when studying the FDC phenotype. The use of an anti-CD14 for cell sorting can also contaminate the FDC preparation with macrophages. When an FDC-specific mAb is used to avoid macrophage contamination, the number of purified FDC is normally insufficient to perform extensive experiments. To solve this problem, some authors have enriched and purified FDC by culture. Nevertheless, obtaining an FDC line is

\*Unidad de Inmunología, Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Hospital Universitario “San Cecilio,” Universidad de Granada, Granada, Spain; †Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain; and ‡Unidad de Inmunología y Biología Molecular, Hospital do Meixoeiro, Vigo, Spain

Received for publication December 8, 2004. Accepted for publication April 12, 2006.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica, Spanish Ministry of Science and Technology (Grant SAF2003-06799) and Consejería de Salud, Junta de Andalucía (Grant 195/2002).

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. Enrique G. Olivares, Unidad de Inmunología, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Avenida de Madrid s/n, 18012 Granada, Spain. E-mail address: engarcia@ugr.es

<sup>3</sup> Abbreviations used in this paper: FDC, follicular dendritic cell;  $\alpha$ -SM actin,  $\alpha$ -smooth muscle actin; BMSCP, bone marrow stromal cell progenitor; LT, lymphotoxin; PDGF, platelet-derived growth factor; DSC, decidual stromal cell; PRL, prolactin; ALP, alkaline phosphatase; BAFF, B cell-activating factor belonging to the TNF family.

not a common achievement, and in the resulting cells, the expression of some A $\beta$ s declines steadily (13–15). In this article, we show that Fibroblast Medium is a suitable culture medium to obtain FDC lines that maintain a stable antigenic phenotype. We observed that FDC were related to bone marrow stromal cell progenitors (BMSCP) (16, 17), and expressed stress fibers containing  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SM actin) and exhibited cell contractility like myofibroblasts. The generation of FDC lines is very important because it will greatly facilitate the study of FDC.

## Materials and Methods

### Samples

The tonsil samples were obtained from patients with tonsillitis at the Hospital Universitario de San Cecilio (Granada, Spain). Patients (3–10 years old) were in complete remission before the intervention. Informed consent was obtained from the parents or guardians of each patient. This study was approved by the Comité Ético y de Investigación (Research and Ethics Committee) of the Hospital Universitario de San Cecilio.

### Monoclonal Abs

The mAbs used in this study are shown in Table I.

### Cytokines

TGF $\beta$ 1, platelet-derived growth factor (PDGF), TNF, and LT $\alpha$  $\beta$ <sub>2</sub> were purchased from Sigma-Aldrich.

### Tumor cell lines

Ramos, a human B lymphoma line, JEG-3, a human extravillous trophoblast choriocarcinoma cell line, and Meth-A, a mouse fibrosarcoma cell line, were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) with 100 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml gentamicin, and 10% FCS. These tumor cells were used when they were in the log phase of growth.

### Fibroblast Medium

According to the information provided by the manufacturer (Sigma-Aldrich), Fibroblast Medium consists of fibroblast basal medium (a modified

version of the culture medium MCDB 105), and a supplement containing FCS (2%, final concentration), and unspecified amounts of basic fibroblast growth factor, heparin, epidermal growth factor, and hydrocortisone. Although Fibroblast Medium is no longer available from Sigma-Aldrich, with Fibroblast Growth Medium (Promocell), another low-protein medium, we obtained cell lines phenotypically similar to those reported in this work.

### Isolation and culture of FDC lines

To establish FDC lines, we used the method described by Kim et al. (15) with modifications. Briefly, human tonsils freshly obtained from routine tonsillectomy were thoroughly washed in PBS solution and cut into small pieces that were finely minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. The suspension was put in a solution of 0.25% trypsin and 0.5 mM EDTA (Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C, and the reaction was stopped by adding cold RPMI 1640 with 20% FCS. The suspension was filtered through gauze and centrifuged at 425  $\times$  g for 10 min. The supernatant was discarded, and the cell pellet was suspended in RPMI 1640 and centrifuged on Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech) for 20 min at 600  $\times$  g. Cells were collected from the interface, suspended in PBS, and washed. This suspension was incubated in culture flasks for 1 h at 37°C in complete RPMI 1640 with 10% FCS to allow macrophages and granulocytes to adhere to the flask. The supernatant cells were washed and incubated in Fibroblast Medium with 100 U/ml penicillin and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. After overnight incubation to allow adherent cells to attach to the flask, lymphocytes in the supernatant were discarded. Fibroblast Medium was then replaced and changed twice a week. After 2–4 wk, adherent cells were morphologically uniform and covered the whole surface of the 25-cm<sup>2</sup> culture flask. Cell viability was determined by trypan blue exclusion before any experiments were done. Only preparations with >95% viable cells were used.

### Isolation of fresh FDC

To obtain a suspension of fresh cells containing FDC, we used a protocol similar to that reported by Montes et al. (18) for fresh decidual stromal cells (DSC). The tonsil was washed in PBS and minced between two scalpels in a small volume of RPMI 1640 with 10% FCS. The cell suspension was filtered through sterile gauze, washed by centrifugation, and suspended in culture medium. This suspension was centrifuged at 650  $\times$  g for 30 min over a discontinuous gradient of 20 and 30% Percoll (Pharmacia Fine Chemicals). Cells were collected from the 20%/30% interphase and

Table I. mAbs used in this study

mAb	Specificity	Ig Subclass	Conjugated with	Obtained from
Isotype control		IgG1	FITC or PE	Sigma-Aldrich
Isotype control		IgG2a	FITC or PE	Caltag
Isotype control		IgM	Unconjugated	Sigma-Aldrich
Isotype control		IgM	FITC	Caltag
OKT3	CD3	IgG2a	PE	Ortho-Diagnostic System
Anti-CALLA	CD10	IgG1	PE	Dako Cytomation
CD13	CD13	IgG1	FITC	Caltag
CD14	CD14	IgG2a	PE	Sigma-Aldrich
CD15	CD15	IgM	FITC	Caltag
CD21	CD21 (short isoform)	IgG1	PE	Caltag
DRC-1	CD21 (long isoform)	IgM		DakoCytomation
BU38	CD23	IgG1	FITC	The Binding Site
CD29	CD29	IgG1	FITC	Caltag
CD34	CD34	IgG1	FITC	Caltag
Anti-human CR1	CD35	IgG1	FITC	Biosource
CD40	CD40	IgG1	FITC	Caltag
CD45	CD45	IgG1	FITC	Sigma-Aldrich
ICAM-1	CD54	IgG2a	FITC	Caltag
CD63	CD63	IgG1	FITC	Caltag
CD73	CD73	IgG1	PE	BD Biosciences
Anti-human Thy-1	CD90	IgG1	FITC	Serotec
VCAM-1	CD106	IgG2a	FITC	R&D Systems
BAFF	CD257	IgG1	FITC	R&D Systems
Anti- $\alpha$ -SM actin	$\alpha$ -SM actin	IgG2a	FITC	Sigma-Aldrich
B4-78	Bone/liver/kidney isoenzyme of ALP	IgG1		Developmental Studies Hybridoma Bank
Anti-human FDC	CNA.42	IgM		DakoCytomation
OKDR	HLADR	IgG2a	FITC	Ortho-Diagnostic System
Anti-human FDC	HJ2	IgM	FITC	Sigma-Aldrich
STRO-1	STRO-1	IgM		Developmental Studies Hybridoma Bank

Table II. *Primer sequences used for RT-PCR*

mRNA	Oligonucleotide Primers	PCR Product Size (bp)
CD10	5'-AACATGGATGCCACCACTGAG-3' 5'-CACATATGCTGTACAAGCCTC-3'	525
CD13	5'-AAGCTCAACTACACCCCTCAGC-3' 5'-GGGTGTGTCATAATGACCAGC-3'	600
$\alpha$ -SM actin	5'-ACTGTGTATGTAGCTCTGGAC-3' 5'-ACAATGGAAGGCCCGCTTC-3'	465
ALP	5'-GGACAAGTTCCCTTCGTGG-3' 5'-GCATGAGCTGGTAGGCCGATG-3'	362
Osteocalcin	5'-AGGCGCTACCTGTATCAATGG-3' 5'-TAGACCGGGCCGTAGAAGC-3'	155
CD34	5'-ACAACCTTGAAGCCTAGCCTG-3' 5'-CAAGACCAGCAGTAGACACTG-3'	348
CD21	5'-GGAGAGAGCACCATCCGTTG-3' 5'-GCAGCGAGTCACAGGAGGAG-3'	CD21 long isoform: 834 CD21 short isoform: 657
CD45	5'-ACCAGGGTTGAAAAGTTTCAG-3' 5'-GGGATTCACAGGTAATTACTCC-3'	343
PRL	5'-GGGTTTCATTACCAAGCCATC-3' 5'-TTCAGGATGAACCTGGCTGAC-3'	276
HLA-DRB	5'-CCTACTGCAGACACAAGTACG-3' 5'-TCAATGCTGCCTGGATAGAAAAC-3'	154

washed in PBS. Cell viability was determined by trypan blue exclusion. Only preparations with >95% viable cells were used. Five tonsil samples were studied independently by flow cytometry.

#### *Treatment of cultured FDC with cytokines*

Cultured FDC were preincubated in Fibroblast Medium for 1, 3, or 7 days with TNF or LT $\alpha$  $\beta$ <sub>2</sub> or both at concentrations of 10 or 100 ng/ml, and then their Ag phenotype was analyzed by flow cytometry.

#### *Analysis of culture supernatants*

To determine the concentration of prolactin (PRL) and osteocalcin, supernatants from confluent FDC cultures were collected, concentrated 10-fold in a Miniplus concentrator (Amicon). Osteoprotegerin and CXCL13 were analyzed in nonconcentrated supernatant. The presence of PRL was studied with an electrochemiluminescence immunoassay (Roche). Osteocalcin was investigated with an <sup>125</sup>I RIA kit (DiaSorin), osteoprotegerin was detected with an ELISA from Immundiagnostik. CXCL13 (BLC/BCA-1) was measured with an ELISA from R&D Systems.

#### *Flow cytometry analysis*

FDC were detached from the culture flask by treatment with 0.04% EDTA at 37°C. The cells were centrifuged, the supernatant was discarded, and the pellet was suspended in PBS at 10<sup>6</sup> cells/ml. For direct staining, 100  $\mu$ l of the cell suspension was incubated with 10  $\mu$ l of the appropriate mAb for 30 min at 4°C in the dark. Cells were washed, suspended in 0.5 ml of PBS, and immediately analyzed in a flow cytometer (Ortho-Cytoron; Ortho Diagnostic Systems). To identify dead cells, we incubated FDC with propidium iodide (Sigma-Aldrich). The percentage of cells that were Ab-positive was calculated by comparison with the appropriate isotype control (Table I). For double labeling, we followed the same procedure except that a second mAb with a fluorescent marker different from that of the first mAb was also added. For indirect labeling, FITC-labeled goat anti-mouse Ig was added after the first mAb. For intracytoplasmic labeling, FDC were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and permeabilized with cold acetone

for 10 min before the mAb was added. Fresh FDC were gated based on side scatter and CD10 Ag expression.

#### *PCR primers*

Primers used in this study are shown in Table II. They were designed according to sequences available from GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank)) and synthesized by Genset. To prevent the amplification of contaminant genomic DNA, sense and antisense primers were designed, when possible, from sequences located far apart on different exons, and tested in PCR with RNA used in cDNA synthesis.

#### *RT-PCR*

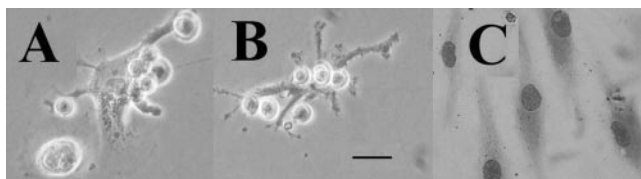
Total RNA from cells was extracted by the Ultrasec RNA isolation method according to the manufacturer's protocol (Biotecx Laboratories). A single-strand cDNA copy was made from total RNA using random hexamers (Amersham Biosciences) and Moloney murine leukemia virus H minus RNase reverse transcriptase (Promega). After heating to 65°C for 5 min and quickly cooling to 4°C in a thermal cycler (Geneamp PCR System 9600; PerkinElmer/Cetus) for denaturation, reverse transcription was performed for 1 h at 37°C. Starting with the equivalent of 75 ng of RNA, amplification was conducted in a total volume of 12.5  $\mu$ l of the amplification mix, 10 mM Tris(tris(hydroxymethyl)aminomethane)-Cl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% gelatin, 0.2 mM deoxy-NTPs, 5% glycerol, 0.25 mM each primer, and 0.02 U/ml TaqDNA polymerase (Promega). After incubation for 5 min at 96°C, each cycle consisted of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, and 72°C for 30 s, for a total of 32 cycles. The PCR products were size-separated on ethidium bromide-stained 2% agarose gels, and a 100-bp DNA ladder was included in each run.

#### *Immunofluorescence microscopy*

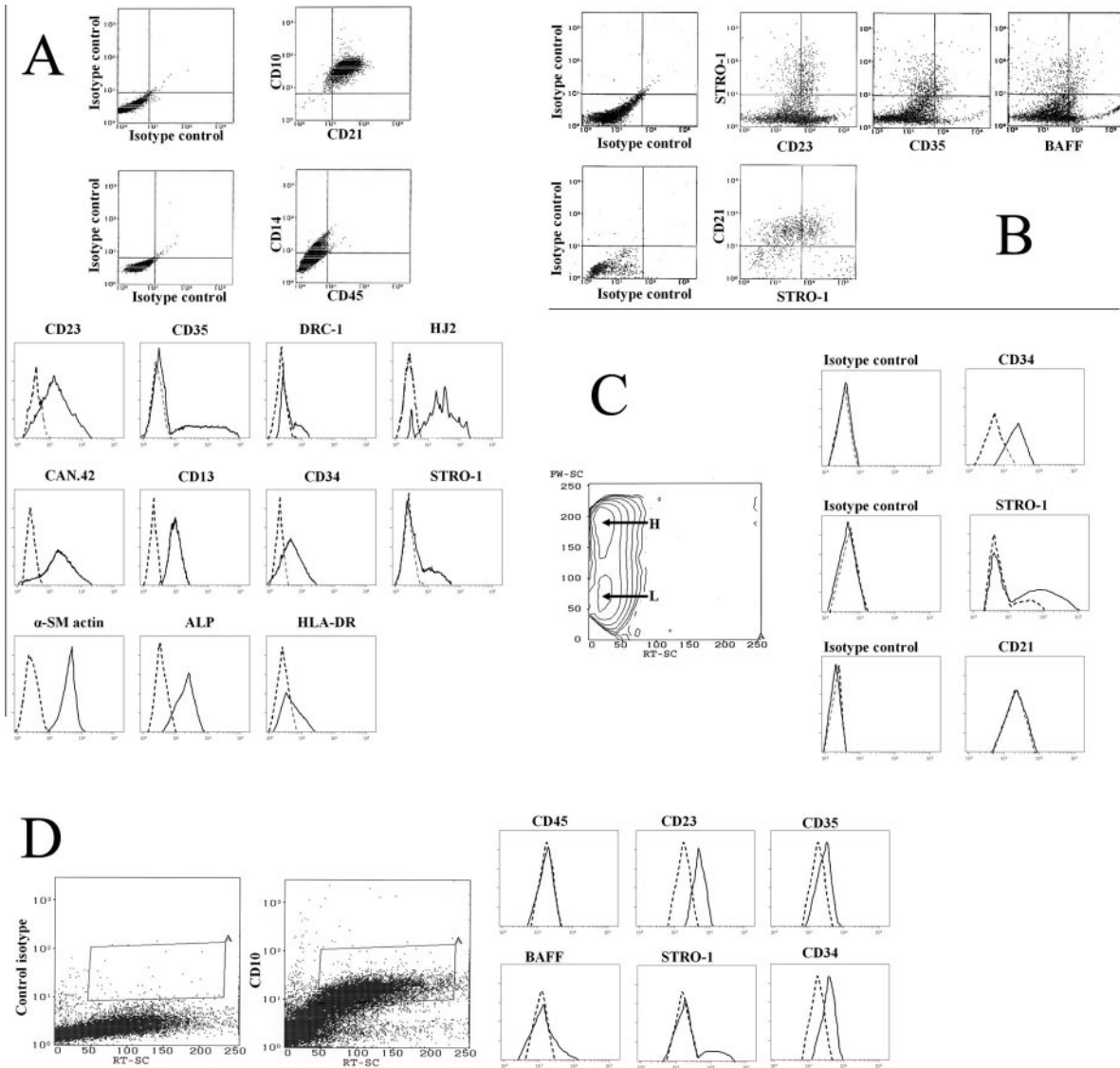
FDC were plated onto slides in Fibroblast Medium. After 24 h cells were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at 4°C, and permeabilized with cold acetone for 10 min before the addition of fluoresceinated anti- $\alpha$ -SM actin (Table I). Preparations were examined with a Leica confocal microscope (Leica Microsystems).

#### *Gel contraction assay*

Cellular collagen gel contraction assays were performed as previously described (19). A sterile solution of purified, pepsin-solubilized bovine dermal collagen (Vitrogen; Cohesion Technologies) was prepared according to the manufacturer's instructions and combined with 25  $\times$  10<sup>4</sup> FDC. The collagen/cell mixture (100  $\mu$ l/well) was dispensed into culture plates and allowed to polymerize at 37°C for 30 min. Immediately after polymerization, 2 ml of Fibroblast Medium with or without the appropriate cytokine was added to each well. After incubation for 24 h, the height (*h*) and diameter (*d*) of each gel were measured with a microscope micrometer, and



**FIGURE 1.** Fresh and cultured FDC. Fresh FDC cells with clustered lymphoid cells 24 h after isolation (A and B). FDC cultured in Fibroblast Medium showing fibroblast morphology (H&E staining) (C). Bar, 50  $\mu$ m.



**FIGURE 2.** Flow cytometry analysis of Ag expression by FDC. *A*, Expression of Ags by FDC cultured in Fibroblast Medium. Isotype control (---); mAb (—). *B*, Coexpression of STRO-1 with FDC-associated Ags by FDC cultured in Fibroblast Medium. *C*, Differential expression of Ags by FDC of different sizes cultured in Fibroblast Medium. For this analysis, a high (H) and a low (L) forward-scatter gate were set. Cells gated in H (---; larger cells); cells gated in L (—; smaller cells). *D*, Expression of Ags by fresh FDC. Cells were gated based on CD10 Ag expression vs side scatter. Isotype control (---); mAb (—).

the volume (*V*) of each gel was calculated with the following formula:  $V = 1/24 \times \pi \times l \times (3 \times d^2 + l^2)$ .

The mean of the measurements ( $n = 3$  for each sample) taken at each concentration point was used to estimate gel volume. The data are presented as the percent gel contraction of cytokine-treated FDC compared with cells cultured in the absence of cytokine, calculated with the following formula: cell contractility (percent) =  $100 \times (V \text{ with no cytokine} - V \text{ with cytokine})/V$  with no cytokine.

As a negative control for cell contractility in gel, we used Ramos cells. These cells are unable to adhere to plastic or gel surfaces. They are therefore unable to contract gels, because this activity depends on adhesion to the gel matrix.

**Binding assay**

The method used was based on that of Clark et al. (14) with some modifications. Ramos cells as test binding cells, and Meth-A cells as control binding cells, were labeled by culturing at  $10^5$  cells/ml for 20 h at 37°C with  $10 \mu\text{Ci/ml}$  [ $^3\text{H}$ ]thymidine (Amersham Biosciences), washed, and suspended at  $5 \times 10^5$  cells/ml in complete RPMI 1640. Cultured FDC as test binder cells, and JEG-3 cells as control binder cells, were treated with 0.05% trypsin and 0.5 mM EDTA, resuspended in complete Fibroblast Medium and RPMI 1640, respectively, and then added to 96-well micro-

titer plates in quadruplicate for each experimental variable at  $10^4$  cells/well. After 20 h at 37°C, the plates were carefully washed with PBS, and  $200 \mu\text{l}$  of [ $^3\text{H}$ ]thymidine-labeled cells was added to each well. The plates were centrifuged at  $5 \times g$  for 4 min, incubated for 6 h at 37°C, and then washed four times in PBS at room temperature. Two hundred microliters of trypsin was added per well, and samples were harvested and counted in a scintillation counter. The percentage of binding was calculated using the following formula: binding (percent) =  $100 \times \text{mean experimental cpm}/\text{mean total cpm added}$ .

**Statistical analysis**

Quantitative results were performed in triplicate or quadruplicate  $\pm$  SD. Student's *t* test was used to compare results of the binding assay.

**Results**

*Ag phenotype of FDC obtained in Fibroblast Medium*

After 24 h of culture, adherent cells with attached lymphoid cells appeared (Fig. 1). During the first week of culture, lymphoid cells died and only a population of adherent cells with morphological features of fibroblasts survived (Fig. 1). With Fibroblast Medium,

we obtained 18 FDC lines which, with weekly passages, proliferated for 7–18 wk. After this period, the cells started to die. In these long-term cultures, proliferating cells overgrew other possible contaminant cells. Fig. 2A and Table III show the Ag phenotype (determined by flow cytometry) of these FDC, and demonstrate the presence of a population in which almost all cells were CD13<sup>+</sup>, CD10<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, and  $\alpha$ -SM actin<sup>+</sup>. Ags CD21, CD29, CD63, alkaline phosphatase (ALP), and CNA.42 were also expressed by most of these cultured cells. Ags CD14, DRC-1, CD23, CD34, CD35, CD40, CD90, ICAM-1, VCAM-1, B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF), HJ2, HLA-DR, and STRO-1 were also detected in these cells. Some FDC lines, however, did not express CD14, DRC-1, and HLA-DR at any time during culture. None of FDC lines expressed CD3, CD15, and CD45.

The absence of CD45 and the detection of Ags associated with FDC (CD21, CD23, CD35, CD40, CD73, ICAM-1, VCAM-1, and BAFF) (20–23), and Ags specific for FDC (DRC-1, CAN.42, and HJ2) (12, 24, 25) relate the cell lines with FDC. In contrast, the expression of STRO-1, an Ag specific for BMSCP (16, 17), relates the cell lines with these stromal cell progenitors, and this relationship is further strengthened by the expression of Ags associated to the BMSCP (CD10, CD13, CD29, CD34, CD63, CD73, ICAM-1, VCAM-1,  $\alpha$ -SM actin, ALP, and HLA-DR, and the lack of CD3, CD15, and CD45) (16, 17, 26). Furthermore, the Ag phenotype of FDC lines is also related to that of other mesenchymal cells such as DSC (18, 27, 28), osteoblasts (29), and adipocytes (30). The expression of  $\alpha$ -SM actin suggests that FDC lines are also related to myofibroblasts (31).

The fibroblastic morphology of the cultured cells, the expression by almost all of them of CD10, CD13, CD73, and  $\alpha$ -SM actin, and the absence of CD3, CD15, CD45—all features characteristics of BMSCP—suggest that the cell lines constitute a homogeneous population. However, the detection of BMSCP-associated Ags (e.g., STRO-1) or FDC-associated Ags (e.g., CD23, CD35, BAFF, DRC-1) in some but not all of the cells shows the presence of subpopulations (Table III). The coexpression by some but not all

the cells of STRO-1 with CD21, CD23, CD35, or BAFF (Fig. 2B) confirms the relationship between “BMSCP traits” and “FDC traits” and suggests the presence of cells in different stages of differentiation between BMSCP and mature FDC. The presence of subpopulations was confirmed by the detection in the cell lines of large and small cells (Fig. 2C), which expressed the same Ag phenotype (Table III) but differed in the intensity of expression of STRO-1 and CD34. Cells selected in a low forward-scatter gate (small cells) expressed these Ags more intensely than cells selected in a high forward-scatter gate (large cells) (Fig. 2C).

#### Ag phenotype of fresh FDC

Fresh FDC are difficult to study because these cells represent only 1% of the cells in the germ center. However, because we found that cultured DSC are closely related to FDC, to study fresh FDC we used a method similar to that used for fresh DSC (18). Flow cytometric analysis of Percoll-isolated low-density tonsil cells, gated by CD10 expression and side scatter, revealed the presence of cells with a phenotype similar to that of cultured FDC. CD10<sup>+</sup> cells were negative for CD45, but coexpressed CD23, CD34, CD35, BAFF, and STRO-1 (Fig. 2D).

#### Stability of the Ag phenotype of FDC lines obtained in Fibroblast Medium

We obtained an FDC line in RPMI 1640 with 20% FCS. Although stability of the surface Ag phenotype was greater than in other studies (13–15), most Ags, except for CD10, CD13, and  $\alpha$ -SM actin, started to show down-modulation after 7 wk of culture. However, the FDC lines obtained in Fibroblast Medium maintained a stable Ag phenotype throughout the culture process (Fig. 3). Because previous attempts to maintain FDC with a stable Ag phenotype in culture were unsuccessful (13–15), the use of Fibroblast Medium appears to be suitable option to enrich and purify FDC for their study.

#### Detection of mRNAs in FDC lines

The expression of Ag mRNAs was studied by RT-PCR in four FDC lines obtained in Fibroblast Medium. CD10, CD13,  $\alpha$ -SM actin, ALP, osteocalcin, CD34, CD21, and HLA-DRB mRNAs were detected in all FDC lines, whereas CD45 and PRL mRNA were not found in any of the four FDC lines (Fig. 4). The short CD21 isoform mRNA was detected in all the FDC studied; one cell line also expressed the long CD21 isoform mRNA (Fig. 4). This long isoform corresponds to DRC-1, an Ag specific for FDC (24) that was detected by flow cytometry to be weakly expressed in some but not all FDC lines (Fig. 2A, Table III).

Although FDC lines showed phenotypic characteristics similar to those of BMSCP, DSC, and osteoblasts (Table IV), we found some differences. FDC lines did not secrete PRL into the culture supernatant (Table IV) or express PRL mRNA (Fig. 4), although DSC produced PRL in vivo and in vitro (32, 33). Like osteoblasts and BMSCP, FDC lines expressed ALP and osteocalcin mRNA (Fig. 4), expressed ALP protein (Fig. 2A, Table III), and secreted osteoprotegerin (Table IV), but unlike osteoblasts and BMSCP, FDC lines did not secrete osteocalcin into the supernatant (Table IV).

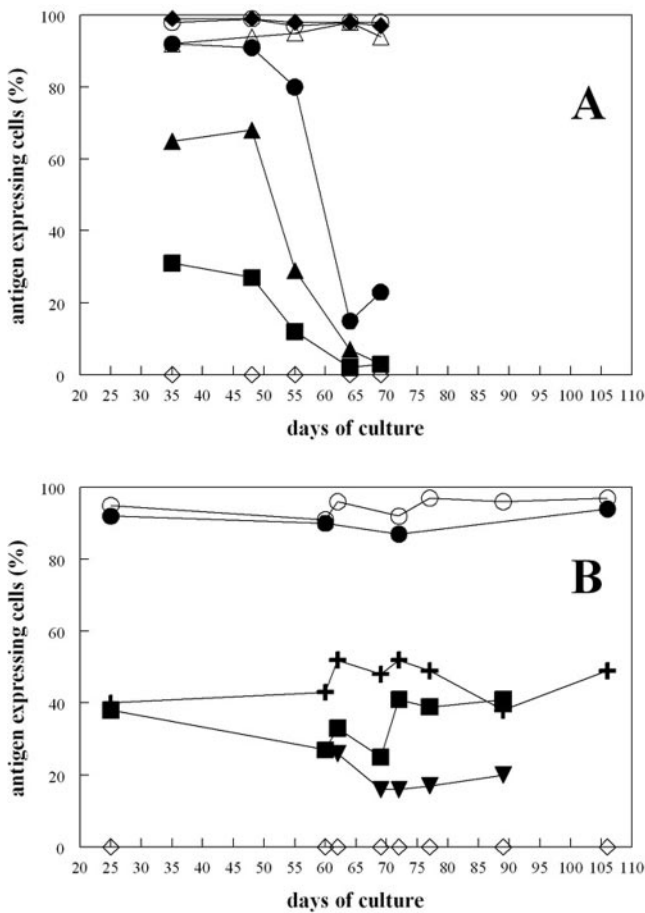
#### FDC lines show morphological and functional features of myofibroblasts

We have shown that FDC express  $\alpha$ -SM actin protein and mRNA (Figs. 2A and 4). This protein is considered a marker of myofibroblasts (31), cells with contractile activity involved in wound retraction, inflammation, and fibrosis (34). Studies with immunofluorescence microscopy, using a fluoresceinated mAb against

Table III. Ag expression on cultured FDC (n = 18)

Antigen	Flow Cytometric Reactions (% of positive cells)
CD3	<1
CD10	95–99
CD13	94–97
CD14	<1–45
CD15	<1
CD21	69–99
DRC-1	1–37
CD23	8–74
CD29	74–99
CD34	21–52
CD35	15–32
CD40	24–65
CD45	<1
CD54 (ICAM-1)	30–85
CD63	75–92
CD73	95–99
CD90	42–80
CD106 (VCAM-1)	17–66
CD257 (BAFF)	7–24
$\alpha$ -SM actin	95–99
Bone/liver/kidney isoenzyme of ALP	79–99
CAN.42	67–93
HLA-DR	<1–23
HJ2	47–89
STRO-1	3–43



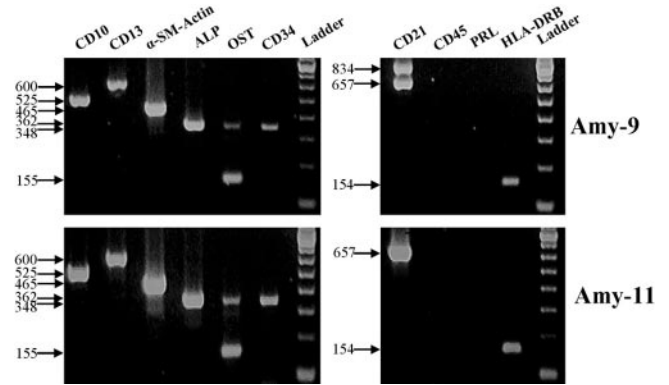


**FIGURE 3.** Variation over time of Ag expression by cultured FDC. Flow cytometric analysis of the variation over time of the expression of CD10 (○), CD13 (△), CD21 (●), CD23 (+), CD34 (■), CD35 (▼), CD45 (◇),  $\alpha$ -SM actin (◆), and HJ2 (▲) by an FDC line obtained and cultured in RPMI 1640 containing 20% FCS (A) and by an FDC line obtained and cultured in Fibroblast Medium (B).

$\alpha$ -SM actin, showed a diffuse pattern of staining in the cytoplasm of untreated FDC, which revealed the presence of unpolymerized  $\alpha$ -SM actin (Fig. 5A). PDGF or TGF $\beta$ 1 increased the presence of  $\alpha$ -SM actin in the stress fibers (Fig. 5B,C). Because the expression of  $\alpha$ -SM actin in stress fibers increases the contractile activity of fibroblastic cells in vitro (35), we determined whether FDC were able to contract collagen gels in vitro under the effect of TGF $\beta$ 1 and PDGF, two cytokines able to induce cell contractility in fibroblast cells (36, 37). We found that both cytokines induced cell contractility in FDC in a dose-response manner. Neither of these cytokines, however, showed any effect in the Ramos cells used as a negative control (Fig. 6).

*Adherence of a B lineage cell to FDC lines*

Binding of B cells is a specific feature of FDC (38) that was exhibited by the FDC lines obtained in our laboratory. When cells of the Ramos human B cell line were incubated with the FDC lines, these B cells strongly adhered to the FDC. FDC bound a significantly higher proportion of Ramos cells than Meth A cells (control binding cells). In contrast, JEG-3 cells (control binder cells) bound significantly fewer Ramos cells than did the FDC, and we found no significant differences between the adhesion of Ramos cells and Meth A cells to JEG-3 (Fig. 7).



**FIGURE 4.** mRNA expression by FDC cultured in Fibroblast Medium. Expression of different mRNAs by two different FDC lines (Amy-9 and Amy-11) studied with RT-PCR.

*Treatment of FDC lines with TNF and LT $\alpha_1\beta_2$*

Because TNF and LT $\alpha_1\beta_2$  are cytokines responsible for the development of the germinal center and FDC in the mouse (10), we treated the cultured FDC with these cytokines. As reported previously (39–41), TNF and LT $\alpha_1\beta_2$  increased the expression of VCAM-1 and ICAM-1 (Fig. 8A) and the secretion of CXCL13 (Fig. 8B). Although VCAM-1 seems to be a marker for the maturation of FDC in the germinal center (40), we did not observe significant modifications in the expression of other Ags that indicated complete maturation of FDC (Fig. 8). This suggests that, in addition to the effects of TNF and LT $\alpha_1\beta_2$ , other interactions are required for the differentiation of FDC. Experimental evidence in mice and humans showed that cell-cell interactions with B cells may be involved (42, 43).

**Discussion**

In previous studies, we isolated different DSC lines (cells of the decidua, the maternal tissue in close contact with the fetal trophoblast), and maintained them in culture (18). These cells exhibited a consistent Ag phenotype related to that of the BMSCP (28) and, like myofibroblasts, expressed  $\alpha$ -SM actin and showed cell contractility in vitro (27, 44, 45). The fact that the DSC lines also expressed Ags associated with FDC (18, 27) prompted us to establish FDC lines and compare them with DSC lines. The present study shows that the FDC lines obtained in Fibroblast Medium have an Ag phenotype very similar to that of DSC lines, and are also related to BMSCP and myofibroblasts.

The origin, cell lineage, and differentiation of FDC are still controversial, because technical difficulties in isolating these cells have hindered their study. However, we show that Fibroblast Medium is a suitable aid to the isolation of FDC, as we obtained 18 FDC lines that showed a stable Ag phenotype (Figs. 2 and 4, Table III). FDC lines were able to bind B cells (Fig. 7), and secrete CXCL13 (Fig. 8B)—typical functions of FDC (38, 41)—and their Ag phenotype (CD21<sup>+</sup>, CD23<sup>+</sup>, CD35<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD40<sup>+</sup>, ICAM-1<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, VCAM-1<sup>+</sup>, BAFF<sup>+</sup>) was compatible with that reported in previous studies of FDC (20–23). The expression by the FDC lines of DRC-1, CNA.42, and HJ2, Ags specific for FDC (12, 24, 25), further confirms their identity. Other Ags such as  $\alpha$ -SM actin, CD29, CD63, and HLA-DR have also been reported to be expressed by FDC (20, 21, 46, 47). Furthermore, CD10<sup>+</sup> cells that coexpressed CD23, CD34, CD35, BAFF, and STRO-1, but were negative for CD45 (a phenotype compatible with that of cultured FDC), were found in fresh tonsil preparations (Fig. 2D). In previous reports, however, the detection of CD10 was inconsistent (21,

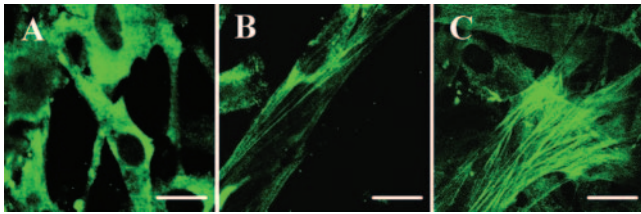
Table IV. Comparison of phenotype markers and functional characteristics expressed by FDC lines with those of other mesenchymal cells

Phenotype Marker	BMSCP	Adipocytes	Osteoblasts	DSC	FDC
CD3	—	—	—	—	—
CD10	+	+	+	+	+
CD13	+	+	+	+	+
CD14	—	—	—	—	+
CD15	—	—	—	—	—
CD21	ND <sup>a</sup>	ND	+ <sup>b</sup>	+	+
CD23	ND	ND	+	+	+
CD29	+	+	+	+	+
CD34	+	+	+	+	+
CD35	ND	ND	ND	+	+
CD45	—	—	—	—	—
CD54	+	+	+	+	+
CD63	+	ND	ND	+	+
CD73	+	+	+/(—) <sup>c</sup>	+ <sup>b</sup>	+
CD90	+	+	+	+	+
CD106	+	+	+	+	+
DRC-1	ND	ND	+	+	+
α-SM actin	+	+	+	+	+
ALP	+	+	+	+	+
CAN.42	ND	ND	ND	+	+
HJ2	ND	ND	+	+	+
HLA-DR	+	—	+	+	+
Osteocalcin	—/(+) <sup>c</sup>	+	+	—/mRNA+ <sup>b</sup>	—/mRNA+
Osteoprotegerin	+	ND	+	+ <sup>b</sup>	+
Prolactin	ND	ND	ND	—/(+) <sup>c</sup> /mRNA+	—/mRNA—
STRO-1	+	—/+ <sup>d</sup>	+	+	+
Myofibroblast ultrastructure	+	+	ND	+	+
Cell contractility	ND	ND	ND	+	+
Hemopoietic cells- supportive activity	CFU-GM BFU-E CFU-Mix	Myeloid cells	Osteoclasts	Decidual NK cells	B cells
References	16, 17, 26, 31, 51, 54, 57, 58	30, 31, 51, 54, 59, 60, 61	29, 31, 51, 56, 62, 63, 64, 65, 66	18, 27, 28, 31, 33, 44	This study, 22, 31, 38, 52

<sup>a</sup> ND, Not done.<sup>b</sup> Our unpublished result.<sup>c</sup> Under differentiation conditions.<sup>d</sup> Negative in Ref. 30, positive in Ref. 64.

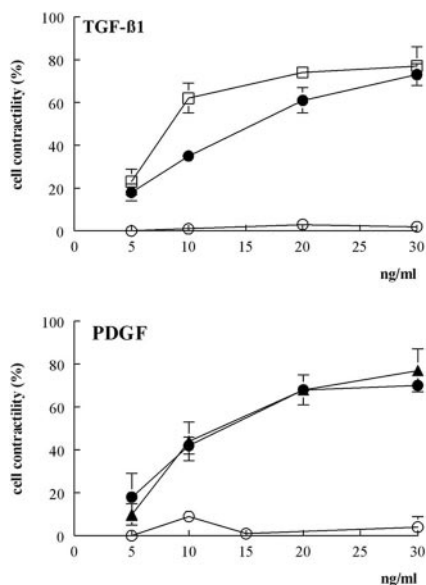
48), and CD14, an Ag expressed weakly or not at all by our FDC lines (Table III), was strongly detected in other studies of FDC (21). Moreover, CD13 and CD34, expressed by cultured FDC in our results (Figs. 2A and 4, Table III), were not detected on FDC in two previous reports (11, 49). These discrepancies may be attributed to the fact that most of these studies were conducted with fresh nondividing FDC, probably end-differentiated cells (isolated in some reports with anti-CD14 mAbs; Ref. 9), whereas in the present study we selected proliferating FDC, probably precursor cells. This possibility is supported by the expression by fresh FDC and FDC lines of STRO-1 (Fig. 2, Table III), an Ag which identifies clonogenic BMSCP (16, 17). Although STRO-1 has not been previously studied in FDC, some authors detected BST-1, an Ag also found on BMSCP, on FDC lines (15, 46). The absence of CD45, and the presence of other Ags detected on our FDC lines such as CD10, CD13, CD29, CD34, ICAM-1, CD63, CD73, CD90, VCAM-1, HLA-DR, ALP, and α-SM actin, further support the relationship between FDC and BMSCP (16, 17, 26) (Table IV). However, STRO-1 was expressed in only a proportion of the cultured cells, as with FDC-associated Ags (Fig. 2, Table III). The coexpression of STRO-1 with CD21, CD23, CD35, or BAFF by some but not all the cells (Fig. 2B) confirmed the relationship between BMSCP and FDC, and suggested the presence of cells in different stages of differentiation. The detection of subpopulations of FDC—smaller cells that expressed STRO-1 and CD34 more intensely than larger cells (Fig. 2C)—appears to confirm this possibility. In this connection, it has been shown that STRO-1 and

CD34 are differentiation Ags that are progressively down-modulated as the cells differentiate (17, 30). Other Ags such as CD14 and DRC-1, however, may be up-modulated by FDC during maturation. These two Ags were expressed only weakly or not at all by FDC lines in this study (Table III) and in early reports (14, 15), but were intensely expressed by fresh mature FDC (21). The fact that the DSC lines, which are similar in phenotype to FDC lines and are also related to the BMSCP, are actually precursors of DSC (18, 28), suggests that DSC and FDC lines are in an intermediate stage of differentiation between BMSCP and mature DSC and FDC, respectively. When we tried to induce differentiation in FDC lines with TNF and LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>—cytokines involved in the development of murine FDC (10), as previously reported (39, 40, 41)—we detected an increase in the expression of ICAM-1 and VCAM-1 (Fig. 8A) and in the secretion of CXCL13 (Fig. 8B), but no significant changes in the other Ags expressed by FDC lines. Although VCAM1 seems to be a marker for the maturation of FDCs in germinal centers (40), differentiation did not appear to be complete in the presence of TNF and LTα<sub>1</sub>β<sub>2</sub>, because possible maturation Ags (e.g., DRC-1 or CD14), which were highly expressed in fresh FDC, were not up-modulated in our FDC lines (results not shown). In vivo experiments show that FDC differentiation requires the presence of B cells (42, 43). Additional experiments are therefore necessary to determine whether differentiation of FDC lines can be achieved in the presence of B cells or through the activation of Ags involved in FDC-B cell interaction.



**FIGURE 5.** Expression of  $\alpha$ -SM actin by FDC cultured in Fibroblast Medium. Immunofluorescence detection of  $\alpha$ -SM actin in the cytoplasm of cultured FDC. A representative experiment of five FDC lines studied.  $\alpha$ -SM actin was detected with a fluoresceinated mAb. A diffuse pattern of staining with almost no stress fiber was predominant ( $<5\%$  of cells with stained stress fibers) in untreated FDC (A). PDGF (B) and TGF $\beta$ 1 (C) increased the number of cells in which stress fibers were stained (42–63% for PDGF and 56–74% for TGF $\beta$ 1). Bar, 50  $\mu$ m.

STRO-1<sup>+</sup> bone marrow cells include fibroblast colony-forming cells and are similar if not identical, to mesenchymal stem cells (26, 50), as shown by the fact that they give rise to fibroblasts, adipocytes, osteoblasts, chondrocytes, and hemopoietic supportive stromal cells (51). Interestingly, osteoblast lines obtained under culture conditions similar to those used for DSC and FDC lines (29), and in vitro-differentiated adipocytes (30), show a phenotype similar to that of BMSCP, FDC, and DSC (Table IV). The expression of CD10, CD13, CD29, CD34, CD73, CD90, ICAM-1, VCAM-1, STRO-1,  $\alpha$ -SM actin, and ALP; the absence of CD3, CD15, and CD45; and hemopoietic cell-supportive activity are common features to all these cell types (Table IV). FDC and DSC lines express osteogenic markers such as ALP (mRNA<sup>+</sup>protein<sup>+</sup>) and osteocalcin (mRNA<sup>+</sup>protein<sup>-</sup>) (Fig. 4) (28). Furthermore, like BMSCP and osteoblasts, FDC lines and DSC lines secrete osteoprotegerin (52) (Table IV). Although we cannot rule out that the in vitro conditions favor the persistence of the osteogenic markers,

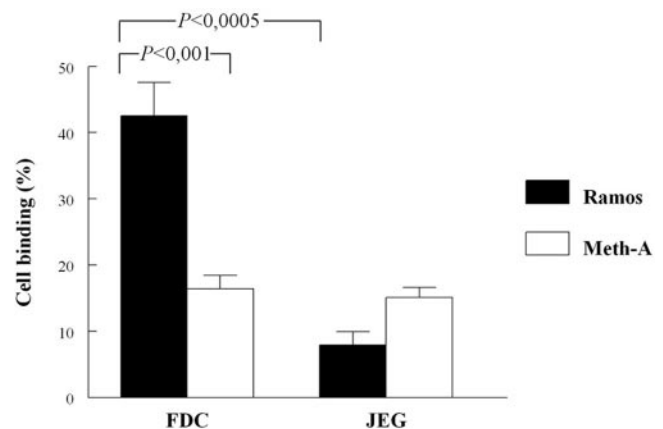


**FIGURE 6.** Contractility of FDC cultured in Fibroblast Medium. Induction of contractility in FDC lines by TGF $\beta$ 1 and PDGF, determined by the collagen gel contraction assay. Each curve (□, ●, ▲) represents the contractile activity of different FDC lines. As a negative control for gel contraction we used Ramos cells (○). The mean of measurements ( $n = 3$  for each sample) taken at each concentration point was used to estimate contractility. The data are presented as the percent gel contraction  $\pm$  SD of cytokine-treated DSC compared with that of cells cultured in the absence of cytokine.

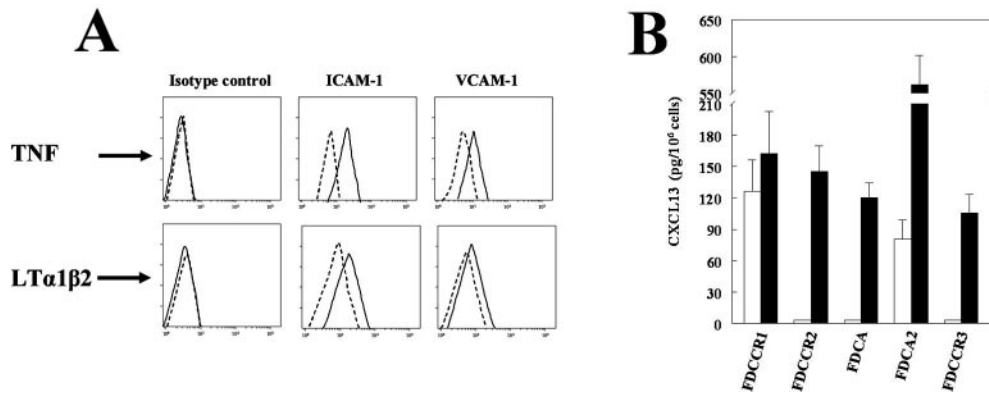
the fact that the osteogenic pathway predominates in the in vitro differentiation of clonal mesenchymal progenitor cells (53) suggests a possible intrinsic commitment in all these cells. Nevertheless, DSC and FDC lines did not secrete osteocalcin in vitro, whereas the osteoblast lines did (29). DSC lines secrete PRL (18), which was not detected in the FDC lines (Fig. 4); these latter cells expressed CD14 (Fig. 2A, Table III), which was not found in any of the cell types listed in Table IV. These differences are probably related to the specific differentiation pathways of each cell type.

Although early experiments with mouse chimeras led to controversial conclusions (9), more recent results have proved that FDC derive from bone marrow (7). This, together with the expression of Ags associated with hemopoietic cells by FDC, led some authors to suggest that these cells belonged to the hemopoietic lineage (7). However, the relation between FDC and BMSCP reconciles the bone marrow origin of FDC and their mesenchymal (nonhemopoietic) characteristics. The close similarity of DSC lines, FDC lines, osteoblast lines, and adipocytes to BMSCP (Table IV) suggests that these progenitors emigrate from the bone marrow to the endometrium, secondary lymphoid organs, bone, and adipose tissue to differentiate into their respective lineages. The presence of cells with an Ag phenotype and multilineage potential similar to those of BMSCP in peripheral tissues appears to support this hypothesis (54). Further corroboration of the nonhemopoietic origin of the FDC cells comes from the absence of WASP protein, an adaptor protein that is expressed only in cells of hemopoietic origin (55).

A hotly debated subject regarding FDC is their expression of MHC class II Ags. Although many reports have shown that FDC express these Ags, others demonstrated their absence on these cells (20, 21). Denzer et al. (47) have observed that the expression of MHC class II Ags by FDC is due to the passive acquisition of exosomes, possibly derived from B cells. Nevertheless, our results showed that FDC lines express their own HLA-DR, because the long-term culture of these cells in the absence of B cells makes passive acquisition unlikely. Furthermore, the presence of HLA-DR mRNA in the FDC lines (Fig. 4) supports that these cells express these Ags. Our results, however, do not contradict with those of Denzer et al. (47), because MHC class II Ags expressed by FDC precursor may be down-modulated as these cells differentiate. FDC may then acquire exosomes passively from nearby B cells.



**FIGURE 7.** B cell binding by FDC cultured in Fibroblast Medium. Binding of Ramos B cells and control Meth A cells to cultured FDC and to control JEG cells. The data are presented as the percent cell binding  $\pm$  SD ( $n = 4$  for each sample). Ramos B cell binding to FDC was significantly higher than to control JEG cell, whereas FDC bound a significantly higher percentage of Ramos B cells than of control Meth A cells.



**FIGURE 8.** Effects of TNF and  $LT\alpha_1\beta_2$  on FDC cultured in Fibroblast Medium. **A**, Flow cytometric analysis of the expression of ICAM and VCAM-1 by untreated cultured FDC (---) and cultured FDC treated with 10 ng/ml TNF or  $LT\alpha_1\beta_2$  for 72 h (—). **B**, Secretion of CXCL13 by untreated cultured FDC (□) and by cultured FDC treated with 10 ng/ml  $LT\alpha_1\beta_2$  for 72 h (■). Results from five different FDC lines are shown.

$\alpha$ -SM actin has been considered a marker of myofibroblasts (31)—cells with contractile activity involved in wound retraction (34). Although the presence of  $\alpha$ -SM actin in FDC was reported previously (46), our results confirm the expression of  $\alpha$ -SM actin protein and mRNA in FDC lines (Fig. 4). We also show that these cells, like myofibroblasts, express stress fibers containing  $\alpha$ -SM actin (Fig. 5), and that FDC contracted collagen gels under the effect of TGF- $\beta$ 1 and PDGF (Fig. 6)—cytokines reported to induce myofibroblast contraction (36, 37). The facts that  $\alpha$ -SM actin is also detected in BMSCP, osteoblasts, adipocytes, and DSC (16, 27, 30, 56) and that contractile activity has also been proved in DSC (44, 45) are further evidence of the relatedness of these cells (Table IV). The contractile function demonstrated in FDC may favor their activity in the stimulation of B cells during the secondary response (3). Contractile forces may help to increase the surface of the FDC membrane and thus maintain dendritic morphology, facilitating the interaction between FDC and B cells. As demonstrated for DSC (44, 45), Th1 and Th2 cytokines probably modulate FDC contractility and therefore their interaction with B cells.

Although the present work documents the contractile activity of FDC and their relation with BMSCP and other mesenchymal cells, the in vitro differentiation of FDC lines remains to be elucidated to shed light on the changes in their Ag phenotype and functions during differentiation.

## Acknowledgments

We are grateful to the Servicios de Otorrinolaringología, Hospital Universitario San Cecilio de Granada y Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada for providing us with tonsil specimens. We thank K. Shashok for improving the style of the manuscript.

## Disclosures

The authors have no financial conflict of interest.

## References

- van Nierop, K., and C. de Groot. 2002. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. *Semin. Immunol.* 14: 251–257.
- Park, C. S., and Y. S. Choi. 2005. How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* 114: 2–10.
- Lindhout, E., G. Koopman, S. T. Pals, and C. de Groot. 1997. Triple check for antigen specificity of B cells during germinal centre reactions. *Immunol. Today* 18: 573–577.
- Grouard, G., and E. A. Clark. 1997. Role of dendritic and follicular dendritic in HIV infection and pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 563–567.
- Bruce, M. E., K. L. Brown, N. A. Mabbott, C. F. Farquhar, and M. Jeffrey. 2000. Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol. Today* 21: 442–446.
- Kim, H. J., V. Krenn, G. Steinhauser, and C. Berek. 1999. Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J. Immunol.* 162: 3053–3062.
- Kapasi, Z. F., D. Qin, W. G. Kerr, M. H. Kosco-Vilbois, L. D. Schultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1998. Follicular dendritic cell (FDC) precursors in primary lymphoid tissues. *J. Immunol.* 160: 1078–1084.
- Lindhout, E., and C. de Groot. 1995. Follicular dendritic cells and apoptosis: life and death in the germinal centre. *Histochem. J.* 27: 167–183.
- Humphrey, J. H., D. Grennan, and V. Sundaram. 1984. The origin of follicular dendritic cells in the mouse and the mechanism of trapping of immune complexes on them. *Eur. J. Immunol.* 14: 859–864.
- Fu, Y. X., and D. D. Chaplin. 1999. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 399–433.
- Schliever, F., A. S. Freedman, G. Freeman, G. Messner, G. Lee, J. Daley, and L. M. Nadler. 1989. Isolated follicular dendritic cells display a unique antigenic phenotype. *J. Exp. Med.* 169: 2043–2058.
- Butch, A. W., B. A. Hung, and M. H. Nahm. 1994. Properties of human follicular dendritic cells purified with HJ2, a new monoclonal antibody. *Cell. Immunol.* 155: 27–41.
- Tsunoda, R., M. Nakayama, K. Onozaki, E. Heinen, N. Cormann, C. Kinet-Denoel, and M. Kojima. 1990. Isolation and long-term cultivation of human tonsil follicular dendritic cells. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 59: 95–105.
- Clark, E. A., K. H. Grabstein, and G. L. Shu. 1992. Cultured human follicular dendritic cells: growth, characteristics and interactions with B lymphocytes. *J. Immunol.* 148: 3327–3335.
- Kim, H. S., X. Zhang, and Y. S. Choi. 1994. Activation and proliferation of follicular dendritic-like cells by activated T lymphocytes. *J. Immunol.* 153: 2951–2961.
- Simmons, P. J., and B. Torok-Storb. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78: 55–62.
- Simmons, P. J., and B. Torok-Storb. 1991. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood* 78: 2848–2853.
- Montes, M. J., P. Aleman, C. G. Tortosa, C. Borja, C. Ruiz, and E. G. Olivares. 1996. Cultured human decidual stromal cells express antigens associated with hematopoietic cells. *J. Reprod. Immunol.* 30: 53–66.
- Kleinman, H., E. B. McGoodwin, S. I. Rennard, and G. R. Martin. 1979. Preparation of collagen substrates for cell attachment: effect of collagen concentration and phosphate buffer. *Anal. Biochem.* 94: 308–312.
- Tew, J. G., M. H. Kosco, G. F. Burton, and A. K. Szakal. 1990. Follicular dendritic cells as accessory cells. *Immunol. Rev.* 117: 185–211.
- Schriever, F., and L. M. Nadler. 1992. The central role of follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *Adv. Immunol.* 51: 243–284.
- Airas, L., and S. Jalkanen. 1996. CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells. *Blood* 88: 1755–1764.
- Hase, H., Y. Kanno, M. Kojima, K. Hasegawa, D. Sakurai, H. Kojima, N. Tsuchiya, K. Tokunaga, N. Masawa, M. Azuma, K. Okumura, and T. Kobata. 2004. BAFF/BLyS can potentiate B-cell selection with the B-cell coreceptor complex. *Blood* 103: 2257–2265.
- Naiem, M., J. Gerdes, Z. Abdulaziz, H. Stein, and D. Y. Mason. 1983. Production of a monoclonal antibody reactive with human dendritic reticulum cells and its use in the immunohistological analysis of lymphoid tissue. *J. Clin. Pathol.* 36: 167–175.
- Delsol, G., F. Meggetto, P. Brousset, E. Cohen-Knafo, T. al Saati, P. Rochaix, B. Gorguet, J. J. Voigt, and S. Chittal. 1993. Relation of follicular dendritic reticulum cells to Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease with emphasis on the expression of CD21 antigen. *Am. J. Pathol.* 142: 1729–1738.
- Gronthos, S., A. C. Zannettino, S. J. Hay, S. Shi, S. E. Graves, A. Kortessidis, and P. J. Simmons. 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116: 1827–1835.
- Oliver, C., M. J. Montes, J. A. Galindo, C. Ruiz, and E. G. Olivares. 1999. Human decidual stromal cells express  $\alpha$ -smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum. Reprod.* 14: 1599–1605.

28. García-Pacheco, J. M., C. Oliver, M. Kimatrai, M., F. J. Blanco, and E. G. Olivares. 2001. Human decidual stromal cells express CD34 and STRO-1 and are related with bone marrow stromal precursors. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 151–157.
29. Reyes-Botella, C., M. J. Montes, M. F. Vallecillo-Capilla, E. G. Olivares, and C. Ruiz. 2002. Antigenic phenotype of cultured human osteoblast-like cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 12: 359–364.
30. Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, and J. M. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 189: 54–63.
31. Foo, I. T., I. L. Naylor, M. J. Timmons, and L. K. Trejdosiewicz. 1992. Intracellular actin as a marker for myofibroblasts in vitro. *Lab. Invest.* 67: 727–733.
32. Tabanelli, S., B. Tang, and E. Gurdip. 1992. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42: 337–344.
33. Olivares, E. G., M. J. Montes, C. Oliver, J. A. Galindo, and C. Ruiz. 1997. Cultured human decidual stromal cells express B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) and stimulate allogeneic T cells. *Biol. Reprod.* 57: 609–615.
34. Gabbiani, G., G. B. Ryan, and G. Maine. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27: 549–550.
35. Hinz, B., G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, and C. Chaponnier. 2001.  $\alpha$ -Smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol. Biol. Cell* 12: 2730–2741.
36. Clark, R. A., J. M. Folkvord, C. E. Hart, M. J. Murray, and J. M. McPherson. 1989. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *J. Clin. Invest.* 84: 1036–1040.
37. Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier, and R. Brown. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 349–363.
38. Kosco, M. H., E. Pflugfelder, and D. Gray. 1992. Follicular dendritic cell-dependent adhesion and proliferation of B cells in vitro. *J. Immunol.* 148: 2331–2339.
39. Husson, H., S. M. Lugli, P. Ghia, A. Cardoso, A. Roth, K. Brohmi, E. G. Carideo, Y. S. Choi, J. Browning, and A. S. Freedman. 2000. Functional effects of TNF and lymphotoxin  $\alpha_1\beta_2$  on FDC-like cells. *Cell. Immunol.* 203: 134–143.
40. Balogh, P., Y. Aydar, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 2002. Appearance and phenotype of murine follicular dendritic cells expressing VCAM-1. *Anat. Rec.* 268: 160–168.
41. Huber, C., C. Thielen, H. Seeger, P. Schwarz, F. Montrasio, M. R. Wilson, E. Heinen, Y. X. Fu, G. Miele, and A. Aguzzi. 2005. Lymphotoxin- $\beta$  receptor-dependent genes in lymph node and follicular dendritic cell transcriptomes. *J. Immunol.* 174: 5526–5536.
42. Kapasi, Z. F., G. F. Burton, L. D. Shultz, J. G. Tew, and A. K. Szakal. 1993. Induction of functional follicular dendritic cell development in severe combined immunodeficiency mice: influence of B and T cells. *J. Immunol.* 150: 2648–2658.
43. Edwards, J. C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D. R. Close, R. M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350: 2572–2581.
44. Kimatrai, M., C. Oliver, A. C. Abadía-Molina, J. M. García-Pacheco, and E. G. Olivares. 2003. Contractile activity of human decidual stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 88: 844–849.
45. Kimatrai, M., O. Blanco, R. Muñoz-Fernandez, I. Tirado, F. Martin, A. C. Abadía-Molina, and E. G. Olivares. 2005. Contractile activity of human decidual stromal cells. II. Effect of interleukin-10. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 6126–6130.
46. Clark, E. A., K. H. Grabstein, A. M. Gown, M. Skelly, T. Kaisho, T. Hirano, and G. L. Shu. 1995. Activation of B lymphocyte maturation by a human follicular dendritic cell line, FDC-1. *J. Immunol.* 155: 545–555.
47. Denzer, K., M. Van Eijk, M. J. Kleijmeer, E. Jakobson, C. de Groot, and H. J. Geuze. 2000. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J. Immunol.* 165: 1259–1265.
48. Gerdes, J., H. Stein, D. Y. Mason, and A. Ziegler. 1983. Human dendritic reticulum cells of lymphoid follicles: their antigenic profile and their identification as multinucleated giant cells. *Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 42: 161–172.
49. Petrasch, S., C. Perez Alvarez, J. Schmitz, M. Kosco, and G. Brittinger. 1990. Antigenic phenotyping of human follicular dendritic cells isolated from nonmalignant and malignant lymphatic tissue. *Eur. J. Immunol.* 20: 1013–1018.
50. Claplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9: 641–650.
51. Dennis, J. E., J. P. Carbillet, A. I. Claplan, and P. Charbord. 2002. The STRO-1<sup>+</sup> marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170: 73–82.
52. Yun, T. J., P. M. Chaudhary, G. L. Shu, J. K. Frazer, M. K. Ewings, S. M. Schwartz, V. Pascual, L. E. Hood, and E. A. Clark. 1998. OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J. Immunol.* 161: 6113–6121.
53. Muraglia, A., R. Cancedda, and R. Quarto. 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J. Cell Sci.* 113: 1161–1166.
54. De Ugarte, D. A., Z. Alfonso, P. A. Zuk, A. Elbarbary, M. Zhu, P. Ashjian, P. Benhaim, M. H. Hedrick, and J. K. Fraser. 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89: 267–270.
55. Martin, F., M. G. Toscano, M. Blundell, C. Frecha, G. K. Srivastava, M. Santamaria, A. J. Thrasher, and I. J. Molina. 2005. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences. *Gene Ther.* 12: 715–723.
56. Kinner, B., and M. Spector. 2002. Expression of smooth muscle actin in osteoblasts in human bone. *J. Orthop. Res.* 20: 622–632.
57. Ramalho, A. C., A. Jullienne, P. Couttet, A. M. Graulet, C. Morieux, M. C. de Vernejoul, and M. E. Cohen Solal. 2001. Effect of oestradiol on cytokine production in immortalized human marrow stromal cell lines. *Cytokine* 16: 126–130.
58. Stewart, K., P. Monk, S. Walsh, C. M. Jefferiss, J. Letchford, and J. N. Beresford. 2003. STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell Tissue Res.* 313: 281–290.
59. Gimble, J. M., K. Youkhana, H. Hua, K. Medina, M. Sullivan, J. Greenberger, and C. S. Wang. 1992. Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J. Cell. Biochem.* 50: 73–82.
60. Dorheim, M. A., M. Sullivan, V. Dandapani, X. Wu, J. Hudson, P. R. Segarini, D. M. Rosen, A. L. Aulthouse, and J. M. Gimble. 1993. Osteoblastic gene expression during adipogenesis in hematopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 154: 317–328.
61. Benayahu, D., A. Shamay, and S. Wientroub. 1997. Osteocalcin (BGP), gene expression, and protein production by marrow stromal adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231: 442–446.
62. Gohel, A. R., A. R. Hand, and G. A. Gronowicz. 1995. Immunogold localization of  $\beta_1$ -integrin in bone: effect of glucocorticoids and insulin-like growth factor I on integrins and osteocyte formation. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 1085–1096.
63. Chen, X. D., H. Y. Oian, L. Neff, K. Satomura, and M. C. Horowitz. 1999. Thy-1 antigen expression by cells in the osteoblast lineage. *J. Bone Miner. Res.* 14: 362–375.
64. Stewart, K., S. Walsh, J. Screen, C. M. Jefferiss, J. Chainey, G. R. Jordan, and J. N. Beresford. 1999. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J. Bone Miner. Res.* 14: 1345–1356.
65. Hofbauer, L. C., S. Khosla, C. R. Dunstan, D. L. Lacey, W. J. Boyle, and B. L. Riggs. 2000. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15: 2–12.
66. Bruder, S. P., M. C. Horowitz, J. D. Mosca, and S. E. Haynesworth. 1997. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21: 225–235.