



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Modulación *in vitro* del proceso de
diferenciación y maduración de CD mediante
la interacción de células troncales
mesenquimales y células tumorales

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

DANIA NANES SARFATI



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA ENRÍQUEZ

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Nanes

Sarfati

Dania

52514377

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

412012844

2. Datos del tutor

M en C

Miguel Ángel

Herrera

Enríquez

3. Datos del sinodal 1

Dra

Gabriela

Piñón

Zárate

4. Datos del sinodal 2

Dr

Jaime Iván

Velasco

Velázquez

5. Datos del sinodal 3

Dra

Martha Luz

Ustarroz

Cano

6. Datos del sinodal 4

M en C

Patricia

Torres

Barrera

7. Datos del trabajo escrito.

Modulación *in vitro* del proceso de diferenciación y maduración de CD mediante la interacción de células troncales mesenquimales y células tumorales

67 p

2017

Índice

Resumen	5
Justificación	7
Objetivos	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
Métodos	8
Revisión bibliográfica.....	8
Propuesta experimental.....	8
Las células dendríticas	9
Origen y diferenciación	9
Clasificación de CD	11
Reconocimiento de patógenos y maduración de CD	12
Participación de CD en distintas patologías	17
Cáncer	17
Enfermedad injerto contra huésped	19
Uso terapéutico de las CD	20
Células dendríticas efectoras.....	20
Células dendríticas tolerantes.....	21
Estimulación de la maduración de CD <i>in vitro</i>	22
Citocinas.....	23
Factores de crecimiento	25
Interacciones celulares	25
Células troncales mesenquimales	27
Localización y función.....	27
Secretoma de MSC.....	29
Modulación de MSC	30
Citocinas.....	31
Interacciones celulares	32
Interacción entre cáncer y MSC	33
Interacción celular entre CD y MSC	36
Cáncer, CD y MSC	38
Uso terapéutico de MSC y su sobrenadante	40

Propuesta experimental	43
Diseño experimental	43
Métodos	44
Células tumorales HCC1954.....	45
Cultivo y acondicionamiento de WJ-MSK	45
Obtención de GM-CSF de cultivo de células CHO	45
Diferenciación de moCD.....	45
Evaluación de los efectos en la maduración de moCD	46
Análisis estadístico.....	46
Resultados.....	47
Diferenciación de moCD en presencia de snMSC-HCC1954.....	47
Expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 por moCD en presencia de snMSC-HCC1954	49
Expresión del ligando 2 de muerte programada CD273 por moCD en presencia de snMSC-HCC1954	49
Discusión	49
Conclusiones	53
Literatura citada	54

Agradecimientos

A Mike por su guía en este proyecto.

A Gaby por su disposición y apoyo.

A todos en el laboratorio por su compañía y sus ideas.

A mi familia por su apoyo incondicional y por motivarme a superarme constantemente.

A la UNAM por abrirme las puertas hacia la ciencia.

Resumen

Las células dendríticas (CD) tienen la capacidad de adoptar distintos fenotipos, ya sea activadores o tolerogénicos. En un individuo sano estas poblaciones se encuentran en equilibrio funcional. En distintas patologías observamos un desbalance en sus poblaciones. En enfermedades autoinmunes se observa un incremento de CD activadas, causando la proliferación de linfocitos T y por lo tanto una actividad agresiva contra el propio cuerpo. La actividad exacerbada causa muerte celular y puede ser mortal. En cambio en cáncer la respuesta inmune es suprimida y la población de CD tolerogénicas (tolCD) aumenta. Las tolCD promueven la inhibición de los linfocitos T o la activación de linfocitos T reguladores (Treg).

El microambiente tumoral tiene efectos inmunosupresores, protegiendo así al tumor contra el reconocimiento y ataque del sistema inmune, promoviendo un fenotipo inmunosupresor en CD. Lo cual se debe a las señales producidas por las propias células tumorales, así como por las células mesenquimales (MSC) presentes en el microambiente tumoral. El uso de esta interacción podría ser utilizado para la producción de tolCD, para utilizarlas en la recuperación del equilibrio inmunológico en enfermedades autoinmunes.

La revisión bibliográfica del tema llevó a la propuesta de un diseño experimental para evaluar el efecto sobre la maduración de células dendríticas de médula ósea (moCD) de ratón en presencia del sobrenadante de células mesenquimales de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJ-MSC, por sus siglas en inglés) precondicionadas con células de cáncer. Con este diseño experimental se busca identificar la capacidad del sobrenadante de WJ-MSC (SN-WJMSC) precondicionadas con cáncer en la modificación del microambiente donde maduran las moCD, y por consecuencia producir una población más grande de tolCD con la finalidad de utilizar esta población en el tratamiento de GVHD y enfermedades autoinmunes.

En el experimento preliminar llevado a cabo observamos que el uso de SN-WJMSC tiene un efecto negativo sobre la diferenciación de CD cuantificado por la baja expresión de CD11c. Además se observó que el uso de los distintos sobrenadantes aumenta la presencia de moléculas co-estimuladoras. Es imprescindible la evaluación del protocolo con el uso de células únicamente de una especie para evaluar los efectos de los tratamientos sobre las CD. Asimismo es necesaria la evaluación de la secreción de IL-10 e IL-12 para poder tener resultados certeros de la función de las CD tratadas.

Glosario de abreviaturas

CTLA-4	Antígeno de linfocito citotóxico 4
CD	Células dendríticas
cCD	Células dendríticas convencionales (1 y 2)
moCD	Células dendríticas de médula ósea
pCD	Células dendríticas plasmacitoides
tolCD	Células dendríticas tolerogénicas
CD#	Cluster de diferenciación # (4, 11c, 40, 80, 86, etc.)
NK	Células “natural killers” (asesina natural)
HSC	Células troncales hematopoyéticas
MSC	Células troncales mesenquimales
WJ-MSC	Células troncales mesenquimales de la gelatina de Wharton de cordón umbilical
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
DMDI	Diabetes mellitus dependiente de insulina
GVHD	Enfermedad injerto contra huésped
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
NFκB	Factor nuclear de potenciador de cadenas ligeras kappa de células B activadas
Irf4	Factor regulador de interferón 4
Irf8	Factor regulador de interferón 8
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN-γ	Interferón gamma
IL-#	Interleucina - 1 β , 2, 4, 6, 8, 10, 12, 12/23, 17
TRAIL	Ligando de inducción de apoptosis relacionado a TNF
PD-L1	Ligando 1 de muerte programada 1 (CD274)
PD-L2	Ligando 2 de muerte programada 2 (CD273)
Flt3L	Ligando de tirosina quinasa 3 similar a fms
Treg	Linfocitos T reguladores
MAT	Microambiente tumoral
TCR	Receptor de células T
NO	Óxido nítrico
MAMP	Patrón molecular asociado a microbios
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
CDP	Progenitora común de CD
CLP	Progenitora común linfoide
CMP	Progenitora común mieloide
PGE2	Prostaglandina E2
SN-WJMSC	Sobrenadante de WJ-MSC
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

Justificación

El fenotipo y función de las distintas subpoblaciones de CD es altamente modificable, dependiente de las condiciones del microambiente en el que estas se encuentren, por lo que el éxito de su utilización en distintas estrategias de inmunoterapia, tanto efectoras como tolerogénicas, depende de las condiciones en las que se cultiven. Es por esto que es pertinente evaluar nuevas estrategias de modulación *in vitro* de CD.

Se ha observado anteriormente que la presencia de MSC en el microambiente de CD altera la diferenciación y maduración de estas, provocando una mayor expresión del fenotipo tolerante de CD. Se ha propuesto que el microambiente cancerígeno tiene este mismo efecto en la población de CD correspondiente. Se sugiere que la agresividad del cáncer guarda una relación directa con el grado de inhibición en la diferenciación y maduración de CD, mediado por la secreción diferencial de citocinas y la participación de las MSC como mediadoras en la diferenciación y maduración de CD hacia un perfil tolerante.

Por lo tanto, la revisión bibliográfica de estos temas puede llevar al diseño de mejores propuestas de condicionamientos novedosos para la obtención de tolCD. Además de dilucidar la intrincada relación celular que se presenta en el microambiente tumoral por la presencia de MSC, CD y células tumorales.

Objetivos

Objetivo General

Realizar una revisión bibliográfica acerca de la interacción entre MSC y células tumorales en la regulación de la actividad de las CD y su posible utilización en distintas estrategias terapéuticas.

Objetivos Particulares

1. Revisión bibliográfica sobre CD, su origen, diferenciación, maduración y función, así como su utilización en distintas estrategias inmunoterapéuticas.
2. Revisión bibliográfica sobre el fenotipo y función de MSC, así como su papel en la modulación del sistema inmunológico.
3. Revisión bibliográfica sobre la interacción existente entre las CD, MSC y células tumorales.
4. Identificación de posibles mecanismos por los cuales se puedan modular la maduración y función *in vitro* de células dendríticas mediante la interacción de células troncales mesenquimales y células tumorales para realizar una propuesta experimental para modular el fenotipo de CD mediante la utilización de MSC y células tumorales.

Métodos

4.1 Revisión bibliográfica

Se llevó a cabo una revisión bibliográfica basada en artículos clave sobre los diferentes temas. Se consultaron diferentes revistas científicas a través de PubMed, buscando identificar revisiones de años recientes o artículos experimentales donde se evaluara la interacción entre CD, MSC, y/o células tumorales. Se complementó la búsqueda con artículos en la base de datos de las Bibliotecas Digitales de la UNAM, así como con la plataforma Google Académico. Se utilizaron las siguientes palabras clave (en inglés) en las búsquedas: *dendritic, mesenchymal stem cells, tumor microenvironment, supernatant, cancer*, entre otras.

4.2 Propuesta Experimental

Tomando en cuenta la información bibliográfica acerca del tema, se propuso un diseño experimental con el cual se podría evaluar el efecto del sobrenadante obtenido del condicionamiento de MSC con células de cáncer sobre el fenotipo de CD. Se realizaron pruebas preliminares para confirmar la viabilidad del experimento y poder evaluar si la propuesta es viable.

Células dendríticas

Las CD fueron descritas por primera vez por Steinman y Cohn. Las describieron como células con morfología estrellada, dendrítica y fueron observadas en preparaciones de esplenocitos adherentes (Steinman y Cohn, 1973). Sin embargo, tardaron varios años en ganar importancia y ser reconocidas como células presentadoras de antígenos. Actualmente es indiscutible su importancia en el sistema inmune y se exploran nuevos horizontes con respecto a su modulación y uso terapéutico (Merad, *et al.*, 2013).

Las CD engloban a un grupo heterogéneo de células presentadoras de antígenos, consideradas las más potentes debido a su alta eficiencia en la interacción con linfocitos T (Chung, *et al.*, 2013). Esto permite que los linfocitos T ejerzan su función en reacción al antígeno presentado y lleven a cabo una función inmune o tolerante. Es por esto que las CD representan la conexión entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Su presencia es esencial para la detección de alarminas, patógenos y moléculas no propias y propias en el microambiente y parecen ser esenciales para mantener el sistema inmune en un delicado equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia (Chung, *et al.*, 2013).

Origen y diferenciación

El origen de las CD, tanto en humanos como en ratones, está en las poblaciones de células troncales hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, todas las CD tienen su origen en la médula ósea y a partir de ahí se dirigen hacia los tejidos donde serán residentes y originarán diferentes líneas de CD en los organismos (Sapathy, *et al.*, 2012; Merad, *et al.*, 2013).

En humanos y en ratones las HSC pueden diferenciarse en células progenitoras linfoides (CLP) o células progenitoras mieloides (CMP). Ambas líneas pueden diferenciarse hacia células precursoras de células dendríticas (pre-CD), y a partir de esta población celular se diferencian tanto las CD clásicas (cCD) tipo cCD1 o cCD2 como las CD plasmacitoides (pCD) (Fig. 1). Por otra parte, únicamente las CMP pueden dar origen a las poblaciones de CD conocidas como células de Langerhans y a CD derivadas de monocitos. Las diferentes posibilidades para la diferenciación de CD llevan a la inmensa variedad de CD. Sin embargo, esto no afecta su función (a excepción de las pCD) y pueden ser reconocidas con distintos marcadores de membrana

(Shortman & Liu, 2002; Ishikawa, *et al.*, 2007; Sapathy *et al.*, 2012; Mared, *et al.*, 2013; Pühr, *et al.*, 2016; Castell-Rodríguez, *et al.*, 2017).

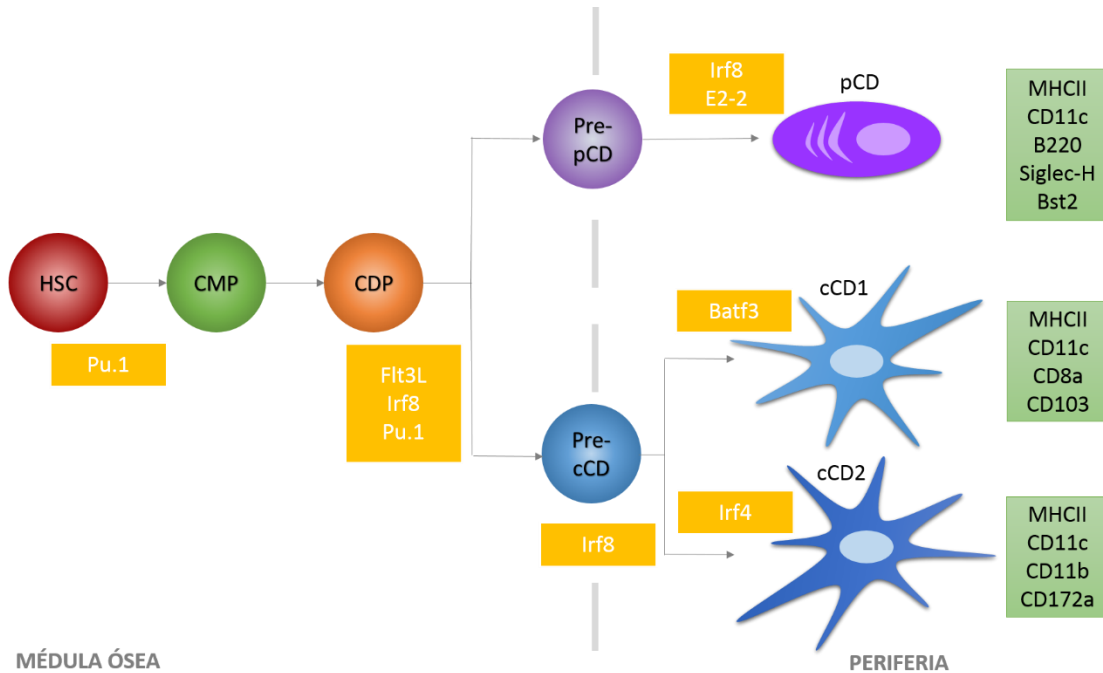


Figura 1. Ontogenia, clasificación y factores de transcripción necesarios para la diferenciación de CD en ratón. La diferenciación hacia CD se deriva de HSC las cuales se pueden diferenciar a CMP o a células progenitoras linfoides (no mostradas para simplificar el diagrama), estas a su vez se diferencian a CDP y posteriormente a pre-pCD o pre-cCD. En este momento pueden salir de la médula ósea y terminar su diferenciación. En los cuadros amarillos se encuentran los factores de transcripción necesarios para la diferenciación en diferentes momentos. Estas vías de diferenciación se encuentran altamente conservadas en humanos. Los recuadros amarillos contienen los factores de transcripción necesarios para la diferenciación en cada etapa. Los recuadros verdes contienen los marcadores de membrana presentes para cada clasificación de CD. Células troncales hematopoyéticas (HSC); células progenitoras mieloides (CMP); células progenitoras comunes de CD (CDP); precursoras de pCD (pre-pCD); precursoras de cCD (pre-cCD); CD plasmacitoides (pCD); CD convencionales 1 (cCD1); CD convencionales 2 (cCD2).

Las CD se originan en la médula ósea, de la cual migran y se alojan en diferentes órganos con un fenotipo inmaduro (Caux, *et al.*, 2000). En general, las CD derivadas de médula ósea se pueden reconocer por los marcadores de membrana: CD11c⁺ y complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II)⁺ (Shortman & Liu, 2002; Ganguly, *et al.*, 2013). Es por esto que estos marcadores son de gran utilidad para la identificación de CD exitosamente diferenciadas *in vitro*. En cuanto las CD procesan algún antígeno, comienza una cascada de señalización que disminuye su capacidad para fagocitar e incrementa su capacidad de migración a los órganos linfoides para activar a los linfocitos T (Caux, *et al.*, 2000).

La diferenciación de CD a partir de sus progenitores es dependiente de diferentes señalizaciones del microambiente, tanto en humanos como en ratones. La diferenciación de las células progenitoras mieloides (CMP) hacia células comprometidas a CD (pre-CD) requiere principalmente de los factores

de transcripción PU.1, Irf8 y el ligando de Flt3 (Flt3L) (Fig. 1) (Becker, *et al.*, 20112; Belz y Nutt, 2012). Se ha reconocido que Flt3L es una molécula imprescindible para la diferenciación de CD *in vivo* (McKenna, *et al.*, 2000; Karunsky, *et al.*, 2003; Motta y Rumjanek, 2016). Carotta, *et al.* (2010) identificó que PU.1 (codificado por *Sfpi1*) regula de manera dependiente de la concentración a Flt3L, y concluye que esta cadena de señalización es esencial para la diferenciación. De hecho, se ha observado que PU.1 afecta también otros componentes importantes de CD como el receptor de GM-CSF, MHC II y las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Hohaus, *et al.*, 1995). Estas señalizaciones para la diferenciación de pre-CD se mantienen conservadas en humanos y ratones (Seillet y Belz, 2013).

Las pre-CD son las primeras células de esta vía de diferenciación que salen de la médula ósea a la sangre; estas migran y se localizan en diferentes tejidos donde podrán terminar su diferenciación. No obstante, esta diferenciación final ocurre tardíamente debido a la baja sobrevivencia de las CD maduras y la plasticidad que confiere el encontrarse como pre-CD para actuar con más precisión cuando se necesita una respuesta inmune (Belz y Nutt, 2012).

Clasificación de CD

Debido a su presencia cosmopolita y a los diferentes fenotipos identificados, a través de los años han existido distintas clasificaciones para las CD. Actualmente, la clasificación más apropiada consiste en dos grandes grupos: las pCD y cCD.

Las pCD son una población celular con una morfología esférica en vez de dendrítica, similar a las células plasmáticas. Esta población celular es diferenciada de los precursores de células dendríticas gracias a la presencia de factor de transcripción E2-2 (Asselin-Paturel, *et al.*, 2003). Las pCD expresan los marcadores B220, Siglec-H y Bst2 en ratón; y en humano BDCA2 y BDCA4. Funcionalmente difieren de las cCD debido a que no tienen la capacidad de fagocitar, y presentan alto recambio de MHC II; esto las hace bastante ineficientes en la presentación de antígenos ante linfocitos T. Sin embargo, en reacciones infecciosas contra virus, estas células secretan grandes cantidades de interferón (IFN) tipo 1 con lo que desencadenan la activación del sistema inmune (Asselin-Paturel, *et al.*, 2003; Satpathy, *et al.*, 2012; Motta y Rumjanek, 2016). Además, después de su activación sufren un gran cambio morfológico, siendo similares a cCD y adoptan capacidades similares a estas para la presentación de antígenos (Castell-Rodríguez, *et al.*, 2017).

Las cCD son altamente capaces de fagocitar y son las más eficientes procesadoras y presentadoras de antígenos. Este grupo engloba una gran cantidad de subtipos, Williams *et al.* (2014) proponen un sistema sencillo para identificar a estos grupos y los clasifica en dos linajes: cCD1 y cCD2. Las cCD1 incluye a aquellas cCD que expresan CD8a y CD103; a su vez las cCD2 expresan CD11b y CD172a. En humanos las cCD1 expresan BDCA3 (CD141) y las cCD2 expresan BDCA1 (CD1c). Además, esta clasificación separa estos dos linajes debido al requerimiento distinto de factores de transcripción para su desarrollo, en el caso de cCD1 BATF3 es necesario y en el caso de cCD2 se necesita IRF4.

Los grupos anteriormente mencionados comparten un origen común derivado de precursoras de CD y la presencia de Flt3L. Un tercer grupo se deriva de monocitos debido a la presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Williams, *et al.*, 2014). Esta población se diferencia hacia CD cuando entra en contacto con señales inflamatorias, por lo que se les conoce también como CD inflamatorias (Seillet y Belz, 2013; Sapathy, *et al.*, 2012). Esta población celular ha sido ampliamente utilizada debido a la fácil obtención a partir de monocitos de sangre periférica y el claro manejo para su diferenciación *in vitro* (Motta y Rumjanek, 2016).

La función de todas las cCDs consiste en fagocitar y procesar antígenos de los tejidos y del microambiente; erigiéndose como una segunda barrera contra patógenos (se considera a los epitelios como la primera barrera). Una vez que se ha fagocitado un patógeno o antígeno se debe procesar para su presentación. Estos antígenos podrán ser presentados a través de MHC I, MHC II o moléculas presentadoras de antígenos de la familia CD1 (Palucka, *et al.*, 2007).

Posteriormente y debido a la expresión de algunas moléculas como CCR7 y moléculas coestimuladoras, las cCD migran a través de vasos linfáticos aferentes hacia los órganos linfáticos secundarios; donde las cCD interactúan con los linfocitos T naive hasta encontrar un linfocito T reactivo al antígeno específico que presentan. Este reconocimiento causará la activación del linfocito T y puede a su vez promover la activación de linfocitos B. Los linfocitos T activados regresarán a la zona de infección, debido a una cascada de señalización iniciada por quimiocinas, y activarán una respuesta contra el patógeno (Palucka, *et al.*, 2007). Debido al cambio tan drástico de actividad, las CD se consideran altamente plásticas y se pueden encontrar en diferentes estados de maduración (Sapathy, *et al.*, 2012).

Reconocimiento de patógenos y maduración de CD

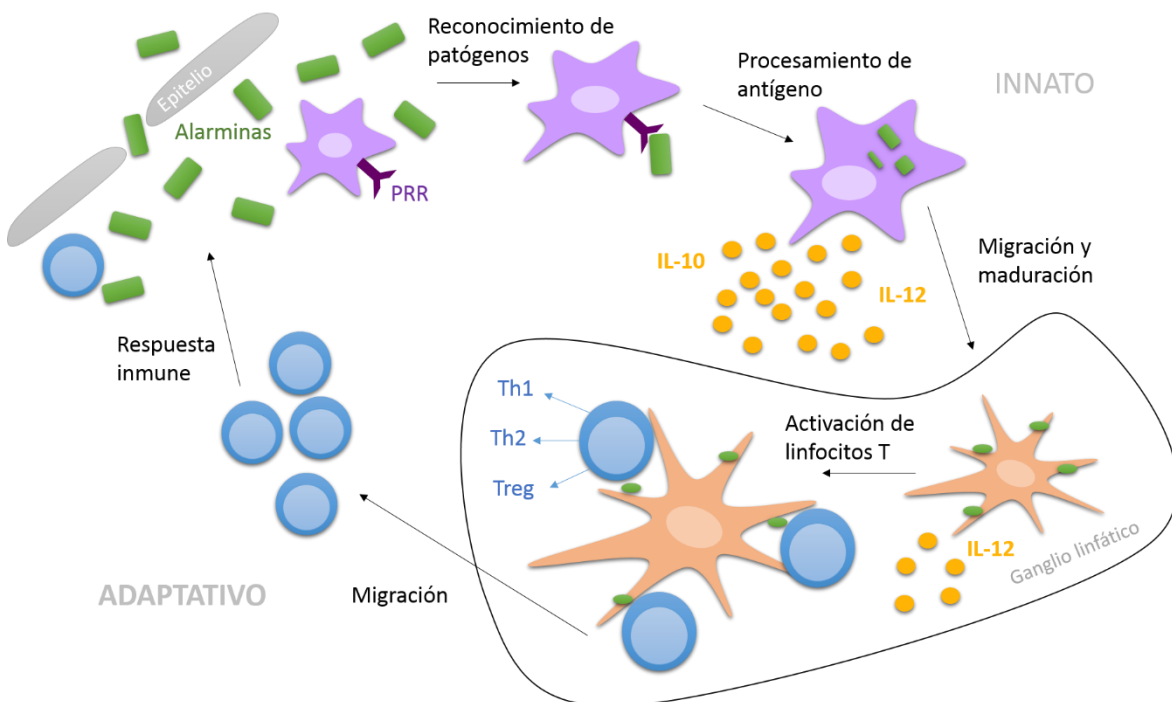
Una vez diferenciadas las CD pueden adquirir diferentes funciones dependiendo de su estado de maduración. Cuando se encuentran en un estado inmaduro, las CD tienen gran capacidad para fagocitar y procesar en vesículas internas las moléculas u organismos ingeridos. Al fagocitar y reconocer como ajenas a las moléculas, las CD maduran (o se activan) y su función se modifica para migrar hacia tejidos linfoides. Ya que han madurado, las CD tienen la función de presentar en su membrana los antígenos e impulsar la maduración de células del sistema inmune adaptativo como linfocitos T, linfocitos B y NK (Woltman & Kooten, 2003). La interacción con linfocitos T puede activar a linfocitos T cooperadores (CD4+) o citotóxicos (CD8+). Los linfocitos T cooperadores migran a la zona donde fue identificada la señal y liberan citocinas para activar a otras células de la región como NK y macrófagos, los cuales a su vez podrán eliminar la amenaza. Los linfocitos T citotóxicos eventualmente identifican a las células afectadas y las lisan. Por otra parte, los linfocitos B maduran cuando existe la interacción entre linfocitos T y CD en el ganglio linfático; la interacción se da a través de los linfocitos T y esto permite la migración de linfocitos B activados y la producción de anticuerpos específicos para el reconocimiento de las señales de peligro. De esta manera, los linfocitos B ayudan a la inmovilización e identificación de patógenos para ser eliminados por NK y macrófagos (Banchereau, *et al.*, 2000).

Otra función de las CD es la tolerancia inmunológica y se adquiere cuando las CD reconocen moléculas propias del organismo o cuando existe una señalización anti-inflamatoria en el medio. Las tolCD ocasionan ya sea la diferenciación de linfocitos T hacia linfocitos T reguladores (Treg) o la inhibición de linfocitos T debido a las citocinas del microambiente y a que la interacción celular que se puede llevar a cabo es más débil con tolCD. En algunas patologías este fenotipo se ve afectado por el microambiente en el que se encuentran las CD y se modifica el equilibrio inmunológico (Dudek, *et al.*, 2013).

En general las CD inmaduras están destinadas a la endocitosis de antígenos en el ambiente para llevar un control y localizar posibles invasores; son parte del sistema inmune innato para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Las CD se encuentran en la mayoría de los tejidos y constantemente censan el microambiente mediante endocitosis y macropinocitosis. El reconocimiento de los PAMPs se da a partir de receptores, incluyendo receptores tipo Toll (TLR), por lo que la expresión de estas moléculas es muy alta en ellas (Janeway, *et al.*, 2002). Al encontrarse con un PAMP, la célula sufre un cambio morfológico debido a una cascada de

señalizaciones guiadas por el aumento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, mismo que guía la migración hacia los ganglios linfáticos (Mellman, 2013). Estos cambios promueven la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, moléculas MHC II y la habilidad de cargar estas con antígenos para su presentación; desencadenan la secreción de citocinas de maduración; y además comienzan la migración hacia los órganos linfoides (Janeway, *et al.*, 2002; Mellman, 2013). Las CD después de estos cambios, que duran entre 12 y 24 horas, se consideran maduras (Fig. 2) (Mellman, 2013).

Figura 2. Generalidades de la función de cCD. La primera barrera contra patógenos es el epitelio, si ésta se ve comprometida encontramos el sistema inmune innato. Las CD inmaduras se encuentran en diferentes tejidos de forma inmadura. En cuanto reconocen un antígeno a través de sus PRR lo procesan y comienzan la migración hacia el ganglio linfático. En el ganglio linfático las CD terminan de madurar, presentan los antígenos en su superficie e interactúan con linfocitos T *naive*; desde este momento se considera ya parte del sistema inmune adaptativo. En cuanto existe un reconocimiento por parte de los linfocitos T, estos son activados y migran con ayuda de quimioattractores de regreso al



lugar donde se encuentra la señal de peligro para producir una respuesta acorde. Las CD también pueden interactuar con otras células del sistema inmune como macrófagos o NK para actuar contra el patógeno reconocido. CD inmaduras (morado); CD maduras (rojo); linfocitos T (azul); patógeno (verde); receptor de reconocimiento de patógenos (PRR).

Las CD maduras adquieren una gran afinidad por linfocitos T, estas interacciones son posibles por las citocinas secretadas y las moléculas expresadas en la membrana de las CD estimuladas por la maduración que permiten la comunicación intercelular. Las CD maduras se encuentran localizadas en los órganos linfoides, debido a la migración desencadenada por el reconocimiento de PAMPs por los TLR, y aquí son capaces de entrar en las

regiones ricas en linfocitos T para la estimulación de estos (Mellman, 2013). La presentación de los antígenos procesados puede darse a través de MHCI o MCHII, dependiendo del antígeno presentado.

La interacción entre linfocitos T y CD está mediada por algunas proteínas de membrana. Las CD maduras expresan moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), estas permiten el reconocimiento con los antígenos funcionales de leucocitos (LFA-1) expresados en la membrana de los linfocitos T (Steinman, 1991). Esta interacción es débil pero permite que los receptores de linfocitos T (TCR) censen al antígeno presentado por las MHCII (Lanzavecchia, *et al.*, 1999). Si el TCR reconoce al antígeno presentado por la CD habrá una reacción inmune, sino simplemente la interacción celular terminará y el linfocito T seguirá interactuando con otras CD (Schwartz, 1992; Lanzavecchia y Sallusto, 2001).

Tabla 1. Citocinas requeridas para la diferenciación final de linfocitos T CD4+ para realizar una actividad específica: Th1, Th2, Th17, Tfh, Treg y su función particular.

	Th1	Th2	Th17	Tfh	Treg
Citocinas activadoras	IFN- γ IL-12	IL-4	TGF- β IL-6 IL-23	IL-6 IL-21	TGF- β IL-2
Respuesta hacia...	Patógenos intracelulares, autoinmunidad	Parásitos extracelulares, alergias, asma	Bacterias extracelulares, hongos, autoinmunidad	Respuesta humoral de largo plazo	Tolerancia, homeostasis, regulación de la respuesta inmune
Referencias	Kallinski, <i>et al.</i> , 1999; Sallusto y Lanzavecchia, 2002	Sallusto y Lanzavecchia, 2002	Weaver, <i>et al.</i> , 2006	Crotty, 2011; Crotty, 2014	Weaver, <i>et al.</i> , 2006

El sistema inmune presenta una gran habilidad para reconocer moléculas externas al cuerpo y eliminarlas debido a la región variable que tienen los linfocitos T que promueven el desarrollo de una amplia gama de reconocimiento molecular. Los linfocitos T se desarrollan en el timo, en donde existe un reordenamiento de la región variable del receptor de linfocitos T (TCR). Este reordenamiento permite gran variabilidad para el reconocimiento de moléculas que posiblemente pudieran afectar al organismo. Este proceso azaroso inevitablemente lleva a la generación de algunos linfocitos T auto-reactivos. La eliminación de estos linfocitos T nocivos es esencial para la vida del organismo; la selección de los linfocitos T adecuados se conoce como tolerancia central (Perry y Hsieh, 2016). Esta actividad protege al organismo contra un reconocimiento de antígenos propios.

Al ser reconocido el antígeno, las CD y los linfocitos T mantienen una interacción más fuerte y se quedan unidas. El linfocito T será activado, pero el tipo de activación será regido por el tipo de interacciones que continúan. Si existe una interacción de CD80 y CD86 (en la CD) con CD28 (en el linfocito T) se producirá una señal de expansión y supervivencia de los linfocitos T (Schwartz, 1992). Esta interacción es esencial para la expansión clonal de los linfocitos T. Posteriormente puede existir una señalización dirigida por citocinas que definirá la diferenciación de los linfocitos T hacia un tipo específico ya sea linfocitos T CD8+ citotóxicos o hacia linfocitos T CD4+, los cuales pueden efectuar respuestas Th1, Th2, Th17, Tfh, o Treg (Tabla 1) (Kallinski, *et al.* 1999; Sallusto y Lanzavecchia, 2002; Gordon, *et al.*, 2014).

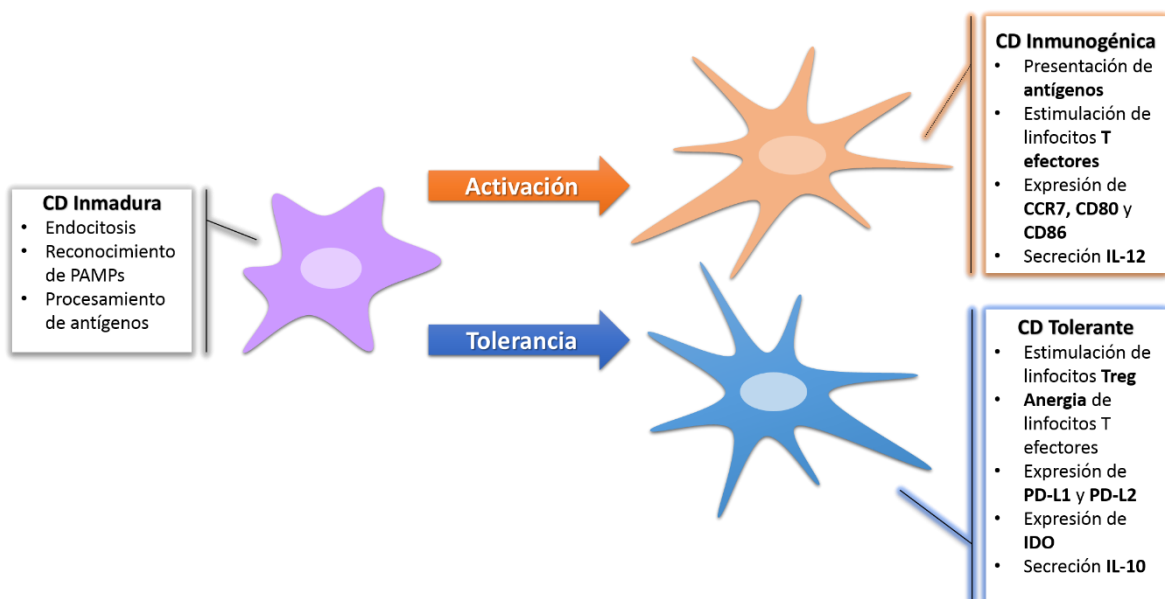


Figura 3. Maduración de CD hacia un fenotipo inmunogénico o tolerante. La maduración de CD es dependiente de muchos factores incluyendo citocinas, interacciones celulares y procesamiento de antígenos. Las CD inmaduras tiene la función principal de procesar antígenos para censar el ambiente y producir una respuesta certera. La maduración hacia un fenotipo inmunogénico produce CD capaces de activar linfocitos T efectoros. Son identificadas por la alta expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86; además de altas secreciones de IL-12 que ayuda con la respuesta inmune. Si la maduración lleva a un fenotipo tolerante, las CD muestran alta expresión de PD-L1 y PD-L2 (CD273 y CD274) y alta secreción de IL-10. Este fenotipo será capaz de causar la diferenciación de linfocitos T hacia Treg, causar la inhibición de los linfocitos T activados, y en algunos casos promover la apoptosis de los linfocitos T efectoros.

La activación de los linfocitos T a su vez estimula la producción de antígeno de linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4) para frenar la interacción y la señalización de CD a linfocitos T (Linsley, *et al.*, 1991). La interacción entre CD80 con CTLA-4 es 20 veces más afín que con CD28 (Linsley, *et al.*, 1991, Schwartz, 1992; Schnider, *et al.*, 2007); esta interacción tiene un efecto inhibitorio sobre los linfocitos T y frena su expansión (Schnider, *et al.*, 2007). De esta manera se mantiene el equilibrio o la homeostasis inmunológica.

Las tolCD están relacionadas con la inducción de tolerancia más que una respuesta inmunogénica. Estas interactúan con linfocitos T, pero en este caso causarán el desarrollo de linfocitos Treg o una inactivación de linfocitos T efectores. Se ha propuesto que, debido a su fenotipo parecido, las CD inmaduras son tolCD; sin embargo, esto sigue en discusión (Yoo & Ha, 2016).

La presencia de PD-L1 y PD-L2, conocidas también como CD274 y CD273 respectivamente, permite que se inactiven los linfocitos T efectores; por lo tanto estas moléculas son altamente expresadas por tolCD. También es característico el perfil de citocinas expresado por las tolCD debido al impacto que tienen estas moléculas sobre la actividad de los linfocitos T. Es característico que la secreción de IL-12 sea baja o nula debido a que esta puede inducir la secreción de TNF- α e IFN- γ los cuales inducen la actividad inmunogénica de los linfocitos T y activan NKs. En su lugar habrá una gran cantidad de IL-10, la cual impide la actividad de linfocitos T y NKs además de inhibir la producción de IL-12, TNF- α e IFN- γ . También se ha observado una gran producción de TGF- β el cual es muy importante para el mantenimiento y vida de los Treg (Fig. 3) (Yoo & Ha, 2016).

La presencia de la enzima Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es también un claro indicador de tolCD. Esta enzima restringe el catabolismo de triptófano, por lo tanto, su presencia causa un cambio en el ritmo de esta ruta metabólica y en consecuencia aumenta la producción de kinureninas. Se ha mostrado que TGF- β impulsa la producción de esta enzima por lo que la expresión de IDO y la secreción de kinureninas es típica de un fenotipo tolerante en CD (Munn, *et al.*, 2002; Pallota, *et al.*, 2011).

Participación de CD en distintas patologías

Las CD tienen la capacidad de desatar una respuesta inmunogénica o tolerogénica dependiendo del fenotipo que adquieren durante su maduración. Es por esto que la regulación de estas poblaciones es muy importante para la comprensión y tratamiento de varias patologías donde el cuerpo sufre de un desequilibrio de cualquiera de estas respuestas.

Cáncer

El cáncer en general es una de las causas de mortandad más importantes en el mundo. Esta serie de enfermedades se atribuye al crecimiento descontrolado de células transformadas. Este crecimiento descontrolado puede evolucionar en metástasis y provocar el desarrollo del

cáncer en más de una región y así causar la muerte de su portador. La cura de esta enfermedad depende de la eliminación de todas las células malignas.

Paul Ehrlich, a principios del siglo 20, propuso que el sistema inmune podría ser utilizado para combatir el cáncer. Sin mucho éxito, las investigaciones continuaron y en los sesentas, después del estudio del rechazo de órganos trasplantados, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas propusieron la teoría de la "vigilancia inmune" en las neoplasias, poniendo otra vez en la mira el papel del sistema inmune en la progresión del cáncer (Burnet, 1970). Esta idea ha llevado a acuñar el término "inmunoedición", utilizado para referirse a los cambios causados por el crecimiento del tumor sobre el sistema inmune. Esta propuesta considera tres fases de crecimiento tumoral relacionadas al sistema inmune: eliminación, equilibrio y escape (Dunn, *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2007).

La fase de "eliminación" se da en las etapas tempranas del tumor, donde varios tipos celulares del sistema inmune pueden reconocer las células cancerosas y promover su eliminación. Varias de estas células son atraídas a la zona por las citocinas pro-inflamatorias derivadas del tumor. Uno de los mecanismos activados en esta fase consiste en que las NK, estimuladas por las citocinas pro-inflamatorias, pueden estimular a las CD para que migren a órganos linfoides y a su vez activen a linfocitos T específicos contra el tumor que se está formando. Esto causará una respuesta citotóxica limitada. Además de esto, las NK y macrófagos atacan directamente al tumor y secretan citocinas que causarán la inhibición de la angiogénesis y la muerte celular (Dunn, *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2007).

Las células cancerosas que sobreviven a este primer ataque inmunológico pasarán a la fase de "equilibrio". En esta fase habrá una selección constante de las células tumorales, lo que causará la selección de las clonas celulares más resistentes a ataques inmunes. Consecuentemente, las células cancerosas son atacadas pero no eliminadas por completo (Dunn, *et al.*, 2002). Esta fase puede durar muchos años (Kim, *et al.*, 2007).

La última etapa es la más peligrosa, conocida como "escape". Las células cancerosas restantes, después de una selección astringente, presentan muy poca inmunogenicidad. En este momento es cuando el tumor comienza a crecer de manera más rápida. Durante este proceso el tumor crea su propio microambiente tumoral (MAT) donde se expresan altas cantidades de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) b, IL-6, IL-10, TGF- β , prostaglandina E2 (PGE2), entre otros factores. Estas señales inmunosupresoras pueden expresarse localmente o afectar otros tejidos y promover así la metástasis (Dunn, *et al.*, 2004; Kim, *et al.*, 2007). Además de modificar la función de las

células del sistema inmune, se ha observado un aumento en la apoptosis de las células del sistema inmune dentro del tumor (Esche, *et al.*, 1999).

En el MAT las CD son tolerantes a las células tumorales y contribuyen a la inmunosupresión observada en tumores cancerosos. Se han identificado diferentes causas para este comportamiento deficiente como hipoxia, acumulación de adenosina, altos niveles de lactato, pH bajo, además de la modificación de citocinas secretadas (Veglia y Gabrilovich, 2017); las cuales afectarán las funciones celulares. Se ha observado que la hipoxia puede disminuir la actividad fagocítica de las CD inmaduras y aumentar su capacidad migratoria; además se ha observado un aumento en la expresión de CD40, CD80 y CD86 en las CD que si diferencian en un ambiente hipóxico. Los efectos observados se atribuyen a la expresión de HIF-1 α , el mecanismo sigue siendo estudiado (Winning y Fandrey, 2016). La acumulación de adenosina permite la activación de la proteína quinasa activada por adenosina monofosfatasa (AMPK), la cual trunca la vía de señalización activada por los TLR en las CD, lo cual permite la actividad inmunogénica, y por lo tanto la CD adquiere un fenotipo tolerante. Por otra parte, se ha observado que la acumulación de lactato en las CD, así como de lactato en el microambiente, inclina a las CD a adquirir un fenotipo tolerante (Dong y Bullock, 2014). Junto con la alta concentración de lactato, el pH bajo puede modificar la secreción de IL-6, IL-12 y TNF- α por lo que se propone que también esto esté afectando la maduración de CD y produciendo tolCD (Seliger y Massa, 2013). Todas estas condiciones, presentes en el MAT, afectan la actividad de las CD y son en parte responsables del ambiente inmunosupresor registrado en los tumores cancerosos.

La alta cantidad del VEGF funciona como quimioatrayentes de células mieloides al MAT. En CD se observa una inhibición de la diferenciación y maduración debido al bloqueo de la cadena de señalización de NF κ B debido a las altas concentraciones de VEGF (Oyama, *et al.*, 1998). Por otro lado, los altos niveles de IL-10 disminuyen la actividad de los linfocitos T efectoras e inhiben la producción de IL-12, citocina relevante para el desarrollo de una respuesta Th1 necesaria para la eliminación de células tumorales. La disminución en estas actividades es similar a los efectos de tolCD y por lo tanto el tumor no es atacado por el sistema inmune y el crecimiento tumoral es permitido (Ruffell, *et al.*, 2014). De hecho, se observó en un modelo de cáncer de mama que el bloqueo de IL-10 a través del uso de anticuerpos contra IL-10R (receptor de IL-10) rescataba la respuesta antitumoral debido a la secreción de IL-12, permitiendo así la activación de linfocitos T (Castro, *et al.*, 2000; Ruffell, *et al.*, 2014).

La presencia de CD inmaduras y tolCD aumenta a su vez la concentración de TGF- β en el MAT, por lo que esta citocina también está implicada en la inducción de tolerancia. Este incremento se ha reconocido como el causante de la proliferación de Treg (CD4+CD25+FoxP3+), aumentando así la tolerancia en la región (Ghiringhelli, *et al.*, 2005). Además, se ha reconocido a TGF- β como un factor de crecimiento que favorece el crecimiento tumoral (Stagg, *et al.*, 2007). Se ha identificado también que PGE2 es un fuerte inhibidor de la diferenciación de CD. El efecto observado sobre CD maduras parece ser contrario, debido a que se promueve la migración hacia órganos linfoides a través de la estimulación de la expresión de CCR7 y moléculas coestimuladoras; sin embargo, la interacción que tienen las CD activadas con PGE2 se ha reconocido como inmunosupresora y no inmunogénica dado que se ha cuantificado una disminución en la secreción de IL-12 por las CD, una disminución en la activación de linfocitos T efectores (CD8+), NK y Th1, y además un efecto atrayente de Treg al MAT (Kalinski, 2012).

En conclusión, el MAT es responsable de muchos de los cambios observados en la respuesta inmune debido a la amplia gama de modificaciones que ocurren en esta región. Las CD juegan un papel importante en la regulación de esta respuesta debido a la conexión que ofrece entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Sus funciones están modificadas por TGF- β , PGE2 e IL-10 mayormente. Al identificar esta deficiencia inmune se han propuesto métodos novedosos de inmunoterapia para activar el sistema inmune y permitir el reconocimiento y destrucción de las células cancerosas.

Enfermedad injerto contra huésped

La enfermedad injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) se manifiesta en trasplantes de tejidos con células inmunocompetentes; en especial en trasplantes de médula ósea y en ocasiones transfusiones sanguíneas. Se caracteriza por causar una activación descontrolada de linfocitos T que causarán daño a diferentes tejidos (Blazar, *et al.*, 2012). Las CD del receptor comienzan esta cadena de reacciones inmunes al presentar antígenos propios a linfocitos T del donador, lo cual los activa y causa el ataque contra tejidos del receptor. De igual manera, las CD del huésped pueden infiltrar el aloinjerto, reconocer moléculas ajenas y activar una respuesta de linfocitos T en contra del tejido trasplantado. La aceptación a largo plazo del tejido trasplantado ocurrirá únicamente cuando los linfocitos T del hospedero se vuelvan tolerantes al aloinjerto (Lipscomb y Masten, 2002).

El desarrollo de GVHD se ha dividido en tres fases. En la fase 1 las CD son activadas por citocinas liberadas en el sitio de daño tisular en el hospedero;

especialmente IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α . Estas CD maduran y presentan antígenos ante los linfocitos T, durante la fase 2. La estimulación de los linfocitos T se da por la presentación cruzada de antígenos alogénicos por cCD a linfocitos T del hospedero. La activación de linfocitos T produce respuestas Th1 y Th2 dirigidas hacia los órganos en cuestión, además de promover la secreción de IFN- γ e IL-2. Una vez en el tejido, se desencadena una serie de reacciones dañinas incluyendo apoptosis celular, secreción de mediadores citotóxicos y ataque por macrófagos; esto causa daño tisular y si no se controla puede causar la muerte (Stenger, *et al.*, 2012).

Debido a estas reacciones exacerbadas, una meta importante de la investigación en cuestión de trasplantes es la comprensión y explotación de tolCD (Lipscomb y Masten, 2002). La recuperación del equilibrio inmune resulta, una vez más, esencial para la sobrevivencia del paciente y el funcionamiento adecuado del sistema inmune.

Uso terapéutico de las CD

Las CD han sido identificadas como partícipes en una amplia gama de patologías. Es por esto que se han tratado de utilizar en sus distintos fenotipos para el tratamiento de muchas enfermedades. El uso de CD como terapias celulares varía entre CD efectoras y tolCD, dependiendo de la enfermedad a tratar. El término común para estas terapias, donde se estimula el sistema inmune de una u otra forma es inmunoterapia.

Células dendríticas efectoras

El uso de la inmunoterapia como tratamiento para el cáncer es actualmente ampliamente estudiado. Una de estas terapias consiste en la administración de vacunas génicas en donde se administran genes de proteínas producidas por el tumor, además de la administración de GM-CSF o Flt3L, para activar a las CD en contra de las células tumorales (Lipscomb y Masten, 2002). Otras terapias se caracterizan por cargar CD *in vitro* con el antígeno tumoral, como los antígenos MAGE, e inyectar estas CD activadas de regreso a la región tumoral para causar una activación del sistema inmune y la disminución del tumor (Piñón-Zárata, *et al.*, 2014). También se han producido estrategias para el uso de exosomas derivados de CD con altas concentraciones de moléculas coestimuladoras y MHC para la activación de las CD (Pitt, *et al.*, 2014).

La producción de inmunoterapias también ha sido utilizada para tratar infecciones como el VIH. Esta tarea ha resultado ser muy compleja debido a la

alta variedad genética que presenta el virus; sin embargo, se han propuesto algunas terapias (Patham, *et al.*, 2011). En un caso se creó una vacuna a base de CD del paciente cargadas con el virus del paciente completo y desactivado con aldritol-2. Esto probó ser efectivo en la reducción del virus en el paciente (Lu, *et al.*, 2004). Otro equipo probó cargar las CD con linfocitos T infectados y apoptóticos; esta prueba resultó ser aún más efectiva que la anterior en la reducción de proteína viral (Zhao, *et al.*, 2002). Otras terapias incluyen el uso del virus o partes del virus exógenos, anticuerpos específicos, péptidos y vectores virales, shRNA y siRNA para activar una respuesta inmune contra las células infectadas por el virus (Patham, *et al.*, 2011).

En el tratamiento de la tuberculosis, el problema de salud por infección más antiguo, la inmunoterapia con CD también ha sido explorada. En una prueba reciente, se tomaron CD de pacientes con tuberculosis y se cargaron con lisados autólogos de *M. tuberculosis*; posteriormente, fueron inyectadas al paciente y se observó una disminución importante en la presencia de la bacteria (Titov, *et al.*, 2015). El equipo de Satake, *et al.* (2017) están actualmente probando la eficiencia de CD activadas con IL-1 β , TNF- α , IFN- α , IFN- γ y ácido poliinosínico-policitídico, y cargadas con la proteína ESAT-6 de la bacteria. Se registró una mayor concentración de IL-12p70 en los pacientes tratados con estas células, además de una activación mayor de NK y linfocitos T efectoras. Estas terapias parecen prometedoras para tratar esta infección.

Es importante recalcar que todos estos intentos son valiosos ensayos para conocer más a fondo las enfermedades y poder diseñar una terapia adecuada para cada patología. En general, el uso de CD activadas o efectoras en inmunoterapia parece ser una atractiva terapia para muchas condiciones.

Células dendríticas tolerantes

Las tolCD se han utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, hipersensibilidad y trasplantes. A continuación expongo solo algunos de estos estudios.

Una de las moléculas más exploradas para la generación de tolCD es el antígeno de CTLA4; el cual es un fuerte inhibidor de la respuesta inmune. Su actividad se caracteriza por competir por la interacción con B7 en las CD y causar una disminución en la activación de linfocitos T. Además, esta interacción causa la secreción de IL-10 y TGF- β y por lo tanto modula la generación de Treg (de Matos Silva, *et al.*, 2015). El antígeno de CTLA4 se ha utilizado para el tratamiento de GVHD así como de artritis reumatoide (Koura, *et al.*, 2014; Ruderman y Pope, 2005), entre otras enfermedades autoinmunes.

Existen también tratamientos que se encuentran ya en fase clínica para el tratar la artritis reumatoide con terapia celular. Benham *et al.*, en 2015,

probaron la administración de CD autólogas tratadas con un inhibidor de NFκB expuesto a cuatro antígenos de péptidos citrulinados para frenar el desarrollo de la artritis reumatoide. El tratamiento resultó en la reducción de linfocitos T efectoros y el incremento de Treg, además el tratamiento no produjo efectos secundarios importantes. Otro tratamiento que está en Fase I de prueba clínica utiliza también CD autólogas, derivadas de monocitos y diferenciadas en presencia de líquido sinovial autólogo. Con este condicionamiento obtienen tolCD y las inyectan de regreso en los pacientes. Los resultados sugieren que es necesaria más investigación pero que es posible que exista un mayor control en la inflamación de las articulaciones tratadas (Bell, *et al.*, 2017).

Las tolCD se utilizaron como terapia celular para combatir GVHD en un modelo murino. Estas tolCD fueron producidas *in vitro* a través de la exposición de monocitos a GM-CSF, IL-10 y TGF-β, posteriormente fueron estimuladas con LPS. Estas células fueron inyectadas y su efecto evaluado a través de las poblaciones de linfocitos T en la región afectada. Se observó una disminución en la cantidad y la actividad de linfocitos T efectoros, así como un aumento en la cantidad de Treg y una reducción en la concentración de citocinas pro-inflamatorias (Sato, *et al.*, 2003).

En el caso del tratamiento de la diabetes mellitus dependiente de insulina, se ha propuesto el uso de CD inmaduras cargadas con anticuerpos de las células β antes de que se desencadene la enfermedad (Luo, *et al.*, 2010). Sin embargo, ha ganado más atención la capacidad de cargar a las CD *in vivo* con los antígenos de interés a través del receptor DEC-205, produciendo así tolCD (Bonifaz, *et al.*, 2002). De esta manera se evitan los riesgos de la introducción de células *ex vivo*. Se ha comprobado que con este método se eliminan los linfocitos T CD8+ causantes de la diabetes (Mukhopadhyaya, *et al.*, 2008).

Estimulación de la maduración de CD *in vitro*

La estimulación de CD ha sido explotada para el tratamiento de enfermedades inmunológicas buscando la obtención del fenotipo adecuado para cada terapia. Debido a sus capacidades inmunoestimuladoras o tolerantes, se ha estudiado su modulación para su uso contra cáncer, enfermedades autoinmunes, GVHD, entre otras (Woltman y van Kooten, 2003). Estas CD moduladas *in vitro*, como se vio en la sección anterior, pueden ser utilizadas para inmunoterapia; o también pueden ser utilizadas para comprender mejor las características de las CD en distintas patologías.

Las CD utilizadas *in vitro* son usualmente derivadas de monocitos de médula ósea o extraídos de la sangre. En ratón las CD en la sangre son escasas, por lo que derivarlas de monocitos de médula ósea es lo más común. En humanos los monocitos son obtenidos de muestras de sangre periférica, debido a que este procedimiento es menos invasivo que la obtención de médula ósea. Las CD derivadas de médula ósea (moCD) de ratón son diferenciadas *in vitro* para la obtención de grandes poblaciones de CD. La técnica más conocida para realizar esta diferenciación es el cultivo de los precursores con GM-CSF e IL-4 para obtener una población de CD inmaduras (Romani, *et al.*, 1994; Sallusto y Lanzavecchia, 1994; Lutz, *et al.*, 1999).

Se ha observado que, al estar constantemente vigilando el ambiente, estas células son altamente regulables. El microambiente donde se encuentran puede tener grandes efectos en la morfología, función y secreciones de estas células. Algunos de los factores que modifican estas características celulares y definen el estado de maduración de estas células son citocinas, factores de crecimiento e interacciones celulares (Tabla 2).

Citocinas

El primer coctel de citocinas utilizado como “gold standard” para la maduración de CD *in vitro* consistía en TNF- α , PGE2, IL-6 e IL-1 β . Inicialmente se proponía que este coctel promovía la activación de CD debido a su alta capacidad migratoria y estimulación de linfocitos T. Sin embargo, se mostró posteriormente que estas células estaban activando Treg (CD4+CD25+) y tenían bajas capacidades para producir IL-12. Por lo tanto, la supuesta reacción Th1, no se obtuvo con este coctel, sino un fenotipo tolerante (Jongmans, *et al.*, 2005).

Las tolCD se pueden modular para su obtención *in vitro*, las citocinas más comunes son IL-10, IFN- γ y TGF- β (Yoo y Ha, 2016). El tratamiento con IL-10 inhibe la maduración de CD (Haasse, *et al.*, 2002) y reduce su capacidad de secreción de citocinas inflamatorias y activación de linfocitos T (Boks, *et al.*, 2012). Las moCD tratadas con bajas dosis de IFN- γ son deficientes en la presentación de aloantígenos ante linfocitos T e inducen la diferenciación de linfocitos T CD4+ hacia Treg FoxP3+ (Eljaafari, *et al.*, 2009). Estas afecciones son concentración dependiente, por lo que se considera que el IFN- γ debe utilizarse a bajas concentraciones (Kerkar, *et al.*, 2009). De manera similar, TGF- β también causa la disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras e inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias (Boks, *et al.*, 2012) (Tabla 2).

Tabla 2. Efectos sobre el fenotipo y función de CD por diferentes factores.

Citocina	Fenotipo CD	Efecto sobre la función	Referencias
IL-10	toICD	Inhibición maduración de CD Decrece citocinas inflamatorias Decrece activación linfocitos T	Yoo y Ha, 2016; Haase, <i>et al.</i> , 2002; Boks, <i>et al.</i> , 2012
IFN- γ (bajas concentraciones)	toICD	Baja presentación de antígenos Aumento en Treg	Eljaafari, <i>et al.</i> , 2009
IFN- γ (altas concentraciones)	CD madura	Respuesta Th1 Alta secreción de IL-12p70 Baja secreción de IL-10	Kerkar, <i>et al.</i> , 2009.
TGF- β	toICD	Decrece citocinas inflamatorias Disminuyen moléculas co-estimuladoras	Boks, <i>et al.</i> , 2012
TNF- α y CD40L	CD madura	Respuesta Th2 Alta secreción de IL-12p70 Aumento en moléculas co-estimuladoras	Castiello, <i>et al.</i> , 2011
Factor de crecimiento	Fenotipo CD	Efecto	
VEGF	CD inmaduras	Reducción es estimulación de linfocitos T Interrupción de la maduración	Gabrilovich, <i>et al.</i> , 1996; Ohm y Carbone, 2001; Minerva, <i>et al.</i> , 2007
HGF	Diferenciación CD	Mayor producción de CD a partir de células CD34+ de médula ósea	Ovali, <i>et al.</i> , 2000
Interacción celular	Fenotipo CD	Efecto	
Epitelio intestinal	toICD	Disminución en la expresión de CD80 Aumento en la secreción de IL-10 y TGF- β	Butler, <i>et al.</i> , 2006
Melanoma	toICD	Reducción en la expresión de CD80, CD86 y MHC II	Rommel, <i>et al.</i> , 2001
Cáncer de mama Cáncer de colon	toICD	Cambio fenotípico Inhibición de la maduración	Gabrilovich, <i>et al.</i> , 1996
Células troncales mesenquimales	toICD	Estimulación de Treg Reducción en la expresión de CD80, CD86 y MHC II Reducción en la secreción de IL-12	Li, <i>et al.</i> , 2008; Beyth, <i>et al.</i> , 2005.

Actualmente se ha propuesto un nuevo coctel óptimo para la activación de CD que consiste en TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ y CD40L. Con este tratamiento se obtiene una mayor cantidad de CD activadas con un fenotipo más definido. Además la producción de IL-12p70 es significativamente mayor con el uso de este coctel (Kaka, *et al.*, 2008). El uso de TNF- α y CD40L producen un fenotipo activado de CD. Este fenotipo parece estar inclinado hacia una respuesta Th2. El uso de IFN en altas concentraciones parece ser mejor para inducir una respuesta Th1 (Castiello, *et al.*, 2011).

Factores de crecimiento

VEGF es considerado un modulador de la diferenciación y maduración de CD *in vitro* e *in vivo*. Se cree que la presencia de receptores de este factor de crecimiento sobre la membrana de CD produce una señalización que interrumpe la maduración. Se observó que la morfología de las CD cambia y se inhibe la maduración en presencia de este factor de crecimiento. VEGF es importante debido a que es expresado por la mayoría de los tumores cancerosos, habilitando el crecimiento descontrolado de estos. De hecho, se ha probado que si se inhibe el receptor de VEGF (VEGF-R) en las CD, la maduración ocurre de manera normal (Gabrilovich, *et al.*, 1996; Ohm y Carbone, 2001). Asimismo, Mimura, *et al.* (2007) probaron que VEGF afecta la estimulación alogénica de linfocitos T; probando así el efecto negativo de este factor de crecimiento en la función normal de CD.

Otro factor de crecimiento con efectos sobre CD, menos estudiado, es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). Ovali, *et al.*, (2000) probó que el HGF producía una mayor cantidad de CD bajo su diferenciación a través de monocitos CD34+. De hecho, producía mayor cantidad de CD que la diferenciación con GM-CSF (el cual es el factor más utilizado actualmente).

Interacciones celulares

Butler, *et al.*, en 2006 probaron el efecto de las células de epitelio intestinal sobre las CD en un intento de comprender esta relación celular. Probaron la interacción célula-célula, así como el co-cultivo sin contacto. En ambos casos observaron que el fenotipo de CD se volvía tolerante. Hubo una reducción en la expresión de CD80 y CD86, y por lo tanto baja capacidad de activación de linfocitos T. Las citocinas pro-inflamatorias disminuyeron. Asimismo, se cuantificó el aumento en la secreción de TGF- β e IL-10. Este estudio resaltó la importancia de los epitelios en las mucosas para mantener la homeostasis inmune.

El efecto de las células de melanoma y su sobrenadante sobre la diferenciación y maduración de CD también ha sido estudiado. En este caso observaron un aumento en la expresión de CD80, CD86 y MHCII; lo que parece ser equivalente al fenotipo activado obtenido con estimulación de LPS o CD40L. Son más concluyentes los ensayos que registran que estas células tienen más capacidades migratorias (Rommel, *et al.*, 2001). Otro equipo probó el efecto del sobrenadante de varias líneas de cáncer de mama y cáncer de colon sobre las CD. Ellos observaron una morfología y fenotipo inmaduro en las CD, además de un decremento significativo en la cantidad de CD obtenidas del cultivo de monocitos. Estos resultados los atribuyen en parte a la presencia de VEGF en

el medio debido a que el uso de anti-VEGF aumentaba la diferenciación de CD pero no la recuperaba por completo (Gabrilovich, *et al.*, 1996).

Las células mesenquimales han sido reconocidas por estimular la maduración de CD hacia un fenotipo tolerante. *In vitro* se ha observado que las CD generadas en cocultivos con MSC o su sobrenadante producen la activación de Treg via factores solubles como IL-6 y TGF- β , además de la activación de la cascada de señalización de Notch (Li, *et al.*, 2008). Conjuntamente se ha cuantificado una disminución en la producción de IL-12 y una reducción en la expresión de moléculas co-estimuladoras y MHC I y II (Beyth, *et al.*, 2005).

Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (MSC) son una población celular que ha causado controversia por la falta de una definición clara de su fenotipo y sus funciones. El término, propuesto en 1991 por Arnold I. Caplan, describe a células multipotentes de origen mesodérmico con capacidades regenerativas para todos los tejidos conectivos. No obstante, el origen y la función *in vivo* de estas células sigue siendo cuestión de investigación. A pesar de esto ha sido una población utilizada en una gran cantidad de estudios debido a la amplia gama de funciones que se le han atribuido *in vitro*. Además de presentar auto-renovación, las MSC se pueden diferenciar hacia condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Actualmente el sobrenadante que producen ha tomado importancia debido a la amplia gama de moléculas que secretan, las cuales parecen conferir sus múltiples funciones (Kyurkchiev, *et al.*, 2014).

Localización y función

Parece ser que estas las MSC tienen orígenes múltiples provenientes del desarrollo temprano de los organismos. El mesodermo se ha identificado como el tejido principal del cual se derivan estas células, de donde se forma el tejido esquelético y el tejido conectivo, además de pericitos (Dennis y Charboard., 2002; Murray, *et al.*, 2013). Otros estudios han demostrado que algunas de las MSC se derivan de la cresta neural, siendo los precursores de estas las células neuroepiteliales SOX1+ (Morikawa, *et al.*, 2009). Este último origen ha sido respaldado con la observación de la migración de células derivadas de la cresta neural hacia la médula ósea (Nagoshi, *et al.*, 2009). Recientemente se ha surgido la idea de que las MSC son probablemente células perivasculares relacionadas con pericitos; por lo que se pueden obtener de todos los órganos vascularizados (Murray, *et al.*, 2013). No obstante, es necesario llevar a cabo más investigación sobre este tema.

Las MSC son una población heterogénea de células multipotentes localizadas en una amplia variedad de tejidos. Las MSC no han sido claramente definidas pero existe un consenso propuesto por la Sociedad Internacional de Terapia Celular que consiste en cinco características generales: (i) son plástico-adherentes; (ii) tienen una morfología parecida a fibroblastos; (iii) son capaces de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos y adipocitos; (iv) no presentan los marcadores de membrana hematopoyéticos CD11b, CD14, CD34, CD19, CD45 ni los marcadores CD79a, HLA-DR, CD31; (v) expresan CD13, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD166, y Stro-1 (Fig. 4)

(Gebler, et al., 2011). Sin embargo, el fenotipo parece ser muy variable con respecto al microambiente donde se encuentren estas células y por lo tanto es importante controlar estas condiciones para su estudio (Spaeth, et al., 2008).

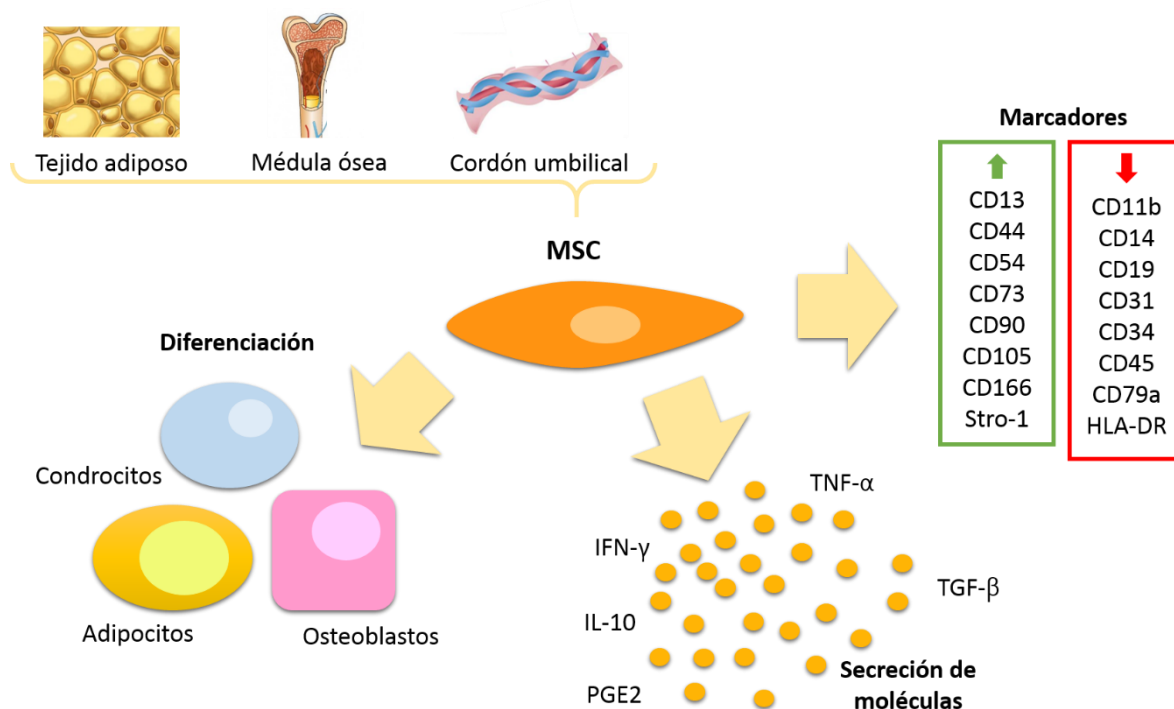


Figura 4. Generalidades de MSC. Las MSC se pueden obtener de diferentes tejidos, los más comunes siendo el tejido adiposo, médula ósea y cordón umbilical. Las características que definen a las MSC son su capacidad plástica-adherente; su capacidad de diferenciarse hacia condrocitos, adipocitos y osteoblastos; y la expresión de ciertos marcadores de membrana (señalados en la figura y en el texto). Su secreción de citocinas las caracteriza debido a que juegan un papel muy importante en las funciones identificadas *in vitro*.

Las primeras MSC en obtenerse fueron derivadas de médula ósea y por lo tanto son las más estudiadas hasta ahora. La función de las MSC *in vivo* ha sido complicada de definir debido a la falta de un marcador específico, así como su baja frecuencia en los tejidos (Caplan, 2007). Se cree que en la médula ósea las MSC proveen los precursores de todos los tipos celulares no hematopoyéticos de la médula ósea como osteoblastos, adipocitos, y células reticulares. De esa manera se propone que ayuda a mantener la homeostasis de la región (Friedenstein, *et al.*, 1966; Nombela-Arrieta, *et al.*, 2011; Kyurkchev, *et al.*, 2014).

En heridas, las señales inflamatorias producidas causan la migración de MSC al sitio promoviendo así la regeneración del tejido gracias a su multipotencialidad. Los microambientes a los que se atañen también tendrán un efecto sobre su fenotipo, secreción y función. En los ambientes inflamatorios se propone que pudieran además estar mediando la respuesta inmunológica (Prasanna, *et al.*, 2010; Shi, *et al.*, 2012).

Las MSC se han identificado en muchos de los tejidos humanos presentando fenotipos similares, multipotencia y actividad inmunosupresiva (Prasanna, *et al.*, 2010). Algunos de los sitios de donde se han obtenido las MSC incluyen: médula ósea, tejido adiposo, pulpa dental, ligamento periodontal, tendones, cordón umbilical, piel, placenta, fluido amniótico, membrana sinovial, endometrio, entre otros (Murray, *et al.*, 2013).

Comúnmente, para su uso *in vitro*, se obtienen las MSC de tejidos adultos derivados de médula ósea, de tejido adiposo o de sangre periférica; la obtención a partir de tejidos fetales o “de nacimiento” implica diferentes poblaciones de la placenta y del cordón umbilical (Hass, *et al.*, 2011). Debido a sus diferencias se han utilizado con distintos fines. Actualmente existen miles de artículos que hacen referencia a estas células, descubriendo novedosas aplicaciones para cada una. Una de las ventajas más notables de esta población celular para su aplicación clínica es que debido a la baja cantidad de MHC I y II que expresan, son células inmunoprivilegiadas, es decir, no causan una reacción inmunogénica (Saparov, *et al.*, 2016).

Las MSC derivadas de médula ósea (moMSC) se han considerado el “estándar de oro”; no obstante, se ha demostrado que MSC de otros tejidos son igual de efectivas. De todos los orígenes, las MSC de cordón umbilical obtenidas de la gelatina de Wharton (WJ-MS), son las que menos obstáculos éticos tienen debido a que el tejido es desechado en la mayoría de los partos y no involucra una extracción dolorosa (Talwadekar, *et al.*, 2015). Además se puede obtener una gran cantidad de células de este tejido comparadas con las mayormente usadas moMSC y MSC de tejido adiposo (taMSC), debido a su mayor proliferación en cultivo (Amable, *et al.*, 2014). Es también ventajoso que en las WJ-MS la edad del paciente no influye en la muestra, el riesgo de contaminación por bacterias o virus se ve reducido por su corta edad y representan una población más “primitiva” (Prasanna, *et al.*, 2011).

Esta población celular se ha utilizado mucho en experimentos relacionados a la inmunoregulación por la innegable modulación que ejercen sobre el sistema inmune. El 14.2% de todos los ensayos clínicos relacionados con MSC e inmunomodulación son realizados con WJ-MS y el único ensayo clínico en fase 4 hasta el momento involucra su uso (Wang, *et al.*, 2016).

Secretoma de MSC

Se ha identificado que las MSC secretan una gran cantidad de moléculas solubles incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas, causando así la modificación del microambiente y por lo tanto afectando a distintos tipos

celulares. Varios laboratorios han indagado en los causantes de los efectos terapéuticos de las MSC, tomando en cuenta efectos causados por interacción célula a célula y a través del secretoma, La importancia de identificar los factores del secretoma recae en encontrar herramientas (como el sobrenadante de las MSC) para producir terapias sin células y disminuir así el riesgo que conlleva el contacto celular. Se han llevado a cabo dos tipos de acercamientos para la identificación de moléculas en el secretoma: los dirigidos, a través de la identificación de proteínas de interés y análisis de la función de las proteínas identificadas; y los estudios realizados por tamizados protéicos y analizados con herramientas bioinformáticas (Lavoie & Rosu-Myles, 2013).

Las moléculas bioactivas identificadas hasta ahora que secretan las MSC se pueden dividir por sus efectos en: anti-apoptóticas, inmunomoduladoras, anti-cicatrizantes, de soporte, angiogénicas, y quimioatrayentes (L. da Silva Meirelles, *et al.*, 2009). Se han reportado más de 90 citocinas y factores de crecimiento que conforman el secretoma de las MSC. Entre los más notables se encuentran: IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ ; GM-CSF, EGF, HGF, LIF, PGF y VEGF (Bai, *et al.*, 2016).

En un estudio realizado por Amable, *et al.*, en 2014, se compararon WJ-MSc, taMSC y moMSC; se observó mayor secreción de citocinas, proteínas pro-inflamatorias y factores de crecimiento por parte de las WJ-MSc y mayor cantidad de moléculas pro-angiogénicas y componentes de la matriz extracelular en las taMSC. Esto implica que el origen podría afectar bastante las aplicaciones terapéuticas de estas células.

Particularmente, se les atribuye a las MSC un efecto inmunomodulador afectando la proliferación y activación de NKs, linfocitos T y linfocitos B. A su vez, se reconoce que causan la inhibición de la diferenciación y maduración de CD; siendo el secretoma un factor importante en estas interacciones (Aggarwal & Pittenger, 2005; Bruno, *et al.*, 2015). Algunas de las moléculas anti-inflamatorias reconocidas son PGE2, TGF- β , HGF, SDF-1, NO,IDO, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β y TNF- α (da Silva Meirelles, *et al.*, 2009; Amable, *et al.*, 2014; Ma, *et al.*, 2014; Bai, *et al.*, 2016). Se ha observado que la secreción de estas citocinas pueden inhibir la maduración de CD, afectar la presentación de antígenos de CD a linfocitos T y NKs, aumentar la producción de Treg, aumentar la secreción de IL-10, disminuir la citotoxicidad de linfocitos T efectoras, afectar la función de macrófagos, entre otras (L. da Silva Meirelles, *et al.*, 2009; Murphy, *et al.*, 2013; El Omar, *et al.*, 2014; Ma, *et al.*, 2014).

Modulación de MSC

Una de las perspectivas que ha ganado popularidad en años recientes es la idea de modificar el efecto de las MSC a través de preconditionamiento con diferentes factores (Saparov, et al., 2016). La exposición de las MSC a microambientes de hipoxia, por ejemplo, aumentó la supervivencia de las células y se incrementó la secreción de algunas proteínas de supervivencia y factores de crecimiento (Bader, et al., 2015). Se han propuesto también como métodos de preconditionamiento de MSC diferentes citocinas como IFN- γ , TNF- α , e IL-1 β , además de ligandos de TLR y andamios 3D (Saparov, et al., 2016). Es de especial interés cuando se trata de utilizar a esta población celular en terapias específicas para ciertas condiciones.

Citocinas

Considerando la posibilidad de manejar los efectos de estas células, se ha indagado sobre diferentes preconditionamientos de MSC para potenciar sus efectos inmunoreguladores. Mohammapour, *et al.* (2015) mostraron en cocultivos de MSC y CD que el tratamiento de MSC con IFN- γ afecta la maduración de las CD al modificar la expresión de IDO, y por lo tanto de kinureninas, al igual que el aumento de Treg producidas por la población de CD tratadas; asimismo se cuantificó un aumento en la expresión de PD-L1 y PD-L2 así como el decremento de HLA-DR e ICOSL. Además se ha observado que con este preconditionamiento las MSC aumentan la secreción de PGE₂, IFN- γ , TNF- α , e IL-1 las cuales producen Gal-9, lo cual afecta la producción de linfocitos T y protege a las MSC contra ataques por parte de las NK (Madrigal, 2014).

La modulación de MSC por TNF- α afecta inversamente a las CD promoviendo la activación de estas células. Mohammapour, et al. (2015) observaron la disminución en la expresión de PD-L1 y PD-L2 y una baja en la secreción de TGF- β . Concluyeron que la modificación del ambiente celular puede afectar enormemente las funciones de las MSC y por ende sus efectos en otros tipos celulares. Las MSC tienen receptores de TNF y LPS, los cuales al encontrar a su ligando activan la cascada de señalización de NF κ B, estimulando así la secreción de citocinas que inducen un fenotipo anti-inflamatorio o tolerante de CD, linfocitos T y NK (Yagi, *et al.*, 2010). En otro estudio, el preconditionamiento de MSC con TNF- α aumentó la capacidad angiogénica *in vitro* de estas debido a la alta secreción de VEGF (Kwon, *et al.*, 2013).

La exposición de MSC a IL-6 ha sido reportada como tratamiento supresor de moléculas promotoras de tumor como TNF- α , CCL5, PDGF-BB y MCP-1, ya que estas se encuentran en menor proporción bajo el tratamiento con IL-6. Además las MSC tratadas con IL-6, a comparación de las MSC sin tratamiento, reducían la migración de células de cáncer gástrico, así como su proliferación. En el experimento *in vivo* observaron que las MSC preconditionadas promovían también la apoptosis celular tumoral (Wang, *et al.*, 2015).

El preconditionamiento de MSC con IL-1 β ha sido evaluado en WJ-MSc y moMSc. En WJ-MSc, el tratamiento promovió la expresión de COX-2, IL-6, IL-8 CXCR4, lo que aumenta la capacidad migratoria de las WJ-MSc *in vitro*. Con moMSc se cuantificó el aumento de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-23A, y moléculas de adhesión como ICAM-1 e ICAM-4. Asimismo el preconditionamiento aumentó la capacidad de las MSC para atraer neutrófilos, monocitos, linfocitos y eosinófilos (Saparov, *et al.*, 2016). Adicionalmente, la combinación de IL-1 β con LPS causa una gran producción de PGE2 por parte de las MSC tratadas (Gray, *et al.*, 2015).

El uso de IL-17 para el preconditionamiento de MSC ha sido recientemente evaluado. Esta interleucina aumenta el efecto inhibitorio de MSC sobre la activación de linfocitos T debido a la reducción en la secreción de IFN- γ , TNF- α , e IL-2 comparado con MSC sin tratamiento. También se observó un incremento en la población de Treg inducidas por las MSC tratadas con IL-17. Se concluyó que este tratamiento es efectivo para la producción de MSC inmunosupresoras y podría ser utilizado para mejorar la aceptación de alotrasplantes (Sivanathan, *et al.*, 2015).

La observación de la modulación de las capacidades de MSC *in vitro* forma parte clave de la modulación para crear terapias dirigidas y más potentes. La identificación de moléculas nuevas, reguladoras de la secreción y función de MSC es esencial para el desarrollo de terapias celulares más efectivas.

Interacciones celulares

Zhao y su equipo (2015) mostraron mediante estudios *in vitro* que las MSC provenientes de pacientes con síndrome mielodisplásico presentan capacidades inmunoregulatoras distintas que las MSC normales. Observaron que la agresividad de la enfermedad también modifica las funciones de MSC. Las MSC de síndrome mielodisplásico de alto riesgo se asocian con mayor presencia de TGF- β 1, mayor cantidad de apoptosis y mayor efecto

inmunosupresivo. Específicamente se identifica que TGF- β 1 es responsable del incremento de Treg CD4+CD25+Foxp3+. Esto confirma que el microambiente y posiblemente las interacciones celulares pueden modificar la actividad de MSC.

En un segundo estudio (Wang, *et al.*, 2015) evalúan los efectos de las mismas poblaciones de MSC del estudio anterior sobre la función de las CD. Ellos identifican que las MSC de pacientes con síndrome mielodisplásico tienen un potente efecto inhibitorio sobre la diferenciación de CD alterando su función endocítica. Además de inhibir la secreción de IL-12 y su habilidad para estimular linfocitos T. También reconocen el efecto diferencial entre síndrome mielodisplásico de alto riesgo y de bajo riesgo, así como TGF- β 1 como responsable de los efectos inhibitorios identificados.

Tabla 3. Efectos observados por el condicionamiento de MSC con diferentes factores.

Condición	Efectos sobre MSC	Efectos secundarios	Referencias
IFN- γ	Aumento en PD-L1 y PD-L2 Aumento en secreción de PGE2, IFN- γ , IL-1 y TNF- α Protección contra NK	Aumento en tolCD Aumento en Treg	Mohammappour, <i>et al.</i> , 2015; Madrigal, <i>et al.</i> , 2014
TNF- α	Baja secreción de TGF- β Activación de NFkB Alta secreción de VEGF	Activación de CD Aumento angiogénesis	Mohammappour, <i>et al.</i> , 2015; Yagi, <i>et al.</i> , 2010; Kwon, <i>et al.</i> , 2013
IL-6	Supresión de la secreción de TNF- α , CCL5, PDGF-BB y MCP-1	Reducción de la migración de células de cáncer gástrico Apoptosis de células tumorales	Wang, <i>et al.</i> , 2014
IL-1 β IL-1 β +LPS	cuMSC promovió secreción de COX-2, IL-6, IL-8 CXCR4 \rightarrow mayor migración <i>in vitro</i> moMSC promovió secreción de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-23A, así como muchas quimiocinas y moléculas de adhesión como ICAM-1 e ICAM-4 Aumentó secreción de PGE2	Atracción de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos	Saparov, <i>et al.</i> , 2016; Gray, <i>et al.</i> , 2015
IL-17	Reducción en secreción de IFN- γ , TNF- α , e IL-2	Reducción en activación de linfocitos T Incremento de Treg	Sivanathan, <i>et al.</i> , 2015
Síndrome mielo-displásico	Mayor secreción de TGF- β 1	Incremento en apoptosis de linfocitos T Incremento de Treg Menor función endocítica de CD Aumento en tolCD Inhibición de la secreción de IL-12 (CD)	Zhao, <i>et al.</i> , 2015; Wang, <i>et al.</i> , 2015

Interacciones entre cáncer y MSC

Se han implicado a las MSC en algunas patologías, por las cuales su estudio ha ganado popularidad en años recientes. Una de las más relevantes es

el cáncer, en donde las MSC, debido a sus capacidades migratorias y respuesta a señalización inflamatoria, son atraídas a la región tumoral. Es por esto que se ha comenzado a estudiar sus efectos en el microambiente (Hall, et al., 2006; Spaeth, et al., 2008).

Las MSC migran hacia la región tumoral debido a la señalización expresada por el tumor. Las moléculas más importantes identificadas en el microambiente como posibles atrayentes de MSC incluyen: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8, TGF- β , PGF, PDGF, HGF, SDF-1, MMP, VCAM-1, CXCL, MCP-1, HIF-1, y LL-37. Estas moléculas podrían estar modificando la función de las MSC y afectando la inmunomodulación de la región tumoral. Estas MSC tumorales, a diferencia de las MSC normales, promueven el reclutamiento de células inmunosupresivas y la proliferación de células tumorales, además de permitir la angiogénesis tumoral (Sun, *et al.*, 2014).

Las MSC residentes del tumor han sido estudiadas en varios tipos de cáncer, en los cuales se han asociado con el crecimiento tumoral y el incremento en las capacidades invasivas debido a su modulación de la angiogénesis y la inmunomodulación. Se han reconocido múltiples citocinas y factores de crecimiento que se encuentra sobre expresadas, y posiblemente implicadas en la modificación del microambiente, por parte de las MSC como HGF, IL-6, IL-10, proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1), TGF- β y VEGF (Zimmerlin, *et al.*, 2013).

En 2011, Razmkhah y su equipo obtuvieron taMSC residentes de cáncer de mama de varias pacientes para analizar su fenotipo. Ellos identificaron que las taMSC residentes del tumor tenían expresión elevada de IL-10 y TGF- β a comparación de taMSC de pacientes sanas. Posteriormente evaluaron el efecto del sobrenadante de las taMSC sobre un cultivo de leucocitos mixtos y cuantificaron un aumento en la expresión de mRNA de IL-4, TGF- β , IL-10, CCR4 y CD25. Adicionalmente, identificaron un aumento en la población de Treg CD4+CD25+CDFoxp3+. Todo esto llevó a la conclusión de que las taMSC residentes del tumor están siendo afectadas por el microambiente tumoral y están jugando un papel importante en la inmunosupresión.

En un esfuerzo por evaluar el efecto de las MSC en el microambiente tumoral Ljubic, *et al.* (2013) inyectaron MSC humanas en tumores de cáncer de mama en un modelo de ratones y evaluaron el tamaño tumoral, la metástasis, la inmunomodulación y la secreción de proteínas. Observaron un incremento en el tamaño tumoral proporcional a la cantidad de MSC inyectadas en los ratones inoculados con células cancerosas. Identificaron un incremento en la metástasis del cáncer en ratones inoculados con cáncer y MSC, más no en los que se trataron únicamente con células cancerosas o MSC. Estos efectos sinérgicos en

el microambiente tumoral fueron también confirmados al evaluar la población de Treg (CD4+Foxp3+) en el bazo; en los ratones con cáncer y MSC se identificó una población significativamente mayor.

De la mano con estos resultados, observaron que la población de linfocitos T CD8+ citotóxicos era menor en los ratones tratados con células cancerosas y MSC. Estos resultados apoyan la hipótesis del papel que juegan las MSC en la inmunomodulación en el microambiente tumoral. Finalmente, cuantificaron diferentes proteínas en la sangre periférica de los ratones e identificaron que la combinación de MSC y células tumorales causaba un incremento significativo en la concentración de IL-4, IL-10 y TGF- β , así como un incremento de menor magnitud en la secreción de IFN- γ . Todos estos resultados resaltan varias implicaciones las MSC pueden tener sobre el progreso tumoral y la inmunotolerancia presente en el microambiente tumoral.

Interacción celular entre CD y MSC

Las MSC se han explotado por sus capacidades inmunoregulatoras. Se consideran importantes para esta regulación la interacción célula a célula así como la secreción de distintos factores como: IL-6, IL-10, PGE2, HGF, IDO, óxido nítrico (NO), TGF y antígeno de leucocitos humanos G (HLA-G) (Bruno, *et al.*, 2015). Al repasar la lista de factores secretados, podemos observar que muchos de estos están implicados en la modulación de CD.

Aggarwal y Pittenger, en 2005, propusieron uno de los primeros diseños experimentales de co-cultivo para evaluar la relación entre estos tipos celulares. Este proyecto surge de la necesidad de explicar los efectos positivos de un trasplante de MSC para el tratamiento de la GVHD. Entre sus resultados observan una disminución en la secreción de TNF- α por parte de las CD en contacto con las MSC; además, registraron un aumento en la producción de IL-10. También identifican la secreción de PGE2 por parte de las MSC como un posible factor importante en la inmunoregulación. Anteriormente, Zhang *et al.* (2004) habían identificado que las MSC afectaban las proteínas en la membrana y se concluyó que esta interacción causaba la diferenciación de CD a tolCD.

Durante esos años Jiang y su equipo (2005) evaluaron las citocinas secretadas por CD estimuladas con MSC y reafirmaron que había una baja en IL-12 y un aumento en IL-10. Además evaluaron la expresión de IFN- γ y reportaron un decremento en esta citocina. Fue también este grupo quien reconoció que las CD tratadas presentaban considerablemente menos estimulación de linfocitos T. Ellos concluyen que esta modulación puede ser llevada a cabo sin contacto celular, a una proporción de 1:10 (MSC:monocitos) en un modelo de co-cultivo con insertos transwell. Desde entonces muchos grupos siguen investigando esta relación celular y el papel del secretoma de MSC sobre la modulación de CD.

English *et al.* (2008) observaron en un modelo murino la interacción de MSC y CD *in vitro*. Identificaron que al co-cultivar estos tipos celulares la maduración de CD fue inhibida. Por lo tanto, la activación de linfocitos T era reducida y la expresión de CCR7 también se veía afectada. También reconocieron la pérdida de la capacidad migratoria por una menor respuesta a CCL19 y una alta expresión de E-cadherina. Este experimento demostró que las MSC modulaban tres funciones esenciales de las CD: capacidades migratorias, maduración y presentación de antígenos.

En 2013 el equipo de Wang *et al.* experimentó con los efectos del síndrome mielodisplásico sobre MSC y su interacción con CD. Al obtener MSC

de pacientes con este síndrome y co-cultivar a estas con CD se observó una inhibición en la diferenciación y función de las CD analizadas. Las CD tratadas presentaban un fenotipo inmaduro y secretaban IL-12 en menores cantidades. Identifican a TGF- β como un importante mediador de la respuesta inmunosupresora. Es importante recalcar que compararon los efectos de las MSC de pacientes con el síndrome mielodisplásico de alto riesgo con los de bajo riesgo; identificaron un efecto diferencial, siendo mucho más inmunoregulatoras las MSC de pacientes de alto riesgo. Esto supone que el preconditionamiento de las MSC está teniendo un efecto importante en la función de estas MSC.

De manera inversa, las CD afectan el comportamiento de MSC. En un estudio realizado por Silva, *et al.* (2017) se observó que las vesículas extracelulares (VE) producidas por CD son internalizadas por MSC y esto promueve su migración hacia el sitio donde se encuentran las CD. Esta migración resultó ser dependiente de la concentración de VE. Dentro de las VE se reconoció la presencia de osteopontina y de metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9). Ambas moléculas se caracterizan por ser fuertes promotores de la migración celular. Por lo tanto se puede concluir que las CD afectan a las MSC al producir señales de migración. Este nuevo descubrimiento podría llevar al desarrollo de nuevos métodos de terapia celular.

Las interacciones celulares pueden tener gran impacto en las funciones celulares ya sea mediante factores parácrinos o contacto celular. La relación entre MSC y CD debe seguirse estudiando para dilucidar más aspectos importantes que podrían impulsar el desarrollo de nuevas técnicas de modulación de ambos tipos celulares para una terapia más precisa.

Debido a los experimentos realizados anteriormente es claro que existe una inmunorregulación por parte de las MSC hacia las CD, modificando la expresión de moléculas de maduración y afectando su función. Además se modifican las citocinas expresadas y por consiguiente los efectos que las CD pudieran tener sobre otros tipos celulares. Al tener un fenotipo tan flexible, las CD se convierten en un interesante jugador tanto en la progresión de una gran variedad de enfermedades así como en el mantenimiento de la homeostasis inmunológica. Es también notable a su vez la plasticidad que las MSC presentan, por lo que se sugiere que el ambiente donde se encuentren ambos tipos celulares tendrá una gran influencia sobre la función de estas. En especial es de interés este ambiente cuando se considera las alteraciones en patologías asimismo como en la modificación de estas condiciones *in vitro* para su aplicación dirigida.

Cáncer, CD y MSC

Desde el año 2000 se han identificado los “hallmarks” del cáncer: autosuficiencia con respecto a la señalización de crecimiento, evasión de la apoptosis, falta de reconocimiento de señales anti-crecimiento, angiogénesis continua, invasión de tejidos y metástasis, capacidad ilimitada de potencial de replicación (Hanahan & Weinberg, 2000), y la evasión de la destrucción por parte del sistema inmune (Hanahan y Weinberg, 2011). A partir de entonces se ha identificado, en conjunto con las características celulares, un papel importante del microambiente tumoral para la supervivencia del cáncer. Por lo tanto, hoy se describe como una herida complicada de sanar; siendo la inflamación crónica un ambiente favorable para el desarrollo de esta patología (Sun, *et al.*, 2014).

El microambiente tumoral se caracteriza por la presencia de una amplia gama de citocinas, las cuales sirven de señalización para el reclutamiento de varios tipos celulares ajenos al tumor. Las citocinas principales presentes incluyen pero no se limitan a TNF- α , IFN- γ , IL-16, IL-8, IL-10, TGF- β , PDGF, VEGF, SDF-1 y metaloproteasas. Los tipos celulares identificados, ajenos al tumor, incluyen linfocitos, macrófagos, CD, células endoteliales, fibroblastos asociados al tumor (TAF) y MSC (Fig. 6). Estas diferentes poblaciones han sido reconocidas por varios grupos de investigación como posibles promotoras del crecimiento tumoral y metástasis, atraídas a la región debido a la presencia de las citocinas anteriormente mencionadas (Hanahan y Weinberg, 2011; Spaeth, *et al.*, 2008; Sun, *et al.*, 2014).

En relación con las CD, se ha observado que en los ambientes tumorales estas células han sido identificadas como deficientes o defectuosas debido a su bajo efecto en la detección y destrucción del tumor. Varios factores han sido identificados como responsables de este comportamiento incluyendo: hipoxia, acumulación de adenosina, incremento en los niveles de lactato y pH bajo (Veglia & Gabrilovich, 2017). En un modelo de cáncer de mama en ratón se identificó que IL-10 juega un papel importante en la disfunción de las CD al evitar la secreción de IL-12 y por lo tanto forzando una inmunosupresión (Ruffell, *et al.*, 2014). Además las CD son afectadas por la secreción de citocinas como IL-10 y TGF- β del tumor y producen altas cantidades de Treg, las cuales no atacan al tumor y por consecuencia promueven su crecimiento (Fridman, *et al.*, 2012). También ha sido identificado PD-L1 como un importante mediador de esta respuesta, ya que las CD en el tumor expresan altas cantidades de esta proteína y su bloqueo eleva la producción de IL-12, TNF- α , IL-1 β , todas citocinas pro-inflamatorias e inductoras de una respuesta Th1 (Salmon, *et al.*, 2016).

Ruffell (2014) y su equipo mostraron una interesante interacción entre los macrófagos del ambiente tumoral y las CD deficientes. Los macrófagos F4/80+ intratumorales expresan altas cantidades de IL-10, lo cual se ha visto que afecta la activación de linfocitos T CD8+. No obstante, la relación no es directa con los linfocitos, si no que el bloqueo de la IL-10 secretada, con IL-10R, promueve la secreción de IL-12 por parte de las CD. Por lo tanto, se concluye que esta interacción entre tipos celulares puede ser clave para comprender la tolerancia producida por la disfunción de CD en el microambiente tumoral.

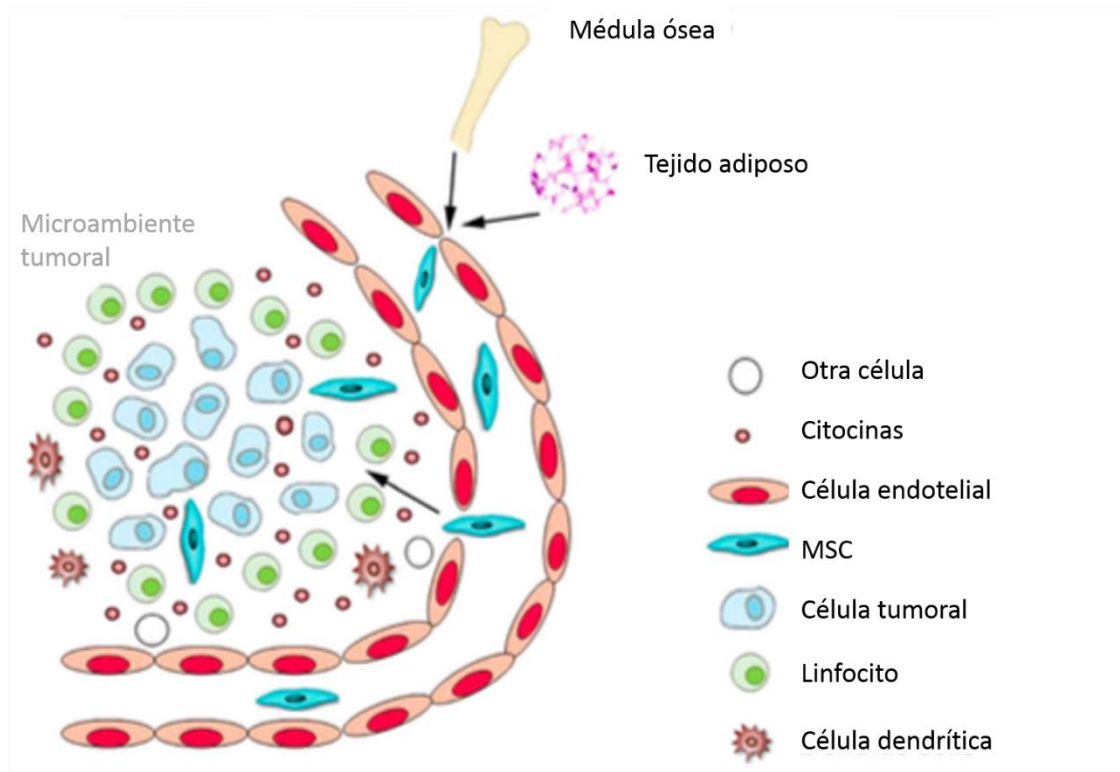


Figura 5. Composición celular del microambiente tumoral. Debido a la señalización inflamatoria producida por el tumor se observa la presencia de una amplia gama de células. La migración de MSC y CD al microambiente tumoral es causada por estas señalizaciones. Las MSC pueden provenir de médula ósea o de tejido adiposo. El microambiente tumoral a su vez es modificado por la presencia de las células que migran hacia la región y las citocinas que expresan. Se ha reconocido que la modificación del ambiente causa la inmunosupresión y permite la evasión del sistema inmune por el tumor. Modificado de Sun, *et al.*, 2014.

Uso Terapéutico de MSC y su sobrenadante

Las terapias con MSC y su sobrenadante han sido beneficiosos para el tratamiento de varias enfermedades en modelos animales. Actualmente existen numerosos grupos de investigación dedicados a utilizar las células en ensayos clínicos para procurar la seguridad de estos tratamientos. Hasta el momento la infusión de MSC parece ser segura y no se han observado efectos malignos en los pacientes, sin embargo los estudios deben de continuar (Baron y Storb, 2012).

En un ensayo clínico reciente se observó que la cantidad de pacientes con GVHD después de un trasplante disminuía si estos recibían una infusión de MSC. En otro ensayo, también relacionado con trasplantes se observó que el grupo tratado con MSC aumentó la sobrevida del paciente, por lo que se consideró que el tratamiento reducía el riesgo de muerte o de infección relacionada con GVHD en los pacientes (Tolar, *et al.*, 2010). En el tratamiento de GVHD en pacientes que no responden bien al tratamiento con esteroides, las MSC parecen ser una propuesta prometedora. Debido a sus capacidades para reparar tejidos y su inmunomodulación, fueron utilizadas a través de una infusión para tratar a pacientes con GVHD aguda. Una mayoría de los pacientes tratados fueron diagnosticados con una mejora en el cuadro patológico y la tasa de supervivencia aumentó (Le Blanc, *et al.*, 2008).

En la enfermedad de Crohn se evaluó el uso de MSC como terapia. En un modelo murino *in vivo* se observó que la infusión con taMSC y moMSC mejoraba la gravedad de la enfermedad al disminuir la inflamación intestinal y prevenir la recurrencia de colitis. El preconditionamiento de las moMSC con IFN- γ exacerbaba los efectos positivos. Sin embargo, queda por estudiarse la importancia del tratamiento con MSC en los primeros días de la enfermedad (Munir y McGettrick, 2015).

La administración de MSC en un modelo murino de lesión neural mostró que estas células migran al lugar de la lesión, aumentan el linaje celular de oligodendrocitos y promueven la respuesta inmune para mantener un balance más adecuado de respuestas Th1/Th2. Estos mismos resultados fueron observados cuando se utilizó únicamente el medio condicionado de las MSC, por lo que se ha propuesto que el HGF secretado por MSC es el responsable de los efectos cuantificados (Murphy, *et al.*, 2013).

Por otra parte, moMSC fueron utilizadas en un modelo murino de artritis producida por colágena para probar su eficiencia en la terapia contra artritis reumatoide. En el estudio observaron que una sola inyección de moMSC podía disminuir la gravedad de la enfermedad. Asimismo observaron

que las MSC disminuían la actividad de linfocitos T al reducir su proliferación y modular la expresión de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, se cree que la terapia con MSC podría ser efectiva para modificar la actividad de linfocitos T y aumentar la producción de Treg (Augello, *et al.*, 2007).

Los múltiples experimentos realizados, donde se observa que el contacto celular y la permanencia de las MSC no es necesario para causar un efecto terapéutico, han llevado al estudio del sobrenadante de estas células como posible tratamiento. El utilizar este en vez de las células tiene dos ventajas muy importantes. La primera consiste en que el utilizar solamente el SN elimina la necesidad de introducir células al cuerpo del paciente y por lo tanto disminuye el riesgo que estas terapias conlleven. La segunda ventaja es que el SN de MSC se puede producir de manera masiva debido a que no es necesario tener las células del paciente y hacer la expansión. Esto permite además tener un banco de SN que se podría utilizar para diferentes terapias.

En un esfuerzo por eliminar el uso de células vivas como terapia Lee *et al.* (2009) propusieron probar los efectos del medio condicionado de MSC con un tratamiento de hipoxia sobre el sanado de heridas. Anteriormente había sido probado que el uso de MSC preconditionadas con hipoxia podían mejorar la cicatrización, por lo que el probar el medio condicionado de estas era adecuado para identificar si los efectos eran causados por las citocinas secretadas o por contacto celular. El SN-MSC preconditionadas en hipoxia redujo significativamente el área de la herida y aumentó la secreción de VEGF y bFGF en la región. Por lo tanto, concluyeron que el SN-MSC preconditionado en hipoxia ayuda considerablemente a la reparación del tejido.

Yew y su equipo (2011) mostraron que el SN-MSC aceleraba la cicatrización de heridas con mayor infiltración celular y angiogénesis. Asimismo observaron un incremento en la migración celular hacia la zona de la herida. Como responsable identificaron a la IL-6 dentro del medio preconditionado y en menor cantidad IL-8 y CXCL1. Ellos proponen que estas secreciones están reguladas por la vía de p38 MAPK, y por lo tanto la regulación de esta vía en MSC es crucial para la reparación tisular.

En un modelo de daño tisular en pulmones por humo de cigarro se observó que el uso del medio condicionado de MSC podía inhibir la apoptosis de fibroblastos, inducir su proliferación y nivelar la producción de caspasa-3, p53, p21, p27, Akt y p-Akt. Además, el uso del sobrenadante recuperó la expresión de proteínas de la matriz extracelular y la contracción de colágena. Los causantes de esta mejora no han sido identificados (Kim, *et al.*, 2012).

Al reconocer los efectos pro-angiogénicos de las MSC, su uso en terapia para recuperar la irrigación sanguínea ha sido muy estudiado. La isquemia es

una enfermedad que afecta a 80 millones de personas a nivel mundial. Kwon y su grupo (2013) estudiaron *in vitro* y posteriormente *in vivo* los efectos del sobrenadante de MSC precondicionadas con TNF- α en un modelo de isquemia en extremidades. Lo observado fue que el TNF- α estimula la función parácrina de las MSC para promover la angiogénesis *in vitro*. Después probaron el uso del sobrenadante en un modelo *in vivo* y observaron que el SN promovía la angiogénesis, estimulaba la perfusión sanguínea e inhibía la necrosis tisular. Asimismo reconocieron que el SN causaba la migración de células precursoras endoteliales que apoyaban con la reparación del tejido. La reparación observada mejoraba tanto el daño, que se evitaba la necesidad de amputar la extremidad. Este estudio muestra el alcance del uso del sobrenadante de MSC en terapias celulares.

Es importante evaluar la relevancia del contacto celular para definir la terapia ideal para diferentes enfermedades. La modulación del secretoma y función de las MSC para uso terapéutico también es decisivo para el desarrollo de terapias puntuales y más efectivas.

Propuesta experimental

Reflexionando sobre la revisión bibliográfica realizada consideramos que el MAT causa modificaciones importantes sobre las funciones de MSC y CD. Aunando esto con el hecho de que las MSC promueven un fenotipo tolerante sobre las CD, se propone que la interacción en el microambiente tumoral de estos dos tipos celulares esté sumándose a la evasión del sistema inmune por parte de las células cancerosas. El coctel de moléculas en el microambiente se considera de gran importancia en la regulación de la actividad de estos tipos celulares, por lo que es importante evaluar los efectos que estas moléculas tienen sobre la respuesta inmune observada.

Consecuentemente se propone un diseño experimental para la evaluación del efecto del SN-WJMSC precondicionadas con células de cáncer sobre el fenotipo *in vitro* de moCD. Para el análisis del fenotipo de las CD se utilizaron los marcadores CD11c y MHCII; para evaluar su maduración utilizamos las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y la molécula inhibitoria CD273. Sin embargo, es necesario evaluar el perfil de citocinas secretadas para determinar la función de las CD por lo que proponemos la evaluación de la producción de IL-10 e IL-12 por parte de las moCD tratadas. La identificación de las citocinas en el sobrenadante de MSC responsables de la estimulación de las CD también debe ser evaluada, por lo que proponemos identificar proteínas anteriormente reconocidas como importantes en la inmunomodulación como prostaglandinas, TNF- α , TGF- β , IL-10 e IFN- γ .

Diseño experimental

En un principio se establecerán cultivos celulares de células tumorales (CT) y de WJ-MSK. Al obtener una población expandida se realizará un co-cultivo de estas células, con el uso de un inserto transwell, para posteriormente poder obtener el sobrenadante. La presencia y concentración de prostaglandinas y citocinas (TNF- α , TGF- β , IL-10 e IFN- γ) del sobrenadante se evalúa con un sistema luminex, o con ELISAs.

Se obtendrán precursoras de CD de la médula ósea de ratones C57BL/6 las cuales serán diferenciadas *in vitro* mediante su cultivo con sobrenadante de células CHO transfectadas con el gen GM-CSF (Lutz, *et al.*, 1999). Después de cuatro días de diferenciación de las células de médula ósea se adicionará al medio el sobrenadante del co-cultivo WJMSK-CT siguiendo el programa de adición del sobrenadante de las células CHO; posteriormente se evaluará el

fenotipo y secreción de las moCD obtenidas a través de citometría de flujo. Se analizarán los fenotipos de las CD bajo los diferentes tratamientos (Fig. 7). Posteriormente, para confirmar la actividad, ya sea tolerante o inmunogénica, de las moCD se evaluará la producción de IL-10 e IL-12.

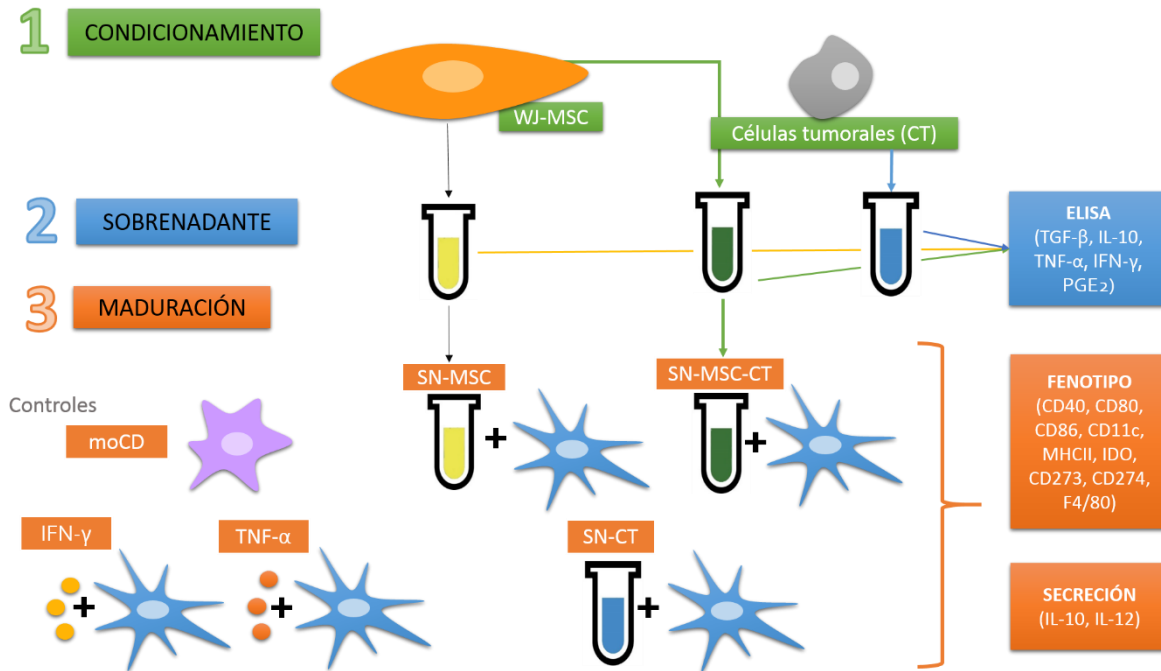


Figura 6. **Diseño experimental.** El experimento se divide en tres etapas principales. El condicionamiento se refiere al cultivo de células troncales mesenquimales de gelatina de Wharton (WJ-MSC), WJ-MSC en cocultivo con células tumorales (CT) y CT. De estos cultivos se obtiene el sobrenadante (SN) para su evaluación por ELISA y para su uso como tratamiento en la diferenciación y maduración de moCD. La tercera etapa consiste en la diferenciación y maduración de CD derivadas de médula ósea (moCD) en presencia de distintos tratamientos: sin tratamiento, interferón gamma (IFN- γ ; bajas concentraciones), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), SN-MSC, SN-MSC-CT y SN-CT. Para cada uno de estos tratamientos se analizará por citometría de flujo el fenotipo y la secreción de las moCD tratadas.

10.1 Métodos

Debido al carácter bibliográfico de la presente tesis, se realizó únicamente un ensayo prospectivo del experimento con la finalidad de probar la viabilidad del diseño propuesto y su eficiencia. A continuación se detallan los métodos llevados a cabo para evaluar el fenotipo de las moCD diferenciadas bajo distintos tratamientos y determinar la eficiencia del diseño experimental en la producción de tolCD. Se evaluó únicamente el fenotipo de estas células basado en su diferenciación (CD11c y MHCII) así como las moléculas de maduración CD80, CD86 y CD273.

10.1.1 Células tumorales de cáncer de mama HCC1954

Esta línea celular fue inmortalizada de cáncer de mama, se caracteriza por la ausencia de receptores de estrógeno y de progesterona, y a su vez se observa una sobre expresión de HER2+ (ER-PR-HER2+). Esta la línea celular fue amablemente donada por parte de la Dra. Maritza García García, Universidad Autónoma de Guadalajara. Las células se sembraron y cultivaron con RPMI suplementado (20% SFB, 1% antibiótico). El medio se cambió cada tercer día y se cultivaron las células hasta obtener una confluencia de 80%. Una vez confluyente se despegaron con Tripsina/EDTA al 0.25% y se sembraron en una densidad de 1×10^5 células en insertos con membrana de 0.4 μm para precondicionar a las MSC.

10.1.2 Cultivo y precondicionamiento de WJ-MSC

Las MSC fueron obtenidas de gelatina de Wharton, de cordón umbilical, y cultivadas con DMEM-F12 suplementado (SFB 20%, antibiótico 1%) de acuerdo con el método de Salehinejad *et al.* (2012), con el cual se obtiene 99% de pureza evaluada por la presencia de los marcadores CD13, CD73, CD90, CD105, HLA-I y la ausencia de los marcadores HLA-2, CD14, CD31, CD34, CD45. Se sembraron en cajas Petri de 10 cm cambiando el medio cada 48 horas. Al llegar hasta una confluencia del 80% se agregó medio sin SFB, después de 48 horas se colectó el sobrenadante. Este fue filtrado y congelado a -80°C hasta su uso posterior. Para el precondicionamiento, se sembraron 1×10^6 de WJ-MSC en placas de 6 pozos durante 24 horas. Posteriormente se colocaron insertos y se sembraron dentro de ellos 1×10^5 células HCC1954. La interacción se permitió mediante co-cultivo por 48 horas con RPMI plano. Se colectó el sobrenadante, se filtró y congeló a -80°C hasta su uso posterior.

10.1.3 Obtención de GM-CSF de cultivo de células CHO

Se sembraron células CHO con transfección estables (seleccionadas con geneticina) con el gen de GM-CSF con F12 suplementado (20% SFB, 1% antibiótico) hasta obtener una confluencia del 80%. Se agregó F12 plano durante 48 horas y se removió el sobrenadante rico en GM-CSF. El sobrenadante fue centrifugado, filtrado y congelado a -80°C .

10.1.4 Diferenciación de moCD

Se utilizaron ratones adultos, hembras de la cepa C57BL/6, mantenidos en las instalaciones del Departamento de Biología Celular y Tisular, de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo condiciones de luz oscuridad y temperatura controladas, con agua y alimento ad libitum y sin hacinamiento, en concordancia con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-

1999. Para cada ensayo se utilizaron dos ratones, los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical, de ellos se colectaron los fémures y tibias en condiciones asépticas posteriormente en campana de flujo laminar se cortaron las epífisis de los huesos y se obtuvo la médula ósea de las diáfisis. La médula ósea fue extraída con ayuda de una aguja de insulina y medio RPMI suplementado (20% suero fetal bovino (SFB), 1% antibiótico). La suspensión celular obtenida se cultivó en medio RPMI suplementado con 20% SFB, 1% antibiótico y medio rico en GM-CSF al 20% (sobrenadante de células CHO transfectadas con el gen GM-CSF). Se sembraron 15×10^6 de células en botellas T-75 con 80% RPMI suplementado (20% SFB, 1% antibiótico) y 20% sobrenadante de las células CHO en una proporción de 1 ml por cada 1×10^6 de células. El sobrenadante empleado al 20% es equivalente a utilizar 200U/ml de GM-CSF de acuerdo al protocolo de Lutz et al. (1999). Debe agregarse medio fresco cada dos días con las mismas proporciones durante 8 días (Piñón-Zárate, 2014). Al cuarto y sexto día se agregó el sobrenadante correspondiente de cada grupo experimental.

10.1.5 Evaluación de los efectos en la maduración de moCD

En el octavo día de cultivo con los distintos estímulos se tiñeron las células para su evaluación a través de citometría de flujo (BD Bioscience FACScalibur) con anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD273 y anti-MHCII (todos los anticuerpos de BD Bioscience, USA). Se despegaron las células semi-adherentes y obtuvo el sobrenadante de los cultivos de moCD. Se centrifugó el sobrenadante y se obtuvo el botón de células. Se resuspendió el botón en PBS de tinción y se separó en tubos Ependorf para su tinción, aproximadamente 5×10^5 moCD por tubo. Se tiñeron tubos control para MHCII (FITc), CD11c (APC) y con CD86 (PE). Los marcadores MHCII y CD11c se utilizaron para identificar a la población de CD vivas y evaluar su diferenciación. Se realizaron dos repeticiones por cada marcador con PE. Todos los resultados fueron procesados con el programa FlowJo v.10.

Grupos experimentales:

- 1) CD estimuladas con sobrenadante 20% WJMSC-HCC1954
- 2) CD estimuladas con sobrenadante 20% WJMSC
- 3) CD estimuladas con sobrenadante 20% HCC1954
- 4) CD estimuladas con TNF α 10000 U/ml (control de activación)
- 5) CD estimuladas con IFN γ 500 U/ml (control tolerogénico)
- 6) CD sin estimulación

10.2 Resultados

10.2.1 Diferenciación de moCD en presencia de snMSC-HCC1954

La diferenciación de moCD se pudo reconocer mediante la evaluación de la expresión de CD11c y MHC II, en todos los grupos experimentales se observó una población CD11c^{high} y MHCII^{high}. En la Fig. 7 se muestra la diferenciación observada en cada uno de los grupos experimentales.

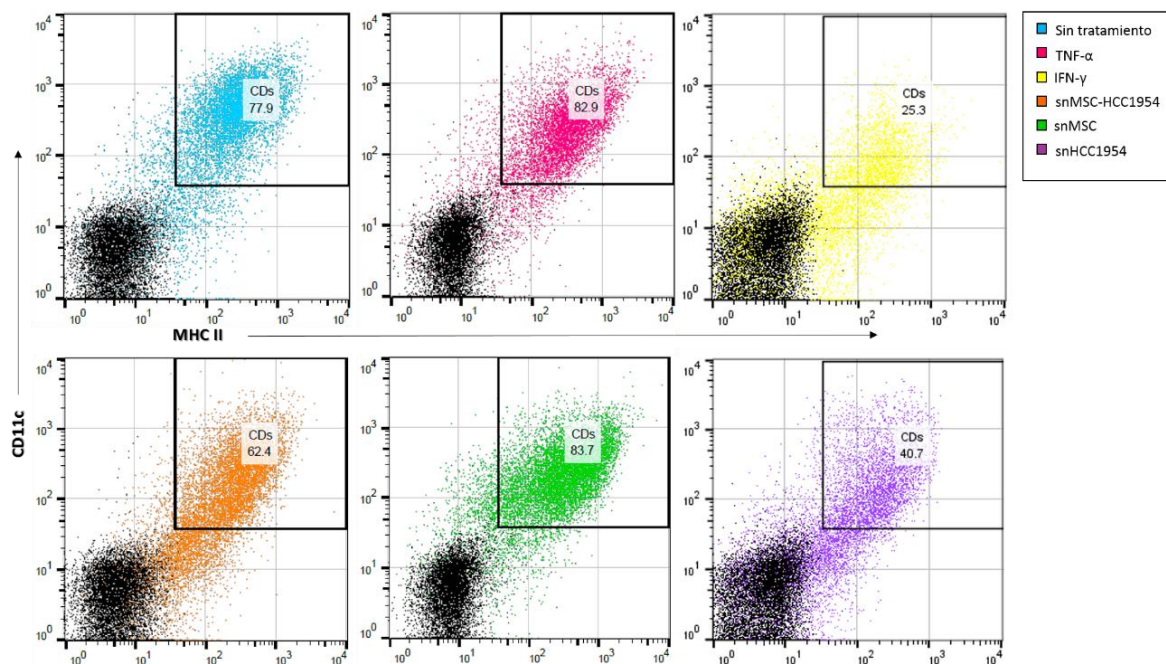


Figura 7. Diferenciación de moCD con diferentes tratamientos. Dot plots de citometría de flujo para la identificación de la población de CD (CD11c+, MHCII+). La diferenciación es evidente en todos los tratamientos. Los porcentajes de diferenciación son: ST 77.9%, TNF α 82.9%, IFN γ 25.3%, snMSC 83.7%, snMSC-HCC 62.4% y snHCC 40.7%.

El porcentaje de diferenciación observado en los grupos controles de CD fue de 77.9% en el grupo de CD sin estímulo, de 82.9% en el grupo que recibió la administración de TNF α , y de 25.3% en el que recibió IFN γ . Mientras que en el grupo experimental que recibió estimulación con el sobrenadante de células mesenquimales el porcentaje de diferenciación fue de 83.7%, el cuál disminuyó a 62.4% cuando el estímulo fue con mesenquimales condicionadas con células tumorales, y a 40.7% cuando solamente recibieron el sobrenadante de células tumorales.

Paralelamente se evaluó el estado de maduración de las CD mediante la determinación de la intensidad de la expresión, la cual fue estandarizada como porcentaje de la media de intensidad de fluorescencia (%MFI), donde las CD tratadas con TNF α e IFN γ muestran una mayor expresión de ambos marcadores que lo observado en las CD diferenciadas sin tratamiento.

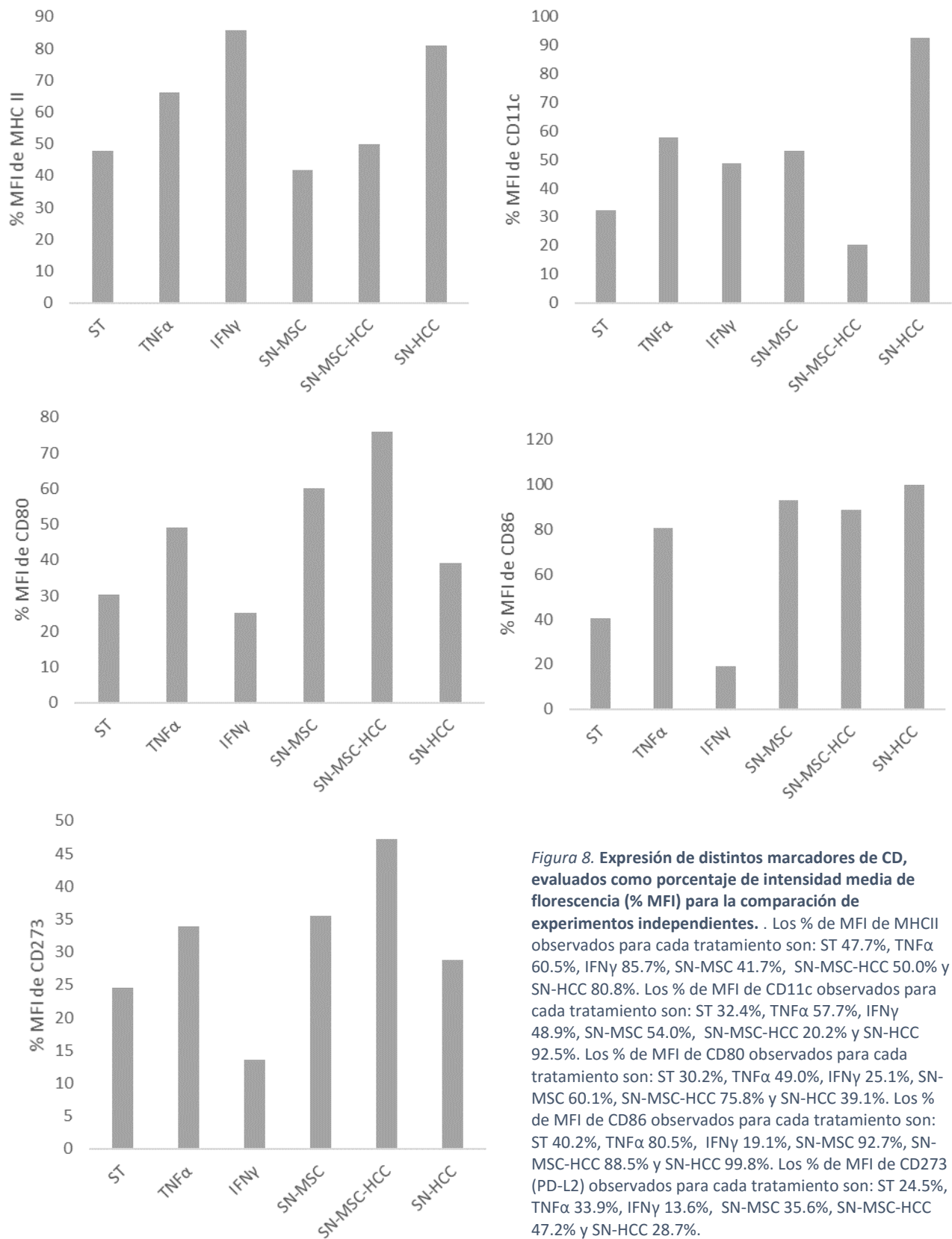


Figura 8. Expresión de distintos marcadores de CD, evaluados como porcentaje de intensidad media de fluorescencia (% MFI) para la comparación de experimentos independientes. Los % de MFI de MHCII observados para cada tratamiento son: ST 47.7%, TNFα 60.5%, IFNγ 85.7%, SN-MSc 41.7%, SN-MSc-HCC 50.0% y SN-HCC 80.8%. Los % de MFI de CD11c observados para cada tratamiento son: ST 32.4%, TNFα 57.7%, IFNγ 48.9%, SN-MSc 54.0%, SN-MSc-HCC 20.2% y SN-HCC 92.5%. Los % de MFI de CD80 observados para cada tratamiento son: ST 30.2%, TNFα 49.0%, IFNγ 25.1%, SN-MSc 60.1%, SN-MSc-HCC 75.8% y SN-HCC 39.1%. Los % de MFI de CD86 observados para cada tratamiento son: ST 40.2%, TNFα 80.5%, IFNγ 19.1%, SN-MSc 92.7%, SN-MSc-HCC 88.5% y SN-HCC 99.8%. Los % de MFI de CD273 (PD-L2) observados para cada tratamiento son: ST 24.5%, TNFα 33.9%, IFNγ 13.6%, SN-MSc 35.6%, SN-MSc-HCC 47.2% y SN-HCC 28.7%.

Las células diferenciadas en presencia de SN-MS, SN-MS-HCC1954 o SN-HCC1954 expresan CD11c y MHCII de manera diferencial (Fig. 8). Cabe señalar que el % MFI de CD11c de las moCD en presencia de snMSC-HCC1954 es bastante bajo con respecto al resto de los tratamientos, tan solo del 21%. Por otra parte, el uso del SN-HCC1954 aumenta la expresión de ambas moléculas, teniendo el mayor % MFI de CD11c de todas las condiciones con 92.5%.

10.2.2 Expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 por moCD en presencia de snMSC-HCC1954

Para evaluar el fenotipo de maduración de las moCD estimuladas con los distintos tratamientos se evaluó la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. Acorde a lo esperado observamos una baja expresión de ambas moléculas en las moCD sin tratamiento, así como en las moCD estimuladas con IFN γ , mientras que se observó una alta expresión de estas moléculas en las moCD tratadas con TNF α . Sorprendentemente observamos una mayor expresión de CD80 y CD86 en las moCD tratadas con SN-MS, SN-MS-HCC1954 y SN-HCC1954 (Fig. 8).

10.2.3 Expresión del ligando 2 de muerte programada CD273 por moCD en presencia de snMSC-HCC1954

Debido a que se compararon distintos ensayos independientes, la expresión de la molécula co-inhibitoria CD273 fue evaluada como el porcentaje de la media de intensidad de fluorescencia, donde la mayor expresión de CD273 fue 47.2% en el grupo de las moCD tratadas con SN-MS-HCC1954. Seguida por las moCD diferenciadas en presencia de SN-MS con 35.6% MFI y 33.9% con TNF α . Finalmente el grupo de moCD que estuvieron en presencia de SN-HCC la expresión fue de 28.7%, ligeramente mayor que en el grupo sin estímulo. Solo en el grupo que recibió IFN γ se observó una débil expresión de 13.6% (Fig. 8).

10.3 Discusión

Los datos obtenidos en el estudio preliminar de nuestra propuesta experimental son muy interesantes.

En términos de la diferenciación de CD, observamos que la presencia de SN-MSHCC1954 ejerce un efecto negativo sobre el proceso de diferenciación en comparación con los otros tratamientos, ya que observamos una reducción de alrededor del 10% con respecto a las moCD sin tratamiento, por lo cual se puede proponer que el SN-MSHCC1954 está afectando la diferenciación de las CD. Se ha propuesto anteriormente que la presencia de IL-10 afecta el proceso de diferenciación de CD. La IL-10 disminuye la secreción de interleucinas pro-inflamatorias y la expresión de MHC II en las CD. Paralelamente, se ha confirmado que la secreción de MSC promueve la secreción de esta interleucina por las CD confiriendo una función tolerante a estas células (Kyurkchiev, *et al.*, 2014).

Aunado a esto, la IL-6 se ha considerado como otro responsable de esta regulación al promover a su vez la secreción de IL-10. No obstante IL-6 no se considera el mecanismo principal para la inhibición de la diferenciación de CD debido a que cuando se bloqueó IL-6 en el medio condicionado de MSC con un anticuerpo específico se observó un aumento en la diferenciación de CD; sin embargo el porcentaje de diferenciación siguió estando afectado (Djouad, *et al.*, 2007). Este mismo grupo comprobó que PGE2 está también involucrado en la función de IL-6 como inmunoregulador, por lo que se considera de igual importancia para esta función. Es por esto que consideramos que IL-10, IL-6 y PGE2, las cuales se ha reportado están presentes en el secretoma de MSC (da Silva Meirelles, *et al.*, 2009; Amable, *et al.*, 2014; Ma, *et al.*, 2014; Bai, *et al.*, 2016), pueden estar modulando la diferenciación de las CD.

Por otra parte, el hecho de que hayamos observado una baja expresión de CD11c en las células tratadas con SN-MSHCC1954, puede estar relacionado con la propia función de las CD. En un experimento similar al nuestro, el cual evaluaba el uso del sobrenadante de MSC estimuladas con esplenocitos sobre la diferenciación de CD, había una disminución únicamente la expresión de CD11c manteniendo los marcadores CD40, CD80, CD86 y MHCII sin cambios significativos (Djouad, *et al.*, 2007). Se ha observado que la molécula CD11c tiene como ligando a ICAM-1 así como LFA-1 por lo que permite la interacción de CD con linfocitos T y por lo tanto la activación de linfocitos T citotóxicos (Jung, *et al.*, 2002; Bullard, *et al.*, 2007). Por lo tanto, la baja expresión de esta molécula por parte de las moCD podría estar alterando la función de este tipo celular.

Aun cuando hay una menor diferenciación, las CDs diferenciadas en presencia de SN-MSHCC1954 muestran una alta expresión de las moléculas comúnmente asociadas a un fenotipo de maduración. Se ha propuesto anteriormente que el fenotipo tolerante de CD, especialmente aquellas CD diferenciadas *in vitro*, pueden tener un fenotipo con alta expresión de MHC II y

moléculas co-estimuladoras; lo que ayuda a determinar su función son las citocinas en el medio en el que se encuentran (Lutz y Schuler, 2002). Por lo tanto, el hecho de que hayamos observado en el grupo de CD tratadas con el SN-MS, SN-MS-HCC1954 y SN-HCC1954 una mayor intensidad de las moléculas MHC II, CD80, CD86 y CD273 no es concluyente sobre su función. La evaluación de las citocinas secretadas por estas CD es esencial para poder determinar si este fenotipo refleja una función tolerante.

En cuanto a la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 también observamos un comportamiento inesperado ya que presentan un incremento en todas las CD tratadas con sobrenadantes con respecto a las moCD estimuladas con TNF α , por lo que parecieran estar más maduras que nuestro control positivo para maduración. Sorprendentemente la expresión de CD80 y CD86 en presencia de SN-MS-HCC1954 fue muy elevada. El % MFI de CD80 es 25% mayor que aquellas células estimuladas con TNF α y para CD86 fue 8% mayor. La secreción de citocinas guiará la función de las CD hacia la tolerancia o la inmunidad (Lutz y Schuler, 2002). Es por esto que consideramos imprescindible la evaluación de las citocinas IL-10 e IL-12 secretadas por las moCD bajo los distintos estímulos ya que estas determinan si existe una inactivación de linfocitos T o si los linfocitos T son activados, respectivamente (Wakkach, *et al.*, 2003).

A pesar de tener registros de administración de MSC humanas (Ljujic, *et al.*, 2013) y diferentes células tumorales humanas (Yoshimura, *et al.*, 1997) en ratones, es muy posible que los sobrenadantes de MSC y HCC1954 (los cuales probablemente contienen pequeños detritus celulares y exosomas) estén siendo reconocidos por las CD del ratón como ajenos y desencadenando una respuesta inmune exacerbada.

De hecho, se ha observado que el mínimo cambio en epítopes puede causar la modificación de la reacción de inmune. En un experimento realizado con ratones C57BL/6 se observó que la inyección del antígeno de diferenciación de melanocitos g75 alogénico no producía una reacción inmune; mientras tanto el uso del antígeno g75 de humano causaba una respuesta inmune importante. Con esto concluyente que los cambios en los antígenos pueden modificar una respuesta tolerante hacia una respuesta inmunogénica (Naftzger, *et al.*, 1996). De manera similar, otro grupo inmunizó ratas con la proteína oncogénica HER-2/neu humana para evaluar si esto causaba una respuesta a la proteína propia de rata. Estas proteínas son 92% homólogas, sin embargo las ratas inmunizadas presentaron una actividad contra la proteína de humanos y de rata. Después de realizar experimentos puntuales concluyeron que el epítipo debe ser 100% similar para no causar esta respuesta (Disis, *et al.*, 1998).

Considerando lo anterior, se puede inferir que el fenotipo observado en presencia de snHCC1954, snMSC y el snMSC-HCC1954 sean a causa de una activación de las moCD por la naturaleza xenogénica de las células y por lo tanto de los exosomas secretados. El uso de células pertenecientes únicamente a una especie debería ser utilizado en estudios de seguimiento a este diseño experimental.

Es esencial tomar el anterior ensayo como una rápida mirada a la posible modulación de las CD a través del sobrenadante de MSC y células tumorales, por lo que se requiere de más experimentos y repeticiones para poder llegar a resultados concluyentes. Las conclusiones presentadas son inferencias y deben tomarse con cautela. El fenotipo de tolCD no es el único determinante de su función y deben considerarse también las citocinas secretadas como parte importante para la determinación funcional de una población de CD (Steinman 2012). Es por esto que la evaluación de las interleucinas secretadas sería muy enriquecedor para el presente trabajo.

La evaluación de las citocinas presentes en los sobrenadantes utilizados es a su vez indispensable para explicar los resultados observados en el fenotipo y secreción de las CD. Nosotros proponemos realizar ELISAs para evaluar la concentración de las citocinas TGF- β , TNF- α , IL-10 e IFN- γ en el medio ya que podrían estar teniendo efectos importantes sobre la función de las CD; o mejor aún un trapeo de citocinas y factores de crecimiento para identificar una mayor cantidad de posibles participantes en esta regulación y tener conclusiones más amplias. Sería también interesante y complementario el continuar esta línea de investigación con la evaluación de la activación de linfocitos T a través de su interacción con las CD condicionadas con el ambiente propuesto. Además el uso de distintas líneas de cáncer proporcionaría mucha información valiosa sobre la modulación efectiva de tolCD *in vitro*.

Conclusiones

A partir de la presente revisión bibliográfica podemos concluir que:

1. El desequilibrio de la función de las CD es observado en muchas enfermedades; en ciertas patologías observamos un aumento en las CD activadas, mientras que en otras observamos el aumento de las CD tolerantes.
2. La función inmunomoduladora de las células troncales mesenquimales han tomado relevancia debido a su posible uso en terapias celulares.
3. Se ha comprobado que la interacción de las MSC o su sobrenadante con CD causa una maduración tolerante de estas.
4. El preconditionamiento de MSC afecta la función y secreción de estas células, por lo cual se pueden modular a través del microambiente.
5. El preconditionamiento de MSC inhibe la diferenciación y promueve la maduración de moCD hacia un fenotipo tolerante.
6. Ha sido propuesto que el preconditionamiento por parte de las células tumorales hacia las MSC podría estar modificando sus efectos inmunoreguladores.

Con base en los datos preliminares obtenidos, inferimos que:

1. El SN-MS-C-HCC1954 podría ejercer un efecto negativo en la diferenciación de moCD, justificado por la baja expresión de CD11c lo que probablemente sea debido a las citocinas presentes en el medio.
2. El empleo de SN-MS-C, SN-MS-C-HCC1954 y SN-HCC1954 puede estar ejerciendo un efecto positivo sobre moléculas co-estimuladoras de las moCD tratadas.

Es esencial evaluar si el reconocimiento de epítopes humanos es responsable de la activación de CD en presencia de los distintos sobrenadantes para determinar los efectos de estos sobre la maduración de moCD. El modelo experimental debe realizarse con células de una misma especie para evitar reacciones por reconocimiento de antígenos xénicos. La cuantificación de la secreción de IL-10 e IL-12 es necesaria para determinar la función de las moCD con distintos estímulos; así como la identificación de citocinas en los sobrenadantes utilizados para identificar algún responsable de esta modificación.

Literatura citada

Aggarwal, S y Pittenger, MF. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogenic cell response. *Blood*. 105(4): 1815-1822. doi: 10.1182/blood-2004-04-1559

Amable, PR., Telles Teixeira, MV., Vieira Carias, RB., Granjeior, JM, y Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*. 5(2): 53. doi: 10.1186/scrt442.

Asselin-Paturel, C., Brizard, G., Pin, JJ, Briere, F., y Trinchieri, G. (2003). Mouse Strain Differences in Plasmacytoid Dendritic Cell Frequency and Function Revealed by a Novel Monoclonal Antibody. *J Immuno*. 171(12): 6466-6477. doi: 10.4040/jimmuno.171.12.6466.

Audigier, C., Rahman, MJ., Yun, TJ., Tarbell, KV., y Lesage, S. (2017). The Importance of Dendritic Cells in Maintaining Immune Tolerance. *J Immunol*. 198: 2223-2231. doi: 10.4049/jimmunol.1601629.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, SM., Cancedda, R., y Pennesi, G. (2007). Cell therapy using allogenic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 56(4): 1175-1186. doi: 10.1002/art.22511.

Bader, AM., Klose, K., Bieback, K., Dirk, K., Schneider, M., Seifert, M., Choi, YH., Kurtz, A., Falk, V. y Stamm, C. (2015). Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells in vitro. *PLoS ONE*. 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0138477.

Bai, L., Li, D., Li, J., Luo, Z., Yu, S., Cao, S., Shen, L., Zuo, Z., y Ma, X. (2016). Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Acta Histochemica*. 118(8): 761-769. doi: 10.1016/j.acthis.2016.09.006.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, YJ., Pulendran, y Palucka, K. (2000). Immunobiology of Dendritic Cells. *Ann Rev Immunol*. 18: 767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767.

Baron, F. y Storb, R. (2012). Mesenchymal Stromal Cells: A New Tool against Graft-versus-Host Disease? *Bio Blood and Marrow Transp*. 18(6): 822-840. doi: 10.1016/j.bbmt.2011.09.003.

Belz, GT. y Nutt, SL. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol*. 12: 101-113.

Bell, GM., Anderson, AE., Diboll, J., Reece, R., Eltherington, O., Harry, RA., Fouweather, T., MacDonald, C., Chadwick, T., McColl, E., Dunn, J., Dickinson, AM., Hilkens, CMU, y Isaacs, JD. (2017). Autologous tolerogenic dendritic cells for rheumatoid and inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 76(1): 227-234. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208456.

Benham, H., Nel, HJ, Law, SC., Mehdi, AM, Street, S., Ramnourth, N, Pahau, H., Lee, BT., Ng, J., Brunck, ME., Hyde, C., Trouw, LA., Dudek, NL., Purcell, AW, O'Sullivan, BJ., Connolly, JE., Paul, SK., Le Cao, KA, y Thomas, R. (2015). Citrullinated peptide dendritic cell immunotherapy in HLA risk genotype-positive rheumatoid arthritis patients. *Sci Transl Med*. 7(290): 290ra87. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9301.

Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., y Rachmilewix, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105: 2214-2219.

Blazar, BR., Murphy, WJ. Y Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol*. 12: 443-458. doi: 10.1038/nri3212.

Bruno, S., Deregibus, M.C., y Camussi, G. (2015). The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett.* 168(2015): 154-158. doi:10.1016/j.imlet.2015.06.007.

Boegel, S., Löwer, M., Bukur, T., Sahin, U., y Castle, J. C. (2014). A catalog of HLA type, HLA expression, and neo-epitope candidates in human cancer cell lines. *Oncoimmunology.* 3(8): e954893. <http://doi.org/10.4161/21624011.2014.954893>.

Boks, M.A., Kager-Groenland, R., Haasjes, MS., Zwaginga, JJ., van Ham, SM., y Ten, BA. (2012). IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction—a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin Immunol.* 142: 332-342.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, MC., y Steinman, RM. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med.* 196(12): 1627-1638. doi: 10.1084/jem.20021598.

Bullard, DC., Hu, X., Adams, JE., Schoeb, TR., y Barnum, SR. (2007). P150/95 (CD11c/CD18) Expression Is Required for the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 170(6): 2001-2008. doi: 10.2353/ajpath.2007.061016

Burnet, FM. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 13: 1-27.

Butler, M., Ng, CY, van Heel, DA., Lombardi, G., Lechler, R., Playford, RJ., y Ghosh, S. (2006). Modulation of dendritic cell phenotype and function in an *in vitro* model of intestinal epithelium. *Eur J Immunol.* 36(4): 864-874. doi: 10.1002/eji.200535497.

Caplan, AI. (1991). Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res.* 9(5): 641-650. doi:10.1002/jor.1100090504.

Caplan, AI. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 213: 341-347.

Castell-Rodríguez, AE., Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M., Jarquín-Yáñez, K., y Medina-Solares, I. (2017). Dendritic Cells: Location, Function, and Clinical Implications. *Biology of Myelomonocytic Cells.* doi: 10.5772/intechopen.68352.

Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, FM., Krensky, AM., y Stroncek, DF. (2011). Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer Immunol Immunother.* 60(4): 457-466. doi: 10.1007/s00262-010-0954-6.

Castro, AG., Neighbors, M., Hurst, SD., Zonin, F., Silva, RA., Murphy, E., Liu, YJ. y O'Garra, A. (2000). Anti-interleukin 10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 192(10): 1529-1534. doi: 10.1084/jem.192.10.1529.

Caux, C., Ait-Yahia, S., Chamin, K., de Bouteiller, O., Dieu-Nosjean, MC., Homey, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Zlotnik, A., y Vicari, A. (2000). Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Semin Immunopathol.* 22: 345-369.

Chen, WJ. (2011). IDO: more than an enzyme. *Nat Immunol.* 12(9): 809-811. doi: 10.1038/ni.2088.

Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marin, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolomé, ST., Sambuceti, G., y Traggiai, E. (2011). Mesenchymal stem cells impair *in vivo* T-cell priming by dendritic cells. *PNAS.* 108(72): 17384–17389. doi: 10.1073/pnas.1103650108.

- Chung, CY., Ysebaert, D., Beneman, ZN., y Cools, N. (2013). Dendritic cells: cellular mediators of immunological tolerance. *Clin Dev Immunol.* 2013: 972865. doi: 10.1155/2013/972865.
- Crotty, S. (2011). Follicular Helper CD4 T Cells (Tfh). *Annu Rev Immunol.* 29: 621-663. doi: 10.1146/annurev-immunol-03120-101400.
- Crotty, S. (2014). T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 41(4): 529-542. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004.
- De Matos Silva, P., Bier, J., Negrini Paiatto, L., Galdino Albuquerque, C., Lopes Sousa, C., Romani Fernandes, LG., de Silva Cunha Tamashiro, WM., y Ucelli Simioni, P. (2015). Tolerogenic Dendritic cells on Transplantation: Immunotherapy Based on Second Signal blockage. *J Immunol Res.* 2015. doi:10.1155/2015/856707.
- Dennis, JE. y Charbord, P. (2002). Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells.* 20(3): 205-214. doi: 10.1634/stemcells.20-3-205.
- Djoud, F., Charbonnier, LM., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos., C., Jorgensen, C. y Noël, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells.* 25(8): 2025-2032. doi: 10.1634/stemcells.2006-0548.
- Dudek, AM, Marin, S., Garg, AD., y Agostinis, P. (2013). Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol.* 4:438. doi: 10.3389/fimmu.2013.00438.
- Dong, H. y Bullock TNJ. (2014). Metabolic Influences That Regulate Dendritic Cell Function in Tumors. *Front Immunol.* 5: 24. doi: 10.3389/fimmu.2014.00024.
- Dunn, GP., Bruce, AT., Ikeda, H., Old, LJ. y Schreiber, RD. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 3: 991-998.
- Dunn, GP., Old, LJ. y Schreiber, RD. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 22: 329-360. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- Eljaafari, A., Li, YP., y Miossec, P. (2009). IFN-gamma, as secreted during an alloresponse, induces differentiation of monocytes into tolerogenic dendritic cells, resulting in FoxP3+ regulatory T cell promotion. *J Immunol.* 183(5): 2932-2945. doi: 10.4049/jimmunol.0804352.
- El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, JF, Menu, P, Velot, E., y Decot, V. (2014). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? *Tissue Eng part B Rev.* 20(5): 523-544. doi: 10.1089/ten.teb.2013.0664.
- English, K. Barry, FP., y Mahon, BP. (2008). Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett.* 115(1): 50-58. doi: 10.1016/j.imlet.2007.10.002.
- Esche, C., Lokshin, A., Shurin, GV., Gastman, BR., Rabinowich, H., Watkins, SC., Lotze, MT. y Shurin, MR. (1999). Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leuko Bio.* 66(2): 336-344.
- Finkelman, FD., Lees, A., Birnbaum, R., Gause, WC., & Morris, SC. (1996). Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J Immunol.* 157(4), 1406-1414.
- Fridman,WH., Pages, F., Sautes-Fridman, C., y Galon J. (2012). The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 11(2): 298-306. doi: 10.1038/nrc3245.

- Friedenstein, AJ., Piatetzky-Shapiro, II., y Petrakova, KV. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16: 381-390.
- Gabrilovich, DI., Chen, HL., Girgis, KR., Cunningham, T., Meny, GM., Nadaf, S., Kavanaugh, D. y Carbone DP. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 10: 1096-1103. doi: 10.1038/nm1096-1096.
- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. y Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat Rev Immunol.* 17: 97-111. doi: 10.1038/nri.2016.107.
- Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V., & Reizis, B. (2013). The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 13(8): 566-577. doi: 10.1038/nri3477.
- Gebler, A., Zabel, O., & Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med.* 18(2): 128-134. doi: 10.1016/j.molmed.2011.10.004.
- Ghiringhelli, F., Puig, PE., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B. y Zitvogel, L. (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- β -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 202(7): 919-929. doi: 10.1084/jem.20050463.
- Ghosh, T., Barik, S., Bhuniya, A., Dhar, J., Dasgupta, S., Ghosh, S., Sarkar, M., Guha, I., Sarkar, K., Chakrabarti, P., Saha, B., Storkus, WJ., Baral, R., y Bose, A. (2016). Tumor-associated mesenchymal stem cells inhibit naïve T cell expansion by blocking cysteine export from dendritic cells. *Int J Cancer.* 139(9): 2068-2081. doi: 10.1002/ijc.30265.
- Goldman, B. y DeFrancesco, L. (2009). The cancer vaccine roller coaster. *Nat Biotechnol.* 27(2): 129-139. doi: 10.1038/nbt0209-129.
- Gonzalez, B., Guerra, C., Morris, D., Gary, D. y Venketaraman, V. (2010). Dendritic cells in infectious disease, hypersensitivity, and autoimmunity. *Int J Interferon Cytokine Mediat Res.* 2010(2): 137-147. doi: 10.2147/ijicmr.si1978.
- Gordon, JR., Ma, Y., Churchman, L., Gordon, SA., y Dawicki, W. (2014). Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.* 5(7). doi: 10.3389/fimmu.2014.00007.
- Gray, A., Maguire, T., Schloss, R., y Yarmuch, ML. (2015). Identification of IL-1 β and LPS as optimal activators of monolayer and alginate-encapsulated mesenchymal stromal cell immunomodulation using design experiments and statistical methods. *Biotechnol Prog.* 31(4): 1058-1070. doi: 10.1002/btpr.2103.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, SH, Onai, N., Schraml, BU., Segura, E., Tussiwand, R., y Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 14: 571-578. doi: 10.1038/nri3712.
- Hanahan, D. y Weinberg, RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. y Weiberg, RA. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 144(5): 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., y Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Comm and Signaling.* 9(12). doi: 10.1186/1478-811X-9-12.
- Haase, C., Jorgensen, TN., y Michelsen, BK. (2002). Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells *in vitro* and strongly influences T-cell priming *in vivo*. *Immunol.* 107: 489-499.

Hohaus, S., Petrovick, MS., Voso, MT., Sun, Z., Zhang, DE., y Tenen, DG. (1995). PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol.* 15(10): 5830-5845.

Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K., y Jonuleit, H. (2013). Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.* 4(82). doi:10.3389/fimmu.2013.00082.

Ishikawa, F., Niino, H., Iino, T., Yoshida, S., Noriyuki, S., Onohara, S., Miyamoto, T., Minagawa, H., Shultz, LD., Harada, M., y Akashi, K. (2007). The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood.* 110(10): 3591-3660. doi: 10.1182/blood-2007-02-071613.

Janeway, CA., y Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Ann Rev Immunol.* 20: 197-216. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Jiang, XX., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S., Wu, Y., Yu, X., y Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Bloodl.* 105(10): 4120-4126.

Jongmans, W., Tiemessen, DM., van Vlodrop, IJH., Mulders, PFA, y Oosterwijk E. (2005). Th1-Polarizing Capacity of Clinical-Grade Dendritic Cells Is Triggered by Ribomunyl but Is Compromised by PGE2. *J Immunother.* 28(50): 480-487.

Jung, J. (2014). Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicol Res.* 30(1): 1–5. doi: 10.5487/TR.2014.30.1.001.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, EG., y Littman, DR. (2002). In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. *Immunity.* 17(2): 211-220. doi: 10.1016/S1074-7613(02)00365-5.

Kaka, A. S., Foster, A. E., Weiss, H. L., Rooney, C. M., y Leen, A. M. (2008). Using Dendritic Cell Maturation and IL-12 Producing Capacity as Markers of Function: A Cautionary Tale. *J Immunother.* 31(4): 359–369. doi: 10.1097/CJI.0b013e318165f5d2.

Kallinski, P. (2012). Regulation of Immune Response by Prostaglandin E2. *J Immunol.* 188(1): 21-28. doi: 10.4049/jimmunol.1101029.

Kallinski, P., Hilkens, CMU, Wierenga, EA y Kapsenberg, ML. (1999). T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 20(12): 561-567. doi: 10.1016/S0167-5699(99)01547-9.

Karnoub, AE., Dash, AB., Vo, AP., Sullivan, A., Brooks, MW., Bell, GW., Richardson, AL., Polyak, K., Tubo, R., y Weinber, RA. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 449 (7162): 557-563. doi:10.1038/nature06188.

Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, IL, y Manz, MG. (2003). Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 198(2): 305–313.

Kerkar, SP., Chinnasamy, D., Hadi, N., Melenhorst, J., Muranski, P., Spyridonidis, A., Ito, S., Weber, G., Yin, F., Hensel, N., Wang, E., Marincola, FM., y Barrertt, AJ. (2014). Timing and intensity of exposure to interferon-gamma critically determines the function of monocyte-derived dendritic cells. *Immunology.* 143: 96-108.

Kim, R., Emi, M. y Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 121(1):1-14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.

Kim, SY., Lee, JH, Kim, HJ., Park, MK., Huh, JW., Ro, JY., Oh, YM., Lee, SD., y Lee, YS. (2012). Mesenchymal stem cell-conditioned media recovers lung fibroblasts from cigarette smoke-induced damage. *Lung Cell Mol Physio*. 302(9): L891-L908. doi: 10.1152/ajplung.00288.2011.

Klein, L., Kyewski, B., Allen, PM., y Hogquist, A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*. 14:377-391. doi: 10.1038/nri2667.

Kobalak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A., y Mobasheri, A. (2015). Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods*. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.016.

Konala, V.B.R., Mamidi, M.K., Bhonde, R., Das, A.K., Pochampally, R., y Pal, R. (2016). The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*. 18(2016): 13-24. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.008.

Koura, DT., Horan, JT., Langston, AA., Qayed, M., Mehta, A., Khoury, HJ., Harvey, RD., Suessmuth, Y., Couture, C., Carr, J., Grizzle, A., Johnson, HR., Cheeseman, JA., Conger, JA., Robertson, J. Stempora, L., Johnson, BE., Garrett, A., Kirk, AD., Larsen CP, Waller, EK, y Kean, LS. (2013). In vivo T cell costimulation blockade with abatacept for acute graft-versus-host disease prevention: a first-in-disease trial. *Biol Blood Marrow Transplant*. 19(11): 1638-1649. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.09.003.

Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K., y Kyurkchiev, S. (2014). Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 6(5): 552-570. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552.

Kwon, YW., Heo, SC, Jeong, GO, Yoon, JW, Mo, WM, Lee, MJ, Jang, IH., Kwon, SM, Lee, JS, y Kim, JH. (2013). Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1832(12): 2136-2144. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.002.

Lanzavecchia, A., Iezzi, G., y Viola, A. (2001). From TCR Engagement to T Cell Activation: A Kinetic View of T Cell Behavior. *Cell*. 96(1): 1-4. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80952-6.

Lanzavecchia, A. y Sallusto, F. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 179(4). doi: 10.1084/jem.179.4.1109.

Lanzavecchia, A. y Sallusto, F. (2001). Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol*. 2: 487-492. doi: 10.1038/88678.

Lavoie, JR. y Rosu-Myles, M. (2013). Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie*. 95(2013): 2212-2221. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.017.

Le Blanc, K., Frassoni F., Ball, L., Locatelli, F., Roelof, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundber, B., Bernardo, ME., Remberger, M., Dini, G., Egeler, RM, Bacicalupo, A., Fibbe, W., y Ringden, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 371(9624): 1579-1586. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60690-X.

Lee, EY., Xia, Y., Kim, WS., Kim, MH., Kim, TH., Kim, KJ., Park, BS., y Sung, JH. (2009). Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 17(4): 540-547. doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00499.x.

Li, YP, Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordigoni, P., Mekhloufi, F., Hequest, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, JP., Stoltz, JF., Miossec, P., y Eljaafari, A. (2008). Human Mesenchymal Stem Cells License Adult CD34+ Hemopoietic Progenitor Cells to Differentiate into Regulatory Dendritic Cells through Activation of the Notch Pathway. *J Immunol.* 180(3): 1598-1608. doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1598.

Lipscomb, MF. y Masten, BJ. (2002). Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 82(1): 97-130. doi: 10.1152/physrev.00023.2001

Linsley, PS., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, LS., Damle, NK. y Ledbetter, JA. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 173(3): 561-569.

Lujic, B, Milovanovic, M., Volverevic, V., Murray, B., Bugarski, D., Przyborski, S., Arsenijevic, N., Lukic, ML., & Stojkovic, M. (2013). Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep02298.

Lu, W., Arreas, LC., Ferreira, WT, y Andrieu, JM. (2004). Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med.* 10(12): 1359-1365. doi: 10.1038/nm1147.

Luo, X., Herold, KC., y Miller, SD. (2010). Immunotherapy of Type 1 Diabetes: Where Are We and Where Should We Be Going? *Immunity.* 32(4): 488-499. doi: 10.1016/j.immuni.2010.04.002.

Lutz, MB, Kukutsch, N., Ogilvie, AL, Rössner, S., Koch, F., Romani, N. y Schuler G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 223(1): 77-92.

Lutz, M y Schuler G. (2007). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23(9): 445-449.

Ma, S, Xie, N, Li, W, Yuan, B., Shi, Y. y Wang, Y. (2013). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 21(2): 216-225. doi: 10.1038/cdd.2013.158.

Madrigal, M., Kosagisharaf, SR, y Riorda, NH. (2014). A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 12: 260. doi: 10.1186/s12967-014-0260-8.

McKenna, HJ., Stocking, KL., Miller, RE., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, CR., Lynch, DH., Smith, J., Pulendran, B., Roux, ER., Teepe, M. Lyman, SD., y Psechon, JJ. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood.* 95(11): 3489-3497.

Melki, MT., Saïdi, H., Dufour, A., Olivo-Marin, JC., y Gougeon, ML. (2010). Escape of HIV-1 Infected Dendritic Cells from TRAIL-Mediated NK Cell Cytotoxicity during NK-DC Cross-Talk – A Pivotal Role of HMGB1. *Plos Pathog.* 6(4). doi: 10.1371/journal.ppat.1000862.

Mellman, I. (2013). Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunol Res.* 1(3): 145-149. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0102.

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., y Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed State. *Ann Rev Immunol.* 31: 563-604. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074950.

Mimura, K., Kono, K., Takahashi, A., Kawaguchi, Y., y Fujii, H. (2007). Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother.* 56(6): 761-770. doi: 10.1007/s00262-006-0234-7.

- Meirelles, S., Fontes, AM., Covas, DT, y Caplan, AI. (2009). Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20(2009): 419-127. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
- Mohammadpour, H., Pourfathollah, A.A., Zarif, M.N., y Tahoori, M.T. (2015). TNF- α modulates the immunosuppressive effects of MSCs on dendritic cells and T cells. *Int Immunopharmacol.* 28(2015): 1009-1017. doi:10.1016/j.intimp.2015.07.045.
- Morikawa, S., Mabuchi, Y, Kubota, Y., Nagai, Y., Nibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Suda, T., Okano, H. y Matsuzaki, Y. (2009). Prospective identification, isolation, and systematic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med.* 206(11): 2483-2496. doi: 10.1084/jem.20091046.
- Motta, JM y Rumjanek, VM (2016). Sensitivity of Dendritic Cells to Microenvironment Signals. *J Immunol Res.* doi: 10.1155/2016/4753607.
- Mukhopadhyaya, A., Hanafusa, T., Jarchum, I., Chen, YG, Iwai, Y., Serreze, DV., Steinman, RM., Tarbell, KV., y DiLorenzo, TP. (2008). Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8+ T cells in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci.* 105(17): 6374-6379. doi: 10.1073/pnas.0802644105.
- Munir, H. y McGettrick, HM. (2015). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks, and Rewards. *Stem Cells Dev.* 24(18): 2091-2100. doi: 10.1089/scd.2015.0008.
- Munn, DH., Sharma, MD, Lee, JR., Jhaver, KG, Johnson, TS, Keskin, DB, Marsha, B, Chandler, P, Antonia, SJ, Burgess, R, Slingluff CL, y Mellor, AL. (2002). Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Science.* 297: 1867-1870.
- Murphy, MB, Moncivais, K., y Caplan, AI. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med.* 45. doi: 10.1038/emm.2013.94.
- Murray, IR., West, CC., Hardy, WR., James, AW., Park, TS., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L. Soo, C. y Péault, B. (2013). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell Mol Life Sci.* 71(8): 1353-1374. doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.
- Naftzger, C., Takechi, Y., Kohda, H., Hara, I., Vijayaradhi, S., y Houghton, A. N. (1996). Immune response to a differentiation antigen induced by altered antigen: A study of tumor rejection and autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25): 14809-14814.
- Nagoshi, N., Shibata, S., Nakamura, M., Matsuzaki, Y., Toyama, Y. y Okano, H. (2009). Neural crest-derived stem cells display a wide variety of characteristics. *J Cell Biochem.* 107(6): 1046-1052. doi: 10.1002/jcb.22213.
- Nombel-Arrieta, C., Ritz, C., y Silberstein, LE. (2011). The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12(2): 126-131. doi: 10.1038/nrm3049.
- Ohm, JE., y Carbone, DP. (2001). VEGF as a Mediator of Tumor-Associated Immunodeficiency. *Immunol Res.* 23(2-3): 263-272.
- Ovali, E., Ratip, S, Kibaroglu, A, Tekelioglu, Y, Cetiner, M, Karti, S, Aydin, F, Bayik, M, y Akoglu, T. (2000). Role of hepatocyte growth factor in the development of dendritic cells from CD34+ bone marrow cells. *Haematologica.* 85(5): 464-469.

Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP y Gabrilovich DI. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*. 160: 1224–32.

Pallotta, M.T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Biciato, S., Mazza, E.M.C., Boon, L., Grassi, F. Fioretti, M.C., Fallarino, F., Puccetti, P., y Grohmann, U. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 12(9): 870-878. doi: 10.1038/ni.2077.

Palucka, A. K., Ueno, H., Fay, J. W. y Banchereau, J. (2007). Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells. *Immunol Rev*. 220: 129–150. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00575.x

Patham, B., Simmons, GL. y Subramanya, S. (2011). Advances in dendritic cell-based vaccines for HIV. *Curr Med Chem*. 18(26): 3987-3994.

Perry, JSA y Hsieh, CS. (2016) Development of T-cell tolerance utilizes both cell-autonomous and cooperative presentation of self-antigen. *Immunol Rev*. 271(1): 141-155. doi: 10.1111/imr.12403.

Perry, SA, Lio, CWJ., Kau, AL., Nutsch, K., Yang, Z., Gordon, JI., Murphy, KM, y Hsieh, CS. (2014). Distinct Contributions of Aire and Antigen-Presenting-Cell Subsets to the Generation of Self-Tolerance in the Thymus. *Immunity*. 41(3): 414-426. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.007.

Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, MA, Hernández-Téllez, B., Jarquin-Yáñez, K., y Castell-Rodríguez, AE. (2014). GK-1 Improves the Immune Response Induced by Bone Marrow Dendritic Cells Loaded with MAGE-AX in Mice with Melanoma. *J Immunol Res*. 2014. doi: 10.1155/2014/158980.

Pitt, JM., Charrier, M., Viaud, S., André, F., Besse, B., Chaput, N., y Zitvogel, L. (2014). Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol*. 193(3): 1006-1011. doi: 10.4049/jimmunol.1400703.

Prassana, SJ., Gopalakrishnan, D., Shankar, SR., y Vasandan AB. (2010). Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF, Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differently. *PLoS One*. 5(2): e9016. doi: 10.1371/journal.pone.0009016.

Puhr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, YJ., y Liu, K. (2016). Dendritic Cell Development – History, Advances, and Open Questions. *Semin Immunol*. 27(6): 388-396. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.012.

Razmkhah, M., Jaberipour, M., Erfani, N., Habibagahi, M., Talei, A., y Ghaderi, A. (2011). Adipose derived stem cells isolated from breast cancer tissue express IL-4, IL-10 and TGF- β 1 and upregulate expression of regulatory molecules on T cells: Do they protect breast cancer cells from the immune response? *Cell Immunol*. 266(2011): 116-122. doi: 10.1016/j.cellimm.2010.09.005.

Rommel, E., Terracciano, L., Noppen, C., Zajac, P., Heberer, M., Spagnoli, GC., y Padovan, E. (2001). Modulation of dendritic cell phenotype and mobility by tumor cells *in vitro*. *Hum Immunol*. 62(1): 39-49.

Rojas, D. y Krishnan R. (2010). IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation. *Immunol Lett*. 132(1-2): 31-37. doi: 10.16/j.imlet.2010.05.003.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kämpgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, PO., Steinman, RM., y Schuler, G. (1994). Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 180(1): 83-93.

- Ruderman, EM. y Pope, RM. (2005). The evolving clinical profile of abatacept (CTLA4-Ig): a novel co-stimulatory modulator for the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 7(sup. 2): S21-S25. doi: 10.1186/ar1688.
- Ruffell, B., Chang-Strachan, D., Chan, V., Rosenbusch, A., Ho, CMT., Pryer, N., Daniel, D., Hwang, ES., Rugo, HS., y Coussens, LM. (2014). *Cancer Cell.* 26: 623-637. doi: 10.1016/j.ccell.2014.09.006.
- Sallusto, F. y Lanzavecchia A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res.* 4(Suppl. 3): S127-S132. doi: 10.1186/ar567.
- Saparov, A., Ogay, V., Nurgozhin, T., Jumabay, M., y Chen, WCW. (2015). Preconditioning of Human Mesenchymal Stem Cells to Enhance Their Regulation of the Immune Response. *Stem Cells Int.* 2016. doi: 10.1155/2016/3924858.
- Satake, Y., Nakamura, Y, Kono, M, Hozumi, H, Ngata, T, Tsujimura, K., Enomoto, N., Fujisawa, T, Inui, N, Fujyama, T, Tokura, Y, Matsui, T, Yokomura, K, Shirai, M, Hayakawa, H, y Suda T. (2017). Type-1 polarised dendritic cells are a potent immunogen against Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 21(5): 523-530. doi: 10.5588/ijtld.16.0371.
- Sato, K., Yamashita, N., Yamashita, N., Baba, M., y Matsuyama, T. (2003). Regulatory Dendritic Cells Protect Mice from Murine Acute Graft-versus-Host Disease and Leukemia Relapse. *Immunity.* 18(3): 367-379. doi:10.1016/S1074-7613(03).
- Satpathy, A.T., Wu, X., Albring, J.C., y Murphy, K.M., (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol.* 13(12): 1145-1154. doi:10.1038/ni.2467.
- Schnider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, BH., Rush, C., Brews, JM., Wei, B., Hogg, N., Garside, P. y Rudd, CE. (2006). Reversal of the TCR Stop Signal by CTLA-4. *Science.* 313(5795): 1972-1975. doi: 10.1126/science.1131078.
- Schroeder, M. A., y DiPersio, J. F. (2011). Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech.* 4(3): 318–333. doi: 10.1242/dmm.006668.
- Schwartz, RH. (1992). Costimulation of T Lymphocytes: The Role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin-2 Production and Immunotherapy. *Cell Press.* 71: 1065-1068.
- Seillet, C. y Belz, G. (2013). Chapter Seven – Terminal Differentiation of Dendritic Cells. Development and Function of Myeloid Subsets. *Adv Immunol.* 120(2013): 185-210. doi: 10.1016/B978-0-12-417028.00007-7.
- Seliger, B. y Massa, C. (2013). The Dark Side of Dendritic Cells: Development and Exploitation of Tolerogenic Activity That Favor Tumor Outgrowth and Immune Escape. *Front Immunol.* 4: 419. doi: 10.3389/fimmu.2013.00419.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, Al., Shou, P., Rabson, AB., y Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol.* 33(3): 136-143. doi: 10.1016/j.it.2011.11.004.
- Shortman, K., y Liu, YJ. (2002). Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes. *Nat Rev.* 2: 151-161. doi: 10.1038/nri746.
- Silva, AM., Almeida, MI., Teixeira, JH., Maia, AF., Calin, GA., Barbosa, MA., y Santos, SG. (2017). Dendritic Cell-derived Extracellular Vesicles Mediate Mesenchymal Stem/Stromal Cell Recruitment. *Sci Rep.* 7: 1667. doi: 10.1038/s41598-017-01809-x.

- Sivanathan, KN., Rojas-Canales, DM., Hope, CM., Krishnan, R., Carroll, RP., Gronthos, S., Grey, ST., y Coates, PT. (2015). Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. *Stem Cells*. 33(9): 2850-2863. doi: 10.1002/stem.2075.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., y Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther*. 15(10): 730-738. doi: 10.1038/gt.2008.39.
- Stagg, J. (2007). Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides of the coin. *Tissue Antigens*. 69(1), 1-9.
- Stagg, J., Johnstone, RW., y Smyth, MJ. (2007). From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 220: 82-101.
- Steinman, RM. (2012). Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. *Annu Rev Immunol*. 30: 1-22. doi: 10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- Steinman, RM., y Cohn, ZA. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 137(1973): 1142-1162.
- Steinman, RM., Gutchinov, B., Witmer, MD., y Nussenzweig, MC. (1983). Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J Exp Med*. 157(2): 613-627.
- Stenger, E. O., Turnquist, H. R., Mapara, M. Y., y Thomson, A. W. (2012). Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood*. 119(22): 5088–5103. doi: 10.1182/blood-2011-11-364091.
- Stivarou, T., Stellas, D., Vartzi, G., Thomaidou, D., y Patsavoudi, E. (2016). Targeting highly expressed extracellular HSP90 in breast cancer stem cells inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol Ther*. 17(8): 799–812. <http://doi.org/10.1080/15384047.2016.1195041>.
- Sun, Z., Wang, S., y Zhao, RC. (2014). The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol*. 7(14). doi: 10.1186/1756-8722-7-14.
- Thomson, AW. y Robbins, PD. (2012). Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Ann Rheum Dis*. 67 (Suppl III) : iii90–iii96. doi:10.1136/ard.2008.099176.
- Titov, LP, Hancharou, AY, Skrahin, AY, Solodovnikova, VV, Skrahina, AM, Shpakovskaya, NS, Ramanava, IU, Antonova, NP, y Zalutskaya, AM. (2015). Immunotherapy of patients with multiple and extreme drug-resistant pulmonary tuberculosis with autologous monocyte- and stem cell-derived dendritic cells vaccine. *Int J Mycobacteriol*. 4(s1). doi: 10.1016/j.ijmyco.2014.11.033.
- Tolar, J., Le Blanc, K., Keating, A., y Blazar, BR. (2010). Concise Review: Hitting the Right Spot with Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells*. doi: 10.1002/stem.459.
- Vasir, B., Wu, Z., Crawford, K., Rosenblatt, J., Zarwan, C., Bissonnette, A., Kufe, D., y Avigan, D. (2008). Fusion of Dendritic Cells with Breast Cancer Carcinoma Stimulate the Expansion of Regulatory T Cells while Concomitant Exposure to IL-12, CpG Oligodeoxynucleotides, and Anti-CD3/CD28 Promotes the Expansion of Activated Tumor Reactive Cells. *J Immunol*. 181(1): 808-821.
- Vicari, AP., Caux, C. y Trinchieri, G. (2002). Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol*. 12(1): 33-42. doi: 10.1006/scbi.2001.0400.
- Veglia, F y Gabilovich, DI. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr Opin Immunol*. 45:43–51. doi: 10.1016/j.coi.2017.01.002.

- Wakkach, A., Fournier, N., Brun, V., Breittmayer, JP., Cottrez, F. y Groux, H. (2003). Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity*. 18(5): 605-617. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00113-4
- Wang, L., Ting, C., Yen, M., Liu, K., Sytwu, H., Wu, KK., y Yen, BJ. (2016). Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *J Biomed Sci*. 23(1):76 . doi: 10.1186/s12929-016-0289-5.
- Wang, M., Cai, J., Huang, F., Zhu, M., Zhang, Q., Yang, T., Zhang, X., Qian, H., y Xu, W. (2015). Pre-treatment of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells with interleukin-6 abolishes their growth promoting effect on gastric cancer cells. *Int J Mol Med*. 35: 367-375. doi: 10.3892/ijimm.2014.2019.
- Wang, Z., Tang, X., Xu, W., Cao, Z., Sun, L., Li, W., Li, Q., Zou, P., y Zhao, Z. (2013) The Different Immunoregulatory Functions on Dendritic Cells between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow of Patients with Low-Risk or High-Risk Myelodysplastic Syndromes. *PLoS ONE*. 8(3): e57470. doi:10.1371/journal.pone.0057470.
- Weaver, CT., Harrington, LE., Mangan, PR., Gavrielli, M. y Murphy, KM. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 24(6): 677-688. doi: 10.1016/j.immuni.2006.06.002.
- Winning, S. y Fandrey J. (2016). Dendritic Cells under Hypoxia: How Oxygen Shortage Affects the Linkage Between Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol Res*. doi: 10.1155/2016/513429.
- Woltman, AM. y van Kooten, C. (2003). Functional modulation of dendritic cells to suppress adaptive immune responses. *J Leuk Bio*. 73. doi: 10.1189/jlb.0902431.
- Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, RG., Kobayashi, N., y Yarmush, ML. (2010). Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*. 19(2010): 667-679.
- Yew, TL., Hung, YT., Li, HY, Chen, HW., Chen, LL., Tsai, KS., Chiou, SH., Chao, KC., Huang, TF., Chen, HL, y Hung., SC. (2011). Enhancement of wound healing by human multipotent stromal cell conditioned medium: the paracrine factors and p38 MAPK activation. *Cell Transplant*. 20(5): 693-706. doi: 10.3727/096368910X550198
- Yoo, S. y Ha, SJ. (2016). Generation of Tolerogenic Dendritic Cells and Their Therapeutic Applications. *Immune Netw*. 16(1): 52-60. doi: 10.4111/in.2016.16.1.52.
- Yoshimura, M., Endo, S., Hioki, K., Ueyama, Y., y Ohnishi, Y. (1997). Chemotherapeutic Profiles of Human Tumors Implanted in SCID Mice Showing Appreciable Inconsistencies with Those in Nude Mice. *Exp Anim*. 46(2): 153-156.
- Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., y Zhao, R.C.H. (2004). Effects of Mesenchymal Stem Cells on Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev*. 13: 263-271.
- Zhao, XQ., Huang, XL., Gupta, P., Borowski, L., Fan, Z., Watkins, S., Thomas, EK., y Rinaldo, CR. (2002). Induction of Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) CD8+ and CD4+ T-Cell Reactivity by Dendritic Cells Loaded with HIV-1 X4-Infected Apoptotic Cells. *J Virol*. 76(6): 3007-3014. doi: 10.1128/JVI.76.6.3007-3014.2002.