



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE
MÉDULA ÓSEA ESTIMULADAS CON ANTÍGENOS DE MELANOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BUCIO LÓPEZ LAURA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE
MÉDULA ÓSEA ESTIMULADAS CON ANTÍGENOS DE MELANOMA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BUCIO LÓPEZ LAURA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2017

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 14 de noviembre de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **BUCIO LÓPEZ LAURA** con número de cuenta **306070455**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE MÉDULA ÓSEA ESTIMULADAS CON ANTÍGENOS DE MELANOMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DRA. EMMA ISABEL MELENDRO LOZANO
Vocal: DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ
Secretario: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Suplente: DR. ALEXANDER PEDROZA GONZÁLEZ
Suplente: DR. CARLOS GUADALUPE PÉREZ PLASENCIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de enero de 2017

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos:

- Beca CONACyT CVU/BECARIO 631025
- Apoyo CONACyT Proyecto PAPIIT/DGAPA-UNAM IN218315

A los miembros del Comité Tutor:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser
- Dr. Carlos Guadalupe Pérez Plasencia

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Agradezco al Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez por su excelente orientación y asesoría de este trabajo.

También agradezco la importante y destacada asesoría de la Dra. Gabriela Piñón Zárate quien contribuyó de manera sustancial a mi formación académica, apoyo técnico y a la elaboración de esta tesis.

A los miembros del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de tejidos de la Facultad de Medicina, UNAM, por su apoyo y comentarios al proyecto.

- Dra. Maritza Roxana García García
- M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez
- M en C. Katia Jarquín Yáñez
- Biol. Beatriz Hernández Téllez

A los miembros del Laboratorio¹⁰ de la Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores, UNAM, por su apoyo incondicional y valiosas ideas que contribuyeron a mi crecimiento académico y la realización de este trabajo.

- Dra. Yolanda Irasema Chirino López
- Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro
- Biol. Estefany Ingrid Medina Reyes

DEDICATORIA

En cada paso de la vida se aprenden cosas nuevas. Caminamos, avanzamos, caemos y nos levantamos para volver a emprender el camino. Yo he tenido la suerte de encontrar personas maravillosas que me han acompañado a caminar y me han ayudado a levantar, personas que con su ejemplo de lucha cada día me inspiran a superarme.

En primer lugar a mi mamá, que lucha cada día por nosotros, las personas que ama. Gracias por dedicarme estos 25 años de tu vida, esta tesis es una pequeña muestra de la infinidad de cosas que he logrado gracias a ti.

A mi hermana que nunca deja de avanzar y de crecer en la vida. Eres la muestra de que con trabajo duro puedes llegar muy lejos, eres siempre mi ejemplo a seguir.

A mis sobrinas Dania y Sara que son mi fuerza cada día. Espero algún día ser un digno ejemplo a seguir.

A los miembros de mi familia que de una u otra forma siempre han estado para mí, para apoyarme en lo que necesite.

A Margarita, que desde que entró en mi vida me ha apoyado de manera increíblemente extraordinaria y me hecho sentir completamente feliz. Amo y admiro cada aspecto de ti. La pasión con la que vives, tus sueños y el amor que muestras por tu trabajo, son una fuente inagotable de inspiración en mi vida personal, académica y laboral. Nunca dejas de creer en mí y siempre me impulsas a seguir adelante; yo pienso que somos un equipo impresionante. Esta tesis te la quiero dedicar especialmente a ti como la promesa de un futuro cada día mejor, lleno de esfuerzo y amor, en el que quiero que estés a mi lado siempre.

A Gaby que estuvo estos años de trabajo incansable conmigo, apoyándome, enseñándome y dándome ánimo. He aprendido infinidad de cosas a tu lado y siempre he disfrutado trabajar contigo. Sin ti, definitivamente no hubiera sido posible hacer esta tesis.

A Ingrid, que cada día me impresiona con su trabajo incansable e inteligencia, es increíble que solo te haya costado un poco de cordura. Güerita, nunca me has negado tu ayuda, siempre he tenido tu apoyo personal y académico. No olvido nunca y presumo con orgullo que tú me enseñaste todas las cosas del mundo en el laboratorio. Hacer ciencia contigo siempre es una experiencia maravillosa.

A Carolina, quien con su extraña mezcla de locura e inteligencia, siempre alegra mis días y convierte los días malos en buenos. Caro, siempre has estado incondicionalmente para mí y me has hecho sentir realmente apreciada, no cambiaría tu presencia en mi vida por nada.

A la Dra. Yolanda y la Dra. Norma que son mujeres extraordinarias, llenas de fuerza, alegría, entusiasmo y dedicación. Desde que las conocí, nunca he dejado de aprender cosas de ustedes, siempre he tenido su apoyo y las admiro mucho. Son como heroínas de la ciencia, son mi ejemplo a seguir.

A Erick, mi mejor amigo, que nunca me ha dejado sola y siempre ha estado para mí con tanto cariño. No pude haber pedido un amigo mejor.

A mis compañeros del laboratorio de inmunoterapia e ingeniería de tejidos que hacen cada día más ameno con sus pláticas y risas.

A mis compañeros del laboratorio 10 de los cuales siempre aprendo mil cosas y me motivan a esforzarme más y más cada día.

“Hay quienes se consideran perfectos, pero es sólo porque exigen menos de sí mismos”

Hermann Hesse

ÍNDICE

Lista de figuras.....	i
1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	3
3. Introducción.....	5
3.1. Sistema inmune y cáncer.....	5
3.2. Antígenos tumorales.....	6
3.2.1. Antígenos MAGE.....	8
3.3. Células dendríticas.....	9
3.3.1. Estados de células dendríticas.....	10
3.3.2. Generación de células dendríticas <i>in vitro</i>	12
3.4. Procesamiento de antígenos.....	13
3.4.1. Procesamiento de antígenos para las moléculas MHC I.....	13
3.4.2. Procesamiento de antígenos para las moléculas MHC II.....	14
3.5. Localización y función de las proteínas que participan en la presentación de antígenos.....	16
3.5.1. MHC I y MHC II.....	16
3.5.2. CD80 y CD86.....	17
3.5.3. CD273 y CD274.....	18
3.5.4. CD40.....	18
3.6. Presentación de antígenos.....	19
3.6.1. Sinapsis inmunológica.....	19
3.6.2. Presentación cruzada.....	20
3.6.3. Cross-dressing.....	20
3.7. Inmunoterapia antitumoral con células dendríticas.....	21

3.8. Exosomas.....	22
3.8.1. Definición y características.....	22
3.8.2. Biogénesis.....	23
3.8.2.1. Endosomas tempranos.....	24
3.8.2.2. Endosomas tardíos y lisosomas.....	24
3.8.3. Función de los exosomas.....	27
3.8.4. Exosomas de células presentadoras de antígenos.....	28
3.8.5. Mecanismos de acción de los exosomas derivados de células dendríticas.....	29
3.8.6. Inmunoterapia antitumoral con exosomas.....	30
4. Justificación.....	31
5. Objetivo general.....	32
6. Objetivos particulares.....	32
7. Antecedentes.....	33
8. Hipótesis.....	34
9. Metodología.....	35
9.1. Material biológico.....	35
9.2. Estrategia experimental.....	35
9.3. Cultivo de células productoras de GM-CSF.....	37
9.4. Cultivo primario de células de médula ósea y diferenciación a células dendríticas.....	38
9.5. Tratamiento de células dendríticas.....	39
9.6. Obtención de exosomas.....	39
9.7. Marcaje con anticuerpos.....	39
9.8. Detección de células dendríticas y exosomas.....	40
9.9. Determinación del fenotipo de células dendríticas y exosomas.....	40

9.10.	Análisis estadístico.....	40
10.	Resultados.....	41
10.1.	Diferenciación de células dendríticas.....	41
10.2.	Detección de exosomas.....	44
10.3.	Expresión de MHC II.....	45
10.4.	Expresión de CD80.....	48
10.5.	Expresión de CD86.....	52
10.6.	Expresión de CD273.....	55
10.7.	Expresión de CD274.....	59
10.8.	Expresión de CD40.....	62
10.9.	Expresión de MHC I.....	65
11.	Discusión.....	68
12.	Conclusiones.....	73
13.	Literatura citada.....	74

LISTA DE FIGURAS

Introducción

Fig. 1. Estados de las células dendríticas

Fig. 2. Procesamiento de antígenos internos

Fig. 3. Procesamiento de antígenos externos.

Fig. 4. Sinapsis inmunológica

Fig. 5. Vesículas formadas durante la vía endocítica

Fig. 6. Biogénesis de los exosomas

Fig. 7. Mecanismos involucrados en la formación de exosomas

Materiales y métodos

Fig. 8 Estrategia experimental

Fig. 9. Células productoras de GM-CSF

Resultados

Fig. 10. Diferenciación de células dendríticas

Fig. 11. Expresión de marcadores de células dendríticas

Fig. 12. Expresión de MHC II en diferentes días de diferenciación

Fig. 13. Detección de exosomas

Fig. 14. Porcentaje de células y exosomas que expresan MHC II

Fig. 15. Expresión de MHC II en células dendríticas y exosomas

Fig. 16. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD80

Fig. 17. Expresión de CD80 en células dendríticas y exosomas.

Fig. 18. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD86

Fig. 19. Expresión de CD86 en células dendríticas y exosomas

Fig. 20. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD273.

Fig. 21. Expresión de CD273 en células dendríticas y exosomas.

Fig. 22. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD274

Fig. 23. Expresión de CD274 en células dendríticas y exosomas.

Fig. 24. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD40

Fig. 25. Expresión de CD40 en células dendríticas y exosomas

Fig. 26. Porcentaje de MHC I en células dendríticas y exosomas

Fig. 27. Expresión de células y exosomas que expresan MHC I

1. RESUMEN

Introducción. Los exosomas son vesículas nanométricas que participan en la comunicación intercelular y son secretadas por todas las células. En particular los exosomas derivados de células dendríticas participan en la presentación de antígenos a linfocitos T. Esto es posible porque expresan en su superficie moléculas MHC I y MHC II que presentan antígenos y por unión directa al receptor de linfocitos T. La respuesta de los linfocitos (estimuladora o tolerogénica) es determinada en parte por los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40) y coinhibitorias (CD273 y CD274) que también se expresan en los exosomas. Recientemente se ha propuesto el uso de exosomas como nueva estrategia para la generación de inmunoterapias anticancerígenas y libres de células, lo que incrementa la importancia de conocer las diferencias entre los fenotipos exosomas de células dendríticas cargadas con un antígeno tumoral (MAGE-AX) y sometidas a diferentes estímulos.

Materiales y métodos. A partir de cultivos de células de médula ósea de ratones C57BL/6, se diferenciaron células dendríticas por presencia de sobrenadante rico en GM-CSF. Las células dendríticas fueron cargadas con el antígeno MAGE-AX y tratadas con 500 U de IFN- γ , 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α , y 1 μ g/ml de LPS con el fin de generar fenotipos diferentes. Posteriormente se colectó el sobrenadante de 24 h de los cultivos de células dendríticas tratadas y se concentró su contenido con ayuda de tubos Amicon. Los exosomas del sobrenadante concentrado se acoplaron a perlas magnéticas α -CD11c para detectarlos mediante citometría de flujo. Tanto las células dendríticas como los exosomas se marcaron con anticuerpos contra MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274, acoplados a fluoróforos para evaluar su fenotipo. Por último se realizó un ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls para cada ensayo con el fin de comparar los diferentes fenotipos de exosomas y de células dendríticas

Resultados. Se obtuvo un porcentaje de células positivas a CD11c mayor a 85% en todos los grupos, sin embargo el porcentaje de células positivas a MHC II así como su la intensidad de fluorescencia que presentaron, fue diferente en cada grupo.

El porcentaje de células dendríticas diferenciadas durante 4 días (control) positivas a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, así como la expresión de estas moléculas, fue menor en comparación con las células dendríticas diferenciadas durante 7 días y las células

dendríticas tratadas con 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α , y 1 μ g/ml de LPS. Sin embargo, en las células dendríticas tratadas con 500 U de IFN- γ se observó un porcentaje e intensidad media de fluorescencia similar a los exhibidos por células dendríticas control.

El porcentaje de las células dendríticas positivas a las proteínas coinhibitorias CD273 y CD274, fue similar en todos los grupos con excepción del grupo tratado con 500 U de IFN- γ que presentó menor porcentaje de células positivas a CD273 que el resto de los grupos.

La expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias fue mayor en exosomas derivados de células dendríticas tratadas con 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α , y 1 μ g/ml de LPS

Las células que no fueron expuestas a algún estímulo mostraron niveles bajos de CD40 en comparación a las células cultivadas en presencia de alguna citocina.

La expresión de MHC I fue menor en las células dendríticas y los exosomas de células dendríticas diferenciadas durante 4 días, así como en los exosomas de células dendríticas tratadas con 10, 000 de IFN- γ .

Conclusiones.

Las células dendríticas inmaduras con 4 días de diferenciación y las células dendríticas tratadas con 500 U de IFN- γ , exhibieron un fenotipo inmaduro con niveles bajos de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86.

Los exosomas derivados de células dendríticas con fenotipo tolerogénico presentaron bajos niveles tanto de moléculas coestimuladoras como de las moléculas coinhibitorias CD273 y CD274.

Las células dendríticas con 7 días de diferenciación y las células tratadas con 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α , y 1 μ g/ml de LPS, exhibieron un fenotipo maduro con niveles elevados de moléculas coestimuladoras

Los exosomas derivados de células dendríticas con fenotipo maduro presentaron elevados niveles tanto de moléculas coestimuladoras como de moléculas coinhibitorias.

2. ABSTRACT

Introduction. Exosomes are nanometric vesicles produced by all cells which are involved in intercellular communication. In particular, exosomes produced by dendritic cells (DCs) are able to present antigen to T cells. According the levels of molecules expressed on the exosomes membrane, such as CD80, CD86, CD274, CD273, MHC I and MHC II, the immune response developed may be stimulatory or tolerogenic.

Since dendritic cells-derived exosomes could be used as a novel cell-free cancer vaccine, it is important to know the expression of the molecules mentioned above in order to avoid the development of a tolerogenic immune response.

So, the aim of this investigation was determinate the immunological phenotype of exosomes derived of dendritic cells charged with MAGE-AX and treated with different stimuli.

Materials and methods. From cultures of bone marrow cells obtained of C57BL/6 mice, we produced dendritic cells immature differentiated for 4 or 7 days with supernatant with GM-CSF; and dendritic cells treated with 500U IFN- γ , 10, 000 IFN- γ ; 1 μ g/ml of TNF- α or 1 μ g/ml of LPS; both in presence of antigen MAGE-AX. After, the 24h supernatant were collect and concentrated with Amicon tubes. The exosomes in concentrated supernatant were coupled to magnetic beads α -CD11c for it detection in flow cytometer. Both dendritic cells and exosomes were labeled with antibody for MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274 coupled to fluorophores in order to evaluate the phenotype. Finally the results were analyzed by ANOVA and test of Newman-Keuls.

Results. The percentage of cells CD11c+ was higher to 85% in all groups, however the percentage and the mean fluorescence intensity of MHC II+ was different in each group.

The percentage of dendritic cells differentiated by 4 days (control) that was positive to the costimulatory molecules CD80 and CD86 and the mean fluorescence intensity of these molecules was lower than the data generated by dendritic cells differentiated by 7 days and dendritic cells treated with 10, 000 U of IFN- γ , 1 μ g of TNF- α , and 1 μ g of LPS. However in dendritic cells treated with 500 U of IFN- γ , the percentage and the mean fluorescence intensity was similar to the expressed by dendritic cells control.

The percentage of dendritic cells positive to coinhibitory molecules CD273 and CD274 was similar in all groups except in dendritic cells treated with 500 U of IFN- γ that showed lower percentage of CD273+ dendritic cells than the all other groups.

The levels of costimulatory and coinhibitory molecules was higher in exosomes of dendritic cells treated with 10, 000 U of IFN- γ , 1 μ g of TNF- α , y 1 μ g of LPS.

The cells unexposed showed low levels of CD40, while dendritic cells treated express high levels of this molecule.

The expression of MHC I in dendritic cells differentiated 4 days and their exosomes, and in exosomes of dendritic cells treated with 10, 000 of IFN- γ was lower than the other groups.

Conclusions. The immature 4 days dendritic cells and the dendritic cells treated with 500 U of IFN- γ exhibited a tolerogenic phenotype with low levels of CD80 and CD86. The exosomes derived of dendric cells with tolerogenic phenotype, exhibited low levels of both costimulatory and coinhibitory molecules. Dendritic cells treated with IFN- γ in 10, 000 U, 1 μ g of TNF- α , 1 μ g of LPS and the showed an mature phenotype with high levels of costimulatory molecules. The exosomes derived of dendritic cells with mature phenotype, exhibited high levels of both costimulatory and coinhibitory molecules.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Sistema inmune y cáncer

El cáncer es una enfermedad potencialmente fatal causada por mutaciones en genes codificantes para proteínas que regulan procesos celulares. El resultado de estas mutaciones son células aberrantes cuyo comportamiento lleva a su expansión clonal descontrolada, destrucción del tejido circundante y propagación a órganos vitales. (Alison, 2001).

En un individuo sano, el sistema inmune reconoce y elimina las células mutantes; sin embargo si el sistema inmune falla, las células neoplásicas sobreviven y producen tumores (Mody *et al.*, 2014). A esta intervención del sistema inmune en el proceso carcinogénico se le conoce como “inmunovigilancia del cáncer” (Cho y Bhardway, 2003).

De acuerdo a la teoría de la inmunoedición del cáncer, el equilibrio entre el crecimiento del tumor y el cambio del sistema inmune consta de 3 fases (Dudek *et al.*, 2013):

- 1.- Fase de eliminación, en la cual el sistema inmune es capaz de reconocer y exterminar a las células cancerígenas.
- 2.- Fase de equilibrio, donde la liberación de factores inmunosupresores resulta en el establecimiento del equilibrio entre las células cancerígenas que son susceptibles a la inmunorradicación y las células inmunoevasivas que son resistentes a la eliminación por el sistema inmune.
- 3.- Fase de escape, que se alcanza cuando la evasión del sistema inmune progresa y el tumor escapa del control del sistema inmune.

La falla en el reconocimiento de antígenos en los tejidos tumorales se debe a diferentes factores:

- a) La mayoría de estos antígenos son compartidos con células normales pero con diferente expresión espacio-temporal. Por ejemplo, algunos de estos antígenos se expresan de manera normal en individuos sanos durante el desarrollo embrionario o en estado adulto en otros tejidos (Dudek *et al.*, 2013).

- b) Las células tumorales en contraste con bacterias y virus, no inducen las citocinas proinflamatorias y quimiocinas requeridas para la interacción apropiada entre células presentadoras de antígenos y células T (Espinoza-Delgado, 2002).
- c) Las células cancerígenas interfieren con la función normal de las células dendríticas suprimiendo su estado maduro, ya sea por la expresión de citocinas inmunosupresoras o por otras señales como la liberación de exosomas por parte de las células tumorales (Dudek et al., 2013), lo cual previene la presentación de antígenos y el establecimiento de respuestas inmunes tumor-específicas (Palucka y Banchereau, 2012).
- d) Los tumores inducen la activación de la diferenciación de monocitos a macrófagos y no a células dendríticas, evitando que estas últimas activen a las células T de manera tumor-específica. Este mecanismo es mediado por IL-6 y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Palucka y Banchereau, 2012).
- e) El tumor reduce la eficiencia en el procesamiento y la presentación de antígenos tumorales a células T por el antígeno carcinoembrionario (un antígeno glicoproteico producido por el tumor), el cual es endocitado por las células dendríticas y confinado a endosomas tempranos (Palucka y Banchereau, 2012).
- f) Los tumores interfieren con la maduración de las células dendríticas por la secreción de IL-10 y secretan factores derivados de tumor que pueden alterar la maduración y el rendimiento de las células dendríticas mieloides. Esto provoca la falta de señales co-estimuladoras en las células dendríticas, evitando la inducción de respuestas inmunes antitumorales (Palucka y Banchereau, 2012).
- g) En cáncer de mama, las células dendríticas plasmacitoides infiltradas pueden afectar la generación de linfocitos T efectores y la señalización para presentación cruzada de antígenos tumorales (Palucka y Banchereau, 2012).

3.2. Antígenos tumorales

Las proteínas alteradas o que se expresan aberrantemente en las células tumorales se conocen como antígenos tumorales. Actualmente estos péptidos se han reconocido y clasificado de acuerdo al patrón de expresión del gen parental, de tal manera que de acuerdo con Coulie y col. (2014) y Vigneron (2015) pueden clasificarse en dos principales grupos:

Antígenos con alta especificidad tumoral: llamados así porque muestran un patrón de expresión específico de tumor y tiene el potencial de inducir respuestas tumor-específicas. Entre estos se incluyen:

Antígenos virales: Son proteínas virales producidas dentro de células tumorales generadas por virus. Pueden encontrarse en tumores como carcinoma cervical, carcinoma nasofaríngeo, hepatocarcinoma y leucemia de células T de adulto.

Antígenos codificados por genes mutados: Son antígenos formados por mutaciones puntuales en genes que se expresan de forma ubicua y que provocan errores como cambios de un aminoácido por otro, alteración de fase del marco de lectura o extensión en la secuencia codificante del codón normal de detención. Algunos péptidos antigénicos resultan de mutaciones que benefician la transformación celular, por ejemplo al favorecer la división celular descontrolada o la disminución de la sensibilidad a apoptosis, entre otros.

Los tumores con elevada tasa de mutación como el melanoma (por radiación ultravioleta) o carcinoma de pulmón (por fumadores de tabaco) tienen más antígenos de genes mutados, por lo que son presumiblemente más antigénicos. Sin embargo, los antígenos mutados no suelen utilizarse para vacunas contra cáncer ya que su amplia diversidad impide que una vacuna sea aplicada a muchos pacientes.

Antígenos tumorales de genes de líneas germinales: Son expresados por una amplia variedad de tipos de cáncer y en tejidos normales solo los expresan células germinales y trofoblásticas. Su única diferencia es que en las células de cáncer se encuentra desmetilado el promotor, mientras que en células normales se encuentra metilado. Esto las convierte en un recurso importante para las vacunas y terapias para combatir el cáncer.

Esta clasificación incluye los genes codificantes de antígenos de melanoma (MAGE), que comprenden 25 genes funcionales ubicados en tres regiones del cromosoma X: MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C, también incluye genes de la familia BAGE, GAGE, LAGE/NY-ESO1 y SSX.

Antígenos con baja especificidad tumoral: se incluyen:

Antígenos de diferenciación: Derivan de proteínas que se expresan tanto en el tumor como en el tejido normal de origen (Vigneron, 2015, Coulie *et al.*, 2014).

Antígenos sobre-expresados: Son antígenos altamente expresados en células tumorales y con baja, pero detectable expresión en tejidos sanos (Vigneron, 2015, Coulie *et al.*, 2014).

Uno de los principales obstáculos que se necesitan superar para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia contra cáncer es identificar antígenos tumorales específicos para ser blanco de una inmunización específica (Gabilovich, 1996).

3.2.1. Antígenos MAGE

Dentro de los antígenos con alta especificidad tumoral se incluyen los miembros de la familia MAGE, que son proteínas caracterizadas por tener un dominio homólogo de aproximadamente 170 aminoácidos denominado “dominio de homología MAGE (MHD)”, el cual forma una estructura de hélice alada que puede actuar como andamio para interacciones proteína-proteína (Eggert *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2014).

Existen 3 subgrupos ácidos de proteínas MAGE, MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C y un subgrupo básico, MAGE-D. Con base en la expresión de patrones de las proteínas MAGE, se han clasificado en dos subgrupos I y II. El subgrupo I incluye las proteínas que se expresan en tumores malignos y testículos pero no en otros tejidos normales; mientras que las proteínas del subgrupo II son expresadas en varios tejidos sanos de adultos humanos (Xiao y Chen, 2004).

Aunque su función biológica está siendo estudiada aún, se ha observado que las proteínas MAGE interactúan con proteínas celulares claves como p53 y KAP1 (Wong *et al.*, 2014). Algunos estudios han mostrado que las células embrionarias contienen genes MAGE con menor metilación de CpG que las células somáticas, mientras que en células tumorales estos genes se encuentran hipometilados. De esta manera se ha especulado que esta familia de proteínas funciona durante el desarrollo embrionario y que los genes son subsecuentemente desactivados por metilación, sin embargo, durante la transformación neoplásica, estos genes son reactivados y expresados, pudiendo ser reconocidos como blancos antigénicos para ser atacados por el sistema inmune (Xiao y Chen, 2004).

Es por esta razón que las proteínas MAGE se han convertido en importantes puntos de investigación de inmunoterapia, incluso se han realizado algunas pruebas clínicas para tratar carcinoma gastrointestinal, carcinoma esofágico y carcinoma pulmonar (Xiao y Chen, 2004).

En particular, las proteínas MAGE-A, un subgrupo codificado por 12 genes altamente homólogos localizados en el cromosoma X, son altamente inmunogénicas. Su capacidad para inducir respuestas citotóxicas dependientes de linfocitos T de manera espontánea, las resalta como blancos convenientes para inmunoterapia (Wong *et al.*, 2014).

Específicamente, un péptido con gran potencial para ser utilizado en inmunoterapia es el péptido MAGE-AX₁₆₉₋₁₇₆ ya que tiene alta afinidad a la molécula MHC I y su secuencia (LGITYDGM) es compartida por tres proteínas de la familia MAGE-A (MAGE-A1, MAGE-A3 y MAGE-A5). En 2004 fue sintetizado y probado por Eggert y colaboradores en un tratamiento de inmunoterapia contra melanoma en ratones y determinaron que la vacuna con este péptido resultaba en inmunidad protectora en los animales retados con células de melanoma y que puede inducir linfocitos T citotóxicos capaces de reconocer y matar blancos que expresen MAGE (Eggert *et al.*, 2004). Posteriormente, en 2014 Piñón-Zárate y colaboradores utilizaron este péptido para cargar células dendríticas derivadas de médula ósea, las cuales utilizaron como terapia en ratones con melanoma. Como resultado se observó que este tratamiento incrementa la supervivencia de los ratones y disminuye la tasa de crecimiento tumoral por la muerte de células tumorales debido a la respuesta antitumoral específica (Piñón-Zárate *et al.*, 2014). Estos resultados aportan evidencia del uso potencial del péptido MAGE-AX para la creación de estrategias terapéuticas contra algunos tipos de cáncer.

3.3. Células dendríticas

Las células presentadoras de antígenos son indispensables para ejercer respuestas antígeno-específicas por medio de células T. En particular, las células dendríticas se conocen por ser las células presentadoras de antígenos con mayor potencia estimuladora (Baar, 1999)

Las células dendríticas son células de origen linfóide distribuidas en varios tejidos. Su función principal es iniciar una respuesta inmune por la presentación de antígenos capturados y expresados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que se localiza en la superficie de la célula dendrítica e interactúa con el receptor de las células T (TCR) localizado en la superficie de células T naïve de los tejidos linfoides (Palucka y Banchereau, 2012). Existen diferentes subpoblaciones de células dendríticas que han sido clasificadas con base en su localización, origen, fenotipo o función (Ju, 2010). Las dos

subpoblaciones principales de células dendríticas han sido descritas con base en la expresión de CD11c: las células dendríticas mieloides que expresan CD11c (también conocidas como convencionales o clásicas), las cuales producen principalmente IL-12; y las células dendríticas plasmacitoides que no expresan CD11c y producen principalmente IFN- α . Los ratones y humanos comparten estos dos subtipos (Johansson *et al.*, 2007; Palucka y Banchereau, 2012).

Las células dendríticas convencionales son las encargadas de generar respuestas antitumorales por medio de la activación de linfocitos T, ya que tienen cinco características (Baar, 1999):

1. Capacidad de captura y obtención de antígenos en tejidos periféricos.
2. Transporte de esos antígenos a órganos linfoides primarios y secundarios.
3. Expresión de elevados niveles de MHC I y MHC II en órganos linfoides.
4. Expresión de elevados niveles de moléculas coestimuladoras.
5. Liberación de citocinas inmunoestimuladoras como IL-12 e IFN- α .

3.3.1. Estados de células dendríticas

En las células dendríticas convencionales existen dos principales estados; el estado inmaduro y el estado maduro. Estos estados se diferencian entre sí a dos niveles: fenotípico y funcional (Fig.1.) (Dudek *et al.*, 2013). A nivel de fenotipo, depende de las proteínas que las células dendríticas expresan en la membrana y de ciertas citocinas que secretan al medio extracelular. Este fenotipo influye directamente a nivel funcional, que es a través de estas proteínas que pueden inducir respuestas estimuladoras o inhibitorias del sistema inmune (Robbins y Morelli, 2014).

Generalmente en tejidos periféricos las células dendríticas son inmaduras y realizan actividad endocítica continua y presentación de antígenos propios a linfocitos T. Ellas acumulan moléculas MHC II en los compartimentos de tipo endosoma tardío-lisosoma, expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras y tienen limitada capacidad para secretar citocinas. Ya que el estado inmaduro no es un estado efector, impiden que las células inmunes ataquen a células que expresan antígenos propios manteniendo la tolerancia del hospedero en condiciones saludables. Esta tolerancia es inducida y mantenida por la acción de las proteínas CTLA-4, CD273 y CD274 que definen el fenotipo de las

células dendríticas y actúan durante la sinapsis inmunológica, induciendo la delección de células T o la expansión de células T reguladoras o supresoras (Dudek *et al.*, 2013; Palucka y Banchereau, 2012).

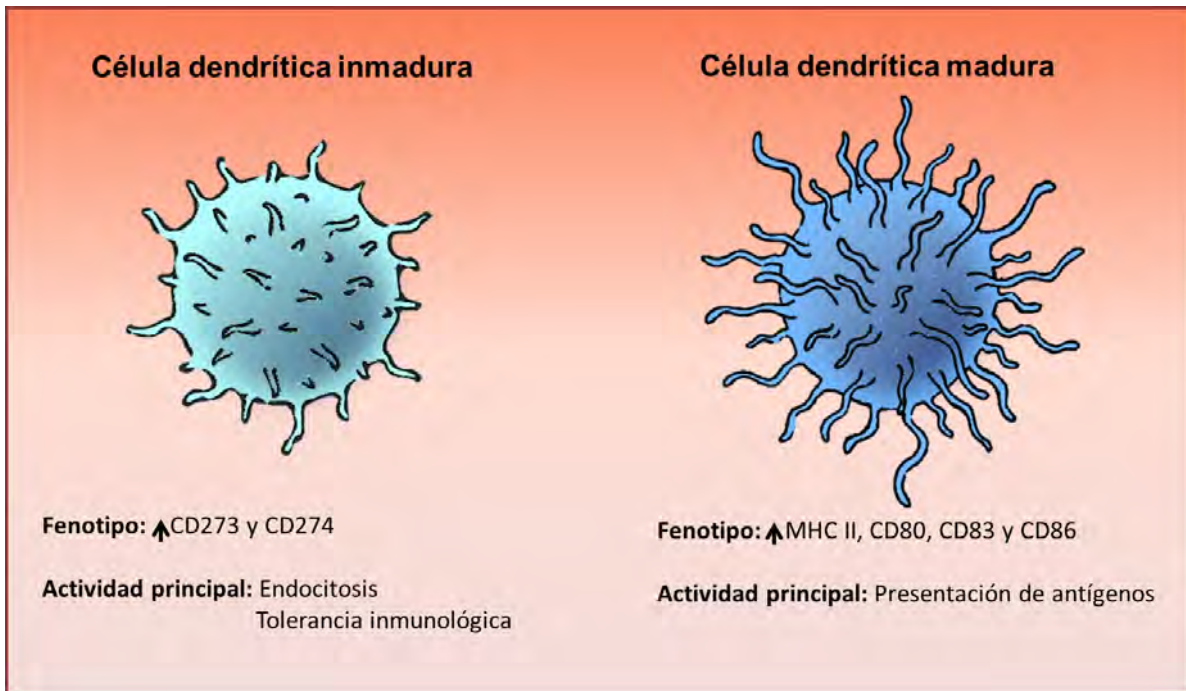


Figura 1. Estados de las células dendríticas. Diferencias fenotípicas y funcionales entre los dos principales estados de las células dendríticas, maduro e inmaduro.

Las células dendríticas inmaduras residen en los tejidos no linfoides, donde capturan y procesan antígenos. Cuando las células dendríticas capturan un patógeno en la periferia inician su proceso de maduración, en el cual disminuyen sus capacidades de procesamiento de antígenos, incrementan la expresión de las moléculas MHC I, MHC II, CD80 y CD86 y migran a los órganos linfoides secundarios, donde cada célula dendrítica activa aproximadamente 5000 linfocitos T *náive* cada hora. Este proceso es controlado por citocinas y señales del microambiente (Labeur *et al.*, 1999).

La maduración fenotípica se alcanza cuando las células dendríticas expresan elevados niveles de los ligandos CD80, CD83 y CD86 y de la molécula MHC II. A nivel funcional tienen elevada capacidad de secretar citosinas ya sea inflamatorias o inmunosupresoras (Dudek *et al.*, 2013).

Existe otro estado de las células dendríticas denominado semi-maduro que resulta de la activación sub-óptima de las células dendríticas. Estas células se caracterizan por tener la capacidad de presentar 2 de las 3 señales requeridas para la activación de los linfocitos T (la primera señal que involucra la unión de MHC con el TCR y solamente una de las otras dos señales que involucra a las moléculas coestimuladoras y coinhibitorias o a las citocinas secretadas). Este fenotipo genera interacciones inestables con los linfocitos T, lo cual puede llevar a activar la ablación de la inmunidad anti-cáncer. Además, junto con las células dendríticas inmaduras tienden a inducir anergia de linfocitos T o generación de linfocitos T exhaustos que inducen tolerancia a las células cancerígenas (Dudek *et al.*, 2013)

3.3.2. Generación de células dendríticas *in vitro*

Las investigaciones sobre la identidad y biología de las células dendríticas, así como de las pruebas clínicas de vacunas basadas en células dendríticas, requirieron métodos para cultivar y expandir progenitores de células dendríticas *in vitro* (Butterfield, 2013).

Estos métodos fueron determinados inicialmente para expandir células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica humana utilizando el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF por sus siglas en inglés) (Butterfield, 2013). Posteriormente se estableció un protocolo para la generación *in vitro* de células dendríticas a partir de células médula ósea de ratón estimulados con GM-CSF (Inaba *et al.*, 1992).

Las células dendríticas obtenidas por diferenciación son inmaduras por lo que necesitan ser sensibilizadas con antígenos e inducir su maduración para obtener células dendríticas estimuladoras de linfocitos T (Amigorena, 2000).

In vivo, el proceso de maduración de las células dendríticas es controlado por un complejo arreglo de señales que incluye factores del microambiente como GM-CSF, TNF, Flt3L, IL-4, IFN- γ , TGF- β , PGE₂, ionomicina, entre otros. En cambio, la activación y maduración *in vitro* de células dendríticas con potencial estimulador (similares a las convencionales) es resultado del contacto con las células T por interacción entre CD40 y CD40L o de estímulos ejercidos por moléculas agregadas a los cultivos (Labeur *et al.*, 1999).

Las moléculas utilizadas más frecuentemente para la maduración de células dendríticas son citocinas, por ejemplo TNF- α (Amigorena, 2000). Sin embargo se ha observado que el fenotipo de las células dendríticas difiere dependiendo de las citocinas añadidas al medio de

cultivo (Baar, 1999). Incluso existen varios protocolos que regulan *in vitro* las moléculas del microambiente de células de médula ósea con el fin de generar células dendríticas con diferentes fenotipos y funciones. Es a partir de estas observaciones que se ha desarrollado la capacidad de madurar y cargar con antígenos a las células dendríticas *in vitro* para su uso en terapias inmunológicas (Labeur *et al.*, 1999).

3.4. Procesamiento de antígenos

Para cumplir su función fisiológica, las moléculas MHC de las células dendríticas deben adquirir péptidos antigénicos (Vyas *et al.*, 2008). A la obtención y carga estos péptidos obtenidos de patógenos o células transformadas y la formación de péptidos unidos a complejos MHC I o MHC II se le conoce como “procesamiento de antígenos” (Blum *et al.*, 2013). A continuación se explican brevemente estos procesos.

3.4.1. Procesamiento de antígenos para las moléculas MHC I

Esta vía está activa en casi todos los tipos celulares y su papel es reportar eventos intracelulares. Para esto exhiben en la superficie celular una muestra de los péptidos derivados de las proteínas que están siendo sintetizadas en la célula en cada momento (Jensen, 2007) (Fig.2.). Ya que a la molécula MHC I solo se pueden unir péptidos lineales de 8 a 10 aminoácidos (Chang, *et al.*, 2006), la célula genera péptidos cortos por el catabolismo de proteínas endógenas en el citoplasma a través de la acción de proteasomas y otras enzimas, estos péptidos son activamente transportados dentro del lumen del retículo endoplásmico por el transportador heterodimérico, asociado con la presentación de antígenos (TAP) Jensen, 2007).

Las moléculas de MHC I se pliegan y ensamblan dentro del lumen del retículo endoplásmico, donde también se da la unión del péptido, en este proceso TAP actúa como un andamio para la etapa final del ensamble de MHC I. Después de la carga del péptido, las moléculas MHC I se disocian de TAP y el complejo es exportado a los sitios de la membrana del retículo endoplásmico, donde son selectivamente reclutadas y transportadas al aparato de Golgi y posteriormente a la membrana plasmática (Hewitt, 2003).

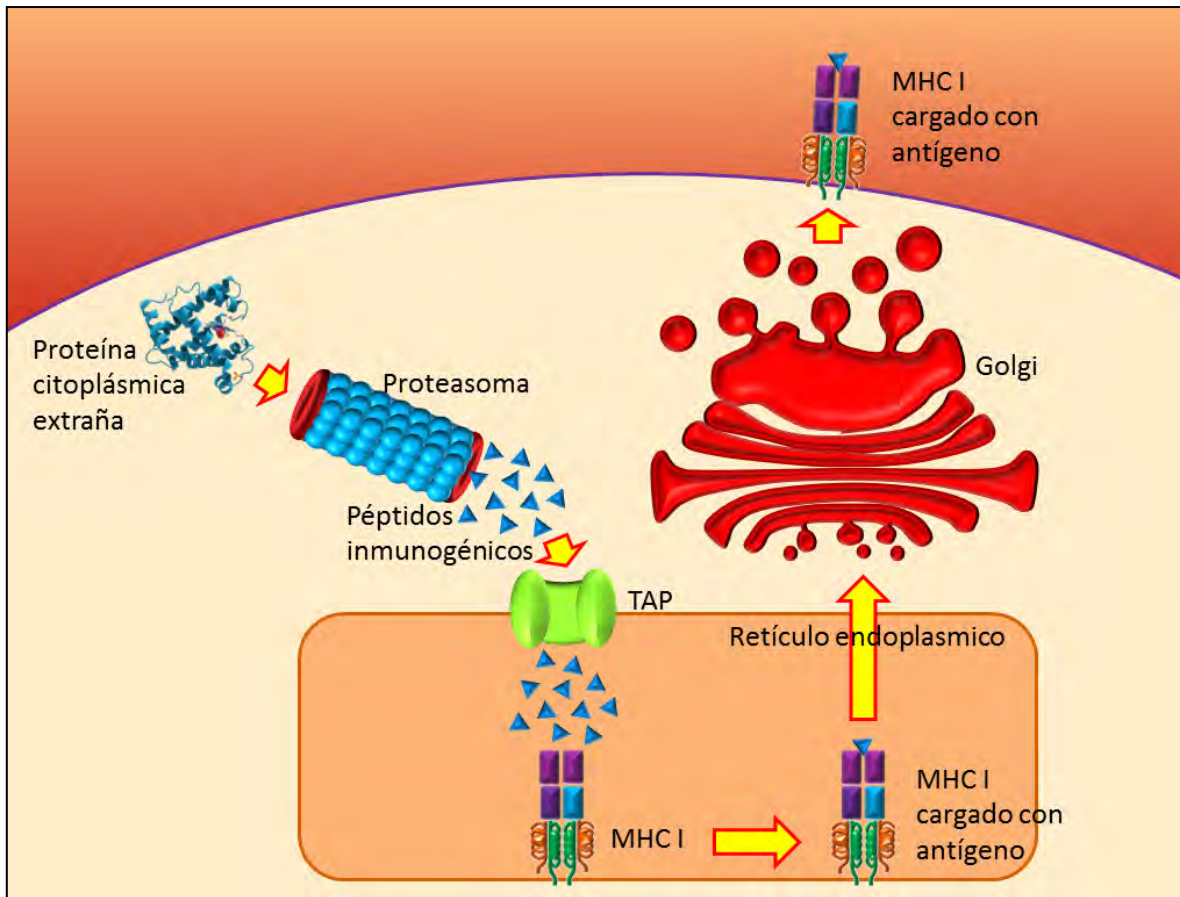


Fig. 2. Procesamiento de antígenos internos. Se observa el proceso a través del cual las moléculas de MHC I adquieren su carga antigénica

3.4.2. Procesamiento de antígenos para las moléculas MHC II

La expresión de moléculas MHC II está principalmente restringida a células presentadoras de antígenos (APC) (Vyas *et al.*, 2008) (Fig.3.). Las moléculas MHC II recién sintetizadas se unen a una proteína no polimórfica denominada cadena invariante (Ii), después de su movimiento a la membrana plasmática a través de la red trans-Golgi, los complejos Ii-MHC II pueden endocitarse mediante receptores de clatrina, lo cual se debe al reconocimiento de motivos de blanco que contiene Ii en su región citoplásmica (Roche y Furuta, 2015).

Ii previene la unión de péptidos antigénicos a MHC II hasta que estos llegan a los compartimentos donde se encuentran los péptidos de origen externo que fueron procesados (Denzin y Cresswell, 1995).

Aunque la carga del péptido en las moléculas del MHC clase II puede ser generada a través del proceso endocítico, los compartimentos típicos para procesamiento de antígenos son endosomas tardíos-lisosomas, los cuales son ricos en enzimas proteolíticas y reductasas disulfuro y tienen un pH suficientemente bajo para activar proteasas para proteólisis del antígeno (Roche y Furuta, 2015).

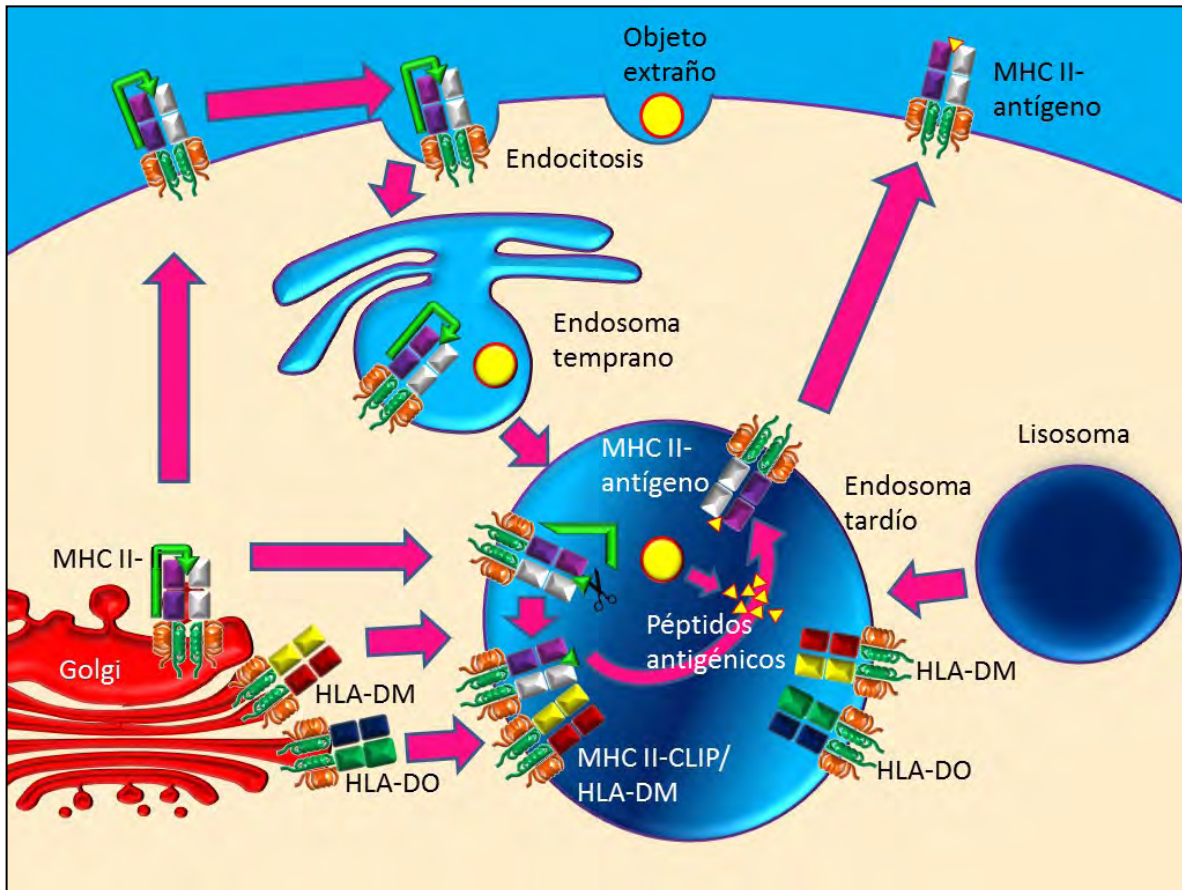


Fig. 3. Procesamiento de antígenos externos. Se observa el proceso a través del cual las moléculas de MHC II adquieren su carga antigénica

En estos compartimentos, conocidos como compartimentos ricos en complejo mayor de histocompatibilidad (MIICs), el antígeno es degradado por proteólisis progresiva y solo permanece un pequeño fragmento denominado péptido de la cadena invariante (CLIP) el cual debe ser removido para la unión del péptido antigénico (Roche y Furuta, 2015). La carga del antígeno a MHC-II (HLA-DR) está regulada por las proteínas MHC-II no clásicas HLA-DM y HLA-DO (H-2M y H-2O en murinos). HLA-DO funciona como un sustrato para competir e inhibir a HLA-DM, que es quien promueve el intercambio de péptidos y la disociación de CLIP (Mellins y Stern, 2014; Denzin y Cresswell, 1995).

Algunos MIICs son conocidos en general como cuerpos multivesiculares (MVB), ya que forman múltiples vesículas internas menores a 0.1 μm de diámetro generadas por la invaginación de su membrana (Roche y Furuta, 2015; Clayton *et al.*, 2001; Denzin y Cresswell, 1995). Una vez que los MVBs se fusionan con la membrana plasmática, liberan vesículas conocidas como exosomas hacia el espacio extracelular. (Clayton *et al.*, 2001).

3.5. Localización y función de las moléculas que participan en la presentación de antígenos

Como se explicó en la sección anterior, además de la interacción de las moléculas MHC I o MHC II con el TCR, se requiere una interacción balanceada entre señales coestimuladoras y coinhibitorias. En la determinación de estas señales participan algunos ligandos de la familia B7 y se ha sugerido que cada molécula de esta familia realiza funciones tan específicas que tienen su propio nicho (Fig.4.) (Podojil y Miller, 2013; Collins, *et al.*, 2005; Seliger *et al.*, 2008).

En general, los estímulos inflamatorios o anti-inflamatorios modulan la expresión de los ligandos de B7, resultando en la liberación de señales de activación o atenuación que determinan la naturaleza y subsecuentemente las respuestas inmunes (Collins, *et al.*, 2005;) Por ese motivo, en este trabajo se presentan las características principales y relevantes de algunas moléculas que participan en la presentación de antígenos, incluidas algunas de la familia B7 presentes en las células dendríticas.

3.5.1. MHC I y MHC II

Las moléculas monoméricas clásicas de MHC I comprenden una cadena pesada altamente polimórfica, unida de forma no covalente a la cadena ligera de microglobulina- $\beta 2$. Estas moléculas presentan péptidos de origen intracelular al sistema inmune interactuando con el TCR de células T citotóxicas CD8+. Además, las moléculas de MHC I también son ligandos para células natural killer y otros subtipos de leucocitos que expresan receptores tipo inmunoglobulina y receptores lectina tipo C (Campbell *et al.*, 2012)

Las moléculas MHC II consisten en dos cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente, la cadena α y la cadena β ; las cuales tienen una secuencia transmembranal y una cola citoplásmica (Jones *et al.*, 2006). Estas moléculas presentan antígenos peptídicos extracelulares a células T CD4+, guiando la activación de células T

náive y sus funciones inmunes. Además de estas funciones, pueden señalar activación, diferenciación o señales de muerte a células B y macrófagos (Harton *et al.*, 2016).

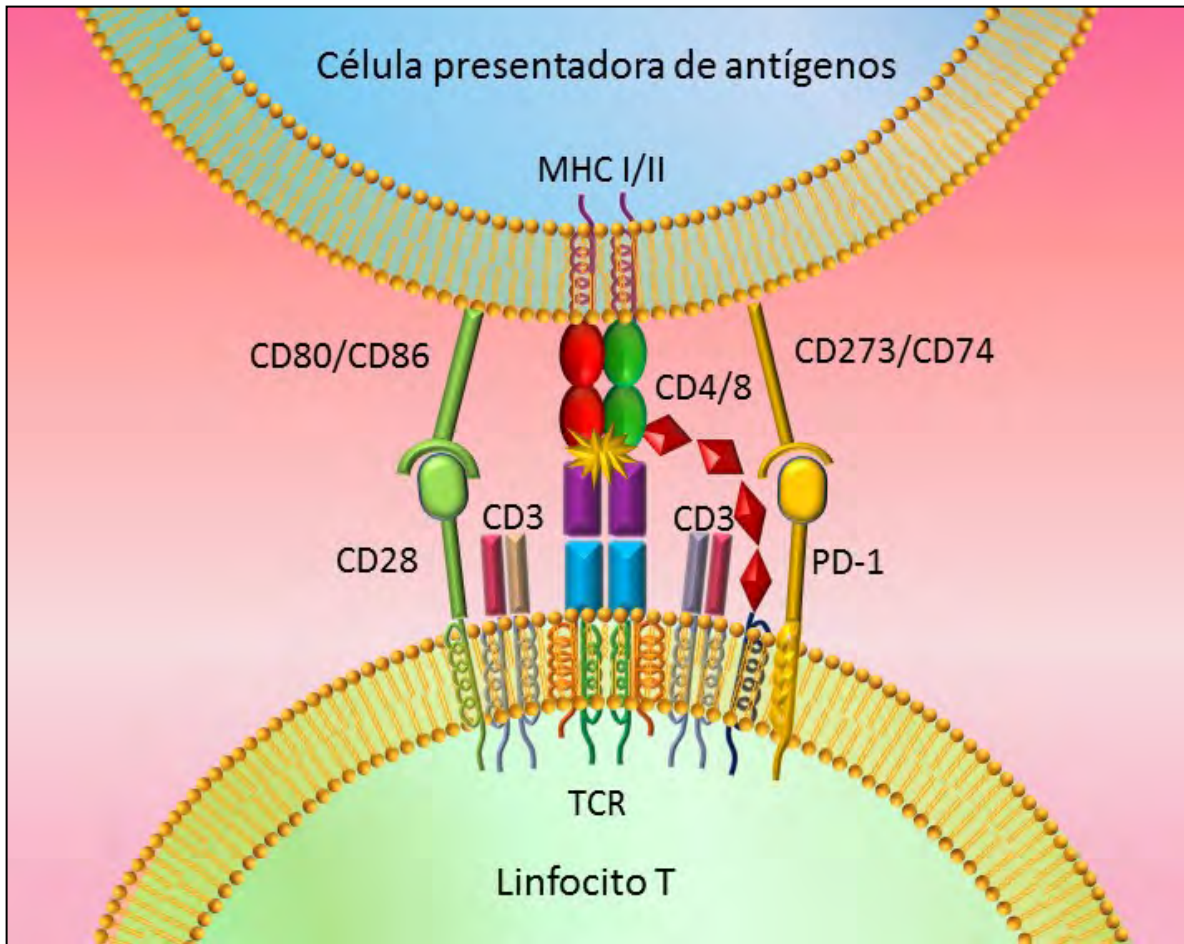


Fig. 4. Sinapsis inmunológica. Moléculas implicadas en la interacción celular a través de la cual se realiza la presentación de antígenos

3.5.2. CD80 y CD86

Pertenecen al grupo de la familia B7 y también son llamadas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86). Son expresadas inducidamente en la superficie de células presentadoras de antígenos como macrófagos, células dendríticas y en células hematopoyéticas; además son sobre-expresadas en células T activadas (Seliger *et al.*, 2008).

Aunque los genes para CD80 y CD86 están estrechamente unidos, comparten solamente 25% de identidad de aminoácidos. Por esta razón ambos interactúan tanto con la proteína CD28 como del receptor CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4). La unión de estas moléculas al receptor CD28 induce activación y supervivencia de células T, sin

embargo su unión al receptor CTLA4 inhibe las respuestas de las células T por bloqueo de la síntesis de IL-2 y de la progresión del ciclo celular, llevando a tolerancia periférica (Seliger y Quandt, 2012)

CD80 y CD86 no tienen papeles equivalentes en la modulación de la respuesta inmune ya que la interacción CD80-CTLA4 tiene mayor afinidad que CD86-CTLA4; mientras que CD28 se une con mayor efectividad a CD86 (Collins, *et al*, 2005).

3.5.3. CD273 y CD274

También son conocidos como PD-L1 o B7-H1 (CD274) y PD-L2 o B7-DC (CD273); ambos son ligandos del receptor PD-1 (CD279) localizado en los linfocitos. La expresión de CD273 está restringida a células presentadoras de antígenos y células T_H2, mientras que CD274 es expresada tanto en células hematopoyéticas y como en no hematopoyéticas. Se sabe que aunque CD273 es el ligando dominante para PD-1 y tiene de 2 a 6 veces mayor afinidad de interacción, CD274 es un competidor para él (Zheng y Zhou, 2015).

Su interacción atenúa la señalización de fosforilación y suprime la activación inmune de la célula. Para comenzar esta señalización PD-1 tiene un dominio citoplásmico que contiene un motivo inmuno-receptor basado en tirosina (ITIM) y un motivo interruptor inmuno-receptor basado en tirosina (ITSM) (Del Rio *et al.*, 2008).

3.5.4. CD40

Es una proteína transmembrana, miembro de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Es expresado en células presentadoras de antígenos, algunas células sin función inmunológica y tumores. Se une al ligando CD40L, el cual es expresado por células T y otras células no inmunes en condiciones inflamatorias. Se ha observado que el incremento de CD40 en la superficie de las células dendríticas promueve la producción de citocinas, la inducción de moléculas coestimuladoras y co-inhibitorias en la membrana celular y facilita la presentación cruzada de antígenos (Elgueta *et al.*, 2013).

3.6. Presentación de antígenos

3.6.1. Sinapsis inmunológica

Las interacciones moleculares que fundamentan la regulación del sistema inmune tienen lugar en un espacio de escala nanométrica donde se unen las células presentadoras de antígenos y las células T, este sitio de interacción se denomina sinapsis inmunológica (Fig.4.). Esta sinapsis integra receptores de tres categorías: adhesión, reconocimiento de antígeno acoplado a MHC (por la célula T) y coestimulación (Dustin, 2014). La hipótesis clásica de las dos señales postula que tanto el estímulo antigénico como el estímulo secundario son requeridas para la activación de células T (Dudek *et al.*, 2013).

El estímulo antigénico, también conocido como la primer señal, se refiere a la unión del receptor de linfocito T con el complejo mayor de histocompatibilidad (TCR-MHC). Se sabe que cada célula T madura expresa un TCR $\alpha\beta$ único que ha sido seleccionado por su habilidad para unirse a péptidos presentados por una molécula MHC. Es así que esta interacción permite el reconocimiento de péptidos extraños por células T, siendo de esta manera esencial para la defensa inmunológica (Sundberg *et al.*, 2007). Sin embargo en ausencia de la segunda señal, el contacto entre el receptor de células T (TCR) y el complejo MHC-antígeno resultará en disfunción o anergia de células T, creando tolerancia inmunológica antígeno-específica (Seliger y Quandt, 2012).

La segunda señal se refiere a la interacción de moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) y/o coinhibitorias (CD273/CD274) con proteínas de membrana en la superficie del linfocito T (CD28, CTLA4 y PD-1). De acuerdo al esquema de activación de linfocitos T por células dendríticas, las señales coestimuladoras actúan como regulador para la activación inicial de células T y proveen señales extras en los linfocitos que promueven la división celular, aumento de la supervivencia celular o inducción de funciones efectoras como secreción de citocinas o citotoxicidad (Peggs y Allison, 2005). Sin embargo cuando es mayor la expresión de moléculas coinhibitorias el efecto es la inducción de tolerancia inmunológica (Dudek *et al.*, 2013).

Es común se considere una tercera señal que involucra factores solubles como IL-12 (Valenzuela *et al.*, 2002). Se ha mostrado que en presencia de las señales 1 y 2 pero ausencia de IL-12, la respuesta resultante es tolerancia periférica en el compartimento de

células T CD8+ (Thomas, 2004). Sumado a esto, se ha observado que las células dendríticas modulan la función de los linfocitos T por otras señales inmunomoduladoras como los exosomas (Dudek *et al.*, 2013).

3.6.2 Presentación cruzada

La presentación cruzada se refiere a la capacidad de las células dendríticas de cargar antígenos de la vía endocítica en las moléculas MHC I para presentación de antígenos (Vyas *et al.*, 2008). El resultado de este proceso es determinado por la naturaleza del antígeno, la forma de captación de antígenos y la subpoblación de células dendríticas que realiza la presentación (Platzer *et al.*, 2014). Sin embargo se han propuesto dos vías principales dependiendo de dónde ocurre el procesamiento de antígenos. En la vía citosólica, los antígenos son transferidos del lumen de los compartimentos endocíticos al citosol donde son degradados por el proteasoma, siguiendo la vía de procesamiento de antígenos de MHC I; en la vía vacuolar, los antígenos internalizados son degradados dentro de los compartimentos endocíticos por proteasas lisosomales y cargada directamente en las moléculas MHC I en los endosomas o fagosomas (Segura y Amigorena, 2015).

3.6.3. Cross-dressing (Transferencia de membrana)

Es la transferencia de membrana con proteínas (en las que se incluye el MHC) desde la superficie de una célula a otra. Se han observado diferentes mecanismos de transferencia, el primero se denomina trogocitosis y se logra de manera rápida por el contacto célula-célula; el segundo mecanismo es la transferencia mediada por exosomas, la cual no requiere contacto celular y ocurre durante intervalos de tiempo prolongados. Otro mecanismo observado de manera más reciente se caracteriza por la formación de nanotubos que median la transferencia de moléculas MHC. Esta transferencia de membrana se ha observado entre varias células como APCs-células T, APCS-APCs, células tumorales-APCs, células epiteliales-APCs, entre otras. En el caso de las células dendríticas se ha demostrado que el péptido en el MHC transferido de esta manera puede ser presentado en la célula receptora (Campana *et al.*, 2015).

3.7. Inmunoterapia antitumoral con células dendríticas

Se ha propuesto que de manera general, todas las terapias anti-cáncer deberían eliminar las células cancerígenas de manera que ayude a activar a las células dendríticas y de esta manera inducir respuestas específicas inmuno-adaptativas con actividad anticancerígena (Butterfield, 2013).

En este aspecto la inmunoterapia celular contra cáncer busca provocar específicamente este tipo de respuestas, ya que pretende inducir el reconocimiento de antígenos asociados a tumores por linfocitos. El primer paso para lograr esta respuesta es proveer a las células presentadoras de antígenos de estos antígenos, lo cual puede ser conseguido *in vivo*, induciendo la captación de antígenos específicos de tumores, o *ex vivo* realizando cultivos de APCs derivadas de pacientes con un antígeno específico de tumores y un adyuvante para inducir su maduración, y posteriormente inyectar esas células de vuelta a los pacientes (Singh y Overwijk, 2015; Palucka y Banchereau, 2012). En particular, las células dendríticas han mostrado propiedades esenciales para su uso como potentes agentes inmunoterapéuticos como migración, “homing”, captación, procesamiento y presentación de antígenos, y coestimulación de linfocitos T (Boon y van der Bruggen, 1996). Un ejemplo de esto es la activación *in situ* (en el tumor) de las células dendríticas, ya que se sabe que en ambientes tumorales se mantiene el estado inmaduro de las células dendríticas, de hecho se ha considerado que la densidad de células dendríticas maduras en tumores se correlaciona inversamente con el estadio patológico y prognosis (Palucka y Banchereau, 2012; Dudek *et al.*, 2013).

Aunque los ensayos clínicos han establecido que en comparación con otros tratamientos como quimioterapia o radiación, la inmunoterapia basada en células dendríticas es segura, viable y capaz de desencadenar respuestas inmunes antígeno específicas de células T efectoras y de memoria (Butterfield, 2013), las vacunas ideales deben ser además estables y molecularmente definidas, lo cual no se logra con el uso de células, por lo que actualmente se busca crear nuevas estrategias que otorguen estas características. Una de las estrategias más prometedoras es el uso de exosomas derivados de células dendríticas (Chaput *et al.*, 2004), lo cual se explicará en los capítulos siguientes.

3.8. Exosomas.

3.8.1. Definición y características

La mayoría de las células liberan proteínas, mediadores y vesículas membranales en el ambiente extracelular (They, *et al.*, 2001). La transferencia de material celular a través de vesículas es un importante mecanismo de protección contra estrés intra- y extracelular y de comunicación en los organismos multicelulares (Nieuwland y Sturk, 2010), además este material permite la modulación de la fisiología de las células receptoras a un nivel más allá que las vías de señalización más clásicas (factores de crecimiento o citocinas) y puede ocurrir a grandes distancias afectando a células de diferentes tipos (Pitt *et al.*, 2014).

Existen diversos tipos de vesículas extracelulares que se diferencian en tamaño, morfología, densidad de flotación y composición proteica. Se han estudiado principalmente tres tipos: vesículas apoptóticas, microvesículas (también denominadas ectosomas) (100-1000 nm) y exosomas (<100 nm) (They, *et al.*, 2001; Raposo y Stoorvogel, 2013).

En particular, los exosomas son generados por la invaginación de la membrana limitante de los endosomas tardíos, lo cual es una característica de estas vesículas. Aunque la composición de cada subtipo de exosomas es desconocida se sabe que como consecuencia de la selección de lípidos y proteínas en su biogénesis, los exosomas presentan un conjunto específico de moléculas (Colombo *et al.*, 2014) entre las que se encuentran algunas chaperonas (Hsc70 y Hsc 90); subunidades de proteínas G triméricas; proteínas del citoesqueleto (actina y tubulina); proteínas ESCRT (Tsg 101, Alix); clatrina, proteínas involucradas en el transporte y fusión (Rab7, Rab2, Annexinas), proteínas de adhesión (integrinas, CAM, tetraspaninas como CD63, CD81 y CD9) enzimas y factores de elongación. Algunos de estos componentes son utilizados como marcadores para distinguir a los exosomas de otras vesículas (Alix, CD81, CD9, CD63) (Niel *et al.*, 2006).

Además de su composición, los exosomas comparten otras características como forma redonda, densidad de flotación (1.5 – 1.9 g/ml) y liberación al medio por fusión entre la membrana plasmática y la membrana de los cuerpos multivesiculares que los contienen (Robbins y Morelli, 2014).

3.8.2. Biogénesis

Una de las características de los exosomas es el proceso a través del cual se forman, este proceso está conformado por tres pasos principales: la invaginación de la membrana plasmática para la formación de vesículas endocíticas o endosomas; la invaginación reversa de la membrana endosomal que resulta en la formación de cuerpos multivesiculares (MVB); y la fusión de los MVB con la membrana plasmática para la liberación del contenido vesicular (exosomas) (Qin y Xu, 2014).

Los cuerpos multivesiculares son parte de un sistema endosomal pleomórfico que consiste en vesículas endocíticas primarias, endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas (Fig.5) (Stahl y Barbieri, 2002), de manera que, con el fin de tener un mejor entendimiento sobre el proceso, en este capítulo se explicará con mayor detalle el tracto endocítico, integrando la información sobre la biogénesis de los exosomas (Fig.6).

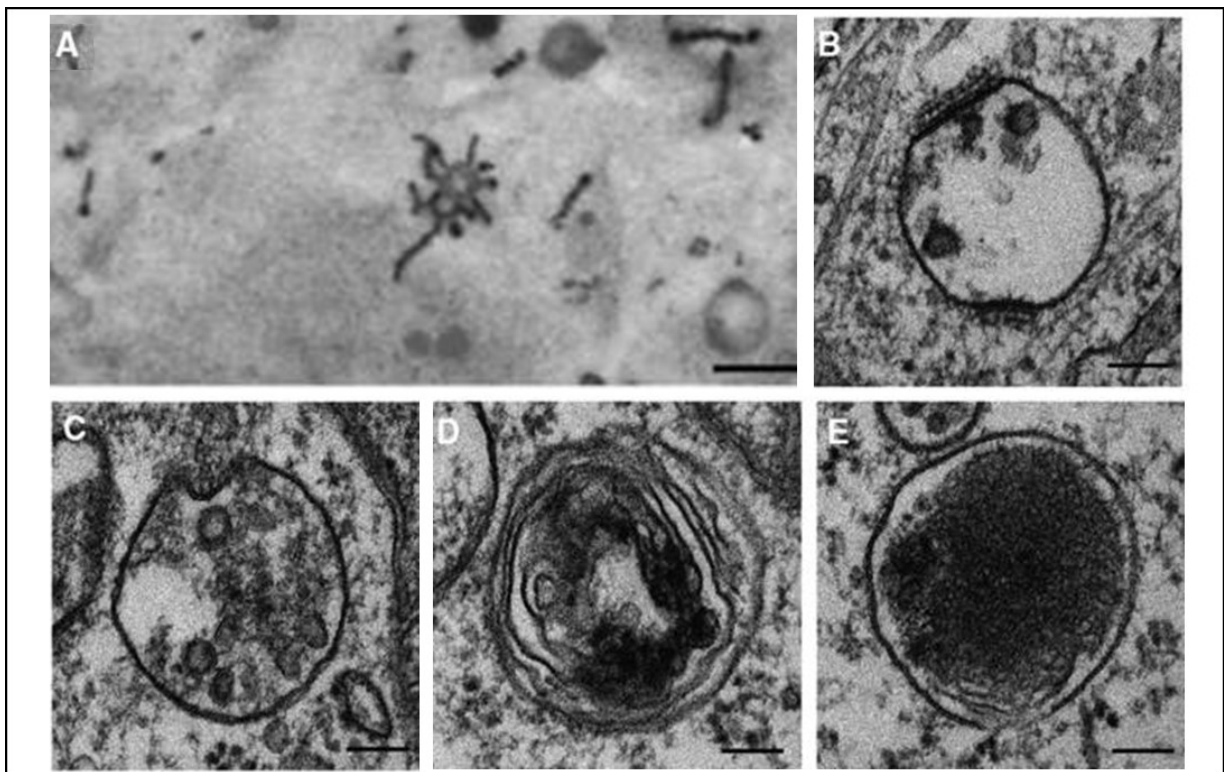


Fig. 5. Vesículas formadas durante la vía endocítica. A. Endosoma temprano B. Endosoma con algunas ILVs formadas C. Endosoma tardío con varias ILVs. D. Endolisosoma. E. lisosoma. Barra A: 500nm. Barra B a E: 100nm. Houtari y Helenius, 2011.

3.8.2.1. Endosomas tempranos

La endocitosis es el primer paso para la formación de los exosomas y es un proceso celular de internalización que se realiza por medio de la invaginación y posterior escisión de la membrana plasmática, derivando en la formación de vesículas. En células de metazoarios, la carga endocítica se conforma de un repertorio de nutrientes, acarreadores, complejos receptor-ligando, fluidos, solutos, lípidos, proteínas de membrana, componentes de la matriz extracelular, residuos celulares, bacterias y virus entre otros (Houtari y Helenius, 2011).

Los endosomas tempranos son el principal sitio de entrada del material endocitado y se forman principalmente por la fusión de vesículas primarias originadas por endocitosis dependiente de clatrina, endocitosis dependiente de caveolas, de GEEC o de ARF6. Tienen un pH ligeramente ácido (6.8-5.9), contienen relativamente bajas concentraciones de Ca^{2+} y son heterogéneos en términos de morfología (tubulares y vacuolares), localización, composición (dominios enriquecidos en Rab5, Rab4, Rab11, Arf/COPI, retromera o caveolas) y función. (Denzer *et al.*, 2000; Houtari y Helenius, 2011).

Su función más conocida es ser una estación de clasificación, sin embargo, la presencia de placas con clatrina y componentes del complejo ESCRT permite que también comience en ellos el segundo paso de la formación de exosomas: la formación de vesículas intraluminales.

Mientras atraviesa sus etapas de maduración (donde tiene gran participación la proteína Rab5), el endosoma temprano mantiene un proceso de comunicación con la red trans-Golgi (con ayuda de Rab7 y Rab9) a través del intercambio de vesículas, en el cual reciben moléculas como hidrolasas lisosomales, derivando en un endosoma tardío (Houtari y Helenius, 2011).

3.8.2.2 Endosomas tardíos y lisosomas.

Los endosomas tardíos son típicamente redondos, tienen un diámetro de 250-1000 nm y un pH es de 6-4.9. En su membrana limitante contienen proteínas lisosomales como LAMP1 e hidrolasas, agregados de proteínas como ATPasas-V, clatrina, complejos ESCRT y balsas lipídicas ricas en colesterol y esfingolípidos. Los endosomas tardíos que se forman en el citoplasma periférico se mueven al área perinuclear donde se fusionan con otros endosomas, lisosomas y/o endolisosomas que constituyen el principal sitio de degradación

de proteínas y lípidos (Houtari y Helenius, 2011). Una de las principales diferencias entre los endosomas tardíos y los lisosomas es su estructura (Fig.5) y los cuerpos multivesiculares pertenecen a la categoría de endo/lisosoma (Denzer *et al.*, 2000).

En el lumen de los endosomas tardíos, se forman numerosas vesículas intraluminales con diámetros de 50-100 nm (Houtari y Helenius, 2011). La generación de estas vesículas requiere trasladar hacia la membrana limitante del endosoma las moléculas que se integrarán a la vesícula. Posteriormente se forma la vesícula por invaginación interna de la membrana del endosoma, adquiriendo así, una pequeña porción del citoplasma y finalmente se libera al interior del endosoma, (Colombo *et al.*, 2013).

Se han propuesto varios mecanismos que modulan las invaginaciones intraluminales. Destaca la maquinaria del complejo endosomal de clasificación requerido para transporte (ESCRT), en este mecanismo actúan secuencialmente los complejos ESCRT-0, -I, -II y -III que clasifican proteínas membranales ubiquitinadas en dominios específicos de membrana, induciendo la invaginación y separación de las vesículas intraluminales (Fig.7) (Roucourt *et al.*, 2015).

Dentro del complejo ESCRT-0 se encuentra la proteína HRS que reconoce y secuestra proteínas mono-ubiquitinadas en la membrana endosomal y las asocia en un complejo con las proteínas STAM, Eps15 y clatrina. Los complejos ESCRT-I y II, son responsables de la formación de brotes con carga retenida y participan en la carga de moléculas a la vesícula. Por último, los componentes del complejo ESCRT-III envían a la vesícula a su separación y la maquinaria ESCRT se disocia y recicla a través de la interacción con la ATPasa-AAA Vps4 (Colombo *et al.*, 2013).

La ceramida y otros lípidos también se han propuesto como mediadores de la biogénesis de exosomas, ya que dirigen la separación de la carga hacia regiones especializadas de membrana endosomal que tengan capacidad para curvarse hacia el interior. Para esto se requiere que la esfingomielinasa tipo II hidrolice la esfingomielina a ceramida (Trajkovic *et al.*, 2008; Roncourt *et al.*, 2015) También las membranas ricas en ácido lisobifosfatídico regulan el transporte intracelular de colesterol, actuando presumiblemente como colector y distribuidor (Denzer *et al.*, 2000, Stahl y Barbieri, 2002).

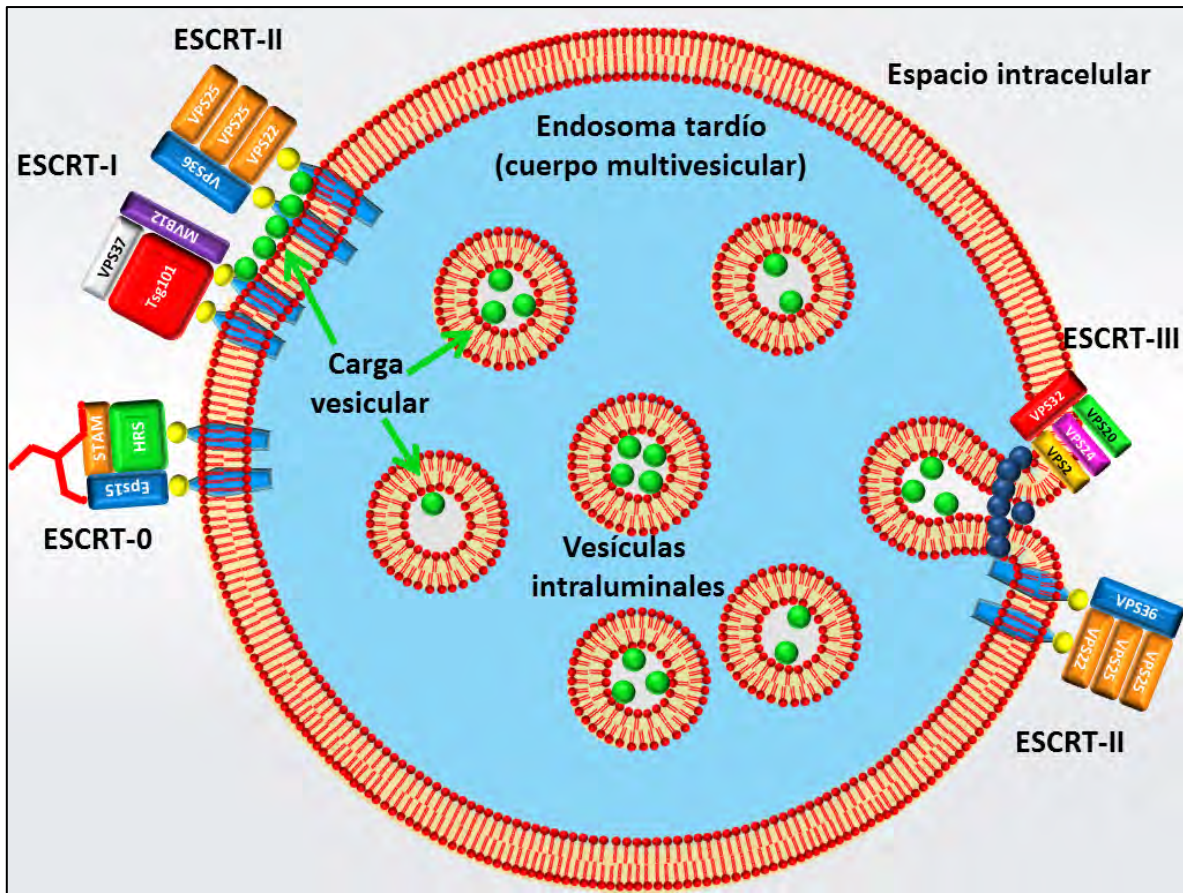


Fig. 7. Mecanismos involucrados en la formación de exosomas. Se observa el mecanismo de formación de las vesículas intraluminales por medio de los complejos ESCRT -0, -I, -II y -III.

Es importante mencionar que ya que los exosomas son considerados vesículas intraluminales, muchas veces, incluyendo en este trabajo, se da por hecho que estos son mecanismos de su biogénesis. Sin embargo se ha reportado la coexistencia de diferentes tipos de cuerpos multivesiculares (MVB), por lo que no se sabe si los endosomas secretores de exosomas son entidades específicas (Xiu *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2013).

La posibilidad de que estos procesos involucren diferentes categorías de MVB no ha sido excluida y se piensa que su destino final puede estar determinado por la interacción con proteínas SNARE, tetraspaninas y receptores como manosa-6-fosfato, las cuales pueden escapar de la degradación después de la fusión con lisosomas (Houtari y Helenius, 2011). En especial las tetraspaninas son conocidas por formar largos complejos proteicos y así facilitar la incorporación de otras proteínas en las vesículas (Denzer *et al.*, 2000).

Por último, se ha observado que los cuerpos multivesiculares siguen al menos dos diferentes vías: la fusión con lisosomas que resulta en la degradación de su contenido; y la fusión con la membrana plasmática, que resulta en el tercer paso de la biogénesis de los exosomas: la exocitosis de las vesículas internas o exosomas al espacio extracelular (Denzer *et al.*, 2000).

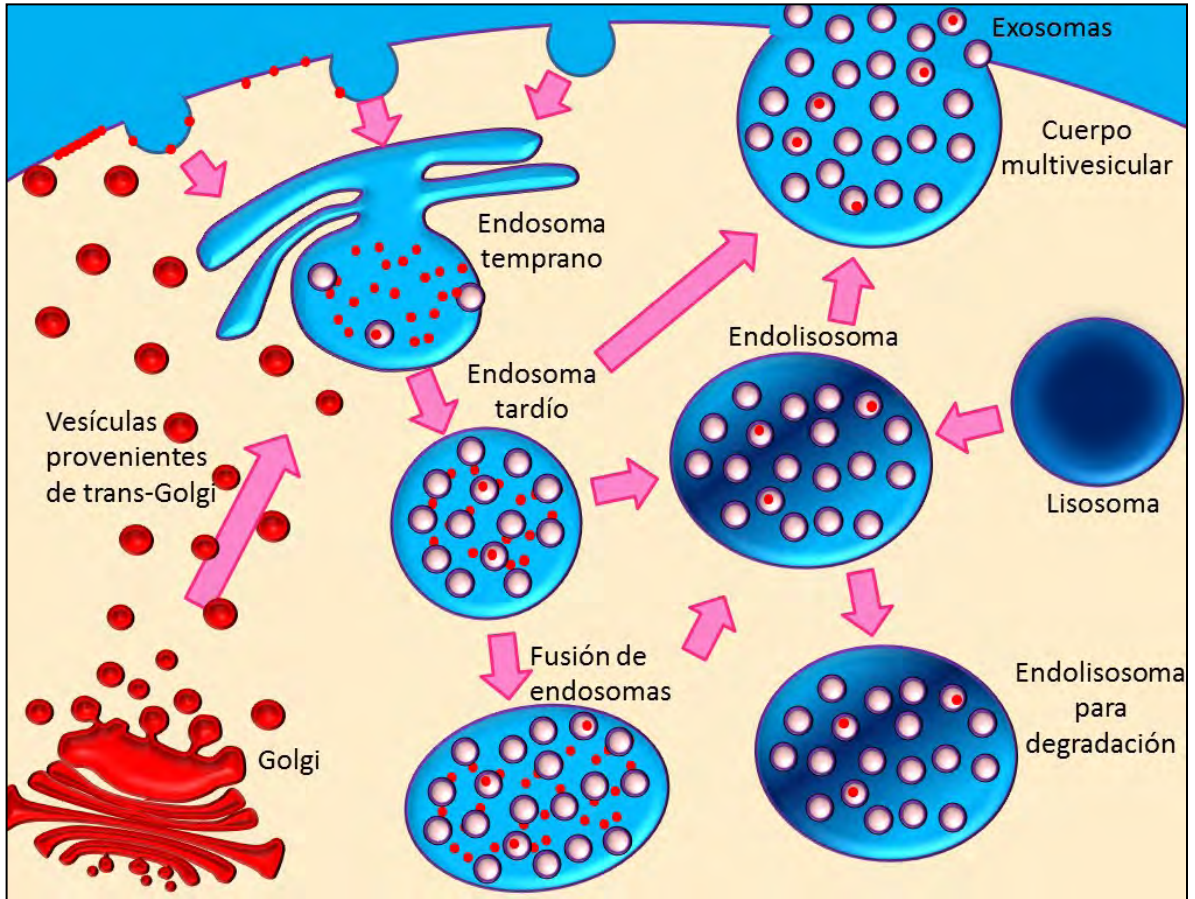


Fig. 6. Biogénesis de los exosomas. Se observa el proceso de formación de exosomas, la vía endocítica de degradación, la vía secretora y las interacciones que existen entre estas vías

3.8.3 Función de los exosomas

Originalmente, la función atribuida de los exosomas fue la eliminación de proteínas obsoletas, sin embargo, en las últimas décadas se han propuesto, junto con otras vesículas extracelulares como microvesículas y cuerpos apoptóticos, como otro mecanismo de comunicación intercelular, que se suma al contacto célula-célula y la transferencia de moléculas secretadas (Reiners *et al.*, 2014; Raposo y Stoorvogel, 2013).

Los exosomas están cargados con proteínas específicas de membrana y citoplasma y con ácidos nucleicos que varían dependiendo de la célula de origen y estado homeostático, de manera que al ser transferidos o interactuar con células receptoras, resulta en funciones distintas de los exosomas. (Reiners *et al.*, 2014; Mittelbrunn *et al.*, 2011).

La captación de vesículas extracelulares y transferencia de su carga a células receptoras juega un papel importante en la comunicación intercelular (Roucourt *et al.*, 2015), de tal manera que con el fin de lograr una eficiente transferencia de información, los exosomas contienen en su superficie proteínas y moléculas de reconocimiento celular, que facilitan la selección de su blanco, adhesión y captación por las células receptoras (Mittelbrunn *et al.*, 2011).

Por ejemplo, se ha reportado que aunque pueden estimular linfocitos T citotóxicos por medio de la molécula MHC I, esta estimulación es menos eficiente que la ejercida por las células (Denzer *et al.*, 2000).

3.8.4 Exosomas de células presentadoras de antígenos.

Los exosomas representan una forma de comunicación intercelular a corta y larga distancia, de manera que son capaces de inducir respuestas inmunológicas y cambios en los diferentes microambientes (Raposo *et al.*, 1996). Los exosomas derivados de células del sistema inmune tienen, en especial, este tipo de comportamiento, razón por la cual son objeto de diversas investigaciones.

Por ejemplo, se ha observado que los exosomas derivados de células presentadoras de antígenos (APC) como los linfocitos B, contienen abundante cantidad de moléculas MHC II y son capaces de estimular a linfocitos CD4+ *in vitro* (Raposo *et al.*, 1996).

Además se ha sugerido que estas vesículas pueden representar entidades estables de presentación de antígenos, ya que son capaces de diseminar péptidos antigénicos a través de fluidos biológicos y establecer comunicación entre células inmunes. Además muestran propiedades inmunomoduladoras, principalmente después de su adsorción con células dendríticas, por la expresión de MHC I, MHC II, moléculas coestimuladoras y tetraspaninas, lo cual ha llevado a iniciar investigaciones para su uso como herramientas inmunoterapéuticas (Gauvreau *et al.*, 2009)

3.8.5 Mecanismos de acción de los exosomas derivados de células dendríticas

Una gran cantidad de moléculas con función inmune en células dendríticas, son expresadas en la parte externa de la superficie de los exosomas que estas células secretan y son funcionales (Munich *et al.*, 2012).

Los exosomas de células dendríticas pueden interactuar con diversos tipos celulares; en algunos casos ejercen funciones directamente sobre la célula receptora. Un claro ejemplo es la inducción de apoptosis en las células tumorales por la presencia de las proteínas TNF, FasL y TRAIL de los exosomas (Munich *et al.*, 2012). Asimismo, por medio de las proteínas TNF, NKG2D e IL-15Ra expresadas en los exosomas, son capaces de activar directamente a células NK en ratones y en pacientes con cáncer. Además, pueden contener complejos MHC-péptidos antigénicos e inducir directamente actividad antígeno-específica en células T CD8⁺ y CD4⁺ (Zitvogel *et al.*, 1998; Thery *et al.*, 2002).

Por otro lado, los exosomas pueden activar células T de manera indirecta al ser captados por otras células dendríticas inmaduras, las cuales se activan al recibir información de los exosomas. Esta captación solo se da eficientemente por células dendríticas (Pant *et al.*, 2011) a través de un proceso fagocítico dependiente de dinamina2, fosfatidil inositol-3-cinasa (PI3K) en la célula y proteínas como integrinas, anexinas, galectina e ICAM1 en la superficie de exosomas. Una vez internalizados, los exosomas pueden encontrar tanto en los fagolisosomas como en los compartimentos endosomales (Munich *et al.*, 2012).

Una vez que la membrana transferida, las células dendríticas adquieren complejos MHC-péptido intactos y completamente funcionales que permiten a las células dendríticas presentar el péptido adquirido (Dolan *et al.*, 2006).

Es sabido que las células T pueden adquirir moléculas MHC de la superficie de las APCs a través de exosomas. Sin embargo, a diferencia de la trogocitosis donde se transfiere un fragmento de la membrana durante la sinapsis inmunológica, este proceso no requiere contacto célula-célula y puede ocurrir durante intervalos de tiempo prolongados (Kourembanas, 2015).

3.8.6. Inmunoterapia antitumoral con exosomas

El hecho de que los exosomas concentraran moléculas involucradas en las diferentes funciones celulares, indicó la posibilidad de que los exosomas de células dendríticas pudieran liberar exosomas inmunogénicos y que las células tumorales liberaran exosomas enriquecidos en antígenos tumorales (André *et al.*, 2002).

Hasta el momento se ha observado que los exosomas derivados de tumores contienen antígenos y ya han sido utilizados como una fuente de estímulo específico para la respuesta inmune contra tumores. Por otro lado se ha comprobado que además del contacto directo con otras células y la secreción de citocinas, los exosomas también tienen un papel importante en la función de las células dendríticas. Esto ha generado el interés en el uso de los exosomas como agentes inmunoterapéuticos (Romagnoli *et al.*, 2014)

Muestra de esto es lo reportado por Zitvogel y col., quienes en 1998 utilizaron exosomas derivados de células dendríticas como terapia antitumoral en murinos y observaron la capacidad de estas vesículas de suprimir el crecimiento de tumores de manera dependiente de linfocitos T y además reporta que estos exosomas expresan moléculas MHC I y II funcionales y moléculas coestimuladoras. Por otro lado se ha observado que los exosomas expresan varias proteínas de adhesión, probablemente involucradas con su blanco específico. (Clayton *et al.*, 2001; Amigorena, 2000). De manera que es importante conocer las proteínas y el nivel de las proteínas expresadas por los exosomas con el fin de aportar evidencia que ayude a determinar si su uso es adecuado en la inmunoterapia antitumoral, en este caso contra melanoma.

4. JUSTIFICACIÓN

Las células dendríticas han sido ampliamente usadas como inmunoterapia adoptiva en diversas patologías como por ejemplo el cáncer. Sin embargo en múltiples ocasiones el desarrollo de las respuestas inmunológicas no es el adecuado y no provocan la remisión de las patologías tratadas.

Un tratamiento alternativo al uso de células dendríticas es el uso de los exosomas que estas secretan. Se ha observado que estos exosomas están sumamente involucrados en el desarrollo de las respuestas inmunológicas, aunque actualmente se desconoce el fenotipo de los exosomas derivados de las células dendríticas tratadas con diferentes estímulos y los efectos que podrían tener en el sistema inmune. Esto impide predecir la respuesta inmunológica e incrementa los riesgos porque la aplicación de exosomas con el fenotipo incorrecto en inmunoterapia puede agravar la afección que se pretende tratar.

Por esta razón es importante conocer los diferentes fenotipos que pueden exhibir los exosomas derivados de células dendríticas y de esta manera utilizar la mejor opción de tratamiento e incrementar su efectividad. Además, conocer la relación entre el fenotipo de los exosomas y el fenotipo de las células dendríticas secretoras, puede contribuir a explicar el papel de los exosomas en el sistema inmune y puede permitir su mejora para su uso en inmunoterapia.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el inmunofenotipo de exosomas liberados por células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con el antígeno MAGE-AX y tratadas con diferentes estímulos.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diferenciar células dendríticas a partir de células de médula ósea precursoras
2. Tratar las células dendríticas con el antígeno MAGE-AX
3. Tratar células dendríticas inmaduras y tratarlas con diferentes estímulos: LPS, TNF- α e IFN- γ).
4. Determinar el inmunofenotipo de las células dendríticas generadas después de los tratamientos.
5. Aislar y purificar exosomas derivados de las células dendríticas tratadas con diferentes estímulos.
6. Determinar el inmunofenotipo de los exosomas derivados de las células dendríticas.

7. ANTECEDENTES

Lamparski et al., en 2002, evaluaron la expresión de proteínas de relevancia inmunológica de exosomas derivados de células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos CD14+, encontrando elevada expresión de MHC I y II, moderada expresión de CD81, CD63, CD9 y CD82, presencia de moléculas CD86, CD11b, CD11c, CD58 y CD53. Además de débil expresión de CD83, CD80 y CD40. Por otro lado en 2001, Clayton y colaboradores evaluaron las proteínas de relevancia inmunológica de células dendríticas CD14- CD1a+, observando pobre expresión en CD80 pero fácil detección de CD86, CD40 e ICAM-1. También se observó expresión elevada de CD59 y presencia clara de CD63. Además reportan que las proteínas CD20, CD71 y CD14 fueron evaluadas pero no detectadas.

Zitvogel et al., en 1998, caracterizó exosomas derivados de células dendríticas diferenciadas a partir de médula ósea de ratón. Encontró que los exosomas derivados de células dendríticas inmaduras expresaban bajos niveles de CD80, CD86, CD40, MHC I y MHC II. En cambio los exosomas derivados de células dendríticas maduras, cargadas con péptidos tumorales y estimuladas con LPS mostraron elevada expresión de CD80, CD86, CD40, MHC I y MHC II.

They et al., en 2002 observó que los exosomas derivados de la línea celular D1 (células dendríticas de bazo) expresaban elevados niveles de MHC I, MHC II y CD86. Finalmente Clayton et al., reporta que los exosomas de células dendríticas diferenciadas de monocitos humanos con GM-CSF e IL-4 expresan niveles altos de CD86 y CD40, moderados niveles de CD63 y pobre de CD80. Por el contrario en exosomas derivados de células dendríticas diferenciadas de monocitos humanos con GM-CSF, IL-4 y TNF- α no detectó CD80, CD86, CD40, MHC I y MHC II.

8. HIPÓTESIS

Las células dendríticas derivadas de médula ósea tratadas con el antígeno MAGE-AX y 1µg TNF-α; 10,000 U de IFN-γ o 1µg de LPS, producen exosomas que expresan elevados niveles de CD80 y CD86; Mientras que las células dendríticas inmaduras o tratadas con el antígeno MAGE-AX y 500 U INF-γ, producirán exosomas que expresan elevados niveles de CD273 y CD274.

9. METODOLOGÍA

9.1 Material biológico

Se utilizaron ratones C57BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, obtenidos en criados y mantenidos en el bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, con un fotoperiodo luz-oscuridad de 12 horas a una temperatura de 18° a 24° C. Su dieta consistió en alimento convencional para ratón Rodent Lab Chow 5001 de Purina y agua potable *ad libitum*.

9.2. Estrategia experimental

Se realizó un cultivo primario de células hematopoyéticas pluripotenciales de médula ósea obtenidas de los fémures y tibias de ratones C57BL/6. Las células fueron estimuladas con el factor de crecimiento GM-CSF para inducir su diferenciación a células dendríticas CD11c+ MHCII+, las cuales fueron cargadas con el antígeno MAGE-AX al tiempo que se trataron con 1µg de TNF-α, 500 U de IFN-γ y 10, 000 U de IFN-γ (por millón de células). Como control negativo de activación se utilizaron células dendríticas diferenciadas 4 y 7 días y sin tratamiento; como control positivo de activación se utilizó 1µg de LPS por millón de células (Fig.8).

Después de cada tratamiento se reemplazó el sobrenadante por medio sin suero fetal bovino (SFB) durante 24h. El sobrenadante resultante fue colectado y su contenido fue concentrado con tubos concentradores de proteínas (en el contenido concentrado se encontraban los exosomas) hasta alcanzar un volumen de 200µl por cada tratamiento. La muestra obtenida fue incubada con perlas magnéticas α-CD11c para capturar los exosomas.

Tanto las perlas magnéticas cubiertas con exosomas como las células dendríticas fueron incubadas con anticuerpos anti CD80 FITC, CD86 PE, CD40 FITC, CD273 PE, CD274 PE y MHC I FITC, MHC II FITC y se determinó la expresión de dichas proteínas con un citómetro de flujo FACScalibur.

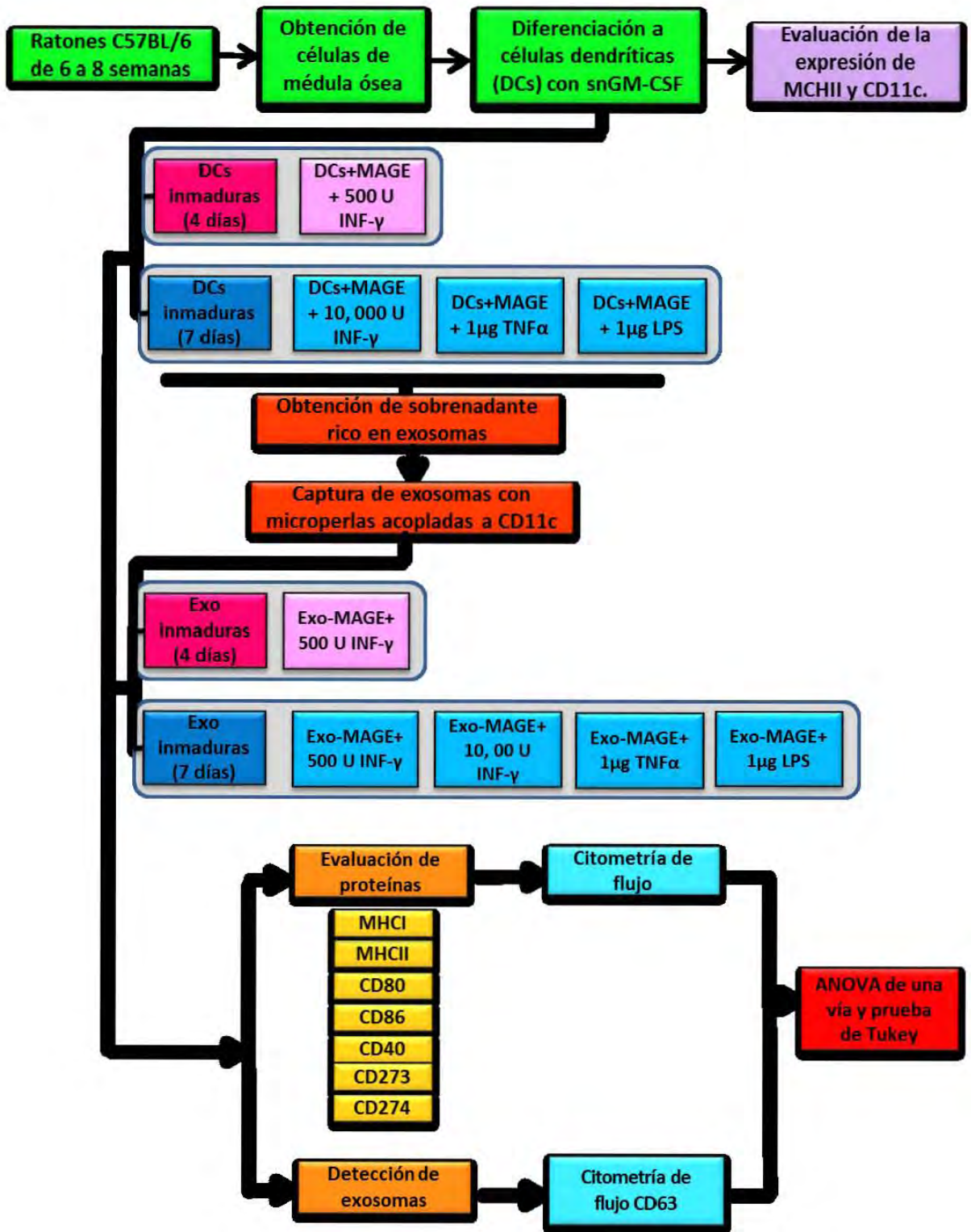


Fig. 8. Estrategia experimental. Se muestra el esquema general de la organización de grupos evaluados tanto de células dendríticas como de exosomas, así como los métodos utilizados para la evaluación de su inmunofenotipo.

9.3. Cultivo de células productoras de GM-CSF

Células de mieloma de la línea X-63 transfectadas con el plásmido pCDNA3 que contiene el gen recombinante para producir el factor de crecimiento GM-CSF, fueron donadas por la Dra. Laila Gutiérrez Kobeh de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina en el Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga (Fig. 9). Para obtener sobrenadante rico en GM-CSF se realizaron los siguientes pasos.

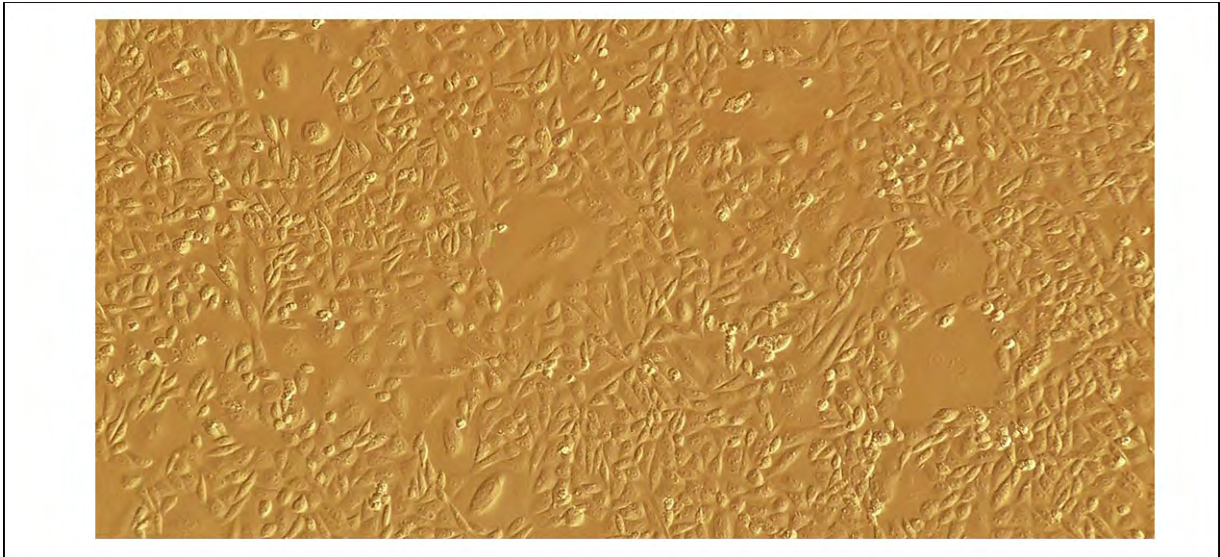


Fig 9. Células productoras de GM-CSF. Microfotografía del cultivo *in vitro* de las células X-63 de mieloma transfectadas con el gen que codifica para producir la proteína GM-CSF en el sobrenadante. Vista a 200 aumentos.

Selección: Se sembraron 1×10^5 células en botellas de cultivo de 25 cm^2 con medio Ham's F12 (Biowest, P0134-N10L) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest, S1650-500) y 1% de cocktail de antibióticos/micóticos (Biowest L0010-100) + $1 \mu\text{g/ml}$ de geneticina (Gibco, 11811-031). Al alcanzar 90% de confluencia se retiró el medio y se incubaron las células a 37°C con 5% de CO_2 y 95% de humedad con 3 ml de tripsina por caja durante 5 minutos.

Las células desprendidas fueron desechadas y las células adheridas se cultivaron nuevamente con medio F12 suplementado + $1 \mu\text{g/ml}$ de geneticina hasta alcanzar 90% de confluencia. Este procedimiento se repitió 3 veces.

Expansión: Para su crecimiento, se colocaron 5×10^5 células previamente seleccionadas, en botellas de cultivo de 75 cm^2 con medio F12 suplementado y se

mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta alcanzar el 95% de confluencia.

Obtención del factor de diferenciación GM-CSF: Después de alcanzar el 95% de confluencia, los cultivos de células de mieloma seleccionadas se mantuvieron con medio F12 sin suero fetal bovino durante 48h. Posteriormente se recolectó el sobrenadante, se filtró con malla de 0.2 µm, se alicuotó y se conservó a -20 °C. No se utilizó snGM-CSF almacenado por más de dos meses para obtener una buena diferenciación.

9.4. Cultivo primario de células de médula ósea y diferenciación a células dendríticas

Para la obtención de células de médula ósea se sacrificaron ratones C57BL/6 por dislocación cervical. Se removieron sus extremidades inferiores y se retiró el tejido muscular adherido al fémur y tibia. Los huesos íntegros y limpios fueron colocados en solución balanceada de Hank's estéril.

En condiciones de esterilidad los huesos fueron lavados vigorosamente cuatro veces con etanol al 70%, dos veces con PBS estéril a 7.4 de pH y colocados en cajas Petri de 10 cm de diámetro con medio RPMI (Biowest, P0860-N10L) suplementado (RPMI con 10% de suero fetal bovino y 1% de coctel de antibióticos/antimicóticos).

Para obtener las células de médula ósea se cortaron las epífisis de los huesos, los cuales fueron perfundidos con una jeringa de 1mL con medio RPMI suplementado.

Las células obtenidas se lavaron 3 veces con PBS a 4 °C y se resuspendieron en 1mL de medio RPMI 1640 (Biowest, P0860-N10L) suplementado con 10% de SFB. Se determinó el número de células con una cámara de Neubauer y contrastando las células con azul tripano (1:50 en PBS) (MERCK, 11732). Finalmente se sembraron 3x10⁷ células en cada botella de cultivo de 75 cm² con 10 ml de 80% de medio RPMI suplementado + 20% de sobrenadante rico en GM-CSF (snGM-CSF) por cada 1x10⁷ células y se mantuvieron en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa.

El día 3 de diferenciación, se añadieron al cultivo 10 ml de 80% de medio RPMI suplementado + 20% de snGM-CSF por cada 1x10⁷ células. El día 4 de diferenciación se recolectaron las células para evaluar su fenotipo y el tratamiento correspondiente. A las células que fueron evaluadas o tratadas el día 7 de se les añadieron 2ml de snGM-CSF por cada 1x10⁷ células el día 6 de diferenciación y fueron colectadas 24h después.

9.5. Tratamiento de células dendríticas

Después de la diferenciación se separaron y sembraron las células semiadherentes y en suspensión (presumiblemente las células dendríticas) y se traspasaron a placas de 6 pozos, donde fueron sembradas 5×10^6 células por pozo con 1 ml de medio RPMI suplementado por cada 1×10^6 células. Estos cultivos se incubaron durante 24h en presencia del péptido MAGE-AX (LGITYDGM) (sintetizado por Research Genetics, Invitrogen, Leiden, Holanda, con 90% de pureza) y $1 \mu\text{g}$ de TNF- α por cada 1×10^6 de células; $1 \mu\text{g}$ de LPS por cada 1×10^6 células; 500U de IFN- γ de murino por cada 1×10^6 células (PeproTech, Inc, 315-05-100UG) de acuerdo al protocolo utilizado por Rojas y Krishnan (Rojas y Krishnan, 2010); y 10, 000U de IFN- γ de murino por cada 1×10^6 células para obtener diferentes fenotipos de células dendríticas. En todos los tratamientos, las células dendríticas estuvieron en presencia del antígeno MAGE-AX, sin embargo, para nombrar el grupo nos referiremos solo a la citocina con las que fueron tratadas y su concentración. También se sembraron para la recolección de exosomas, las células dendríticas diferenciadas al día 4 y día 7 sin tratamientos. Las células del día 4 fueron tomadas como el control.

9.6. Obtención de exosomas

Los cultivos de células dendríticas con los diferentes tratamientos, se incubaron por 24h con medio sin SFB; posteriormente el sobrenadante fue recolectado y filtrado con malla de $0.2 \mu\text{m}$ para eliminar las microvesículas y se filtró el sobrenadante con tubos concentradores de proteínas (Amicon Ultra- 10,000 MWCO, UFC801024). Finalmente el sobrenadante concentrado, el cual contenía los exosomas fue incubado durante 72h con $15 \mu\text{l}$ microperlas magnéticas α -CD11c (MACS® Miltenyi Biotec, N418) para su aislamiento.

9.7. Marcaje con anticuerpos

Las células dendríticas y los exosomas acoplados a perlas fueron marcados con los anticuerpos α -mouse: α -I-A/I-E FITC que reconocen MHCII de ratón, α -CD273 PE (BioLegend, 107206), α -CD274 PE (BioLegend, 558091), α -CD80 Biotin (BioLegend, 553767), α -CD86 PE (BioLegend, 553692), α -CD40 Biotina (BioLegend, 553789), α -CD63 purificado (BioLegend, 143901) y α -CD11c APC (BioLegend, 117310) en dilución 1:500. Además se utilizaron IgG α -rat y estreptavidina PE (BioLegend, 554061) o estreptavidina FITC (BioLegend, 554060)

Las células y las microperlas fueron incubadas con los anticuerpos durante 15 minutos en oscuridad y se lavaron dos veces con PBS de tinción (con albúmina al 0.1% + azida de sodio al 0.02% (J.T. Baker, VO15-05). Las muestras marcadas con el anticuerpo α -CD63 purificado fueron incubadas con IgG α -rat por 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente y lavado tres veces con PBS de tinción. Los anticuerpos con biotina y el α -CD63 purificado acoplado a IgG α -rat fueron además incubados con estreptavidina PE o estreptavidina FITC durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y lavados dos veces con PBS de tinción. Finalmente las células fueron fijadas con PBS con paraformaldehído al 0.5%.

9.8. Detección de células dendríticas y exosomas

Con el fin de determinar el porcentaje de células de médula ósea diferenciadas a células dendríticas, todas las células fueron marcadas contra la proteína CD11c, el cual es un marcador de células dendríticas y contra la proteína MHC II, la cual es indispensable para la presentación de antígenos. El conjunto de células CD11c+, MHCII+ fue considerado la población de células dendríticas.

Por otro lado se determinó el número de microperlas marcadas con la proteína CD63, marcador de exosomas para determinar las microperlas acopladas a exosomas. El conjunto de microperlas CD63+ fue considerado la población de exosomas.

Para observar el porcentaje de células positivas a estos anticuerpos se utilizó un citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron los resultados en el programa FlowJo 8.7.

9.9. Determinación del fenotipo de células dendríticas y exosomas

Se analizó el porcentaje de exosomas y células dendríticas positivas a MHC I, MHC II, CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274 con un citómetro de flujo FACScalibur y se analizaron los resultados en el programa FlowJo 8.7.

9.10. Análisis estadístico

Se realizó ANOVA de una vía para conocer si existen diferencias significativas entre tratamientos y prueba de comparación múltiple de Newman-Keuls para determinar entre cuáles grupos hubo diferencias significativas. También se realizó prueba de t pareada para determinar si había diferencias estadísticas entre las células dendríticas y exosomas del mismo grupo.

10. RESULTADOS

10.1. Diferenciación de células dendríticas

Las células del cultivo de médula ósea en presencia de GM-CSF presentaron cambios en su morfología a través del tiempo. Estos cambios consistieron principalmente en la formación de proyecciones en la superficie celular, las cuales son características de las células dendríticas (Fig. 10., recuadro C) Estas proyecciones se aprecian bien formadas en el día 4 de diferenciación, pero se observa su presencia desde el día 1 de diferenciación (Fig.10., recuadros A y B, flechas amarillas).

A partir del cultivo proveniente de la diferenciación con el factor GM-CSF, las células dendríticas se seleccionaron en el citómetro a través de la presencia de la proteína CD11c y de la expresión de MHC II, ya que es el fenotipo comúnmente utilizado para identificar células dendríticas diferenciadas con GM-CSF (Yamaguchi *et al.*,1997).

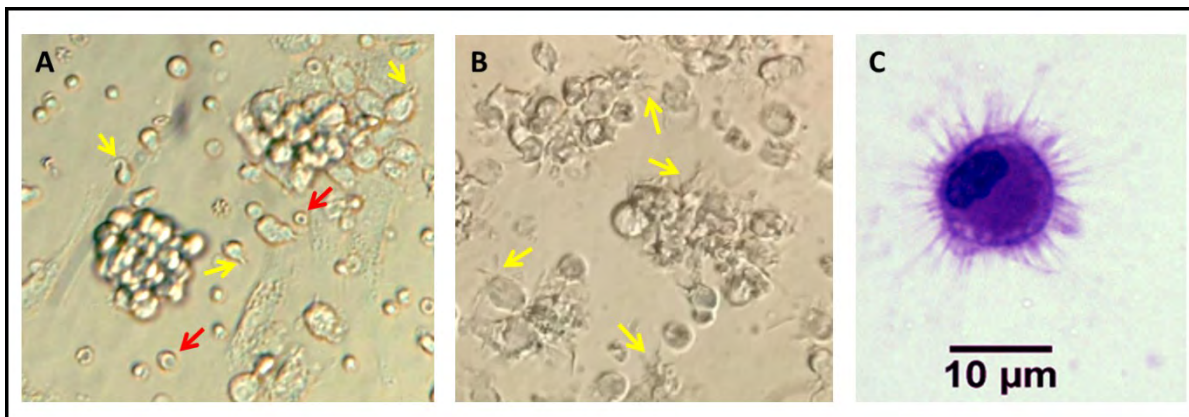


Fig 10. Diferenciación de células dendríticas. A y B Microfotografías del cultivo de células extraídas de médula ósea de ratones en presencia de GM-CSF. Vista a 200 aumentos. A. Cultivo al día 1 de diferenciación. Las flechas amarillas señalan las proyecciones que se comienzan a formar en las células desde el primer día de diferenciación; las flechas rojas señalan la presencia de eritrocitos en el cultivo. B. Cultivo al día 4 de diferenciación. Se observa la presencia de proyecciones más largas en las células C. Tinción con hematoxilina de una célula con 4 días de diferenciación. Se observa el tamaño de la célula y sus proyecciones.

En todos los grupos se obtuvo un porcentaje de diferenciación mayor a 85%, considerando como células dendríticas a las células positivas a CD11c. El promedio de las células positivas al marcador CD11c de todos los grupos, fue de 87.4% y el promedio de las células doble positivas (CD11c y MHC II) fue de 75.8% (Fig.11., A y B).

En el caso de la expresión de la proteína MHC II, se observó que en todos los grupos se presentaron porcentajes mayores a 60% de células que expresaban esta proteína (Fig 11. C y D)

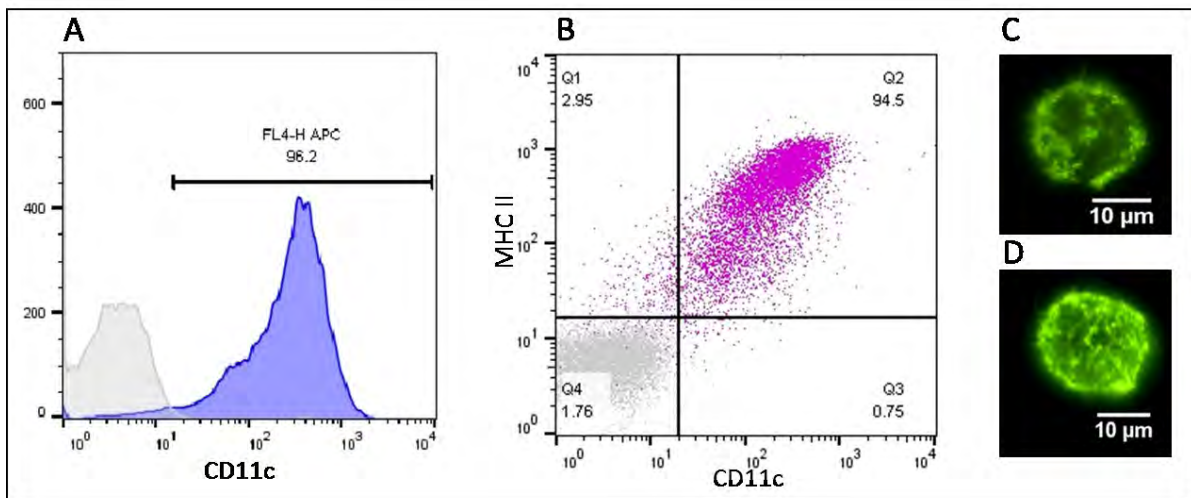


Fig. 11. Expresión de marcadores de células dendríticas. Se observa la presencia de los marcadores de células dendríticas presentadoras de antígenos. A. Histograma con el porcentaje de células positivas a CD11c (marcador de células dendríticas). B. Dot Plot que muestra el porcentaje de células positivas a CD11c y MHC II (molécula característica de las células presentadoras de antígenos) en un cultivo de células con 7 días de diferenciación. C y D. Microfotografías de fluorescencia de células diferenciadas al día 4 (C) y día 7 (D) marcadas con α -MHC II acoplado a FITC

Así mismo, se observó que la expresión de MHC II cambiaba respecto al tiempo de diferenciación en presencia de GM-CSF, de manera que en las células dendríticas al día 4 de diferenciación se observó un bajo nivel de expresión de esta proteína, característica de células dendríticas inmaduras. Así mismo se observó que las células dendríticas expresaron mayores niveles de expresión de MHC II que es característica de células dendríticas maduras (Fig 12).

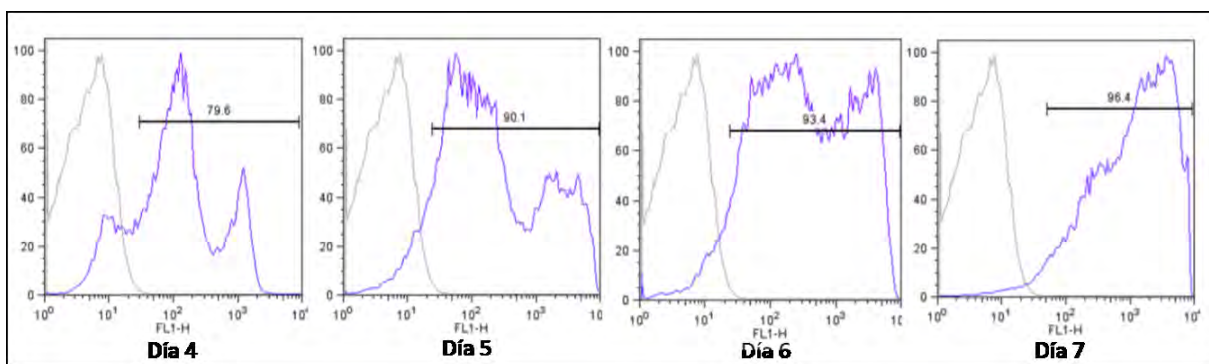


Fig. 12. Expresión de MHC II (FL1-H) en diferentes días de diferenciación. Se observan la Intensidad Media de Fluorescencia y el porcentaje de células marcadas con α -MHC II acoplado a FITC a los días 4, 5, 6 y 7 días de diferenciación.

10.2. Detección de exosomas

En cuanto a la detección de exosomas en el citómetro de flujo, cada evento detectado por el aparato correspondió a una microperla α -CD11c cubierta de exosomas CD11c+. Para seleccionar los eventos correspondientes a microperlas se comparó la población correspondiente a perlas cubiertas con exosomas, con una población de microperlas de tamaños definidos (1 y 2 μ m). Para confirmar la presencia de exosomas en la superficie de la microperla se determinó la presencia de la tetraspanina CD63, la cual es una proteína característica de los exosomas. Se observó que el 92% de las microperlas α -CD11c fueron positivas a CD63 (Fig. 13).

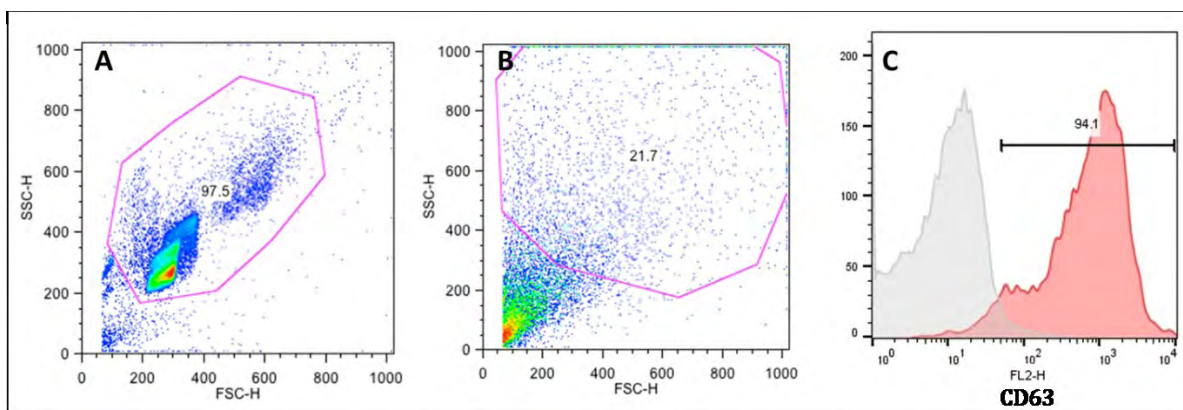


Fig. 13. Detección de exosomas. A. Detección en el citómetro de flujo de perlas de tamaños definidos (1 y 2 μ m), se aprecia la presencia de dos poblaciones bien definidas tanto en tamaño como en granularidad. B. Detección en el citómetro de flujo de las perlas α -CD11c utilizadas para capturar y detectar exosomas. Se observa la región elegida para ser analizada. C. Histograma que muestra el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de las perlas incubadas con sobrenadante rico en exosomas acopladas a α -CD63, marcador de exosomas.

10.3. Expresión de MHCII

El promedio del porcentaje de células que expresaban MHC II (Fig.14) fue de 61.4% en células dendríticas con cuatro días de diferenciación (control), 94.87% en células dendríticas con 7 días de diferenciación, 65.8% en células tratadas con 500 U IFN- γ , 88.1% en células tratadas con 10,000 U de IFN- γ , 91.55% en células tratadas con 1 μ g de TNF- α y 86.18% en células tratadas con 1 μ g de LPS.

Las diferencias significativas entre células dendríticas y exosomas del mismo tratamiento se presentaron en el control y en los tratamientos de 7 días y de 1 μ g de TNF. Además se observaron diferencias significativas entre el control que fue menor a todos los grupos de células dendríticas con excepción de las que fueron tratadas con 500 U de IFN- γ y de las células tratadas con 500 U de IFN- γ y el resto de los tratamientos.

El promedio de porcentaje de microperlas acopladas a exosomas que expresan MHC II fue de 84.86% para exosomas de células dendríticas diferenciadas durante 4 días, 81.9% en exosomas de células dendríticas diferenciadas 7 días, 59.56% en exosomas de células dendríticas tratadas con 500 U de IFN- γ , 88.53% de exosomas de células dendríticas tratadas con 1 μ g de TNF- α y 74.3% en exosomas de células dendríticas tratadas con 1 μ g de LPS. y se presentaron diferencias entre los exosomas grupo tratado con 500U de IFN- γ y todos los demás grupos, incluyendo el control.

En cuanto a la intensidad media de fluorescencia (Fig. 15), se presentan los promedios de las medias geométricas de cada grupo. Las células dendríticas diferenciadas durante 4 días presentaron un promedio de intensidad de fluorescencia de 417.5, las células dendríticas diferenciadas durante 7 días presentaron 339.3 de intensidad media de fluorescencia, el grupo tratado con 500 U de IFN- γ presentó 346.66, el grupo tratado con 10,000 U IFN- γ presentó 343.44, el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α presentó 420.66 y el grupo tratado con 1 μ g de LPS presentó 360.83. No se presentaron diferencias significativas entre los grupos

La intensidad media de fluorescencia observada en los exosomas fue de 515 en los exosomas derivados de células dendríticas diferenciadas durante 4 días, 524.75 en exosomas de células diferenciadas durante 7 días, 1166 en exosomas de células dendríticas tratadas con 500 U IFN- γ , 390.66 en exosomas de células dendríticas tratadas con 1 μ g de TNF y 240 en exosomas de células dendríticas tratadas con 1 μ g de LPS. Las diferencias entre la intensidad media de fluorescencia detectada en las células dendríticas y los

exosomas pertenecientes al mismo tratamiento se presentaron en los tratamientos de 1 µg de TNF y 1 µg de LPS.

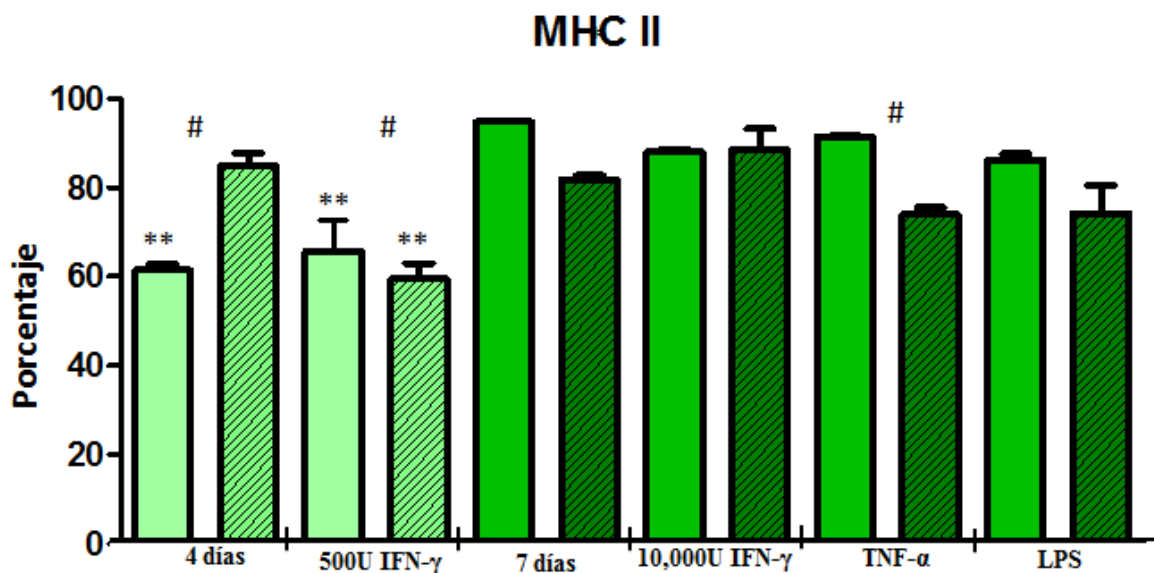


Fig.14. Porcentaje de células y exosomas que expresan MHC II. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula MHC II después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN-γ, células expuestas a 10,000U de IFN-γ, células expuestas a 1µg de TNF-α y células expuestas a 1µg de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

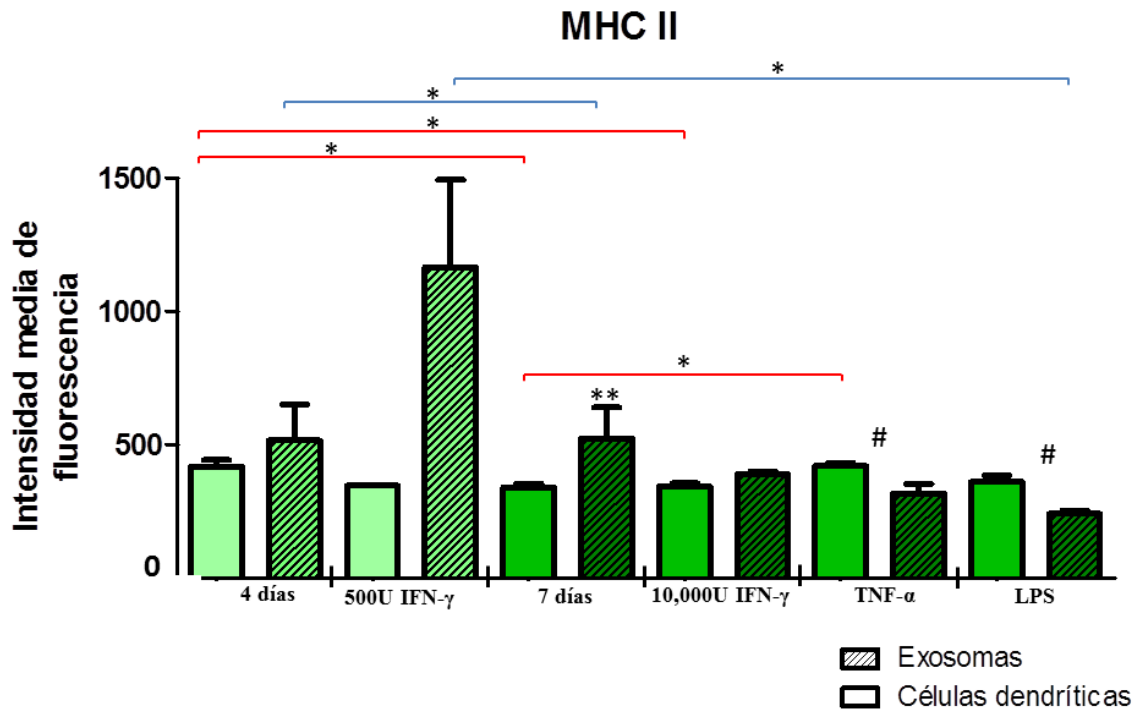


Fig.15. Expresión de MHC II en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula MHC II expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.4. Expresión de CD80

El porcentaje de células dendríticas que expresaron CD80 fue de 49.06% en el grupo control, 93.96% en el grupo con 7 días de diferenciación, 40.33% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 97.2% en el grupo tratado con 10, 000U de IFN- γ , 94.76% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF y 77.83% en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observó que el control fue estadísticamente menor a todos los tratamientos con excepción de las células dendríticas tratadas con 500 U de IFN- γ , el cual también fue menor que el resto de los grupos. Además se observaron diferencias entre los grupos tratados con 10,000 IFN- γ y con 1 μ g de LPS y los grupos tratados con 1 μ g de TNF- α y los grupos tratados con 1 μ g de LPS (Fig. 16).

El porcentaje de microperlas positivas a CD80 fue de 22.31% en el grupo 4 días, 87.5% en el grupo de 7 días, 50.93% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 79.96% en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 94.76% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 70.16% en exosomas tratados con 1 μ g de LPS.

Al comparar estadísticamente los grupos, se observaron diferencias significativas entre el grupo control y todos los grupos, además de diferencias entre el grupo tratado con 500 U de IFN- γ tanto con en el grupo de 7 días y como con el grupo tratado con 10, 000 de IFN- γ y el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α No se presentaron diferencias entre células dendríticas y exosomas del mismo tratamiento (Fig.16).

Los promedios de la intensidad de fluorescencia en células dendríticas fueron 49.7 en el grupo control, 437.66 en el grupo de 7 días, 215.33 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 473.66 en el grupo tratado 10,000 U de IFN- γ , 518.33 en el grupo de 1 μ g de TNF- α y 359 en el grupo de 1 μ g de LPS.

Las diferencias significativas observadas se dieron entre el grupo control y todos los grupos con excepción del grupo tratado con 500 U de IFN- γ . Además se observaron diferencias entre el grupo tratado con 500 U de IFN- γ los grupos tratados con 10, 000 U IFN- γ y con 1 μ g de LPS (Fig.17).

Los promedios de la intensidad de fluorescencia de las micropartículas cubiertas de exosomas fueron de 248 para el grupo control, 437.66 para el grupo de 7 días, 215.33 para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 473.66 en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 518.33 para el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 359 para el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se encontró que había diferencias significativas entre el grupo control los grupos tratados con 10,000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS. El grupo tratado con TNF- α también tuvo diferencias significativas ya que fue mayor que el grupo de 7 días de diferenciación y el grupo tratado con 500 U de IFN- γ (Fig.17). En los tratamientos de 500 U de IFN- γ , 10,000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y de 1 μ g de LPS, se encontraron diferencias entre el grupo de células dendríticas y el grupo de exosomas.

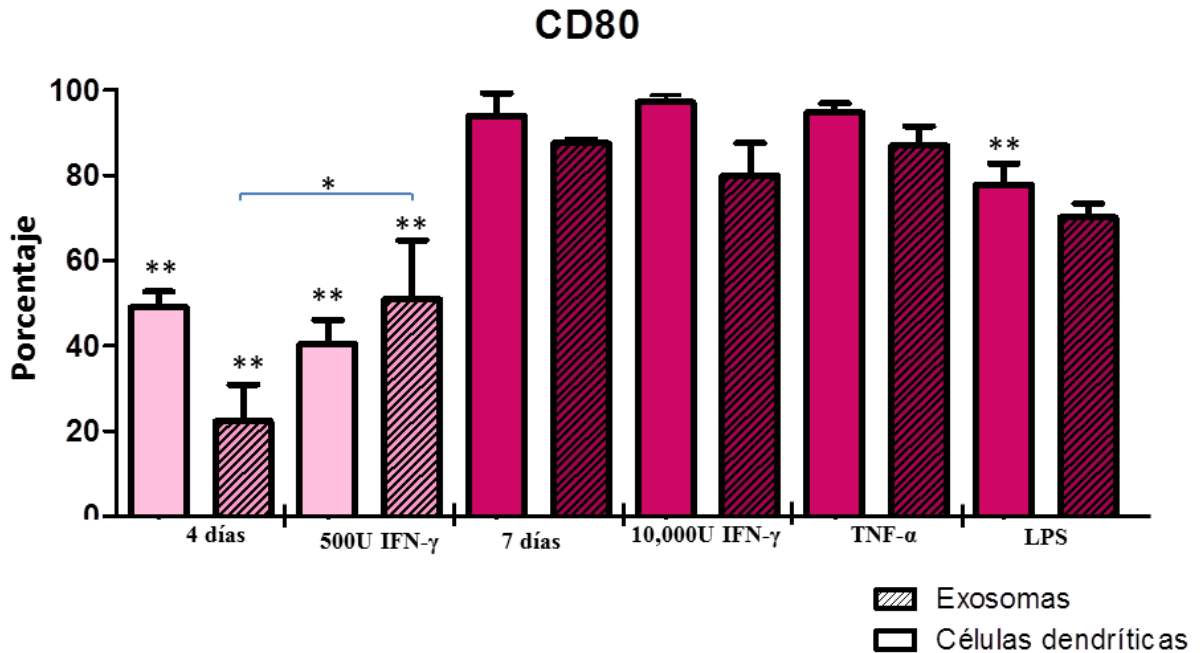


Fig. 16. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD80. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula CD80 después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

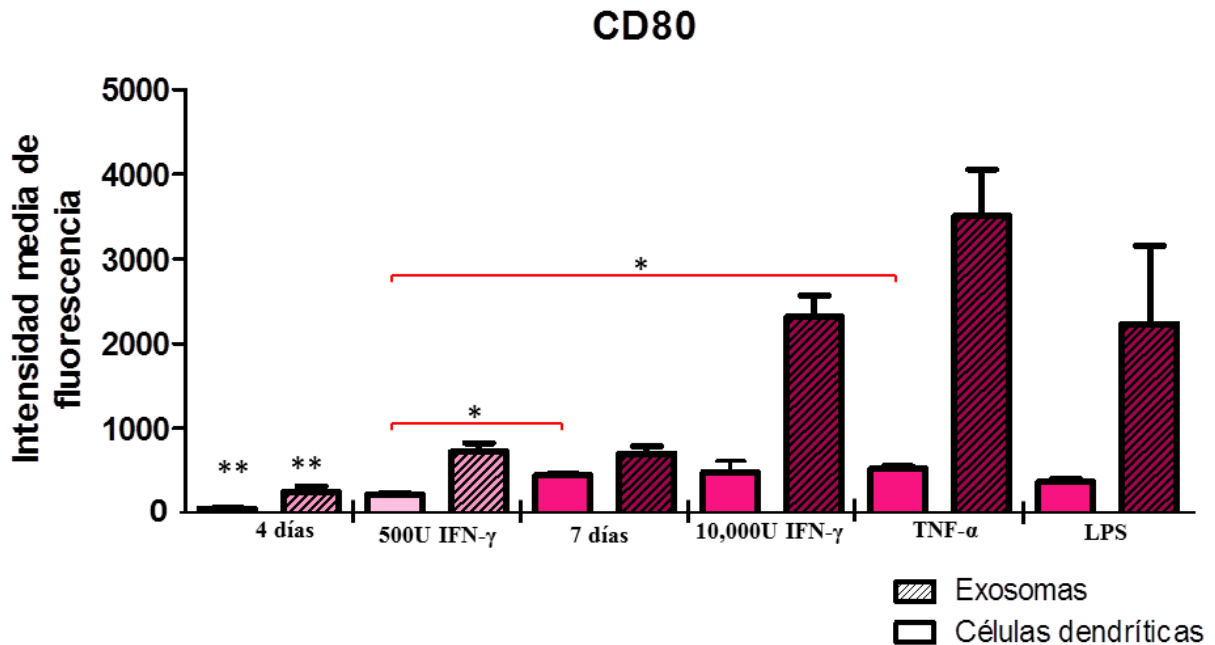


Fig. 17. Expresión de CD80 en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula CD80 expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.5. Expresión de CD86

Los promedios del porcentaje de células dendríticas positivas a CD86 fueron de 66.67% en el grupo de 4 días de diferenciación, 81.1% en el grupo de 7 días de diferenciación, 45.12% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 86.7% en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 88.46% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 85.42 en el grupo tratado con LPS.

Se encontró que el grupo de células dendríticas tratado con 500 IFN- γ mostró ser significativamente menor con respecto a todos los demás grupos, incluyendo el control.

El promedio de microperlas cubiertas de exosomas positivas a CD86 fue de 47.08% en el grupo control, 78.5% en el grupo de 7 días de diferenciación, 49.93% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 40.56% en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 67.83 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 85.06 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS

Se observaron diferencias significativas entre el control que fue menor y el grupo tratado con 1 μ g de LPS, además de entre el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ y dos grupos, el grupo de 7 días de diferenciación y el grupo tratado con LPS.

Solo el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α se observaron diferencias entre células dendríticas y exosomas con el mismo tratamiento.

Los promedios de intensidad media de fluorescencia presentados para CD86 fueron, para las células dendríticas de 247.66 en el grupo control, 278.8 en el grupo de 7 días de diferenciación, 185 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 515.66 en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 392 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 428.25 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS Solo se observaron diferencias significativas entre el control y el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ .

Los promedios de intensidad media de fluorescencia de las microperlas para CD86 fueron 315 para el grupo control, 326.75 para el grupo diferenciado durante 7 días, 328.66 para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 2532.5 para el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 1670 para el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 1995.67 para el grupo tratado con 1 μ g de LPS. Solo se observó diferencia entre el grupo con 7 días de diferenciación y el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ .

En los tratamientos con 500 U de IFN- γ , 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS se encontraron diferencias significativas entre la intensidad de fluorescencia de las células dendríticas y los exosomas correspondientes al mismo tratamiento.

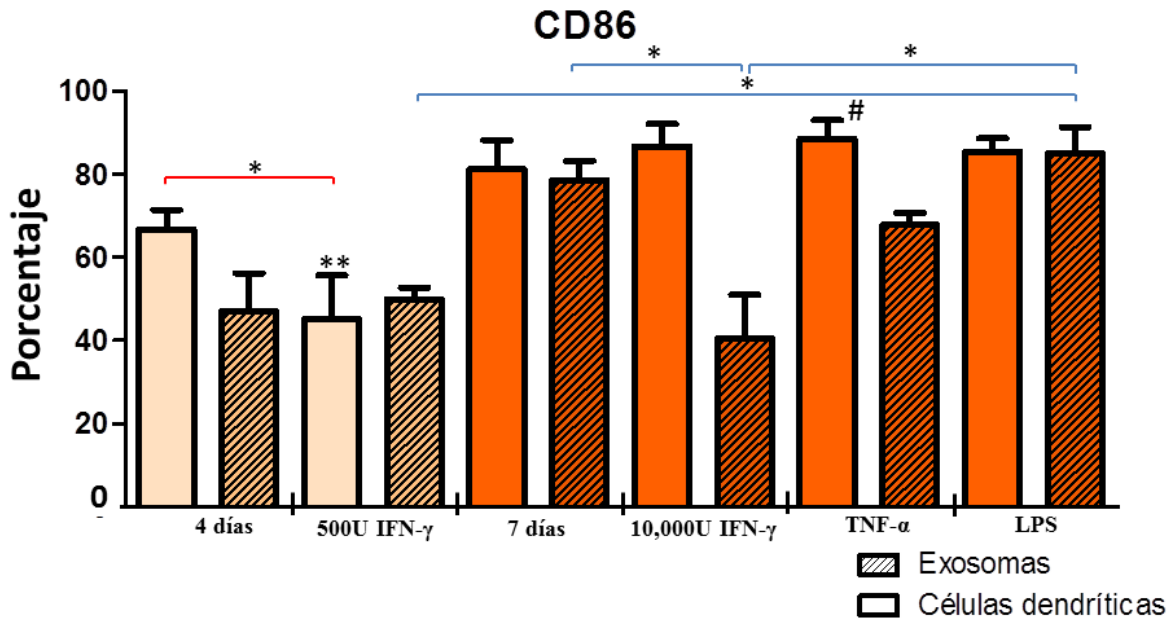


Fig. 18. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD86. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula CD86 después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

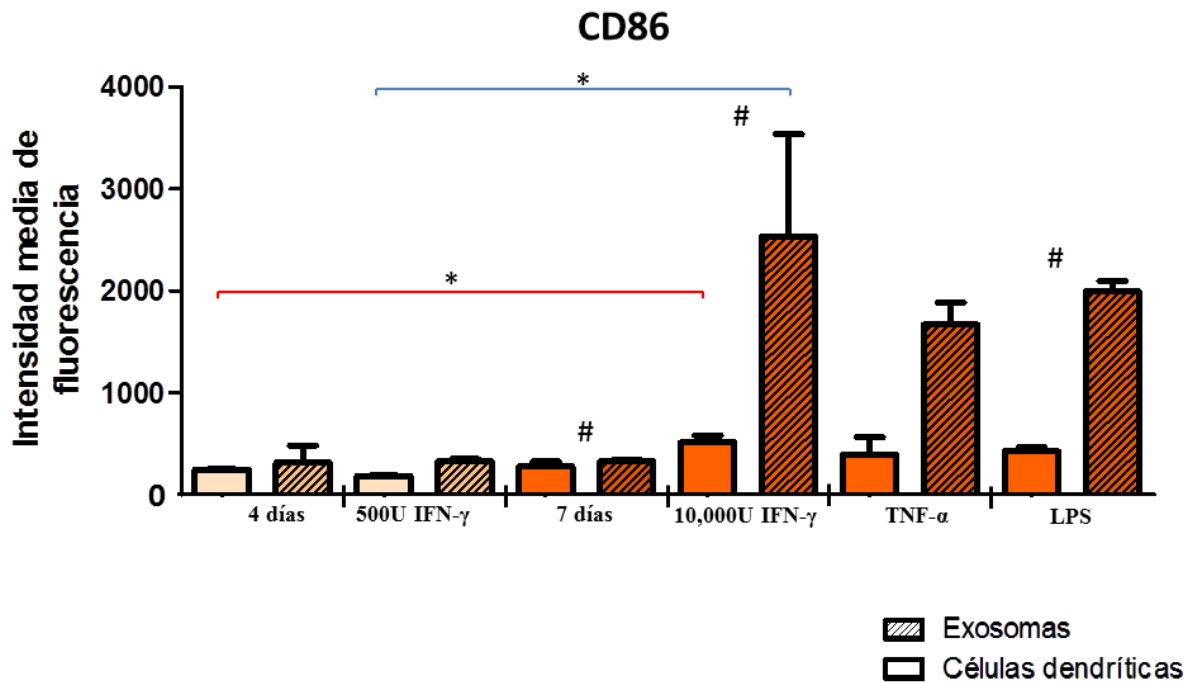


Fig. 19. Expresión de CD86 en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula CD86 expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.6. Expresión de CD273

El porcentaje de células positivas a CD273 fue de 55.06% para el grupo control, 43.36% para el grupo de 7 días de diferenciación, 10.28 para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 42.86% para el grupo tratado con 1 μg de TNF- α y 33.63% para el grupo tratado con LPS.

Solamente se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con 500 U de IFN- γ y el resto de los grupos incluyendo el control.

El porcentaje de microperlas acopladas a exosomas positivas a CD273 fue de 47.93% en el grupo control, 71.7% en el grupo con 7 días de diferenciación, 49.93% para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 53.33 para el grupo tratado con 10, 000 de IFN- γ 61.5% para el grupo tratado con 1 μg de TNF- α y 63.8% para el grupo tratado con 1 μg de LPS. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos.

Las diferencias entre células dendríticas y exosomas con el mismo tratamiento se encontraron en el grupo de 7 días de diferenciación y los grupos tratados con 500 U de IFN- γ , con 10,000 U de IFN- γ . En estos grupos, el porcentaje fue mayor en micropartículas cubiertas con exosomas que en células dendríticas.

En cuanto a intensidad media de fluorescencia, el promedio en células dendríticas fue de 296.33 en el grupo control, 156.75 en el grupo con 7 días de diferenciación, 214.33 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 183.33 en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 238 en el grupo tratado con 1 μg de TNF- α y 240 μg en el grupo tratado con LPS. Solo se observaron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con 7 días de diferenciación, el cual mostro menor promedio de intensidad de fluorescencia.

El promedio de intensidad media de fluorescencia en las micropartículas cubiertas por exosomas fue de 203.66 para el grupo control, 316.33 para el grupo de 7 días de diferenciación, 351 para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 1553 para el grupo tratado con 10,000 de IFN- γ , 829.33 para el grupo tratado con 1 μg de TNF- α y 1402 para el grupo tratado con 1 μg de LPS.

Se encontró que el grupo control fue estadísticamente menor al grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ y con 1 μ g de LPS. Además el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ tuvo mayor intensidad media de fluorescencia que el grupo con 7 días de diferenciación, el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y el grupo tratado con LPS. Así mismo se observó que el grupo tratado con LPS fue mayor que el grupo de 7 días de diferenciación, y el grupo tratado con 500 U de IFN- γ .

Se observó que en los tratamientos de 10, 000 de IFN- γ y 1 μ g de TNF- α , la intensidad media de fluorescencia fue mayor en los grupos de exosomas con respecto a los grupos de células dendríticas con el mismo tratamiento.

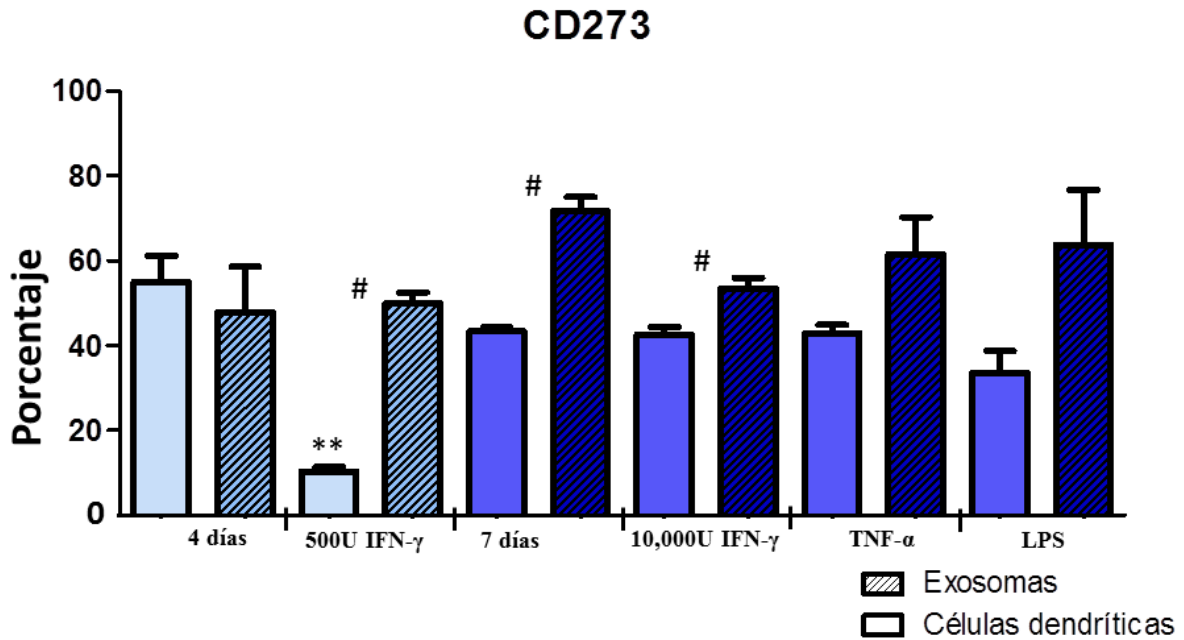


Fig. 20. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD273. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula CD273 después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

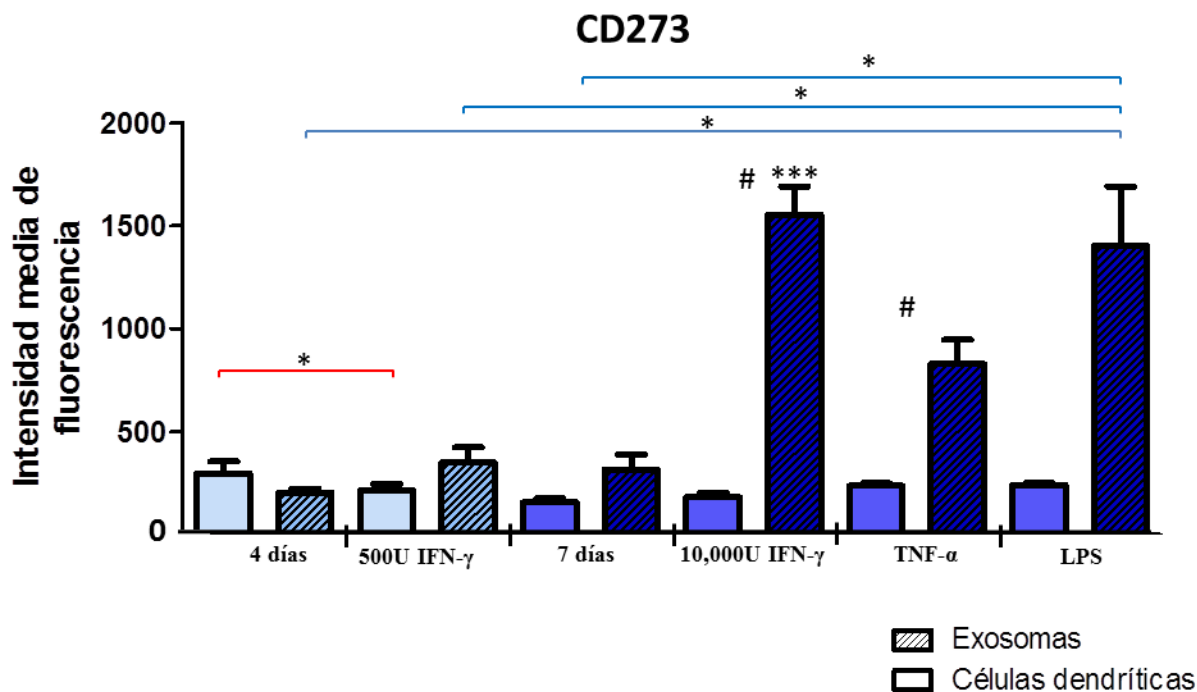


Fig. 21. Expresión de CD273 en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula CD273 expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.7. Expresión de CD274

El promedio de células dendríticas positivas a CD274 fue de 85.5% para el grupo control, 86.5% para el grupo con 7 días de diferenciación, 74.53% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 76.66% el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 85.66% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α Y 87.3% en el grupo tratado con 1 μ g de LPS. No se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos.

El promedio de microperlas cubiertas de exosomas positivas a CD274 fue de 36.37% para el grupo control, 80.26% para el grupo con 7 días de diferenciación, 52.93% para el grupo tratado con 500 U de IFN- α , 66.62% para el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- α , 64.05% para el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 63.9% para el grupo tratado con LPS. Se observó que el grupo control fue menor a todos los demás tratamientos, mostrando diferencias significativas con cada uno de ellos.

Los porcentajes de microperlas positivos a CD274 del control y de los tratamientos con 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS fueron menores a los porcentajes mostrados por las células dendríticas con el mismo tratamiento.

Por otro lado, el promedio de la intensidad media de fluorescencia en células dendríticas para la proteína CD274 fue de 132 para el grupo control, 228.33 en el grupo con 7 días de diferenciación, 471 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 340 en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 545 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 193.33 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observó que la intensidad media de fluorescencia fue menor en el control que en los grupos tratados con 500 U de IFN- γ , 10,000 U de IFN- α y 1 μ g de TNF- α . También el grupo con 7 días de diferenciación tuvo menor intensidad de fluorescencia que los grupos tratados con 500 U de IFN- γ y con 1 μ g de TNF- α . Por su parte el grupo tratado con 1 μ g de LPS tuvo menor intensidad media de fluorescencia que los grupos tratados con 500 U de IFN- γ y con 10, 000 U de IFN- γ .

El promedio de intensidad de fluorescencia para los exosomas fue de 168.66 para el grupo control, 281.33 para el grupo con 7 días de diferenciación, 272 para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 1708.67 en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 710.2 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 703 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observó que el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ fue estadísticamente mayor que el resto de los grupos, incluyendo el control y que entre el resto de los grupos no se observaron diferencias significativas.

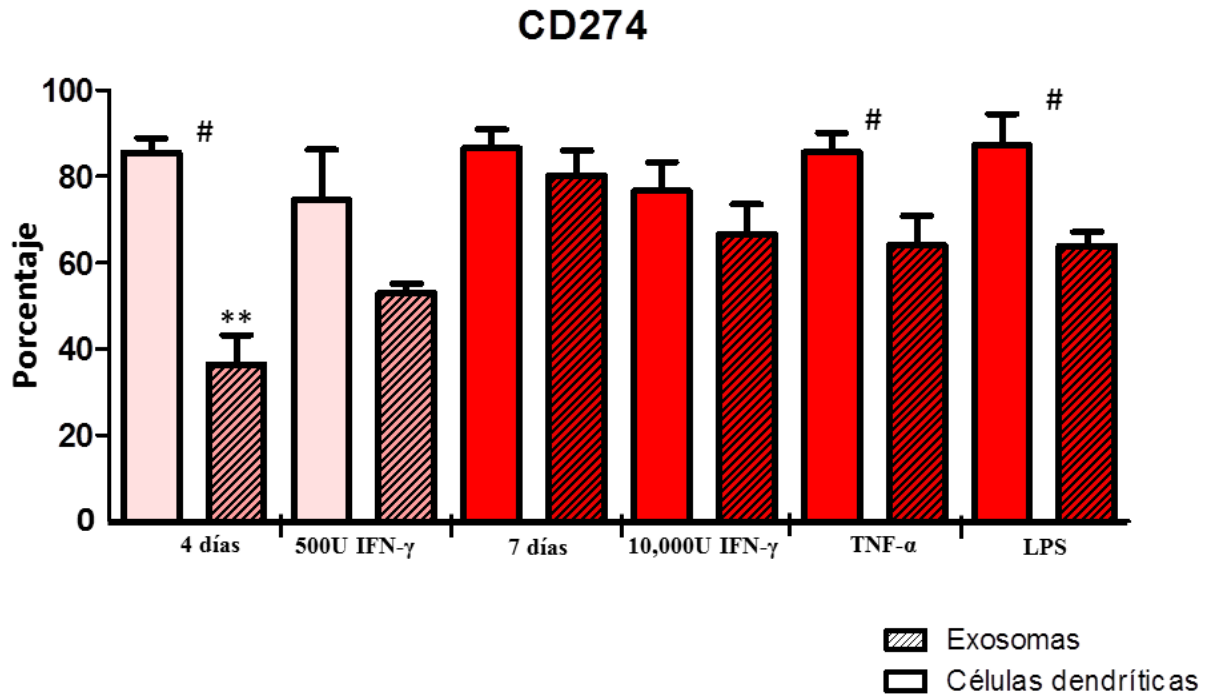


Fig. 22. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD274. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula CD274 después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

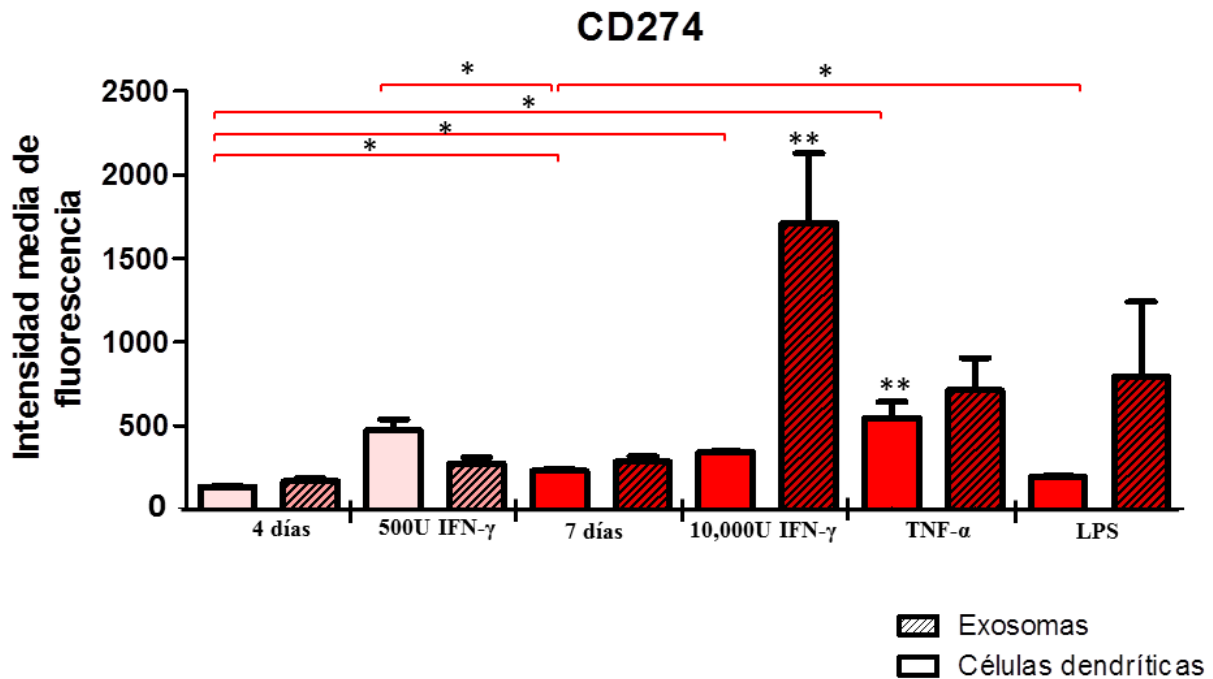


Fig. 23. Expresión de CD274 en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula CD274 expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.8. Expresión de CD40

El promedio de células dendríticas que expresaron CD40 fue de 54.13% para el grupo control, 9.5% para el grupo de 7 días, 97.6% para el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 64.26% para el grupo tratado con 10 000 U de IFN- γ , 72.7% para el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 89.43% para el grupo tratado con 1 μ g de LPS. Y se observó que porcentaje en el grupo control fue mayor al grupo con 7 días de diferenciación pero menor a los grupos tratados con 500 U de IFN- γ y los grupos tratados con 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS. El grupo tratado con 500 U de IFN- γ también fue mayor al grupo tratado con 1 μ g de de TNF- α .

El porcentaje de microperlas cubiertas de exosomas positivas a CD40 fueron 45.65% en el grupo control, 24.30% en el grupo con 7 días de diferenciación, 71.2% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 80.23% en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 72.7% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 52.66 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

No se observaron diferencias entre el porcentaje del control y los tratamientos, sin embargo, el grupo con 7 días de diferenciación tuvo menor porcentaje que el resto de los tratamientos. Mientras que el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ fue menor al grupo tratado con 500 U de IFN- γ y al grupo tratado con 1 μ g de LPS. También se observó que el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α fue menor al del grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Los tratamientos que mostraron mayor porcentaje en células dendríticas que exosomas fueron el grupo tratado con 500 U de IFN- γ y el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , mientras que el grupo tratado con 1 μ g de LPS mostró mayor porcentaje de microperlas positivas a CD40 que de células dendríticas.

La intensidad media de fluorescencia de cada uno de los grupos de células dendríticas fue de 57.13 para el grupo control, 60.03 para el grupo con 7 días de diferenciación, 1058 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 348 en el grupo tratado con 10, 000 U de IFN- γ , 331 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 417 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS. Solo se observó diferencia entre el grupo tratado con 500 U de IFN- γ y el resto de los grupos, teniendo este último mayor intensidad de fluorescencia.

En las microperlas acopladas a exosomas, la intensidad media de fluorescencia fue de 64.26 en el grupo control, 191 en el grupo con 7 días de diferenciación, 310.33 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 1560 en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 1314 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 1212.33 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Los grupos tratados con 10,000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS, mostraron mayor intensidad media de fluorescencia que el grupo control y el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , pero no se observaron diferencias entre estos últimos. Los grupos tratados con 10, 000 U de IFN- γ y con 1 μ g de TNF- α también fueron mayores con respecto al grupo control.

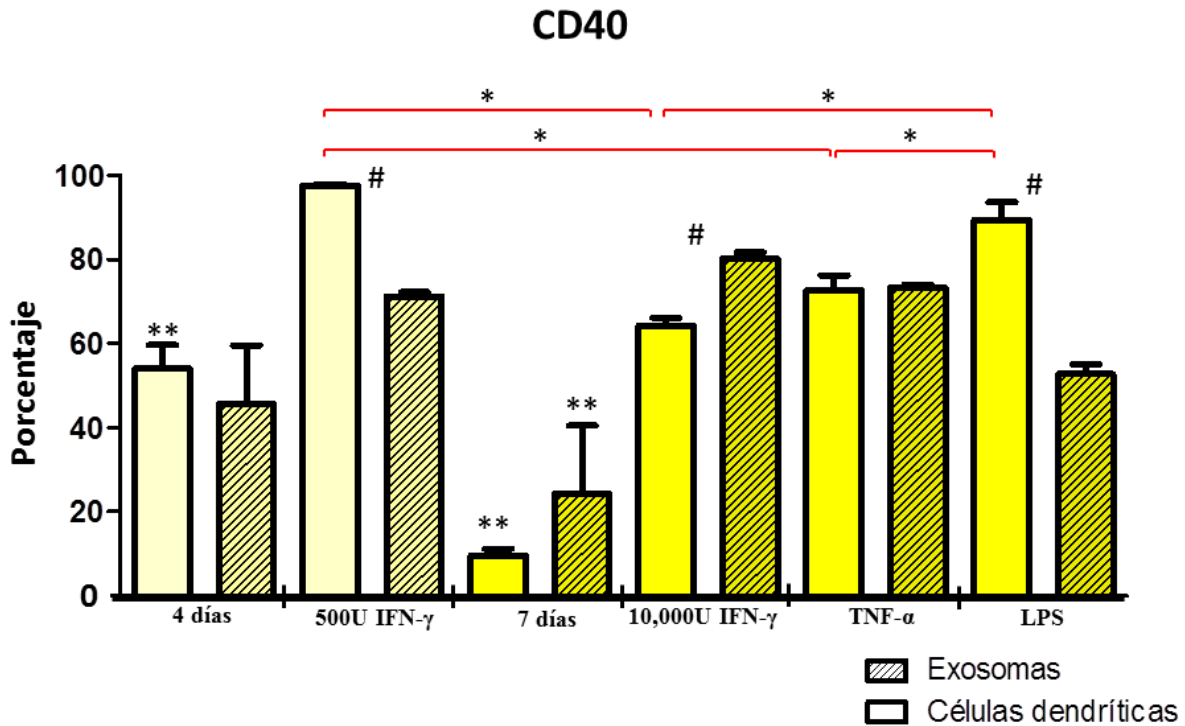


Fig. 24. Porcentaje de células y exosomas que expresan CD40. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula CD40 después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas.. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

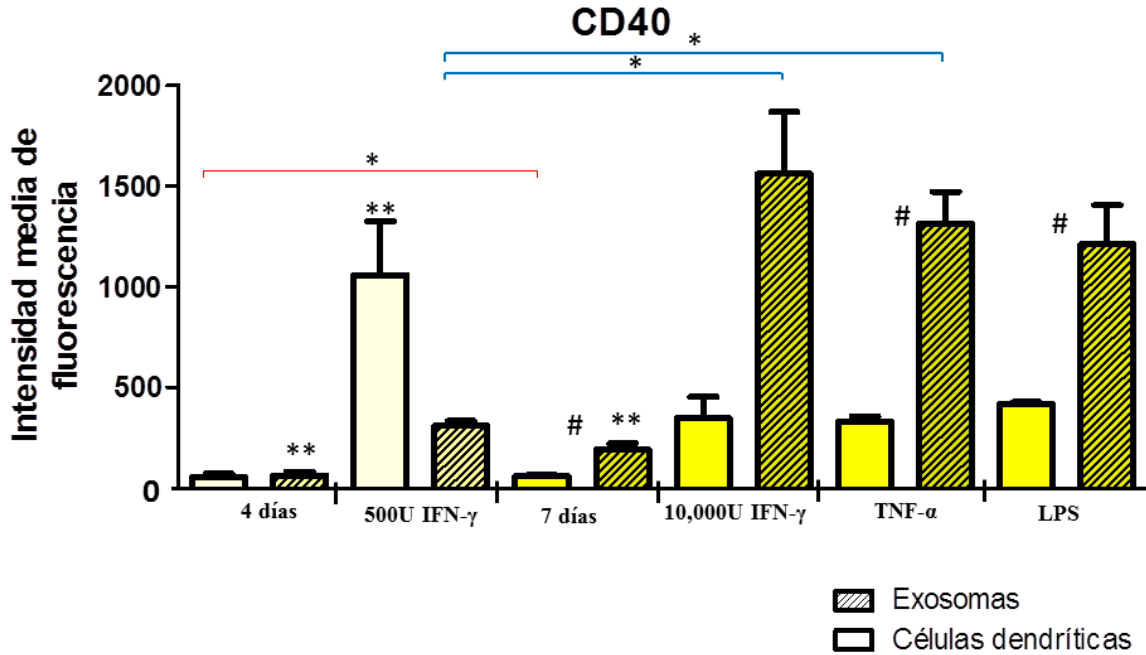


Fig. 25. Expresión de CD40 en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula CD40 expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

10.9. Expresión de MHC I

Los porcentajes de células dendríticas positivas a MHC I fueron 33.06% en el grupo control, 89.27% en el grupo con 7 días de diferenciación, 93.43% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 77.5% en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 85.86% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 93.3% en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observó que el grupo control presentó un porcentaje menor al resto de los grupos y que el porcentaje de células positivas del grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ fue menor al presentado en los grupos tratados con 500 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS.

Los porcentajes de microperlas cubiertas de exosomas positivas a MHC I fueron 20.33% en el grupo control, 86.2% en el grupo con 7 días de diferenciación, 55.83% en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 77.5% en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 85.86% en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 50.53% en el grupo tratado con LPS.

El grupo control tuvo menor porcentaje de microperlas positivas a MHC I en comparación al resto de los grupos. Así mismo se observó que el grupo de 7 días tuvo mayor porcentaje de microperlas positivas que el resto de los grupos y que el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ fue menor que todos los otros grupos.

En células dendríticas, la intensidad media de fluorescencia fue de 96.76 en el grupo control, 401.66 en el grupo con 7 días de diferenciación, 212.66 en el grupo tratado con 500 U de IFN- α 95.56 en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 135.66 en el grupo tratado 1 μ g de TNF- α y 220 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observó que el grupo con 7 días de diferenciación tuvo mayor intensidad de fluorescencia que el resto de los grupos, incluido el control y que no se presentaron diferencias con respecto a los otros grupos.

En exosomas, la intensidad medio de fluorescencia mostrada fue de 204 en el grupo control, 345 en el grupo con 7 días de diferenciación, 357 en el grupo tratado con 500 U de IFN- γ , 92.63 en el grupo tratado con 10,000 U de IFN- γ , 193.33 en el grupo tratado con 1 μ g de TNF- α y 220 en el grupo tratado con 1 μ g de LPS.

Se observaron diferencias entre el grupo control y los grupos con 7 días de diferenciación y tratado con 1 μ g de TNF- α , así como entre el grupo con 7 días de diferenciación que fue mayor al resto de los tratamientos excepto al grupo tratado con 500 U de IFN- γ . También se

observó que el grupo tratado con 500 U de IFN- γ tuvo mayor intensidad media de fluorescencia que los grupos tratados con 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS.

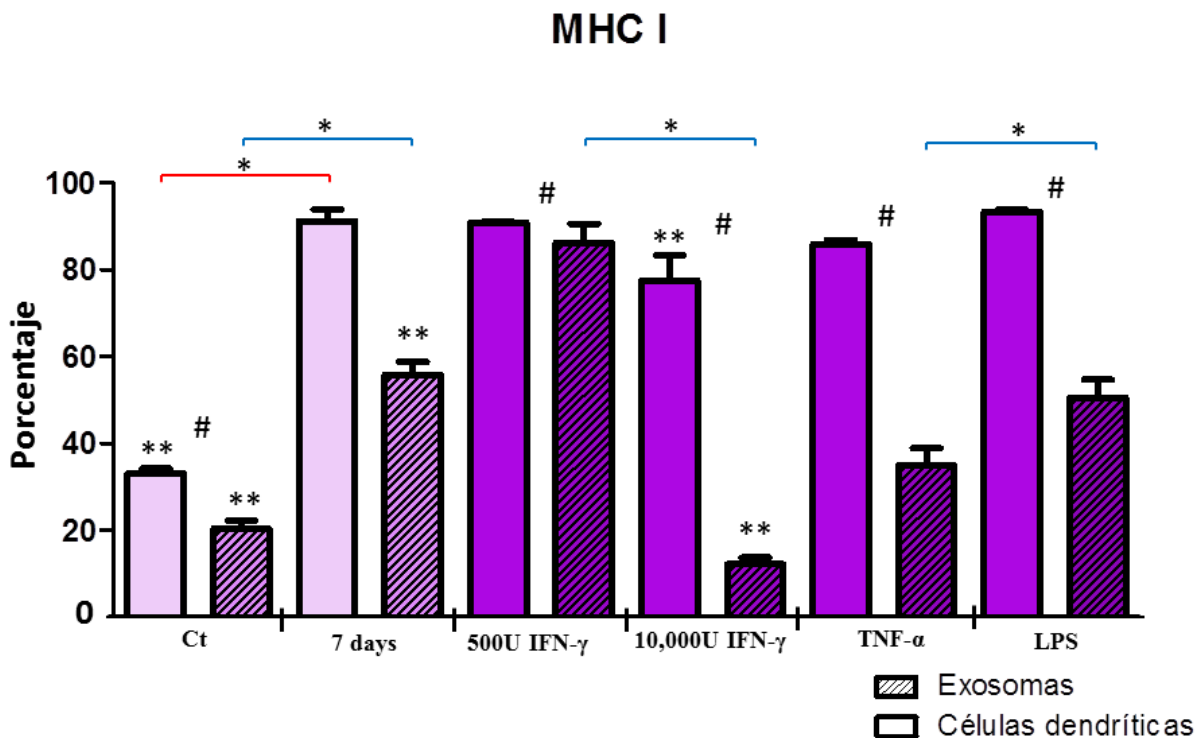


Fig. 26 Porcentaje de células y exosomas que expresan MHC I. Promedio de los porcentajes de células dendríticas y exosomas que expresan la molécula MHC I después de ser expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre dos grupos ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

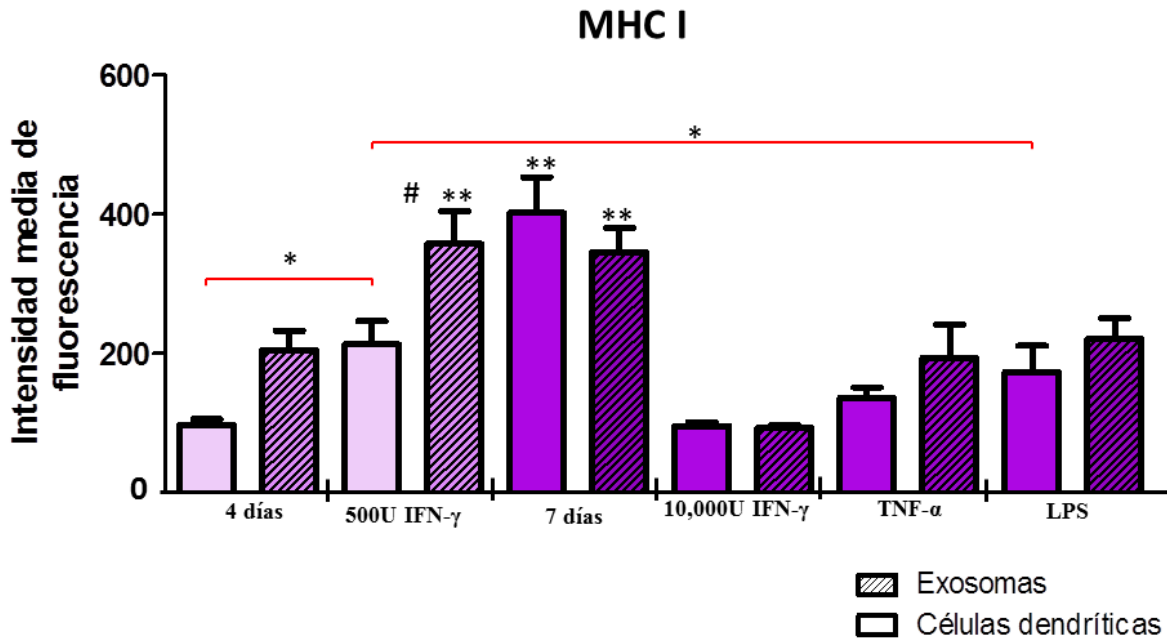


Fig. 27. Expresión de MHC I en células dendríticas y exosomas. Promedio de las medias geométricas de intensidad de fluorescencia de la molécula MHC I expresada por células dendríticas expuestas a diferentes tratamientos (células inmaduras control con 4 días de diferenciación, células inmaduras con 7 días de diferenciación, células expuestas a 500U de IFN- γ , células expuestas a 10,000U de IFN- γ , células expuestas a 1 μ g de TNF- α y células expuestas a 1 μ g de LPS y de los exosomas secretados por estas células y capturados por perlas magnéticas. * Diferencias significativas entre los grupos señalados ($p < 0.05$). ** Diferencias significativas entre el tratamiento señalado y todos grupos de células dendríticas o exosomas con fenotipo maduro. Líneas rojo indican diferencias entre células dendríticas. Líneas azules indican diferencias entre exosomas. # Diferencias entre células dendríticas y exosomas de las células dendríticas del grupo del mismo tratamiento.

11. DISCUSIÓN

Ya que en este trabajo se evaluó la expresión de las moléculas relacionadas con la presentación de antígenos expresadas en células dendríticas tratadas con diferentes estímulos y en los exosomas secretados por estas células, es importante comparar la expresión de estas moléculas tanto entre los grupos de células dendríticas, como entre los grupos de exosomas y además entre las células dendríticas y los exosomas pertenecientes al mismo tratamiento.

Aunque ninguno de los fenotipos generados fue exactamente igual, en los grupos de células dendríticas fue posible distinguir dos tendencias diferentes.; las células dendríticas diferenciadas durante 4 días y las tratadas con 500 U de IFN- γ , mostraron un fenotipo inmaduro, mientras que las tratadas con 10,000 U de IFN- γ , TNF y LPS mostraron un fenotipo maduro. Por otra parte los exosomas analizados no mostraron el mismo fenotipo que las células de las cuales fueron secretados, sin embargo se observó una similitud entre los exosomas de células dendríticas inmaduras y entre exosomas de células dendríticas maduras.

En cuanto a las células analizadas es importante mencionar que nosotros consideramos como células dendríticas a la población de células semiadherentes CD11c⁺, MHC II⁺; no obstante, recientemente se ha comprobado que esta población es heterogénea, y que además de los diferentes estados de maduración de células dendríticas, contiene al menos dos poblaciones distintas: una de células dendríticas y otra de macrófagos CD11c⁺ (Helf *et al.*, 2016).

En este trabajo es prácticamente imposible diferenciar a estas dos poblaciones, ya que para lograr una adecuada separación es necesario detectar la expresión de otros marcadores como CD24, DEC205, IRF4 en el caso de las células dendríticas y CD64, CD115 y CD14 en el caso de los macrófagos. A pesar de esto se observaron características morfológicas de los cultivos obtenidos que corresponden con la morfología de las células dendríticas mencionadas por Na y colaboradores (2016) quien las describe como redondas con una gran cantidad de dendritas apreciables a simple vista. Esto podría ser un indicio de la presencia de células dendríticas dentro de la población evaluada.

En cuanto a la expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígenos, hubo pocas diferencias en la expresión de MHC II entre los grupos de células dendríticas. Las

diferencias más notables se presentaron en cuanto a los porcentajes de células dendríticas MHC II⁺. Esto es interesante ya que anteriormente se ha reportado que la maduración de células dendríticas induce el incremento en la expresión de la molécula MHC II, lo cual no fue observado en este trabajo y por el contrario, este comportamiento fue reportado en los macrófagos CD11c⁺.

Tampoco hubo grandes diferencias entre la intensidad media de fluorescencia de las células y de los exosomas pertenecientes al mismo grupo. Esto aparentemente contradice lo reportado por Zitvogel *et al.*, 1998, quien reportó el incremento en la expresión de MHC II en exosomas de células dendríticas inmaduras. Sin embargo es importante recordar que en este trabajo solo se analizaron exosomas positivos a CD11c y que en dentro de un exosoma podrían o no, expresarse ambas proteínas a la vez, de manera que es posible que muchos de los exosomas que presentan MHC II en su superficie, no expresaran CD11c y por lo tanto no se acoplaran a las micropartículas α-CD11c.

Interesantemente también se ha observado que la delección de la proteína ALIX induce un incremento de 30-400% en la intensidad de fluorescencia de MHC II en superficie sin afectar el nivel de CD63 en células dendríticas inmaduras (Colombo *et al.*, 2013). Esto reafirma la hipótesis de que la regulación de la presencia de la proteína MHC II en exosomas no está directamente relacionada con la proteína CD11c, por lo que su presencia en los exosomas positivos a CD11c puede o no variar con respecto a la presencia de MHC II en el total de exosomas (CD11c⁺ y CD11c⁻)

A diferencia del Western Blot que evalúa el fenotipo del total de exosomas secretados, el procedimiento utilizado en este estudio nos permitió evaluar de manera selectiva el fenotipo de las vesículas que expresan CD11c, es decir, vesículas secretadas específicamente por células CD11c⁺. No obstante, es importante considerar que no es del todo conocido si las vesículas son homogéneas en cuanto a su contenido.

Se sabe, por ejemplo que en células HeLa-CIITA, que expresan MHC II, los exosomas de tamaño más pequeño (30-50 nm) están más enriquecidas en tetraspanina CD63, mientras que las vesículas de mayor tamaño (100 - 200 nm) se encuentran enriquecidas en MHC II y que solo el 20% de estos exosomas contienen ambas proteínas (Colombo *et al.*, 2013).

El procedimiento utilizado en el presente trabajo no permite discriminar entre los diferentes tamaños de vesículas, de manera que no fue posible saber qué tamaño de vesícula

contenía mayor cantidad de una u otra molécula. Esto indica que aunque este método es efectivo para conocer el fenotipo de los exosomas en general, podría ser importante buscar un procedimiento que permita aislar vesículas de diferentes tamaños y obtener exosomas con fenotipos más homogéneos para inducir respuestas más precisas en las terapias.

En los grupos tratados con citocinas y que tenían fenotipo similar al de una célula dendrítica madura, se observó que los exosomas que eran liberados contenían una mayor concentración tanto de proteínas coestimuladoras como coinhibitorias, lo cual se vio reflejado en la intensidad de fluorescencia elevada en los grupos de exosomas.

De acuerdo a Na y colaboradores (2016) otra de las características fenotípicas de las células dendríticas generadas *in vitro* por presencia GM-CSF es la expresión de la molécula CD80. En este trabajo se observó que en las células dendríticas con fenotipo inmaduro, solo aproximadamente la mitad de las células expresaban CD80, mientras que en los grupos de células dendríticas con fenotipo maduro, más del 70% de células expresaban esta molécula. Si bien esto nos podría dar una idea de la cantidad de células dendríticas presentes en cada grupo, esta comparación podría no ser tan precisa, ya que este fenotipo se observó en las células adherentes del cultivo, mientras que las células utilizadas en este trabajo fueron células no adherentes y semi-adherentes.

Por otro lado, se ha reportado con anterioridad que las células dendríticas inmaduras presentan baja expresión de CD80, la cual se eleva durante maduración de las células dendríticas. Ya que este trabajo se observó este comportamiento, es posible la presencia de células dendríticas en el cultivo.

Funcionalmente, CD80 es considerada una molécula coestimuladora, la cual participa junto con CD86, en la activación de linfocitos T. En este trabajo se pudo observar que los exosomas derivados de células dendríticas maduras, expresan elevados niveles de estas dos moléculas, lo cual podría ser un indicio de su papel en la comunicación entre células dendríticas.

Hay que resaltar también que la expresión de CD273 se mantuvo baja en todos los grupos, lo cual es un comportamiento de macrófagos CD11c⁺. Esto apoya el supuesto de que la población evaluada es heterogénea. Interesantemente también se observó que CD273, así como CD274 incrementaron su expresión en los exosomas derivados de células dendríticas con fenotipo maduro.

De manera general, los exosomas secretados por células dendríticas con fenotipo inmaduro mostraron niveles bajos tanto de moléculas coestimuladoras como de moléculas coinhibitorias. Este comportamiento coincide con lo reportado por Ruffner y colaboradores, quien observó bajos niveles de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en exosomas secretados por células dendríticas tratadas con IL-10, que presentaban fenotipo inmaduro (Ruffner *et al.*, 2009).

De acuerdo a Ruffner, este patrón indica que la regulación del tráfico de proteínas difiere en las células dendríticas dependiendo de su tratamiento y esto refleja diferencias en el papel fisiológico de los exosomas y células dendríticas *in vivo* (Ruffner *et al.*, 2009). Esto es significativo porque refuerza la importancia de conocer el fenotipo tanto de células dendríticas como de los exosomas secretados para su uso en inmunoterapia.

Es así, que este trabajo contribuye a la comprensión de cómo el fenotipo de los exosomas puede influir en un determinado tipo de célula blanco. Así, se ha observado que los exosomas pueden interactuar con células tumorales y otras células dendríticas, provocando que las anteriores incorporen en su membrana moléculas coestimuladoras y MHCII, las cuales son primordiales para que se lleve a cabo una exitosa presentación de antígenos (Romagnoli *et al.*, 2013).

En este trabajo, se observó que en todos los grupos se expresaron moléculas coestimuladoras y que en los exosomas de los grupos tratados con 10, 000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS, los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras se mantuvieron elevados. Sin embargo, al comparar la intensidad media de fluorescencia de las proteínas coinhibitorias con las de proteínas coestimuladoras, podemos apreciar que estas últimas siempre fueron mayores, por lo que es probable que el tipo de actividad que muestren los exosomas sea activadora.

Es importante recalcar que las DCs tratadas con LPS, INF- γ o TNF- α no generan exosomas con exactamente el mismo fenotipo, indicando que la regulación proteica en los exosomas también se ve influenciada por el estímulo al que fueron expuestas las células dendríticas y consecuentemente por su mecanismo de activación.

Por esta razón no sería adecuado emplear indistintamente el tratamiento para las células dendríticas DCs, sino más bien, sería deseable conocer con exactitud el fenotipo de los exosomas empleados para poder predecir su respuesta inmunológica. El conocimiento

generado en este trabajo contribuye a fomentar la utilización de tratamientos específicos hacia las células dendríticas con el fin obtener exosomas de un fenotipo determinado.

Con este fin, también sería importante realizar ensayos en donde se evalúen los exosomas obtenidos a partir de los diversos grupos de células dendríticas y su interacción con células tumorales, otras células dendríticas y linfocitos T, de manera que se verifique su potencial inmunoterapéutico.

Por otra parte, se sabe que la presencia de IFN- γ induce el incremento en la expresión de esta la molécula MHC I, lo cual concuerda con lo reportado en este trabajo, donde la expresión de MHC I se observó en un porcentaje menor al 40% de células del grupo control que expresaban MHC I y este porcentaje se vio aumentado tanto en los grupos tratados como en el grupo con 7 días de diferenciación. Es importante resaltar que este cambio solo se observó en cuanto a porcentajes, ya que la intensidad de fluorescencia no tuvo el mismo comportamiento. También es importante notar que el porcentaje de exosomas que expresaban MHC I disminuyó en las células que fueron tratadas con 10,000 U de IFN- γ .

El hecho de que MHC I prácticamente no mostrara cambios en su expresión, puede deberse a que la población de células dendríticas CD11c⁺ MHC II⁺ generadas a partir de médula ósea por estimulación de GM-CSF son genéticamente más parecidas a las células dendríticas CD8 α ⁻ lo cual es importante porque estas células son incapaces de realizar presentación de antígenos.(den Hann *et al.*, 2000).

Esto puede representar un problema al momento de su uso como terapia, ya que el antígeno que fue utilizado para cargar a las células dendríticas en este trabajo, es decir el antígeno MAGE-AX es cargado y presentado a través de la molécula MHC I y la falta de esta proteína en la superficie de los exosomas indica también la falta del antígeno acoplado a esta proteína

12. CONCLUSIONES

1. Las células dendríticas diferenciadas durante 4 días mostraron menor porcentaje de moléculas MHC II, CD80, CD40 y MHC I, con respecto a las células dendríticas diferenciadas durante 7 días.
2. Las células dendríticas tratadas con 500 U IFN- γ y las células dendríticas diferenciadas durante 4 días mostraron un fenotipo inmaduro.
3. Las células dendríticas tratadas con 10,000 U de IFN- γ , 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS y las células dendríticas diferenciadas durante 7 días mostraron un fenotipo maduro.
4. La expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y moléculas coinhibitorias CD273 y CD274 fue mayor en exosomas de células tratadas con 10,000 U de IFN- γ y 1 μ g de TNF- α y 1 μ g de LPS que en las células dendríticas diferenciadas durante 4 días y las células dendríticas tratadas con 500 U de IFN- γ .
5. Los exosomas de células dendríticas tratadas con 10,000 U de IFN- γ mostraron bajo porcentaje de expresión de MHC I

13. LITERATURA CITADA

Alison, MR. 2001. Cancer. Enciclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.

Amigorena, S. 2000. Cancer immunotherapy using dendritic cell-derived exosomes. *MEDICINA (Buenos Aires)*. 60 (Supl. II): 51-54

André, F., Escudier, B., Angevin, E., Tursz, T. y Zitvogel, L. 2004. Exosomes for cancer immunotherapy. *Annals of Oncology*15 (Supplement 4): iv141 – iv144

André, F., Scharls, N., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomen, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E., Zitvogel, L. 2002. Malignant effusions and immunogenic tumor-derived exosomes. *The lancet* (360): 295-305.

Baar, J. 1999. Clinical applications of dendritic cell cancer vaccines. *The oncologist*. 4:140-144.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., y Cresswel, P. 2013. Pathways of antigen Processing. *Annu Rev Immunol*. 31:443-473.

Boon, T. y van der Bruggen, P. 1996. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med*. 183: 725-729.

Butterfield, L. 2013. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Frontiers in immunology*. 4:454

Butterfield, LH. 2013. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Frontiers in immunology*. 4: 1-7.

Campana, S., De Pasquale, C., Carrega, P., Ferlazzo, G. y Bonaccorsi, I. 2015. Cross-dressing: an alternative mechanism for antigen presentation. *Immunol Lett*. 168: 349-354.

Campbell, E.C., Antoniou, A.N. y Powins, S.J. 2012. The multi-faceted nature of HLA class I dimer molecules. *Immunology*. 136: 380-384.

Chang, S.T., Ghosh, D., Kirschner, D.E. y Linderman, J.J. 2006. Peptide length-based prediction of peptide-MHC class II binding. *Bioinformatics*. 22(22):2761-7

Chaput, N., Scharz, N.E.C., André, F., Taïeb, J., Novault, S., Bonnaventure, P., Aubert, N., Bernard, Jacky, Lemonnier, F., Merad, M., Adema, G., Adams, M., Ferantini, M., Carpentier, A.F., Escudier, B., Tursz, T., Angevin, E. y Zitvogel, L. 2004. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naïve Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. *J Immunol.* 172: 2137-2146

Cho, H. y Bhardwaj, N. 2003. Against the self: dendritic cells versus cancer. *APMIS* 111:805-17.

Clayton, A., Court, J., Navabi, H., Adams, M., Mason, M., Hobot, J., Newmn, G. y Jasani, B. 2001. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 247: 163-174.

Collins, M., Ling, V., y Carreno, B.M. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biology.* 6:223

Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L., Théry, C. y Raposo. G. 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science.* 126: 5553-5556.

Colombo, M., Raposo, G. y Théry, C. 2014. Biogénesis, Secreción e interacciones intercelulares de los exosoms y otras vesículas extracelulares. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 255-89.

Coulie, PG., Van den Eynde, BJ., van der Bruggen, P. y Thierry Boon. 2014. Tumor antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer.* 14: 135-46.

Del Rio, ML., Buhler, L., Gibbons, C., Tian, J. y Rodríguez-Barbosa, JI. 2008. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transplant International.* 21: 1015-1028.

Denzer, K., Monique, J., Kleijmeer, H.F.G., Stoorvogel, W. y Geuze, H. 2000. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of Cell Science* 113: 3365-3374.

Denzin, L. K. y Cresswell, P. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC Class II $\alpha\beta$ Dimers and Facilitates Peptide Loading. *Cell*. 84: 155-165.

Dolan, B .P., Gibbs, K.D., Ostrand-Rosenberg, S. 2006. Tumor-specific CD4+ T cells are activated by cross-dressed dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *J. Immunol*. 176: 1447-1445.

Dudek, AM., Martin 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. 4: 438.

Dustin, M.L. 2014. The immunological synapse. *Cancer Immunol Res*. 2 (11): 1023-1033

Eggert, A.O. Andersen, M.H., Voigt, H., Schrama, D., Kämpgen, E., Straten, P.T. y Becker, J.C. 2004. Characterization of mouse MAGE-derived H-2K^b-restricted CTL epitopes. *Eur. J. Immunol*. 34: 3285-3290.

Elgueta, R., Benson, M., Vries, V.C., Wasiuk, A., Guo, Y. y Noell, R.J. 2013. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 229 (1) doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.

Espinoza-Delgado, I. 2002- Cancer Vaccines. *The oncologist*. 7 (3): 20-33.

Gabrilovich, DI., Ciernik, F. y Carbone, DP. 1996. Dendritic cells in antitumor immune responses. *Cellular immunology*. 170: 101- 110.

Gauvreau, ME., Côté, MH., Bourgeois-Daigneault, MC., Rivard, LD., Xiu, F., Brunet, A., Shaw, A., Steimle, V. y Thibodeau, J. 2009. Sorting of MHC Class II Molecules into exosomes through a ubiquitin-independent pathway. *Traffic* 10: 1518-1527.

Harton, J., Jin, L., Hahn, A. y Drake, J. 2016. Immunological functions of the membrane proximal region of MHC class II molecules. *F1000 Faculty Rev* 368: 1-12.

Helft, J., Böttcher, J., Charkravarty, P., Zelenay, S., Houtari, J., Schrami, B., Goubau, D., Sousa, C. 2016. GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c⁺ MHCII⁺ macrophages *Immunity* 42: 1197-1211.

Hewitt, E.W. 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 110:163-169.

Houtari y Helenius, 2011. Endosome maturation. *EMBO J*. 30 (17): 3481-3500

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. y Steinman, R. 1992. Generation of Large Numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal Exp. Med.* 176: 1693-1702

Jensen, P. 2007. Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8: 1041-1048

Johansson, SM., Admyre, C., Scheynius, A. y Gabrielsson, S. 2007. Different types of *in vitro* generated human monocyte-derived dendritic cells release exosomes with distinct phenotypes *Immunology*. 123: 491-499.

den Haan, J, Lehar, S, Bevan, M. 2000. Cd8+ but Not Cd8- Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo. *JEM Home*.192 (12): 1685

Jones, E.Y., Fugger, L., Strominger, J.L. y Siebold, C. 2006. MHC class II proteins and disease: a structural perspective. *Nat Rev Immunol*. 6: 271-282.

Ju X1, Clark G, Hart DN. 2010. *Methods Mol Biol*. Review of human DC subtypes. 595:3-20. (Archivo "Tipos de células dendríticas")

Julich, H., Willms A., Lukacs-Komek, V. y Komek, M. 2014. Extracellular vesicle profiling and their use as potential disease specific biomarker. *Frontiers in immunology*. 5. Artículo 413: 1-6.

Kourembanas, S. 2015. Exosomes: Vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy. *Annu Rev Phys* 77:13-27

Labeur, MS., Roters, B., Pers, B, Mehling, A. Luger, TA., Schwarz, T. y Grabbe, S. 1999. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *Journal of Immunology* 162:168-175.

Labeur, MS., Roters, B., Pers, B, Mehling, A. Luger, TA., Schwarz, T. y Grabbe, S. 1999. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *Journal of Immunology* 162:168-175.

Mellins, E.D. y Stern, L.J. 2014. HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Curr Opin Immunol.* 0:115-122.

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villaroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M., Bernad, A. y Sánchez-Madrid, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications* 2:282.

Mody, N., Dubey, S., Sharm, R., Udita, A y Vyas, S. 2014. Dendritic cell-based vaccine research against cancer. *Expert Rev. Clin. Immunol.* Early online, 1-20.

Montecalvo A., Larregina, A., Shufesky, W., Stolz, D., Sullivan, M., Karlsson, J., Baty, C., Gibson, G., Erdos, G., Wang, Z., Milosevic, J., Tkacheva, O., Divito, S., Jordan, R., Lyons-Weiler, J., Watkins, S. y Morrelli, A. 2012. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* 119 (3): 756-766.

Munich, S., Sobo-Vujanovic, A., Buchser, W., Beer-Stolz, D. y Vujanovic, N. 2012. Dendritic cell exosomes directly kill tumor cells and activate natural killer cells via TNF superfamily ligands. *Oncolmmunology* 1:7, 1074-1083.

Na R., Jung, D., Gu, G. y Seok, S. 2016. GM-CSF grown bone marrow derived cells are composed of phenotypically different dendritic cells and macrophages. *Mol cells.* 39 (10): 734-741.

Niel, G., Porto-Carreiro, I., Simoes, S. y Raposo, G. 2006. Exosomes: A common pathway for a specialized function. *J. Biochem.* 140: 13-21.

Nieuwland, R. y Sturk, A. 2010. Why do cells release vesicles? *Thrombosis Research.* 125: S49-S51.

Palucka, K. y Banchereau, J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews.* 12(4):265-77.

Pant, S., Hilton, H. y Burczynski, M.E. 2011. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. *Biochemical Pharmacology*. 83: 1484-1494.

Peggs, K.S. y Allison, J.P. 2005. Co-stimulatory pathways in lymphocyte regulation: the immunoglobulin superfamily. *British Journal of Haematology*. 130 (6): 809-824.

Piñón-Zarate, G., Herrera-Enríquez, M.H., Hernández-Téllez, B., Jarquín-Yáñez, K. y Castell-Rodríguez, A.E. 2014. GK-1 Improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *Journal of Immunology Research*. 12 pages.

Pitt, J., 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. *The Journal of Immunology*. 193: 1006-1011.

Platzer, B., Stout, M. y Fiebiger, E. 2014. Antigen cross-presentation of immune complexes. *Frontiers of immunology*. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00140>

Podojil, J. y Miller, S.D. 2013. Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules successes and challenges. *BioDrugs*. 27 (1): 1-13

Qin, J. y Xu, Q. 2014. Functions and applications of exosomes. *Drug research*. 71 (4): 537-543.

Raposo, G. y Stoorvogel, W. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 200 (4): 373-383.

Raposo, G., Nijman, H., Stoorvogel, W., Leijendeker, R., Harding, C., Melief, C. y Geuze, H. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicle. *J. Exp. Med.* 183:1.

Reinres, K.S., Dassler, J., Coch, C. y Pogge von Strandmann, E.P. 2014. Role of exosomes released by dendritic cells and/or by tumor targets: regulation of NK cell plasticity. *Frontiers of Immunology* 5 (Article 91): doi: 10.3389/fimmu.2014.00091.

Robbins, P. y Morelli, A. 2014. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*. 14: 195-208.

Roche, P.A. y Furuta, K. 2015. The ins and outs of MHC class II- mediated antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 15(4):203-16

Rojas, D. y Krishnan, R. 2010. IFN- γ generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T- regulatory cell generation. *Immunology Letters* 132: 31-37

Romagnoli GG, Toniolo PA, Migliori IK, Caldini ÉG, Ferreira MA, Pizzo CR, Bergami-Santos PA y Barbuto JA (2013) Tumour cells incorporate exosomes derived from dendritic cells through a mechanism involving the tetraspanin CD9. *Exosomes Microvesicles* 1:4.10.5772/52069

Romagnoli, G. G., Zelante, B. B., Toniolo, P.A., Migliori, I.K. y Barbuto, J.A.M. 2014. Dendritic Cell-Derived Exosomes may be a Tool for Cancer Immunotherapy by Converting Tumor Cells into Immunogenic Targets. *Front Immunol.* 5: 692.

Romagnoli, G., Zelante B., Toniolo P., Migliori, I., Barbuto, J. 2015. Dendritic Cell-Derived Exosomes may be a Tool for Cancer Immunotherapy by Converting Tumor Cells into Immunogenic Targets. *Front Immunol*;5:692

Roucourt, B., Meeussen, S., Bao, J., Zimmermann, P. y David, G. 2015. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. *Cell Research.* 25: 412-428.

Ruffner, M.A., Kim, S.H., Bianco, N.R., Francisco, L.M., Sharpe, A.H. y Robbins, P. D. 2009. B7-1/2, but not PD-1/2 molecules, are required on IL-10-treated tolerogenic DC and DC-derived exosomes for *in vivo* function. *Eur J Immunol.* 39(11): 3084-3090.

Segura, E. y Amigorena, S. 2015. Cross-Presentation in mouse and human dendritic cells. *Advances in immunology.* 127 (Chapter 1):1-21

Seliger, B. Marincol, F.M., Ferrone, S. y Abken, H. 2008. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol Med* 14 (12): 550-559

Seliger, B. y Quandt, D. 2012. The expression, funcion, and clinical relevance of B7 family members in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 61:1327-1341.

Singh y Overwijk. 2015. Intratumoral immunotherapy for melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 64:911-921.

Stahl, PD. y Barbieri, MA. 2002. Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the “Ins and outs” of endosomal traffic. *Sci STKE* (141):pe32.

Sundberg, E.J., Deng, L. y Mariuzza, R.A. 2007. TCR recognition of peptide/MHC class II complexes and superantigens. *Semin Immunol.* 19(4): 262–271

They, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. y Amigorena, S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: A secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *The Journal of Immunology.* 166: 7309-7318.

They, C., Zitvogel, L. y Amigorena, S. 2002. Exosomes: Composition, biogénesis and function. *Nat Rev* 2 (8): 569-579

Thomas, R. 2004. Signal 3 and its role in autoimmunity. *Arthritis Res Ther.* 6 (1): 26-27

Trajkovic, K. Hsu, C., Chiantia, S., Rajerdran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., Simmons, M. 2008. Ceramide triggers budding of exosoma vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 319. 1244.

Valenzuela, J., Schmidt, C., Mescher, M. 2002. The The Roles of IL-12 in Providing a Third Signal for Clonal Expansion of Naive CD8 T Cells. *J Immunol.* 169:6842–6849

Vigneron, N. 2015. Human tumor antigens and cancer immunotherapy. Hindawi Publishing Corporation. 1-17.

Vyas, J.M., Van der Veen, A.G. y Ploegh, H.L. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol.* 8(8):607-18

Wong, P.P., Yeoh, C.C., Ahmad, A.S., Chelala, C., Gillet, C., Speirs, V., Jones, J.L. y Hurst, H.C. 2014. Identification of MAGE-A antigens as causal players in the development of tamoxifem-resistant breast cancer. *Oncogene.* 33: 4579-4588.

Xiao, J. y Chen, HS. 2004. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol.* 10 (13): 1849-1853.

Xiu, F., Côte, M.H., Bourgeois-Daigneault, M.C., Brunet, A., Gauvreau, M.H., Shaw, A. y Thibodeau, J. 2011. Cutting Edge: HLA-DO impairs the incorporation of HLA-DM exosomes. *J. Immunol.* 187:1547-1551.

Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M. e Inaba, K. 1997. Contrasting effects of TGF- β 1 and TNF- α on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem cells.* 15:144-153.

Zheng, P. y Zhiguang, Z. 2015. Human cancer immunotherapy with PD-1/PD-L1 blockade. *Biomarkers in cancer.* 7(S2): 15-18

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Filament, C., Tena, D., Ricciardi-Castagnoli, Raposo, G., Amigorena, S. 1998. Eradication of established murine tumours using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* 4, 549-600.