

CELULAS DENDRITICAS Y SU PAPEL EN PATOLOGIA

SILVIA CORONATO, GRACIELA E. LAGUENS, OSVALDO M. SPINELLI, MARGARITA A. SALAS,
WANDA DI GIROLAMO*Cátedra de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata*

Resumen La finalidad de esta revisión es aportar un conocimiento general sobre las células dendríticas (CD), células accesorias de la respuesta inmune. Se las reconoce como las células presentadoras de antígenos por excelencia (APC) y por lo tanto expresan antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los diversos tipos de CD tienen un origen común en la médula ósea diferenciándose luego bajo la influencia de variados estímulos y distribuyéndose en órganos linfoides y no linfoides. Desde los tejidos periféricos migran a los ganglios linfáticos donde presentan el antígeno a los linfocitos T. Dependiendo del microambiente expresan diversos marcadores de superficie siendo capaces de la secreción de citoquinas como IL-12, IL-1 y TNF α . Como APC cumplen un importante papel en la patogenia de enfermedades autoinmunes y virales destacándose su participación en la infección por HIV. Se las encuentra en el infiltrado de numerosos cánceres humanos donde actuando como APC podrían inducir una respuesta inmune antitumoral. En esta propiedad se basa su utilización para el tratamiento de linfomas y melanomas llevada a cabo actualmente en diversos laboratorios.

Abstract *Dendritic cells: their role in pathology.* The aim of this review is to update the knowledge on dendritic cells (DC), as potent antigen-presenting cells (APC) expressing class II major histocompatibility (MHC) antigen. The different types of DC are derived from a common bone marrow precursor. They differentiate and migrate to lymphoid and non-lymphoid tissues under the influence of diverse stimuli. After binding antigen in their periphery they move to the lymph node activating T cells. Depending on the microenvironment, DC express several surface markers and secrete cytokines such as IL-12, IL-1 and TNF α . DC play a role in the pathogenesis of autoimmune and viral diseases being relevant in AIDS. These cells also infiltrate human tumors where they could be involved in the induction of anti-tumor immune response. The immunostimulatory properties of DC are currently applied in DC-based therapies of melanoma and lymphoma patients.

Key words: dendritic cells, APC, Langerhans cells, antigenic presentation

Las células presentadoras de antígenos (APC) representan una heterogénea población formada por los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas, que tienen en común una capacidad inmunoestimuladora específica.

La primera descripción de células con morfología dendrítica, presentes en la piel data de 1868, y fue hecha por Paul Langerhans, un estudiante de medicina. Estas células, posteriormente conocidas como células de Langerhans (CL), han eludido durante mucho tiempo, no sólo las técnicas histológicas de rutina, ya que no se tiñen con la coloración habitual de hematoxilina y eosina, sino también una explicación clara de su función¹. Es así, que a lo largo de los años se han hecho intentos de asignarle un papel en la percepción sensorial, pigmenta-

ción, queratinización y en la patogenia de varias enfermedades.

El interés hacia ellas fue estimulado por los trabajos de Steinman llevados a cabo a partir de la década del setenta, quien afirmó que las CL correspondían a un linaje celular no reconocido hasta el momento: el de las células dendríticas (CD) que se encuentran en órganos linfáticos, piel y mucosas y que jugarían un papel preponderante en el reconocimiento de antígenos^{2,3}.

Sin embargo, dadas las grandes dificultades para obtener poblaciones puras de células dendríticas, y el escaso número de anticuerpos monoclonales específicos que se podían obtener a partir de ellas, se puso seriamente en duda su existencia. El hecho de que, una vez aisladas fueran fácilmente confundidas con fagocitos mononucleares, complicaba aún más su identificación.

Por otra parte existió un amplio debate acerca de la naturaleza del precursor de las CD ya que su origen se presentaba incierto. En la actualidad, se acepta que las CD derivan de una única célula progenitora de la médula

Recibido: 4-VIII-1997

Aceptado: 25-IX-1997

Dirección postal: Dra. Wanda Di Girolamo, Departamento de Patología B, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP, Calle 60 y 120, 1900 La Plata, Argentina. Fax: 54-31-258-989

ósea, que constituyen una familia de células caracterizada por la expresión de altos niveles de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), y que su función específica es la de ser presentadoras de antígenos, e inmunoestimuladoras de linfocitos^{4, 5}.

Localización de las células dendríticas

Se encuentran en órganos linfoides y no linfoides y también circulantes en linfa aferente y sangre periférica, con diferentes nombres según su ubicación, pero guardando características y funciones similares entre sí. (Cuadro 1)

En órganos linfoides: Se las encuentra en las regiones T dependientes de los ganglios linfáticos y bazo donde se las conoce como células interdigitantes (CID). En el bazo son más numerosas, ya que hay nidos de ellas en la periferia del área de linfocitos T, donde están posicionadas como puentes a través de los cuales deben pasar los linfocitos para entrar en el torrente sanguíneo. Las células foliculares dendríticas (CFD), se encuentran en los centros germinales de los folículos secundarios de las áreas de linfocitos B, de ganglios linfáticos y bazo, siendo parte integral del microambiente del folículo. También están presentes en el timo, sobre todo en la región medular.

En órganos no linfoides: Las células de Langerhans (CL) son las CD mejor caracterizadas. Están situadas en los epitelios planos estratificados de piel y mucosas, hallándose en varias fases del ciclo celular, por lo que se deduce que proliferan in situ^{6, 7}. Migran por vía linfática y esta migración sería utilizada para llevar antígenos de

la piel a los linfocitos T helper situados en los ganglios linfáticos.

En linfa aferente: Se las conoce como células veladas, representando CL migrantes en tránsito desde la piel, al ganglio linfático donde se transformarán en CID⁸.

En sangre periférica: Las CD son muy escasas ya que representan menos del 2% de las células mononucleares. En video microscópico, se puede ver como extienden y retraen continuamente largos lamelipodios o velos.

Steinman y col. utilizaron la fracción de mayor densidad de sangre periférica humana, como población de inicio para la purificación de CD, demostrando que podrían tener origen en esta fracción⁹.

En otros órganos: Las CD del corazón se denominan células intersticiales (CI). También se las encuentra en el hígado, donde han sido poco estudiadas, en el parénquima pulmonar y en la lámina propia del intestino^{9, 10}. En el estroma del endometrio humano se han identificado CD, HLA-DR⁺, cuyo número varía en relación al estado funcional del mismo¹¹. En el cerebro no se han descrito, sin embargo se ve que las células de la microglía, se asemejan a CD por la forma, y por sus marcadores de membrana. Estas células, en cocultivo con linfocitos T CD4⁺, inician la reacción linfocitaria mixta, típica de CD. Estas propiedades serían de importancia para la mantención de una respuesta inmunológica en el sistema nervioso central¹².

Origen

Las células dendríticas se originan a partir de células de la médula ósea. Existen evidencias experimentales que avalan varios orígenes posibles de estas células:

- a. Un progenitor común con las células mieloides CD34⁺¹³, que bajo el estímulo de determinadas citoquinas puede generar dos tipos de poblaciones precursoras, CD1a y CD14, las cuales maduran a células dendríticas

CUADRO 1.- Localización de las células dendríticas en el organismo

Denominación	Localización	Función
Célula dendrítica	Médula del timo	Tolerancia a antígenos propios
Célula dendrítica	Sangre periférica	Migración
Célula de Langerhans	Epidermis	Captación y procesamiento de antígenos
Célula interdigitante	Ganglios linfáticos Bazo	Presentación de Antígenos
Célula folicular dendrítica	Centro germinal	Activación de Linfocitos B
Célula velada	Linfa Aferente	Transferencia de antígenos
Célula intersticial	Parénquima de órganos	Captación y procesamiento de antígenos

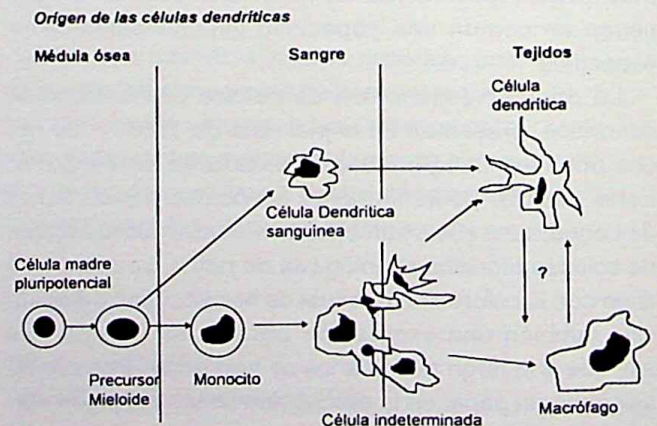


Fig. 1.- A partir de un precursor mieloide común, tiene lugar la diferenciación hacia CD sanguínea o hacia un intermedio monocítico capaz de sufrir diferenciación divergente hacia CD o hacia macrófagos. Existen evidencias de una interconversión entre macrófagos y CD en los tejidos.

de distintas características. La primera dará origen a células con gránulos de Birbeck, y los antígenos Lag y E-catherina, marcadores típicos de las células de Langerhans y las segundas podrán diferenciarse a macrófagos o a células dendríticas carentes de gránulos y de los mencionados antígenos y que, por el contrario expresan CD2, CD9 y CD68.

b. El monocito sanguíneo bajo el estímulo de GM-CSF e IL-4 puede dar origen a células dendríticas inmaduras.

En presencia de los signos apropiados, los macrófagos pueden convertirse en células dendríticas habiéndose sugerido que éstas podrían ser a su vez un paso intermedio en la formación de macrófagos¹⁴⁻¹⁷ (Fig. 1).

Por otra parte, células de apariencia dendrítica se han visto en paralelo con monocitos en el desarrollo fetal temprano y en cultivos de médula ósea¹⁸.

Migración

Los patrones de migración de las distintas CD son bastante complejos, y dependen del tipo celular y del estado de activación o diferenciación de la célula. Los mecanismos moleculares que los controlan, no están bien comprendidos aún.

Los precursores de CD migran a través de la sangre hacia los tejidos no linfoides donde permanecen como células inmaduras. La posterior maduración y migración desde estos tejidos, a los órganos linfoides secundarios, donde colonizan las áreas de LT, están determinadas por la liberación de mediadores inflamatorios (GM-CSF, TNF- α , IL-1B)¹⁹ y un cambio en el patrón de expresión de moléculas de adhesión.

El drenaje linfático y la migración hacia los ganglios, aseguran que linfocitos, APC y antígenos de tejidos infectados o inflamados, converjan en el ganglio linfático. Por lo tanto la función migratoria es fundamental para las CD.

Está descrito²⁰ que, el TNF- α interviene en la maduración y migración de CD hacia tejidos como piel, intestino, corazón y riñón. Las CL, migrantes de la piel, antes de trasladarse, bajan su nivel de E-catherinas^{14,21}, por lo que pierden su estrecha interrelación con los queratinocitos circundantes. El proceso de migración resulta en un reordenamiento del citoesqueleto de actina y aumento de la movilidad celular. El TNF- α , es capaz de inducir este reordenamiento, provocando desprendimiento celular, y formación de una organización de microtúbulos, altamente dinámica²⁰.

Es posible que ciertas combinaciones de citoquinas puedan reclutar a las células precursoras de CD, del torrente sanguíneo, para infiltrar tejidos inflamados. El primer paso sería la unión de las células circulantes al endotelio vascular, previa expresión de moléculas de

adhesión en este tejido. Posteriormente, se produciría la migración de las células a través del endotelio hacia el sitio de la inflamación, guiadas por estímulos quimiotácticos. El traslado de Cd del torrente sanguíneo a los tejidos, ha sido estudiado en el pulmón y en el hígado^{17,22,23}.

Maduración

La maduración de las CD aumenta su capacidad presentadora de antígenos, pero disminuye la capacidad de fagocitosis y de procesamiento de antígenos más complejos. Los mecanismos que regulan la maduración y los movimientos de las CD en los tejidos, dependen fundamentalmente del microambiente que rodea a la célula. (Cuadro 2).

De sangre periférica humana se han separado tres tipos de CD de distinta morfología: el tipo I, está representado por grandes células mononucleares, con núcleo irregular, pocas organelas en el citoplasma y proyecciones muy cortas; el tipo II, se asemeja a las CL de la piel, con proyecciones un poco más notorias y el tipo III, presenta similitud con las células veladas de linfa aferente²⁴. Podemos agrupar a las CD de sangre periférica, por su comportamiento "in vitro", en dos grupos: uno inmaduro, que requiere la presencia de citoquinas para transformarse en CD típicas, y que se postulan como células en tránsito desde la médula ósea a los tejidos, y otro en vías de maduración, potente estimulador de linfocitos T, que necesita un período de cultivo, sin citoquinas, para alcanzar altos niveles de moléculas clase II del MHC y de adhesinas, y que serían CD migrantes de otro tejido, hacia bazo o nódulos linfáticos²⁵. En sangre periférica no se encuentran células maduras.

Las células maduras se caracterizan por ser células grandes, de baja densidad, con dendritas que las hacen muy móviles y que expresan moléculas de adhesión de la familia B7 (integrinas)¹⁸.

Existen evidencias del control recíproco entre elementos del sistema nervioso y del sistema inmune, habiéndose sugerido la posibilidad de que la maduración de CL esté regulada por un neuropéptido²⁶.

CUADRO 2.- *Proceso de maduración de CD*

Aumenta
- Adhesión a linfocitos T
- Expresión de MHC
- Expresión de moléculas coestimuladoras
- Presentación de antígenos
- Migración
- Síntesis de citoquinas
Disminuye
- Captura y procesamiento de antígenos

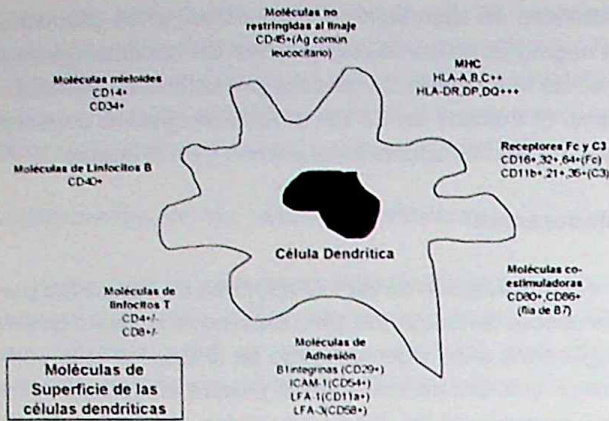


Fig. 2.- Marcadores de superficie de una célula dendrítica

Las APC están en el timo desde las primeras etapas del desarrollo y su función en la restricción y selección antigénica indica que algunas de ellas deben ser completamente maduras en este momento, aunque su actividad no sea óptima en el período neonatal²⁷.

Moléculas de superficie

Las moléculas de superficie contribuyen a la función de las CD tanto en la unión célula-célula como en la señalización. La primera característica significativa es que las CD, no tienen marcadores únicos¹⁸: las distintas poblaciones de CD, presentan una marcada heterogeneidad en la expresión de sus moléculas de superficie. CD de diferentes tejidos presentan distintas moléculas de adhesión de acuerdo al entorno, priorizando así, determinadas funciones. Esto ha hecho que sea extremadamente difícil preparar anticuerpos monoclonales para CD, a pesar de ser consideradas como buenos inmunógenos⁹. Si bien presentan un antígeno común con otros leucocitos (CD45), estudios hechos en ratón sugieren marcadas diferencias entre las moléculas de superficie de ambos tipos celulares²⁸⁻³⁰. (Fig. 2).

La función presentadora de antígeno está asociada con un alto nivel de DEC-205, una proteína de membrana homóloga al receptor de manosa de macrófago, que es capaz de unirse a carbohidratos y mediar endocitosis³¹.

Función

El rol de las CD es presentar antígenos e inducir a los linfocitos a iniciar la respuesta inmune. La activación del linfocito T da origen a dos procesos: proliferación celular y diferenciación a células efectoras. Las células diferenciadas son altamente especializadas.

Las CD de tejidos normales, todavía inmaduras, pueden capturar y procesar antígenos eficientemente, pero activan débilmente a los linfocitos T. Estas células presentan una especial capacidad de macropinocitosis, que

las lleva a incorporar un gran volumen de fluidos, para luego concentrar los macrosolutos¹⁷. La disociación de los filamentos de actina del citoesqueleto, proceso que tiene lugar durante la maduración, llevaría a la disminución de la macropinocitosis, ya que ésta requiere la integridad de los filamentos.

Las CD inmaduras, asimismo, expresan receptor de manosa, lo que permite una eficiente captura de antígenos manosilados, por medio de endocitosis o fagocitosis. También presentan receptores para Fc, lo que favorece la captación de complejos inmunes.

Después de un proceso infeccioso, de toxicidad o de necrosis, las CD inician su maduración. Esto implica grandes cambios en sus propiedades reduciéndose notoriamente la capacidad de capturar antígenos y aumentando la expresión de moléculas de superficie, con lo que adquieren la posibilidad de activar linfocitos T.

Mientras que la interacción CD-LT ha sido tradicionalmente entendida en un solo sentido, recientes datos sugieren que los linfocitos T podrían jugar un rol importante en activar a la CD, aumentando su capacidad estimuladora. Por ejemplo, se ha demostrado que la interacción entre el CD40 L del Lth y el CD40 de la CD, incrementa la viabilidad, maduración y producción de IL-12 por parte de la CD.

La activación de APC para iniciar su papel de inductor es rápida y puede ser ejercida por el mismo inmunógeno o por un adjuvante. Sin embargo, las citoquinas producidas por los linfocitos T (IFN-γ, GM-CSF, TNF-β) son las que mejor activan a las ACP¹⁷.

La maduración se completa después de la interacción con linfocitos T y se caracteriza por la disminución de su capacidad fagocítica, y la síntesis de citoquinas como TNF-α, IL-1B o IL-12.

Cuando las ACP están activadas expresan más moléculas de clase I y II, del MHC, más receptores para FC y más moléculas de adhesión (coestimuladoras)³².

El linfocito T se estimula a través de la unión de sus receptores específicos con péptidos antigénicos procesados por APC. Esta interacción produce la inmunidad específica para este péptido en particular. Los linfocitos T requieren de dos tipos de señales para iniciar esta respuesta. La primera señal es la producida por la unión del receptor complejo TCR/CD3, con péptidos antigénicos unidos a la molécula de clase II del MHC de una APC. La segunda señal, coestimuladora, no involucra al antígeno y está dada por las moléculas de adhesión presentes en las APC profesionales (Fig. 3) que pueden ser CD, macrófagos, o LB activados, que expresen moléculas de clase II del MHC.

Los linfocitos T no pueden responder sin estas señales: cuando son activados por el antígeno, pero no reciben el estímulo de la señal coestimuladora, se vuelven inactivos, alcanzando un estado de tolerancia inmunológica, específica para ese antígeno.

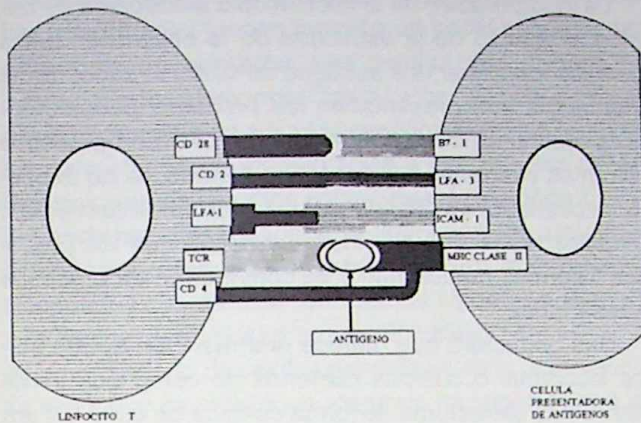


Fig. 3.- Moléculas de superficie involucradas en la presentación antigénica entre una APC y un LT

Los linfocitos T helper, producen citoquinas que también son capaces de actuar como la segunda señal. El IFN- γ puede inducir la expresión de moléculas de clase II del MHC, en una gran variedad de células epiteliales o endoteliales, que habitualmente no la expresan, por lo que, de ese modo, podrían actuar como APC no profesionales³³.

Las células de Langerhans, localizadas en la epidermis suprabasal, representan una de las principales APC,³⁴ estando involucradas en el procesamiento y presentación de antígenos. Tienen marcadores de superficie específicos, actividad de ATPasa en la membrana y como particularidad distintiva presentan gránulos de Birbeck. Por microscopía electrónica se ve que estos gránulos están ubicados en el citoplasma y asociados a lisosomas. Las CL, pueden presentar a los linfocitos T el antígeno entero o péptidos, mientras que las otras células dendríticas, sólo pueden presentar antígeno ya procesado.

Moléculas de clase II del MHC se detectan en la membrana plasmática y también en compartimentos intracelulares, compatibles con gránulos de Birbeck³⁵. La internalización de estas moléculas en dichas estructuras, confirma la hipótesis de que los gránulos de Birbeck derivan de la membrana celular y estarían involucrados en el procesamiento y presentación de antígeno³⁶.

Las CL migran vía sangre o linfa aferente, a las áreas T del bazo o ganglios linfáticos. Allí forman uniones estables con linfocitos T durante la respuesta inmune primaria. El factor que estimula la migración, no ha sido aún identificado. Los estímulos, como el contacto con alérgenos, movilizan a las CL hacia la dermis y linfa, probablemente por acción de citoquinas. Esta migración va acompañada de maduración, que implica, por ejemplo, aumento de la expresión de moléculas de clase II de MHC y de la molécula B7 coestimuladora³⁷.

Las células interdigitantes se encuentran en abundancia en las áreas de linfocitos T de los nódulos linfáticos

y bazo, y se consideran más efectivas que las otras APC, para la activación inicial de linfocitos T, CD4+ en reposo. Actúan tanto en respuesta primaria, presentando antígenos a linfocitos T no activados, iniciando la respuesta inmune T dependiente como en la respuesta inmune secundaria, activando los linfocitos de memoria en nódulos linfáticos²⁴. Una vez activados los linfocitos T interactúan con macrófagos, induciendo la síntesis de interleuquina o con linfocitos B estimulando la producción de anticuerpos¹⁶.

Las células foliculares dendríticas están ubicadas en los centros germinales de los folículos secundarios³⁸.

Al menos tres tipos de células se requieren para la formación de nuevos centros germinales en los folículos secundarios de los ganglios linfáticos: linfocitos B activados, linfocitos T CD4+ y CFD. Estas últimas pueden retener el antígeno por largos períodos en forma de complejos inmunes,³⁹ actuando directamente en la activación de linfocitos B, seleccionando los de alta afinidad por el antígeno y/o promoviendo el paso de IgM a IgG, jugando un papel fundamental en el mantenimiento de la respuesta inmune humoral "in vivo"^{40, 41}.

Las zonas oscura y clara (basal y apical) de los centros germinales representan diferentes compartimientos en la proliferación y diferenciación de LB. Ambos compartimientos tienen un microambiente específico, influenciado por CFD. Los subtipos más indiferenciados de CFD predominan en la zona oscura, y los más diferenciados se encuentran en la zona clara basal⁴². Los LB al tomar contacto con el antígeno específico en los folículos linfoides primarios, dan lugar a centoblastos que migran al interior del folículo, formando la zona oscura del centro germinal y dan origen continuamente a centocitos sin capacidad de división, que migran a la región basal, donde interactúan con las CFD y LT. Los centocitos con alta afinidad por el antígeno expresado por la CFD, serán positivamente seleccionados, pasando a la zona apical más clara donde podrán diferenciarse en linfocitos B de memoria, o formadores de anticuerpos, dependiendo de la señal estimuladora que recibe de CFD. Los LB no seleccionados entran en la vía apoptótica (Fig. 4).

Ultraestructura de la célula folicular dendrítica

El estudio ultraestructural de las células foliculares dendríticas del centro germinativo de los folículos linfoides muestra una apretada red interconectada entre estas células y las linfoides. Las CFD presentan un cuerpo celular elongado con uno o dos núcleos, muchas veces bilobulado y un discreto nucleolo. El escaso citoplasma del cuerpo celular se halla ocupado por mitocondrias, retículo endoplasmático rugoso, aparato de Golgi y vesículas. El rasgo más característico de las CFD es la presencia de largas prolongaciones citoplasmáticas de-

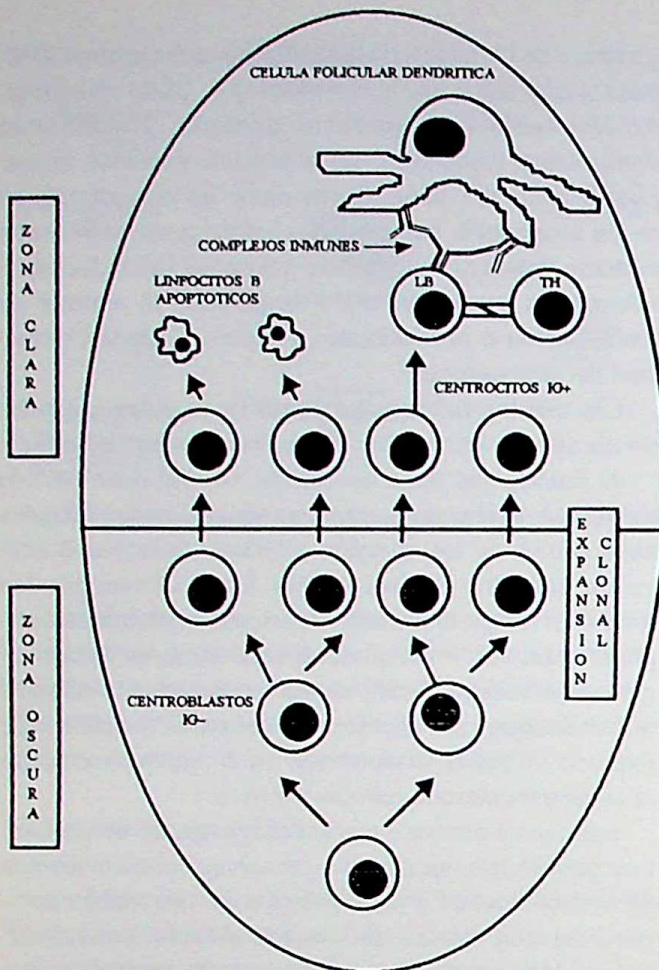


Fig. 4.- Organización del centro germinal: Los LB antígeno-específicos se transforman en centoblastos, que conforman la zona oscura. Allí proliferan dando origen a centrocitos no mitóticos, que migran a la zona clara basal, donde interactúan con CFD y Lth. Los centrocitos con alta afinidad por el antígeno presentado por la CFD se diferencian a LB de memoria o a células formadores de anticuerpos. Los no seleccionados entran en un proceso de apoptosis.

nominadas procesos dendríticos. Aunque algunos autores han reportado la presencia de una red de microtúbulos que se irradian desde la región perinuclear hasta el proceso dendrítico, la mayoría carece de organelas u otra estructura subcelular identificable⁴²⁻⁴⁴.

La presencia de estos múltiples procesos citoplasmáticos le confiere a la célula un aspecto de velo y le permite interconectarse con otras células dendríticas y con linfocitos.

La intrincada red de procesos dendríticos retiene antígenos extracelularmente, los cuales serían posteriormente presentados a las células inmunocompetentes en forma de complejos antígeno-anticuerpo.

Una forma especial de célula dendrítica son las células de Langerhans que se observan a nivel de los tejidos de revestimiento epitelial. Estas células se caracterizan por la presencia constante de organoides intracitoplasmáticos con un tamaño variable entre 100_{nm} y 1_{µm} y con forma de disco con extremos vesiculados, denominados gránulos de Birbeck.

La incorporación de la microscopía electrónica de barrido al estudio de la estructura de la célula dendrítica permitió identificar dos subtipos de CFD, basados en la morfología que presentaban los procesos citoplasmáticos, describiéndose así un tipo de CFD con procesos filiformes y otro tipo con procesos dendríticos de aspecto arrosariado, existiendo además formas intermedias. Estudios realizados "in vitro", indicarían que los procesos filiformes madurarían y se convertirían en procesos arrosariados³⁹.

Una estructura que merece una mención aparte son los icosomas o cuerpos cubiertos de complejos inmunes. Estas estructuras de forma esférica de 0,3 a 0,4 µm de diámetro se observan frecuentemente y en forma transitoria en los centros germinales en desarrollo. Los icosomas son producidos por la interacción de las prolongaciones citoplasmáticas de dos células foliculares dendríticas entre el día 1º y 3º posteriores a un segundo desafío antigénico, hallándose constituidos por complejos inmunes³⁹.

Células dendríticas y autoinmunidad

Las células dendríticas han sido estudiadas en diversas enfermedades autoinmunes humanas y experimentales. Aunque la patogenia difiere en cada una de ellas, existen similitudes llamativas en el comportamiento de estas células cuando se aíslan de los tejidos afectados. De hecho, las CD aisladas de la sinovial de la Artritis Reumatoidea, de la Psoriasis, de la Enfermedad de Crohn y de la Diabetes Autoinmune Insulino Dependiente, tienen aumentada la expresión de moléculas del MHC y coestimuladoras de la familia B7 (CD80 y CD86)⁴⁵. Por otra parte, estas enfermedades comparten, por lo menos en los estadios más tempranos, un patrón similar de infiltración inflamatoria consistente en acúmulos de CD perivasculares rodeados por linfocitos CD4⁺. Surge un componente vascular de tipo HEV (vénulas postcapilares de endotelio alto) donde se realiza la migración de CD y linfocitos circulantes. A pesar que las sustancias quimiotácticas involucradas no son del todo conocidas, existen evidencias que indican que podrían tratarse de quimioquinas y de GM-CSF (factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas). Estos factores inducen la maduración en las CD, al incrementar la expresión de moléculas de clase II y coestimuladoras. De esta manera, en los órganos "blanco" dañados por mínimos traumatismos, se produciría un microambiente rico en citoquinas (especialmente GM-CSF y TNF-α) y antígenos propios. Estos antígenos captados por las CD que migraron de la circulación y maduraron al influjo de las citoquinas, serían presentados a los linfocitos T dando lugar a una fuerte respuesta inmune "in situ" y en los ganglios linfáticos regionales, amplificando y perpetuando el daño en el tejido afectado⁴⁶.

Células dendríticas y dermatitis de contacto: Las células dendríticas juegan también un papel crítico en las dermatitis de contacto. Las células de Langerhans internalizan los alérgenos. Con la carga antigénica migran hacia la dermis y de allí a los ganglios linfáticos regionales para efectuar la presentación a los linfocitos CD4+. Con posteriores desafíos antigénicos, la memoria T CD4 dependiente, desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias responsables de los mecanismos fisiopatológicos de esta reacción de hipersensibilidad⁴⁷.

Células dendríticas y atopia: El hallazgo de un número incrementado de células dendríticas en la piel y mucosa bronquial de individuos atópicos, ha sugerido que dichas células cumplirían un rol importante en la patogenia de las enfermedades atópicas. Se han identificado en la superficie de estas células, receptores para porción Fc de las inmunoglobulinas E, moléculas biológicamente relevantes en la presentación de los alérgenos y activación de linfocitos Th2, los cuales desencadenan y perpetúan una fuerte respuesta tanto humoral como celular en este tipo de enfermedades ²⁶.

Células dendríticas y virus

Las células de Langerhans (CL) son las principales APC de los epitelios planos estratificados. Como tales cumplen un papel fundamental en la captación de antígenos que penetran a través de la piel como es el caso de algunos virus. En nuestro laboratorio, hemos podido comprobar que en la infección experimental del cobajo con virus aftoso, las CL son las primeras en incorporar el antígeno y en presentarlo a las células inmunocompetentes⁴⁸.

En el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se ha demostrado la presencia de CL epidérmicas conteniendo antígeno viral en biopsias de piel de pacientes infectados. La vagina, cuello uterino, ano y cavidad oral están recubiertos por epitelio plano estratificado, ricos en CL, las que constituyen la puerta para la infección viral. Las CL infectadas migran al tejido conectivo dérmico y presentan el virus a los linfocitos CD4+ y de allí pasan a ganglios linfáticos. Ellas son capaces de retener largo tiempo el virus siendo, por lo tanto, un reservorio del mismo⁴⁹. Las CD del centro germinativo de los ganglios linfáticos captan los complejos inmunes formados por el virus, los cuales quedan atrapados en la superficie de las mismas. Los linfocitos CD4+ que transitan a través del tejido linfático son infectados y mueren. El virus liberado se une a anticuerpos específicos y es recapturado por las CD. También hay virus internalizado en las mismas, permaneciendo en forma latente por largo tiempo⁵⁰. Sin embargo, por efecto citopático del virus las CD pueden morir, lo que aumentaría el virus circulante. Estos acontecimientos están asociados a una des-

trucción de los centros germinativos y a la aparición de infecciones oportunistas⁵¹.

Es conocido que en esta patología el sistema inmune puede responder de dos formas diversas. Por un lado hay una persistente estimulación con adenopatía generalizada, activación de CD8+ y producción de anticuerpos. Por otra parte puede haber una importante depleción de CD4+ y el desarrollo de inmunodeficiencia. Las CD pueden estar involucradas en ambos procesos. Las CD humanas, infectadas con bajas dosis de HIV estimulan la proliferación de linfocitos T citotóxicos, y por lo tanto generan una inmunidad protectora contra HIV y otros antígenos. Si son infectadas con altas dosis de virus, in vivo o in vitro, fallan en la respuesta estimulante de células T.

Estudios realizados en pacientes tratados con Zidovudina muestran que la función de las CD es restaurada por el tratamiento, por lo tanto estas células pueden actuar como efectoras deletéreas o protectoras, dependiendo de la dosis de infección. El objetivo de la terapia sería reducir la carga viral de forma tal, que permitiera el desarrollo de una inmunidad efectiva.

Si CD de pacientes infectados son enfrentadas a linfocitos T citotóxicos de individuos sanos, se produce una respuesta inmune específica contra los péptidos virales. Este sistema puede ser utilizado para identificar potenciales inmunógenos para el desarrollo de una vacuna contra HIV²⁴.

Células dendríticas y cáncer

Numerosos cánceres humanos están infiltrados por CD. El carcinoma broncogénico⁵², el adenocarcinoma gástrico⁵³, el adenocarcinoma de colon, el carcinoma nasofaríngeo^{54,55}, el carcinoma papilar de tiroides, el carcinoma laríngeo⁵³, el carcinoma de cuello uterino⁵⁶, el carcinoma de riñón⁵⁷, el carcinoma de esófago⁵⁸ y el melanoma de piel constituyen ejemplos de ello. Clásicamente se ha correlacionado este hecho con un pronóstico favorable de la enfermedad, dado que las CD podrían ser capaces de inducir y mantener una respuesta inmune apropiada capaz de inhibir el crecimiento tumoral y la posibilidad de dar metástasis. Aunque el mecanismo de acción de las CD que infiltran tumores aún no está del todo aclarado, el hecho de encontrarse en íntimo contacto con las células neoplásicas sugiere una función captadora y presentadora de antígenos tumorales a las células efectoras de la respuesta inmune. No obstante, se ha demostrado que en algunos casos, las células tumorales presentan péptidos sintetizados por ellas mismas en el contexto de las moléculas de clase I del MHC, estimulando directamente a los linfocitos CD8+⁵⁹⁻⁶⁰. En nuestro laboratorio, a través del estudio de tumores mamarios malignos humanos, hemos detectado la pre-

sencia de un antígeno tumoral asociado al receptor de estrógeno (HSP 27), en las CD de ganglios no metastásicos regionales⁶¹.

Se ha observado en animales de experimentación que la inoculación de CD desafiadas con antígenos tumorales disminuye el crecimiento tumoral. Sin embargo, en muchos casos las células tumorales liberan sustancias inhibitorias que impiden la funcionalidad de las CD por lo que el tumor escapa al control del sistema inmune, produciéndose la progresión del mismo²⁴. Esto se observa en el carcinoma de células renales, donde a pesar de encontrarse un importante infiltrado de CD, los bajos niveles de moléculas coestimuladoras B7-2 en estas células inducirían una tolerancia al tumor. Este hecho además, estaría relacionado con la elaboración por parte de las células tumorales de IL-10 que actúa como una molécula supresora de la función de CD⁵⁷.

Actualmente se ha identificado una subpoblación de CD que expresa CD8+, localizada en las áreas centrales y periféricas de tumores junto con células inflamatorias y linfocitos T. Estas CD pueden producir lisis de clones de linfocitos T específicos para antígenos tumorales, mecanismo que explicaría la progresión de ciertos tumores a pesar de estar densamente infiltrados por CD⁶².

En lesiones preneoplásicas, como las displasias de cuello uterino, el número de CD intraepiteliales está en relación directa con el grado de maduración epitelial⁶³, y en los carcinomas 'in situ' se ha observado una marcada depleción de células de Langerhans con respecto a controles normales⁵⁶.

Posibilidades terapéuticas

A pesar de que las CD, como hemos señalado en esta revisión, están asociadas a enfermedades autoinmunes, infecciosas y neoplásicas actuando como células APC, esta propiedad aún no ha sido utilizada con fines terapéuticos, con excepción del caso de los tumores malignos.

Como es conocido, las células tumorales pueden expresar diversos antígenos, que generalmente provienen de proteínas elaboradas por las mismas células, luego de haber sufrido variadas mutaciones genéticas.⁶⁴

De la presencia conjunta de antígenos tumorales y de CD, estratégicamente distribuidas en el estroma de tumores y en ganglios regionales, podría esperarse una respuesta inmune antitumoral eficaz. Sin embargo, habitualmente, los tumores crecen y metastatizan. Se ha sugerido que este hecho podría deberse a que las CD que infiltran tumores son generalmente inmaduras y por lo tanto pobres como APC. Esta inmadurez respondería a la producción de factores solubles inhibitorios por las células tumorales⁶⁵. Las terapéuticas actuales están orientadas a desafiar a las CD con antígenos tumorales a fin

de incrementar su función de célula presentadora. El principal inconveniente a esta terapéutica es la dificultad de obtener un número suficiente de CD puras. Actualmente, se han perfeccionado métodos de cultivo a partir de células progenitoras obtenidas en sangre y cultivadas durante 7 días con CSF y TNF- α ⁶⁶.

El protocolo terapéutico potencial requiere el aislamiento de CD, de pacientes con cáncer, su exposición al antígeno tumoral obtenido de la remoción quirúrgica del tumor, y la posterior reinyección en el paciente de estas células sensibilizadas. Es posible que los LT del paciente requieran una frecuente estimulación con las CD, a fin de mantener un nivel de activación óptimo⁶⁷⁻⁶⁸. Se ha sugerido que la administración concomitante de IL-12 favorecería la acción terapéutica al incrementar la respuesta inmune celular antitumoral a través de la inducción de linfocitos T helper 1 (Th1).

Este tratamiento ha sido experimentado exitosamente en ratones: inmunizando los animales con CD desafiadas con péptidos tumorales se ha observado una significativa disminución del crecimiento tumoral, asociada a un incremento de LT citotóxicos, conjuntamente con la producción de citoquinas por los LTh1⁶⁸.

Las propiedades inmunoestimuladoras de las CD pueden ser aumentadas por transducción con genes que codifican CSF, IL-2, IL-12 e IFN γ . Actualmente terapias con CD se están comenzando a utilizar en pacientes con linfomas y melanomas.⁶⁹

Bibliografía

1. Juhlin L, Shelley WB. New staining techniques for the Langerhans cell. *Acta Dermatovener (Stockholm)* 1977; 57: 289-96.
2. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.
3. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II - Functional Properties in vitro. *J Exp Med* 1974; 139: 380-97.
4. Guery JC, Adorini L. Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to clase II- restrictes T cells. *J Immunol* 1995; 154: 536-44.
5. Klinkert ME. Lymphoid dendritic accessory cells of the rat. *Immunol Rev* 1990; 117: 103-20.
6. Czernielewski J, Vaigot P, Prunieras M. Epidermal Langerhans cells. A cycling cell population *J Invest Dermatol* 1985; 84: 424-6.
7. Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells. *J Clin Invest* 1993; 92: 2587-96.
8. King Ph D, Katz DR. Mechanisms of dendritic cell function. *Immunol Today* 1990; 11: 206-11.
9. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.
10. Auslyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. Isolation and characterization of dendritic cells

- from mouse heart and kidney. *J Immunol* 1994; 152;5:2401-10.
11. Laguens G, Goñi Jr JM, Laguens M, Goñi JM, Laguens R. Demonstration and characterization of HLA-DR positive cells in the stroma of human endometrium. *J Reprod Immunol* 1990; 18: 179-86.
 12. Ulvestad E, Williams K, Bjerkgvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 1994; 6: 732-40.
 13. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93.
 14. Girolomoni G, Ricciardi- Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997; 18: 102-4.
 15. Peters JH, Gieseier R, Thielele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today* 1996; 17: 273-8.
 16. Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res* 1995; 55: 1099-104.
 17. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-6.
 18. Thomas R, Davis LS, Lipsky PE. Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol* 1993; 159: 821-34.
 19. Robinson S, Patterson S. Dendritic cells: from basic studies to therapeutic applications. *Mol Med Today* 1997; 3: 100-1.
 20. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L et al. Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor-dependent Long-Term Cultures. *J Exp Med* 1997; 185: 317-28.
 21. Borkowski TA, VanDyke BJ, Schwarzenberger K, McFarland VW, Farr AG, Udey MC. Expression of E-cadherin by murine dendritic cells: E-cadherin as a dendritic cell differentiation antigen characteristic of epidermal Langerhans cells and related cells. *Eur J Immunol* 1994; 11: 2767-74.
 22. Austyn JM, Kupiec-Weglinski JW, Hankins DF, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse-Homing to T-cell-dependent areas of spleen and binding within marginal zone. *J Exp Med* 1988; 167: 646-51.
 23. Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ. Migration patterns of dendritic cells in the mouse-traffic from the blood, and T-cell dependent and independent entry to lymphoid tissues. *J Exp Med* 1988; 167: 632-45.
 24. Knight SC, Stagg A, Hill S, Fryer P, Griffiths S. Development and function of dendritic cells in health and disease. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 33s -8s.
 25. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard W, Betjes M, Bhardwaj N et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82: 487-93.
 26. Stingl G, Bergstresser PR. Dendritic cells: a major story unfolds. *Immunol Today* 1995; 16: 330-3.
 27. Roitt I, Brostoff J, Male D. Development of the immune system. Immunology, Fourth Edition. London: Mosby, 1996 Chapter 10: 1-14.
 28. Hauss P, Setz F, Cavazzana Calvo M, Fischer A. Characteristics of antigen-independent and antigen-dependent interaction of dendritic cells with CD4+ cells. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2285-94.
 29. Johnson JS, Jenkins MK. Co-stimulatory functions of antigen-presenting cells. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 625-58.
 30. Zhou L, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the Immunoglobulin superfamily. *J Immunol* 1995; 154: 3821-35.
 31. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995; 375: 6527: 151-5.
 32. Roitt I, Brostoff J, Male D. Cell cooperation in the antibody response. Immunology, Fourth Edition. London: Mosby, 1996 Chapter 8: 1-13.
 33. Nickoloff BJ, Turka LA. Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol Today* 1995; 15: 464-8.
 34. Braathen LR, Thorsby E. Human epidermal Langerhans cells are more potent than blood monocytes in inducing some antigen-specific T-cell responses. *Br J Dermatol* 1983; 108: 139-46.
 35. Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJ, van Hellemond JJ, Neeffjes JJ, Kast WM et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 1995; 154: 5715-24.
 36. Bucana CD, Munn CG, Song MJ, Dunner K, Kripke ML. Internalization of the molecules into Birbeck granule-like structures in murine dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 365-73.
 37. Steinman R, Hoffman L, Pope M. Maturation and migration of cutaneous dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1995; 105 (suppl.1): 2s-7s.
 38. Szakal AK, Kapasi ZF, Masuda A, Tew JG. Follicular dendritic cells in the alternative antigen transport pathway: microenvironment, cellular events, age and retrovirus related alterations. *Semin Immunol* 1992; 4: 257-65.
 39. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune responses. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 91-109.
 40. Helm SL, Burton GF, Szakal AK, Tew JG. Follicular dendritic cells and the maintenance of IgE responses. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2362-9.
 41. Clark EA, Grabstein KH, Gown AM, Skelly M, Kaisho T, Hirano T, et al. Activation of B Lymphocyte Maturation by a Human Follicular Dendritic Cell Line, FDC-1. *J Immunol* 1995; 155: 545-55.
 42. Rademakers LH. Dark and light zones of germinal centres of the human tonsil: an ultrastructural study with emphasis on heterogeneity of follicular dendritic cells. *Cell-Tissue-Res* 1992; 269: 359-68.
 43. Pulendran B, van Driel R, Nossal G. Immunological tolerance in germinal centres. *Immunol Today* 1997; 18: 27-31.
 44. Setum CM, Serie JR, Hegre OP. Dendritic cell/lymphocyte clustering: morphologic analysis by transmission electron microscopy and distribution of gold-labeled MHC class antigens by high-resolution scanning electron microscopy. *Anat Rec* 1993; 235: 285-95.
 45. Reiser H, Stadecker M. Coestimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. *N Engl J Med* 1996; 335: 18: 1369-77.
 46. Albani S, Carson DA. A multistep molecular mimicry hypothesis for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Immunol Today* 1996; 17; 10: 466-70.
 47. Roitt I, Brostoff J, Male D. Hypersensitivity -Type IV.

- Immunology, Fourth Edition. London: Mosby, 1996, Chapter 22: 1-17.
48. Di Girolamo W, Salas M, Laguens RP, Role of Langerhans cells in the infection of the Guinea-pig epidermis with foot-and-mouth disease virus. *Archiv Virol* 1985; 83: 331-6.
 49. Zambruno G, Giannetti A, Bertazzoni U, Girolomoni G. Langerhans cells and HIV infection. *Immunol Today* 1995; 16; 11: 520-4.
 50. Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262: 1011-8.
 51. Fox CH, Cottler-Fox M. The pathobiology of HIV infection. *Immunol. Today* 1992; 13: 353-6.
 52. Tazi A, Bouchonnet F, Grandsaigne M, Boumsell L, Hance AJ, Soler P. Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. *J Clin Invest* 1993; 91: 566-76.
 53. Rucci L, Bani D, Gallo O, Arbi Riccardi R, Borghi Cirri MB, Fini-Storchi O. Interdigitating cells in the peritumoral infiltrate of laryngeal carcinomas: an immunocytochemical and ultrastructural study. *ORL* 1991; 53: 349-56.
 54. Kerrebijn JD, Balm AJ, Knecht PP, Meeuwis CA, Drexhage HA. Macrophage and dendritic cell infiltration in head and neck squamous-cell carcinoma; and immunohistochemical study. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38: 31-7.
 55. Tas MP, Simons PJ, Balm FJ, Drexhage HA. Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 36: 108-14.
 56. Morris HB, Gatter KC, Sykes G, Casemore V, Mason DY. Langerhans cells in human cervical epithelium: effects of wart virus infection and intraepithelial neoplasia. *Br J Obstet Gynecol* 1983; 90: 412-20.
 57. Thumher M, Radmayr C, Ramoner R, Ebner S, Bock G, Klocker H et al. Human renal-cell carcinoma tissue contains dendritic cells. *Int J Cancer* 1996; 67: 1-7.
 58. Furihata M, Ohtsuki Y, Ido E, Iwata J, Sonobe H, Araki K et al. HLA-DR antigen and S-100 protein-positive dendritic cells in esophageal squamous cell carcinoma-their distribution in relation to prognosis. *Virchows Arch, Cell Pathol Mol Pathol* 1992; 61: 409-14.
 59. Ostrand Rosenberg S. Tumor immunotherapy: the tumor cell as an antigen-presenting cell. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 722-7.
 60. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today* 1997; 18: 267-8.
 61. Laguens G, Di Girolamo W, Spinelli O, Laguens RP. Identificación de un antígeno tumoral asociado al receptor estrogénico en ganglios linfáticos axilares de pacientes con cancer mamario. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 269-72.
 62. Chaux P, Hammann A, Martin F, Martin M. Surface phenotype and functions of tumor-infiltrating dendritic cells: CD8 expression by a cell subpopulation. *Eur J Immunol* 1993; 23: 2517-25.
 63. Di Girolamo W, Goñi J, Laguens RP. Langerhans cells in squamous metaplasia of the human uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 1985; 19: 38-41.
 64. Gimm CD, Morrison VW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussioutis VA, Freeman GJ, et al. Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nature Med* 1996; 2: 1367-70.
 65. Grabbe S, Belssert S, Schwarz T, Granstein R. Dendritic cells as initiators of immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today* 1995; 16: 117-20.
 66. Reid CD, Fryer P, Clifford C, Kirk A, Tikerpae J, Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* 1990; 76, 6: 1139-49.
 67. Gabrilovich DI, Ciernik F, Carbone D. Dendritic cells in antihumor immune responses-I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell Immunol* 1996; 170: 101-10.
 68. Gabrilovich DI, Nadaf S, Corak J, Berzofsky JS, Carbone DP. Dendritic cells in antitumor immune responses-II. Dendritic cells grown from bone marrow precursors, but not mature DC from tumor-bearing mice, are effective antigen carriers in the therapy of established tumors. *Cell Immunol* 1996; 170: 111-9.
 69. Robinson S, Patterson S. Dendritic cells: from basic studies to therapeutic applications. *Mol Med Today* 1997; 100-1.

- - -

Man can climb to the highest summits, but he cannot dwell there long.

El hombre puede trepar hasta las más altas cumbres, pero no puede permanecer allí mucho tiempo.

Bernard Shaw (1856-1950)

Candida, act. III