



**Maduración y activación de células dendríticas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*)
mediante el uso de nanopartículas de síntesis química.**

Aluisa Chalá, Andrea Carolina

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Torres Arias, Marbel, Ph.D

Agosto - 2020

Document Information

Analyzed document TESIS_ALUISA_ANDREA_URKUND.pdf (D77753772)
Submitted 8/13/2020 10:11:00 PM
Submitted by Marbel
Submitter email mmtorres@espe.edu.ec
Similarity 0%
Analysis address mmtorres.espe@analysis.arkund.com

Sources included in the report

W URL: <https://quepasaenchile.files.wordpress.com/2011/10/aravena.pdf>
Fetched: 9/26/2019 7:58:32 AM

 **1**

 Firmado electrónicamente por:
MARBEL
TORRES



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Maduración y activación de células dendríticas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*) mediante el uso de nanopartículas de síntesis química**” fue realizado por la señorita **Aluisa Chalá, Andrea Carolina** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Agosto 2020

Firma:

.....

Torres Arias Marbel, PhD.

C. C: 1802949154.



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Aluisa Chalá, Andrea Carolina**, con cédula de ciudadanía n° 1723420137, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Maduración y activación de células dendríticas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*) mediante el uso de nanopartículas de síntesis química.** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, Agosto 2020.

Firma

Aluisa Chalá Andrea Carolina

C.C.:1723420137



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Aluisa Chalá, Andrea Carolina**, con cédula de ciudadanía n° 1723420137, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Maduración y activación de células dendríticas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*) mediante el uso de nanopartículas de síntesis química.** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, Agosto 2020.

Firma

.....
Aluisa Chalá, Andrea Carolina

C.C.: 1723420137

Dedicatoria

A mis padres, María de Lourdes y Mariano Gustavo

A mi mamata, María Angélica

A mis hermanos, David y Paúl

A mis sobrinos, Bryan, Mateo, Felipe y Daniela

Andrea Carolina Aluisa Chalá

Agradecimientos

A mis padres Gustavo y Lourdes, por su apoyo y amor incondicional, por su esfuerzo, paciencia y sobre todo por inculcarme los mejores valores y principios a lo largo de este camino. Palabras de agradecimiento es lo mínimo que se merecen, esto es por y para ustedes.

A mi mamá, por enseñarme la mejor parte de la vida, la alegría y la bondad, por su apoyo y ayuda constante, por estar siempre para todos. ¡Gracias por tanto mamá!

A mis hermanos, David y Paul, por compartir los mejores momentos de nuestras vidas juntos, por su apoyo, alegría y bromas. Definitivamente son un ejemplo para mí.

A Marbel Torres Ph.D por depositar su confianza en mí, por su ayuda, tiempo y apoyo para realizar mi proyecto de titulación y por permitirme formar parte del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE. A Ligia Ayala Ph.D y Rachid Seqqat Ph.D, por compartir todos sus conocimientos y ayuda para la realización de este proyecto.

Al Doctor Alexis Debut y a la Ingeniera Karla Vizuite investigadores del Laboratorio de Microscopía Electrónica por su colaboración en la investigación.

A la familia LabIV: Alex, Fer, Michu, Tephy, Karlita, Marquito, Ari, Carlitos, David y Caro por su compañía, colaboración, por todas las experiencias compartidas y por ser eso... una familia.

A Luis David por su tiempo, sus consejos y paciencia, por cada momento y ayuda, por estar siempre y por compartir conmigo.

A mis amigos incondicionales Berenice, Elio, Carla, Andrea, Lenin, Alex y David por estar siempre para mí, por cada aventura buena o mala, por cada consejo y momento, son excelentes.

¡En fin... GRACIAS TOTALES!

<i>Dedicatoria</i>	5
<i>Agradecimientos</i>	6
<i>Índice de Contenidos</i>	7
<i>Índice de Tablas</i>	11
<i>Índice de Figuras</i>	12
<i>Listado de Abreviaturas</i>	14
<i>Resumen</i>	16
<i>Abstract</i>	17
<i>Capítulo I: Introducción</i>	18
Antecedentes	18
Justificación	20
Objetivos Generales y Específicos.....	22
<i>Objetivo General</i>	22
<i>Objetivos Específicos</i>	22
<i>Capítulo II: Revisión Bibliográfica</i>	23
Sistema Inmunológico	23
<i>Órganos y Tejidos Linfáticos</i>	23
<i>Células del Sistema Inmunitario</i>	24
Inmunidad Adaptativa e Innata	25
<i>Inmunidad Innata</i>	25
<i>Inmunidad Adaptativa</i>	26
Células Dendríticas	27

	8
Origen y Desarrollo	29
<i>Subclases de Células Dendríticas</i>	<i>31</i>
<i>Morfología de Células Dendríticas</i>	<i>32</i>
Proceso de Maduración de Células Dendríticas	34
Proteínas Involucradas en la Maduración, Aactivación e Indicadoras de Daño en Células Dendríticas	36
<i>β – actina</i>	<i>36</i>
<i>Complejo de Histocompatibilidad Tipo II (MHC – II)</i>	<i>36</i>
<i>CIITA</i>	<i>37</i>
<i>Clec9A</i>	<i>37</i>
<i>CD11c.....</i>	<i>37</i>
<i>CD 40</i>	<i>38</i>
<i>CD 86</i>	<i>38</i>
<i>P53</i>	<i>38</i>
Mecanismo de Presentación de Antígenos.....	39
<i>Vías de Absorción de Antígenos.....</i>	<i>40</i>
<i>Presentación Cruzada de Antígenos</i>	<i>42</i>
Internalización de Nanopartículas por Células Dendríticas	44
Terapia con Células Dendríticas.....	46
Fuentes de Aislamiento de Células Dendríticas en Humanos y Ratones	47
Nanomedicina	48
<i>Nanopartículas.....</i>	<i>49</i>
Nanopartículas de Oro	53
Uso de Modelos Animales.....	56
<i>Principios Éticos con el Uso de Modelos Animales.....</i>	<i>57</i>

	9
<i>Mus musculus</i> como Modelo Animal	57
Células Derivadas de Médula Ósea de Ratón (<i>Mus musculus</i>)	58
Líneas Celulares	60
Líneas Celulares Primarias	60
Líneas Celulares Continuas o Infinitas	60
Inmunoterapia y Nanomedicina	60
Capítulo III: Materiales y Métodos	62
Localización Geográfica	62
Obtención de Células Mononucleares Derivadas de Médula Ósea	62
<i>Selección y sacrificio de individuos de experimentación</i>	62
<i>Obtención de BMDC</i>	62
<i>Viabilidad Celular en Cámara de Neubauer, Siembra y Condiciones de Cultivo</i>	63
Diferenciación a Células Dendríticas y Maduración	64
Extracción de ARN Celular	65
Síntesis de cDNA	65
Diseño de Primers para el Reconocimiento de Células Dendríticas en Ratones (<i>Mus musculus</i>)	67
PCR Punto Final	68
Electroforesis Horizontal en Gel de Agarosa	69
Observación de Células Dendríticas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	69
Observación de Células Dendríticas Mediante Microscopía Confocal	70
Capítulo III: Resultados	72

	10
Obtención de Células Mononucleares Viables Derivadas de Médula Ósea de Ratón (<i>Mus musculus</i>) (bmDC).	72
Ensayo de Diferenciación a Células Dendríticas y Maduración con Nanopartículas de Oro	73
Comprobación de Diferenciación y Maduración de Células Dendríticas	77
<i>Viabilidad Celular</i>	77
<i>Caracterización de Células Dendríticas derivadas de Médula Ósea de Ratón Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel de Agarosa...</i>	78
<i>Análisis de Densitometría a partir de PCR End Point y Electroforesis en Gel de Agarosa.</i>	82
Observación de Cambios Morfológicos de Células Dendríticas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	90
Localización de Nanopartículas de Oro en Células Dendríticas Bajo Microscopía Confocal.	91
<i>Capítulo V: Discusión</i>.....	93
<i>Capítulo VI: Conclusiones</i>	99
<i>Capítulo VII: Recomendaciones</i>.....	100
<i>Referencias</i>.....	101

Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Órganos linfáticos primarios y secundarios.</i>	24
Tabla 2 <i>Células de sistema inmunológico.</i>	25
Tabla 3 <i>Resumen de mecanismos de absorción de antígenos.</i>	42
Tabla 4 <i>Comparación genética entre humanos y ratones.</i>	58
Tabla 5. <i>Componentes y volumen para síntesis de cDNA (1X).</i>	66
Tabla 6. <i>Condiciones de termociclado para síntesis de cDNA.</i>	66
Tabla 7 <i>Primers para detección de células dendríticas maduras.</i>	67
Tabla 8 <i>Componentes de PCR.</i>	68
Tabla 9 <i>Condiciones de amplificación.</i>	69

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Inmunidad innata y adaptativa, tiempo de respuesta</i>	27
Figura 2 <i>Célula dendrítica madura observada en microscopio electrónico de barrido (sem)</i>	28
Figura 3. <i>Respuesta pro y antiinflamatoria ante diferentes estímulos</i>	29
Figura 4. <i>Origen y desarrollo de células dendríticas</i>	30
Figura 5. <i>Características de poblaciones de cd humanas y murinas</i>	32
Figura 6. <i>Proceso de maduración de células dendríticas</i>	33
Figura 7. <i>Maduración de células dendríticas</i>	34
Figura 8. <i>Ciclo de vida de células dendríticas y sinapsis inmunológica</i>	35
Figura 9 <i>Procesos celulares regulados por P53</i>	39
Figura 10. <i>Mecanismos de internalización de antígenos</i>	41
Figura 11. <i>Presentación cruzada de células dendríticas</i>	43
Figura 12. <i>Factores que intervienen en la presentación cruzada de antígenos</i>	44
Figura 13 <i>Mecanismos de ingreso de nanopartículas</i>	45
Figura 14. <i>Inmunoterapia con células dendríticas en humanos</i>	47
Figura 15 <i>Síntesis química de nanopartículas de oro</i>	51
Figura 16 <i>Aplicaciones biológicas de las nanopartículas de oro</i>	52
Figura 17. <i>Precursores de células dendríticas</i>	59
Figura 18 <i>Obtención de BMDC y viabilidad celular</i>	63
Figura 19 <i>Histograma de densidad celular y edad del ratón</i>	72
Figura 20 <i>Observación microscópica de células mononucleares</i>	73
Figura 21 <i>Ensayo de diferenciación y maduración de células dendríticas</i>	74

Figura 22 <i>Células dendríticas con nanopartículas de oro aisladas de médula ósea de ratón.</i>	76
Figura 23 <i>Células dendríticas con gm-csf aisladas de médula ósea de ratón.</i>	76
Figura 24 <i>Viabilidad celular tras 11 días de tratamiento.</i>	77
Figura 25 <i>Electroforesis para β - actina.</i>	78
Figura 26 <i>Gel de agarosa para MHC – II.</i>	79
Figura 27 <i>Electroforesis para CD40 y CIITA.</i>	80
Figura 28 <i>Electroforesis para CLEC9A Y CD86.</i>	81
Figura 29 <i>Electroforesis para P53 (muerte celular).</i>	82
Figura 30 <i>Análisis de expresión de β - actina.</i>	83
Figura 31. <i>Análisis de expresión de MHC – II.</i>	84
Figura 32 <i>Análisis de expresión de la proteína CIITA.</i>	85
Figura 33 <i>Análisis de expresión del cofactor CD40.</i>	86
Figura 34 <i>Análisis de expresión del gen CLEc9A.</i>	87
Figura 35 <i>Análisis de expresión del cofactor CD86.</i>	88
Figura 36 <i>Electroforesis para el cofactor CD11c.</i>	89
Figura 37 <i>Células mononucleares derivadas de médula ósea.</i>	90
Figura 38 <i>Células dendríticas maduras.</i>	91
Figura 39 <i>Micrografías en microscopio confocal de células dendríticas.</i>	92

Listado de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
APC	Célula Presentadora de antígenos
ATP	Adenosín trifosfato
BMDC	Células derivadas de médula ósea
CD40L	Ligando de CD40
CD	Célula dendrítica
cDC	Célula dendrítica convencional
cDNA	ADN complementario
CDP	Progenitor común de células dendríticas
CO ₂	Dióxido de carbono
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DNGR – 1	Receptor – 1 del grupo de lectina natural asesino de células dendríticas
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FLT - 3	Ligando de tirosina quinasa 3 de tipo FMS
g	Gramos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP	Guanosín trifosfato
HSC	Células madre hematopoyéticas
IFN	Interferón
IL	Interleucina
IgG	Inmunoglobulina G
MDP	Progenitores de macrófagos y células dendríticas
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle
MHC-II	Complejo de histocompatibilidad mayor tipo II
mL	Mililitros
moDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NFκβ	Factor nuclear kappa potenciador de cadena ligera de células B activadas
NK	Asesinos naturales
nm	Nanómetros
NP	Nanopartículas
NPAu	Nanopartículas de Oro
pDC	Células dendríticas plasmocitoides
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pMHC – II	Péptido MHC clase II
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT – PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SEM	Microscopio electrónico de barrido
Th	Linfocitos T helper
TLR	Receptores tipo Toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral α
uL	Microlitros
UV	Radiación ultravioleta

Resumen

La nanomedicina es una ciencia interdisciplinaria que conjuga la aplicación de nanotecnología, nanociencia y nanoingeniería con la medicina, las herramientas a nanoescala como las nanopartículas poseen gran potencial terapéutico para uso en células diana, por ejemplo: células dendríticas (CD). Las CD son células altamente móviles cuya función principal es la presentación de antígenos, se consideran un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa. En el presente trabajo, las CD se diferenciaron y maduraron con estímulos externos como GM-CSF y nanopartículas de oro de aproximadamente 30 nm en concentraciones de 5 ug/mL a 200 ug/mL, a partir de células de médula ósea (bmDC) de ratones adultos, hasta 12 días de cultivo. La caracterización de CD se realizó mediante RT – PCR, microscopía electrónica de barrido y confocal para la observación morfológica y ubicación de nanopartículas dentro de las células. Las bmDC se diferenciaron posiblemente en células dendríticas cCD1 y se determinó su estado morfológico mediante la caracterización de factores de coestimulación CD40, CD86 y CD11c, además, de la presencia de MHC – II y CIITA la maduración y activación de las células dendríticas al tener contacto con nanopartículas de oro. La morfología de una célula dendrítica murina madura se confirmó mediante observación microscópica.

Palabras clave:

- **NANOMEDICINA**
- **CÉLULAS DENDRÍTICAS**
- **NANOPARTÍCULAS DE ORO**

Abstract

Nanomedicine is an interdisciplinary science that combines the application of nanotechnology, nanoscience and nanoengineering with medicine, nanoscale tools such as nanoparticles have great therapeutic potential for use in target cells, for example: dendritic cells (DC). DCs are highly mobile cells whose main function is the presentation of antigens, they are considered a bridge between the innate and adaptive immune responses. In the present work, DCs were differentiated and matured in up to 12 days of culture, with external stimuli such as GM-CSF and gold nanoparticles of approximately 30 nm in concentrations of 5 ug / mL to 200 ug / mL, from bone marrow cells (bmDC) of adult mice. The characterization of DCs was carried out by RT-PCR, confocal and scanning electron microscopy for the morphological observation and location of nanoparticles within cells. The bmDCs possibly differentiated into cDC1 dendritic cells and their morphological status was determined by characterizing costimulation factors CD40, CD86 and CD11c, in addition to the presence of MHC-II and CIITA, the maturation and activation of dendritic cells upon contact with gold nanoparticles. The morphology of a mature murine dendritic cell was confirmed by microscopic observation.

KEY WORDS:

- **NANOMEDICINE**
- **DENDRITIC CELLS**
- **GOLD NANOPARTICLES**

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El descubrimiento de células dendríticas fue un hallazgo clave en el desarrollo de la inmunología, con él se logró unir el trabajo de Paul Ehrlich y el hallazgo de la inmunidad adaptativa, e Ilya Metchnikov y la inmunidad innata; en 1967 Robert Mishell y Richard Dutton desarrollan un método para estudiar respuestas inmunológicas específicas *in vitro* el cual, consistió en mezclar antígenos y linfocitos para conocer la respuesta de los anticuerpos del que se concluyó que los linfocitos no eran suficientes para producir inmunidad, y de la necesidad de células accesorias para cumplir con el objetivo (Nussenzweig, 2011)

Steinman junto a Cohn reconocen células derivadas del bazo cuya característica principal era la adherencia al vidrio, como estimuladoras de la respuesta inmune, las cuales fueron conocidas como células accesorias (van Furth & Zanvil, 1968). Se creía que las células accesorias eran los macrófagos, gracias a la experiencia de Cohn y Bárbara Ehrenreich se encontró que al exponer macrófagos con antígenos se induce una respuesta inmune, sin embargo, no se logró encontrar la captación o retención de antígenos por parte de estas células (Nussenzweig, 2011).

En 1973 Nussenzweig utiliza aptameros como antígenos para describir la importancia de las células dendríticas: su mecanismo de presentación y la baja actividad de los macrófagos para esta característica; gracias a varios avances en microscopía electrónica (microscopio en contraste de fases), en 1980 descubrieron una pequeña población de células con morfología estrellada única y diferente a monocitos y macrófagos las que llevarían el nombre de células dendríticas las cuales, presentaron mecanismos de internalización sin la presencia de vacuolas fagocíticas, las células se alargaban exhibiendo estructuras similares a un árbol, hecho que los

llevó a ser merecedores del Premio Nobel en Fisiología y Medicina en el año 2011 (Nussenzweig, 2011). Años más tarde, se descubrió que este tipo de células expresan alto nivel de complejo de histocompatibilidad mayor tipo II (MHC-II) con la intención de estimular la proliferación de linfocitos T (Puhr et al., 2015).

En 1992 se añadió al medio de cultivo citoquinas de linaje para la diferenciación y maduración a las células mononucleares adheridas en diferentes condiciones (Van Spriel & Jong, 2013), por ejemplo: el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), con la intención de estimular la formación de colonias de células mieloides a partir de progenitores de médula ósea (Puhr et al., 2015). Sin embargo, el aislamiento de células dendríticas de los tejidos de cuerpo de ratón es complejo y el número de células aisladas es bajo (Allen & Walker, 2013).

La primera evidencia del uso de materiales a nanoescala se registró hace más de 4500 años con la presencia de nanofibras de amianto natural en cerámicas, en los siglos XIV y XIII a.C. los egipcios y mesopotámicos fabricaron vidrio con nanopartículas metálicas de síntesis química, en 1857, Michael Faraday informó acerca de la síntesis de una solución coloidal de nanopartículas de oro, la cual da paso al inicio del uso de nanomateriales en la ciencia; para 2005 Abraxane, un producto farmacéutico a base de nanopartículas de albúmina sérica es sintetizado y comercializado (Jeevanandam et al., 2018), en la actualidad se encuentran más de 35 nanopartículas aprobadas por la FDA y 152 productos en ensayos clínicos reportados hasta 2019 (Anselmo & Mitragotri, 2019).

En la actualidad, se ha reportado resultados positivos acerca de la interacción entre nanopartículas y células dendríticas, es decir, las NP pueden inducir respuestas inmunológicas como la activación de células presentadoras de antígenos dando paso a una respuesta adaptativa (Niikura et al., 2013); por lo tanto, comprender los efectos tóxicos e inmunológicos de las nanopartículas sería esencial para su posible aplicación en el ámbito farmacológico.

Justificación

Las células presentadoras de antígenos (APCs) como los macrófagos y las células dendríticas fagocitan estas partículas o materiales externos y estimulan la producción de linfocitos y otras células inmunes mediante la liberación de mediadores químicos o citocinas, que se encargan de iniciar la respuesta inmunológica adaptativa (Niikura et al., 2013). Según Zhou y colaboradores (2016), la falta de sistemas inmunológicos eficientes en cuanto a la presentación de antígenos y la activación de linfocitos, así como la migración restringida de células dendríticas y su baja producción limita una respuesta de defensa potencial. Para beneficiarse de la inmunoterapia a gran escala se debe explorar e investigar enfoques novedosos a fin de dirigir antígenos y agentes inmunoestimuladores de células dendríticas.

En la actualidad, se han registrado informes acerca de la actividad de las nanopartículas en células eucariotas, principalmente su poder de inducción a respuestas inmunológicas, como la producción de anticuerpos y la regulación positiva de citocinas; para ello es necesario comprender los efectos de las nanopartículas para futuras aplicaciones en biomedicina, las cuales han sido demostradas debido a sus diferentes características, entre ellas: forma, tamaño y carga superficial (Jazayeri et al., 2016); un tamaño y forma adecuados podrían convertir a la nanopartícula en antígeno eficaz (Yen et al., 2009).

En varias investigaciones se demostró que existen nanopartículas que no causan citotoxicidad significativa, producen citocinas, activan células dendríticas y realizan cambios fenotípicos en ellas (Fytianos et al., 2015).

Su fácil preparación, química de superficie, biocompatibilidad y propiedades ópticas únicas justifican el uso de nanopartículas de oro como inmunoterapia (Arosio et al., 2011); sin embargo, su toxicidad se encuentra íntimamente relacionada con la forma, tamaño y carga superficial debido a que pueden afectar directamente el reconocimiento y aceptación por parte de las células dendríticas, en cuanto al tamaño, las NPAu pueden variar entre 14 y 100 nm debido a que se incorporan fácilmente a células de mamíferos y no indican citotoxicidad (Yen et al., 2009).

Debido a lo expuesto anteriormente, esta investigación pretende abordar y comprobar si las nanopartículas de oro esféricas, de 30 nm de tamaño con carga superficial negativa y citrato como estabilizador son capaces de diferenciar y madurar a las células dendríticas derivadas de médula ósea con el fin de potenciar la respuesta inmunológica adaptativa, generar inmunoterapia dirigida ante diferentes patógenos presentes en el organismo o modular la respuesta inmunológica en personas inmunodeprimidas.

Objetivos Generales y Específicos

Objetivo General

Madurar y activar células dendríticas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*) mediante el uso de nanopartículas de síntesis química.

Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de nanopartículas empleadas para la maduración y activación de células dendríticas.
- Obtener células mononucleares viables derivadas de médula ósea de ratón (*Mus musculus*) (bmDC).
- Estimular la maduración de células dendríticas mediante diferentes factores de estimulación y nanopartículas.
- Caracterizar la activación de células dendríticas mediante RT-PCR identificando MHC – II y/o factores de coestimulación y microscopía electrónica de barrido.

Capítulo II: Revisión Bibliográfica

Sistema Inmunológico

Se conoce como sistema inmunológico al conjunto de células y moléculas responsables de generar inmunidad mediante una respuesta conjunta y coordinada frente a la exposición a sustancias extrañas conocidas como antígenos, ya sean: microorganismos, proteínas, polisacáridos o pequeños compuestos químicos y mantener la homeostasis del cuerpo (Abbas et al., 2015). El sistema inmunológico consta de varios órganos y tejidos, sin embargo, funciona como una entidad única de defensa debido a sus componentes celulares, los cuales se caracterizan por su movilidad y presencia en gran número entre la sangre, linfa y órganos linfoides secundarios (Repasky, 2016).

Órganos y Tejidos Linfáticos

Según Abbas y colaboradores (2015) las interacciones necesarias entre células, el reconocimiento del antígeno y la activación de linfocitos ocurren en órganos y tejidos donde se localizan y concentran. Los órganos que forman parte del sistema inmunológico se clasifican en: órganos linfáticos primarios o centrales en los cuales los linfocitos alcanzan su madurez fenotípica y funcional, su principal función es proporcionar factores de crecimiento y señales moleculares necesarias para la maduración, y órganos periféricos o secundarios donde inicia el desarrollo de la respuesta inmunológica ante antígenos extraños, su función principal es transportar antígenos y linfocitos vírgenes (National Institutes of Health, 2003). En la tabla 1 se detallan los órganos de acuerdo con su clasificación.

Tabla 1*Órganos linfáticos primarios y secundarios.*

Clasificación	Órgano	Función
Generadores, primarios o centrales.	Médula ósea	Lugar de generación de células sanguíneas circulantes: eritrocitos, granulocitos y monocitos (hematopoyesis). Proliferación y maduración de células sanguíneas es estimulada por factores estimuladores de colonias (citocinas)
	Timo	Lugar de maduración de linfocitos T, presencia de células epiteliales medulares tímicas precursoras de linfocitos T.
	Bazo	Eliminar células sanguíneas viejas y dañadas.
Periféricos o secundarios.	Ganglios linfáticos	Favorece el inicio de la respuesta inmune adaptativa, presencia de macrófagos, células dendríticas y linfa. Proliferación de linfocitos B.
	Sistema linfático	Vasos especializados en el drenaje de linfa hacia ganglios linfáticos y sangre para homeostasis hídrica y respuesta inmunitaria.
		Transporte de antígenos hacia gánglios linfáticos.

Nota: recuperado de Abbas et al (2015).

Células del Sistema Inmunitario

Cada célula involucrada en la defensa del organismo desempeña una función especializada, entre ellas se encuentran: células que realizan fagocitosis, células dendríticas, linfocitos especializados y leucocitos. Sus funciones se detallan en la tabla 2.

Tabla 2

células de sistema inmunológico.

Célula	Función	
Células que realizan fagocitosis	Neutrófilos	Ingerir y destruir antígenos, deshacerse de células dañadas.
	Macrófagos	
	Monocitos	
Mastocitos	Producción de mediadores inflamatorios, acumulación rápida en lesiones.	
Basófilos	Presentes en piel y epitelio, producción de citocinas y mediadores de inflamación.	
Eosinófilos	Defensa a reacciones alérgicas.	
Linfocitos	Contienen enzimas lesivas para dañar parásitos.	
	Linfocitos B	Producción de anticuerpos.
	Linfocitos T	Mediadores de la inmunidad celular, linfocitos derivados del timo.
Células presentadoras de antígenos	Células dendríticas	Captan el antígeno, lo indican al linfocito y producen señales para inducir proliferación y diferenciación de linfocitos.
	Macrófagos	
	Linfocitos B	

Nota: recuperado de Abbas et al (2015) y Cruvinel et al (2010).

Inmunidad Adaptativa e Innata

Según Cruvinel y colaboradores (2010) la respuesta inmunológica se encuentra dividida en inmunidad innata y adaptativa.

Inmunidad Innata

La inmunidad innata representa una reacción temprana y rápida ante limitados estímulos, es decir, es la primera línea de defensa ante estructuras que son comunes a grupos de antígenos debido a que no puede distinguir entre ellos (Abbas et al., 2015). Sus principales componentes (Figura 1) son: barreras físicas, químicas y biológicas como el epitelio, células especializadas entre ellas: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos NK, y

moléculas solubles presentes en todos los individuos como el sistema de complemento; la fagocitosis, liberación de mediadores inflamatorios, activación del sistema de complemento, síntesis de citocinas y quimiocinas son los principales mecanismos de respuesta ante un estímulo externo, con el objetivo de activar la respuesta inmune innata mediante la interacción con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) (Cruvinel et al., 2010).

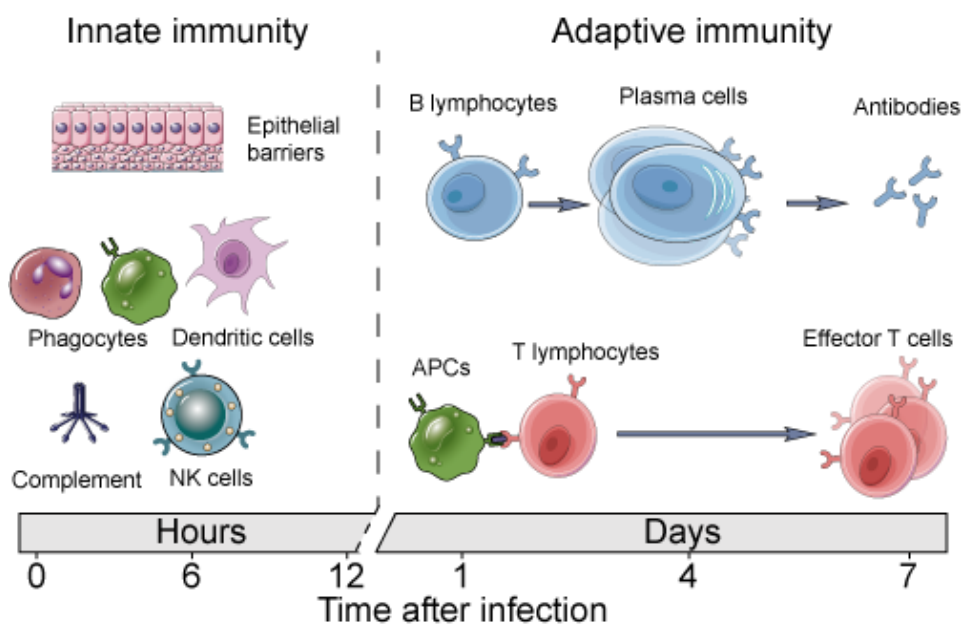
Inmunidad Adaptativa

Este tipo de respuesta depende de la activación de células especializadas (Figura 1): linfocitos y moléculas solubles como citocinas que se encargan de regular y coordinar sus actividades y quimiocinas responsables del movimiento y migración celular; la principal diferencia a la respuesta innata se basa en las características que posee: especificidad, diversidad de reconocimiento, memoria, autocontrol y tolerancia a componentes del mismo organismo (Abbas et al., 2015).

Las células presentadoras de antígeno juegan un papel muy importante en la estimulación de esta respuesta al exponer el antígeno asociado a moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor (Cruvinel et al., 2010).

Figura 1.

Inmunidad innata y adaptativa, tiempo de respuesta.



Nota: tomado de Abbas et al (2015).

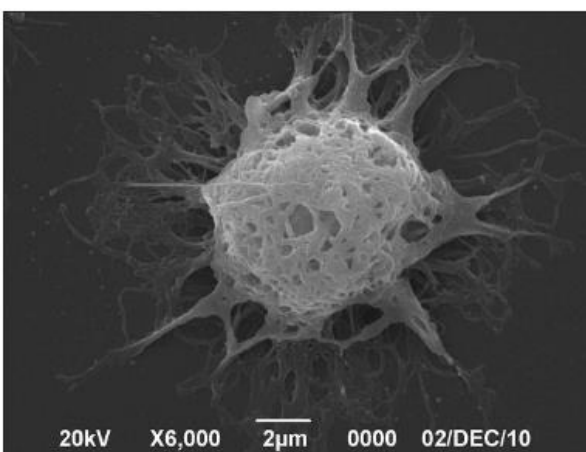
Células Dendríticas

Según Chung y colaboradores (2014) su nombre se debe a la presencia de numerosas proyecciones de membrana similares a las dendritas de las neuronas (Figura 2), son células altamente móviles especializadas en la presentación de antígenos debido a su capacidad de capturar, procesar y exponer de forma óptima a linfocitos T inmaduros y generar respuestas inmunes específicas (Vázquez et al., 2012), se encuentran en lugares del cuerpo que están expuestos a agentes extraños, infecciosos o daño tisular, como: piel, epitelios, tejidos periféricos, bazo e intestino, también en órganos linfoides, linfa aferente y sangre periférica donde capturan antígenos (Mokhtar & Hussein, 2019).

Se activan y migran a los ganglios linfáticos para procesar y presentar al antígeno (Cruvinel et al., 2010); en sangre periférica representan menos del 2 % de células mononucleares (Vázquez et al., 2012), sin embargo, para Wang y colaboradores (2016) constituyen el 1 % aproximadamente de los glóbulos blancos periféricos en animales y humanos.

Figura 2

Célula dendrítica madura observada en microscopio electrónico de barrido (sem).

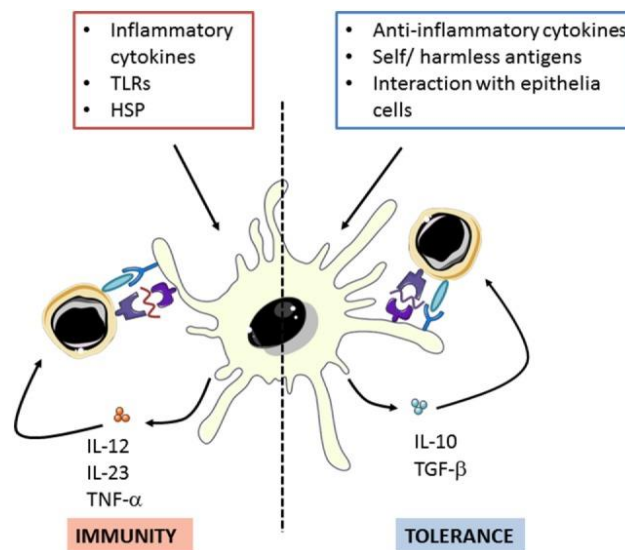


Nota: tomado de Wang et al (2016).

Consideradas un puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa debido a que son atraídas y activadas por elementos del primer mecanismo de defensa y permiten la sensibilización de linfocitos de la respuesta adaptativa, son las primeras células en llegar al lugar de infección (Cruvinel et al., 2010); se caracterizan por la expresión elevada de complejo de histocompatibilidad mayor clase II (MHC-II), la ausencia de marcadores de linaje: CD14 en monocitos, CD3 en linfocitos T, CD19, CD20 y CD24 para linfocitos B, CD56 en células NK y CD56b en granulocitos, además, presentan moléculas de adhesión comunes para monocitos y macrófagos: CD11a, CD11c, CD50, CD54, CD58 y CD102, y moléculas coestimuladoras: CD40, CD80 y CD86 (Vázquez et al., 2012).

Figura 3.

Respuesta pro y antiinflamatoria ante diferentes estímulos.



Nota: tomado de Flórez et al (2018).

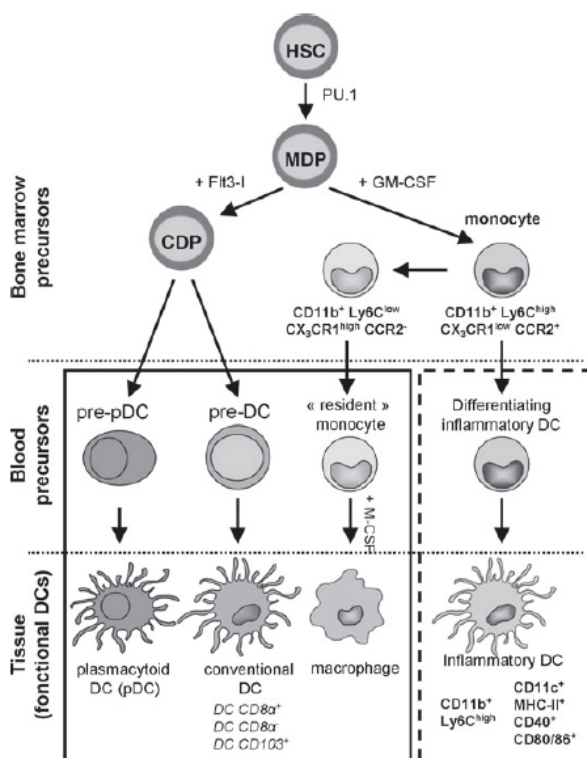
Origen y Desarrollo

Según Hespel y Moser (2012), la diferencia entre células dendríticas inflamatorias y convencionales se encuentra en su origen y diferenciación, como se observa en la figura 4, las células madre hematopoyéticas pluripotentes en la médula ósea (HSC) expresan PU.1 para diferenciarse en progenitores de macrófagos y células dendríticas (MDP), esta es la última etapa común entre células dendríticas convencionales e inflamatorias; en presencia del ligando de tirosina quinasa 3 de tipo FMS (FLT-3), las MDP dan lugar al progenitor común de células dendríticas (CDP) para dar paso a células dendríticas plasmocitoides y precursores (pre-DC), las cuales viajan a través de la sangre a tejidos linfoides y no linfoides en condiciones estacionarias e inflamatorias.

En cambio, en presencia del factor de estimulación de colonias de granulocitos – macrófagos (GM-CSF), las MDP se diferencian en monocitos con altos niveles de Ly6C en altas y bajas concentraciones, cuando son bajas concentraciones se da paso a la diferenciación de macrófagos, en casos de inflamación o infección los monocitos con altos niveles de Ly6C migran a la médula ósea por la vía dependiente de CCR2 a través de la sangre hacia tejidos inflamados donde alcanzan la diferenciación completa en células dendríticas inflamatorias. Sin embargo, aproximadamente el 30 % se diferencia en células dendríticas y el 40 % en macrófagos (Sokolova et al., 2018)

Figura 4.

Origen y desarrollo de células dendríticas.



Nota: tomado de Hespel y Moser (2012).

Subclases de Células Dendríticas

Según Vázquez y colaboradores (2012), las células dendríticas se originan a partir de precursores hematopoyéticos, con influencia de FLT-3 y GM-CSF se obtienen dos tipos de progenitores; en sangre periférica circulan células dendríticas fenotípica y funcionalmente diferentes, las cuales se distinguen entre sí por su expresión de CD11c y CD123:

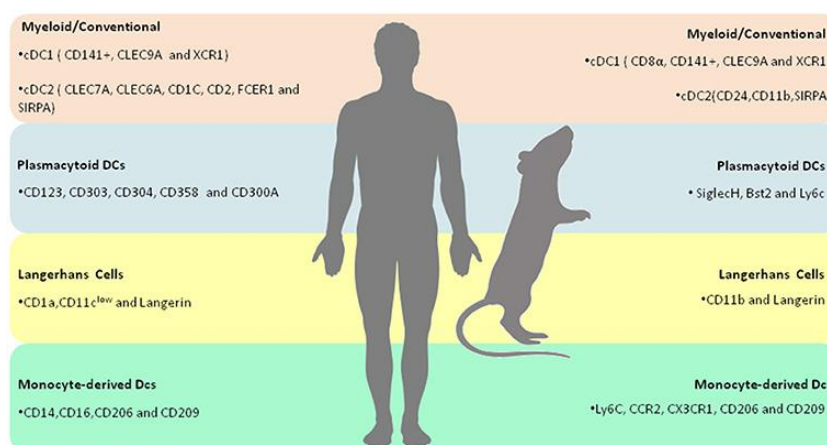
Linfoides (CD11c⁻ CD123⁺). Células dendríticas que derivan de células plasmocitoides en sangre (pDC), secretan grandes cantidades de interferón tipo I (IFN α / β) cuando ocurren infecciones virales, sus receptores TLR7, TLR8 y TLR9 responden a ARN y ADN de antígenos, carecen de dendritas cuando poseen un fenotipo inmaduro, son menos eficientes en el procesamiento de antígenos a comparación de las moDC y se consideran células dendríticas inductoras de tolerancia, además, son las encargadas de generar una respuesta innata antiviral temprana al producir grandes cantidades de IFN tipo I (Al-Ashmawy, 2018). En humanos las pDC provenientes de PBMC se caracterizan por la ausencia de marcadores de linaje mielóide como CD11b, CD11c, CD13 y CD33; en cambio, las de origen murino provenientes de médula ósea expresan CD123 diferentes a las de origen mielóide por ser CD11b⁻ CD11c^{low} B220⁺ (Figura 5) (Aravena, 2006).

Mieloides (CD11c⁺ CD123⁻). Surgen de precursores mieloides como monocitos de sangre periférica o progenitores CD34⁺ de la médula ósea (moDC o cDC), entre ellas las células de Langerhans, principales células dendríticas en la piel, y células dendríticas intersticiales que se encuentran en timo, bazo, pulmón e intestino, expresan receptores de superficie para PAMPs: TLR2 para peptidoglucano y TLR4 para lipopolisacárido (Mokhtar & Hussein, 2019), producen altos niveles de IL-12 y aumentan la diferenciación de células T-helper tipo 1 (Th1) y las respuestas de linfocitos T citotóxicos CD8⁺, por lo tanto, son consideradas células dendríticas

inductoras de inmunidad, en ratones las cDC se subdividen en cDC1 y cDC2 para órganos linfáticos y CD103⁺ y CD103⁻ en órganos no linfoides (Al-Ashmawy, 2018)

Figura 5.

Características de poblaciones de cd humanas y murinas.



Nota: tomado de Tibúrcio et al (2019).

Morfología de Células Dendríticas

Las células dendríticas se encuentran en tres estados funcionales: inmaduras, semimaduras y maduras; se distinguen por su capacidad de interactuar con células vírgenes, al ser inmaduras son tolerogénicas, esenciales para prevenir respuestas contra tejidos sanos a diferencia de las maduras que son inmunoestimulantes (Patente et al., 2019). La mayoría de las células dendríticas *in vivo* se encuentran en estado inmaduro e inactivo, en consecuencia se puede convertir a un estado maduro y activo gracias a la exposición de estas células a diferentes ligandos estimuladores (Liu & Roche, 2015).

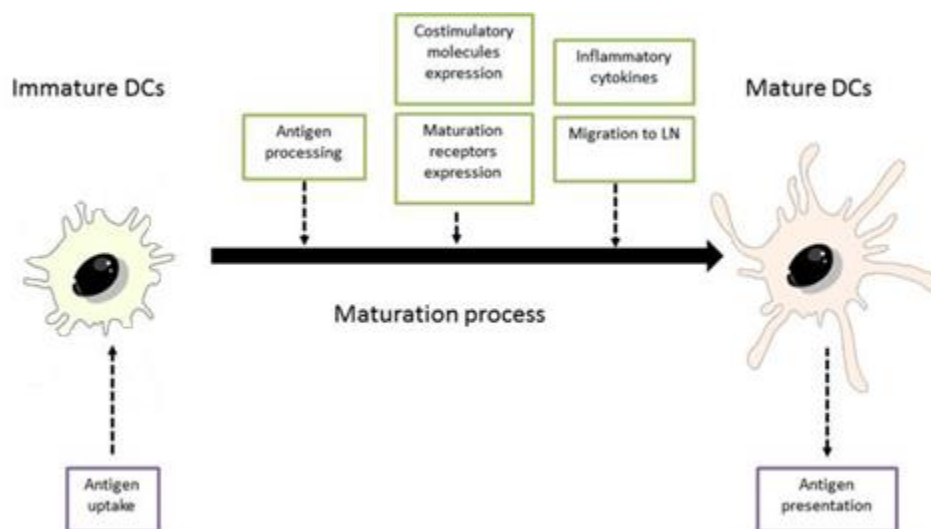
Las células dendríticas inmaduras residen como centinelas en la mayor parte de los tejidos y presentan una mayor eficiencia en la captura de antígenos como patógenos y células

apoptóticas o necróticas; debido a su capacidad endocítica, migran de la médula ósea al torrente sanguíneo para llegar a tejidos periféricos como la piel (células de Langerhans).

Morfológicamente presentan superficie redonda y lisa, bajos niveles de moléculas coestimuladoras como: CD80, CD86, CD83 y MHC – II (Kim & Kim, 2019); mientras que las células dendríticas maduras son más eficientes en el proceso de presentación de antígenos, se activan por la migración a través de los vasos linfáticos hacia órganos linfoides secundarios (tabla 1) (Cruvinel et al., 2010), en su morfología presentan superficie rugosa con múltiples pseudópodos o dendritas, expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras y citocinas inmunoestimuladoras que indican su estado fenotípico y maduro (Figura 6) (Kim & Kim, 2019).

Figura 6.

Proceso de maduración de células dendríticas.

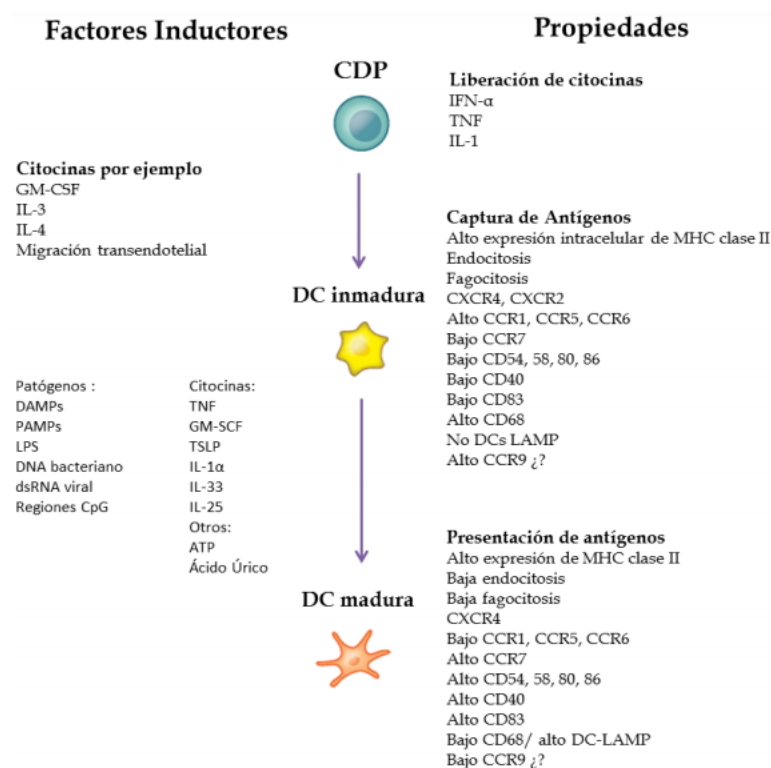


Nota: tomado de Flórez et al (2018). Imagen modificada

Patente y colaboradores (2019) describen como características de células dendríticas inmaduras: la baja expresión superficial de moléculas coestimuladoras y receptores de quimiocinas, no liberan citocinas inmunoestimuladoras como se observa en la figura 7 y se evidencia la presencia de marcadores de superficie como CD11c, CD11b y MHC-II (Al-Ashmawy, 2018).

Figura 7.

Maduración de células dendríticas.



Nota: tomado de Banchereau et al (2000).

Proceso de Maduración de Células Dendríticas

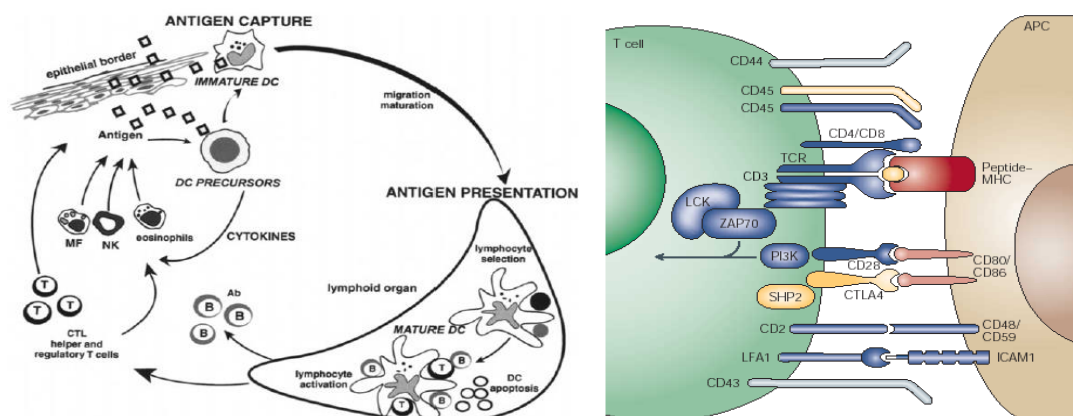
Las células dendríticas llegan a su estado de maduración cuando encuentran estímulos exógenos o endógenos denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) por receptores tipo Toll (TLR), principalmente: TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-8 y TLR-9 (Al-

Ashmawy, 2018), como se puede observar en la figura 8, esto ocurre principalmente por alteraciones en la homeostasis del tejido activando mecanismos de transcripción metabólica, celular y génica, lo cual permite que las células dendríticas migren a tejidos periféricos (órganos secundarios). Durante la maduración pierden estructuras adhesivas, reorganizan el citoesqueleto y aumentan su movilidad, disminuyen su actividad endocítica aumentando la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras; expresan altos niveles de receptor de quimiocina CCR7 y secretan citoquinas entre las principales se encuentran: interleucina 6 (IL-6), IL-10, TNF α e IL 12 para la activación y proliferación de linfocitos T (Cruvinel et al., 2010).

Su activación involucra un proceso de translocación inmediata mediada por quimiocinas hacia ganglios linfáticos periféricos generando inmunidad adaptativa; la maduración fenotípica es alcanzada cuando las células dendríticas regulan la elevada producción de marcadores de maduración en la superficie como: CD40, CD80, CD83 y CD86 (Al-Ashmawy, 2018)

Figura 8.

Ciclo de vida de células dendríticas y sinapsis inmunológica.



Nota: tomado de Banchereau et al (2000), Huppa y Davis (2003).

Proteínas Involucradas en la Maduración, Aactivación e Indicadoras de Daño en Células

Dendríticas

β – actina

Las actinas son proteínas altamente conservadas presentes en abundancia en células eucariotas de mamíferos, involucradas en procesos celulares esenciales como: motilidad celular, estructura e integridad, (NCBI, 2020) citocinesis, remodelación de cromatina y regulación transcripcional. Esta proteína cuenta con 6 isoformas cada una involucrada en procesos específicos y codificadas por genes separados y diferentes (Patrinostro et al., 2018).

Complejo de Histocompatibilidad Tipo II (MHC – II)

Las moléculas de MHC tipo II son glicoproteínas que se encuentran únicamente en células presentadoras de antígenos como: macrófagos, células dendríticas y células B, son responsables de presentar péptidos derivados de patógenos extracelulares a linfocitos T CD4⁺; en humanos hay tres moléculas: HLA-DP, -DQ y -DR, mientras que en ratón únicamente A y E ortólogas a -DR y -DQ de humano (Ting & Trowsdale, 2002).

Inicialmente se encuentra en el retículo endoplasmático donde se estabilizan por su cadena invariante evitando de esta manera su unión a péptidos celulares, a continuación, se externaliza a través del aparato de Golgi donde la cadena invariante es degradada para mantener la unión a un antígeno extraño mediante el intercambio con el mismo. La molécula presenta dos cadenas cada una con dos dominios: $\alpha 1$ y $\beta 1$ formando el surco de unión al péptido y $\alpha 2$ y $\beta 2$ transmembrana (Bio-Rad, n.d.).

CIITA

CIITA es el regulador principal de la expresión de MHC – II con supuestas funciones relacionadas al procesamiento y presentación de antígenos (Anderson et al., 2017); esta proteína posee 4 repeticiones ricas en leucina y un dominio de unión a GTP el cual es empleado para transportarse al núcleo, interactúa con la acetiltransferasa y actúa similar a un coactivador (GeneCards, n.d.)

Clec9A

Receptor transmembrana de tipo lectina, tipo C, ubicado en el grupo de dectina-1 (V), presente únicamente para células dendríticas convencionales tipo 1 (cCD1) en ratones y humanos; DNDR – 1 codificado por *Clec9A*, detecta F – actina, expuesta durante la muerte celular necrótica y media la presentación cruzada de antígenos asociados a células muertas e infecciones virales, no activa NFκβ sin embargo, se ha visto asociado a SHP – 1, reduce la inmunopatología asociada a daño tisular salvaguardando la integridad de tejidos; este no es un indicador de activación (Cueto et al., 2020).

CD11c

También conocida como Integrina X, es una molécula con características de adhesión y expresión elevada en la superficie celular, forma un receptor heterodimérico con CD18 importante en la relación APC – linfocito T (Hara et al., 2013), se encuentra en varias células mieloides como: linfocitos, células naturales asesinas (NK) en menor cantidad y células dendríticas; es usado como un marcador de CD murinas, sin embargo, por su presencia en otras células no es específico para ellas aunque se pueden identificar dos poblaciones de células dendríticas de acuerdo a su expresión. CD11c en la superficie se encuentra regulada negativamente en BMDC de ratón después de su activación (Singh-Jasuja et al., 2013).

CD 40

Es un receptor de superficie de glucoproteína transmembrana miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral, fosfoproteína tipo I que se expresa en diferentes células: células dendríticas, linfocitos B, macrófagos y células no hematopoyéticas. Durante la presentación de antígenos la interacción entre CD40 y el ligando de DC40 (CD40L) induce la producción de interleucina – 12 (IL-12) en CD desencadenando la diferenciación de linfocitos T helper tipo 1 (Th1) y una señalización antiapoptótica en CD a través de la activación de Akt1; además, durante la maduración la expresión de esta proteína en células dendríticas aumenta después de recibir estímulos (Iijima et al., 2003).

CD40 induce cambios en las células dendríticas, entre ellas: aumenta la efectividad de presentación de antígenos, regulación positiva de MHC – II y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86; en células dendríticas inmaduras CD 40 se expresa en niveles bajos. En ratones es empleado como un marcador para distinguir CD activas y no activas (Ma & Clark, 2010).

CD 86

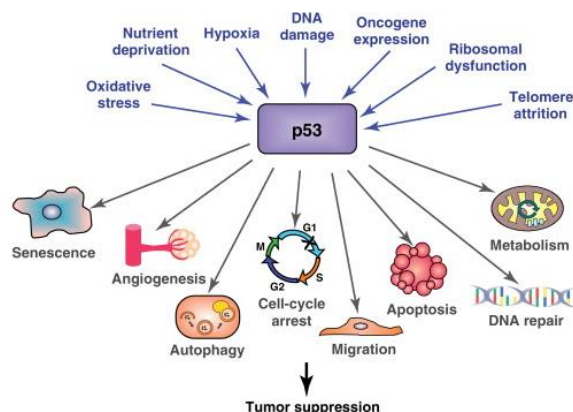
Conocida también como B7 – 2 pertenece a los ligandos de proteínas de superficie celular de la familia B7 con relación estructural, se encuentran en células linfoides y no linfoides donde es regulado tras la activación de linfocitos B, células dendríticas y monocitos (Collins et al., 2005), promueve la maduración, función y supervivencia de células presentadoras de antígenos; la maduración de células dendríticas conduce a una regulación positiva de las moléculas coestimuladoras B7 – 1 y B7 – 2 (Yadav & Sarvetnick, 2007).

P53

Proteína también conocida como TP53 forma un factor de transcripción homotetramérico que regula alrededor de 500 genes diana, por lo tanto se encuentra involucrado en procesos celulares que se detallan en la figura 9 (Aubrey et al., 2018).

Figura 9

Procesos celulares regulados por P53.



Nota: extraído de Bristol Science for Wood (2020).

Mecanismo de Presentación de Antígenos

Según Cruvinel y colaboradores (2010), los antígenos capturados se procesan dentro de la célula y se presentan en la superficie unidos a las moléculas de MHC, los antígenos proteicos son exhibidos por las moléculas del complejo de histocompatibilidad mayor clase I y II que estimulan $LT\alpha\beta$, antígenos lipídicos son presentados por las moléculas CD1 o no clásicas de MHC y estimulan $LT\gamma\delta$ y NK/T, cuando tienen contacto con el antígeno lo retienen en los ganglios linfoides durante largos períodos contribuyendo a la memoria inmunológica.

Las células dendríticas impulsan la producción del efector $CD4^+$ Th1 y linfocitos T $CD8^+$ (Al-Ashmawy, 2018); Bevan en 1976 describe la capacidad única de las células dendríticas en realizar presentaciones cruzadas, es decir la molécula de MHC – I puede capturar antígenos de medio extracelular y permite generar respuestas contra antígenos intracelulares de otros tipos de células (Patente et al., 2019).

Vías de Absorción de Antígenos

Según Al-Ashmawy (2018), la internalización del antígeno extracelulares es una característica específica de células dendríticas inmaduras y puede ocurrir mediante tres mecanismos: endocitosis y macropinocitosis para antígenos solubles y fagocitosis para antígenos particulados (Burgdorf & Kurts, 2008). En células derivadas de médula ósea (bmDC) la macropinocitosis es el mecanismo más común en la internalización de antígenos con proximadamente 2 fL/cell/min proporcionando un mecanismo robusto de captación (Liu & Roche, 2015).

La fagocitosis es un proceso endocítico dependiente de actina donde las partículas opsonizadas, es decir, marcadas para su ingestión y posterior destrucción se unen a receptores de la superficie de células dendríticas, ingresan a la célula en fagosomas derivados de la membrana. Como se observa en la figura 10, los antígenos que han sido fagocitados se asocian a lisosomas MHC-II + obteniendo como resultado fagolisosomas o dirigirse directamente al compartimento multivesicular endosómico/lisosómico temprano estable para generar complejos péptido-MHC clase II (pMHC-II) (Liu & Roche, 2015).

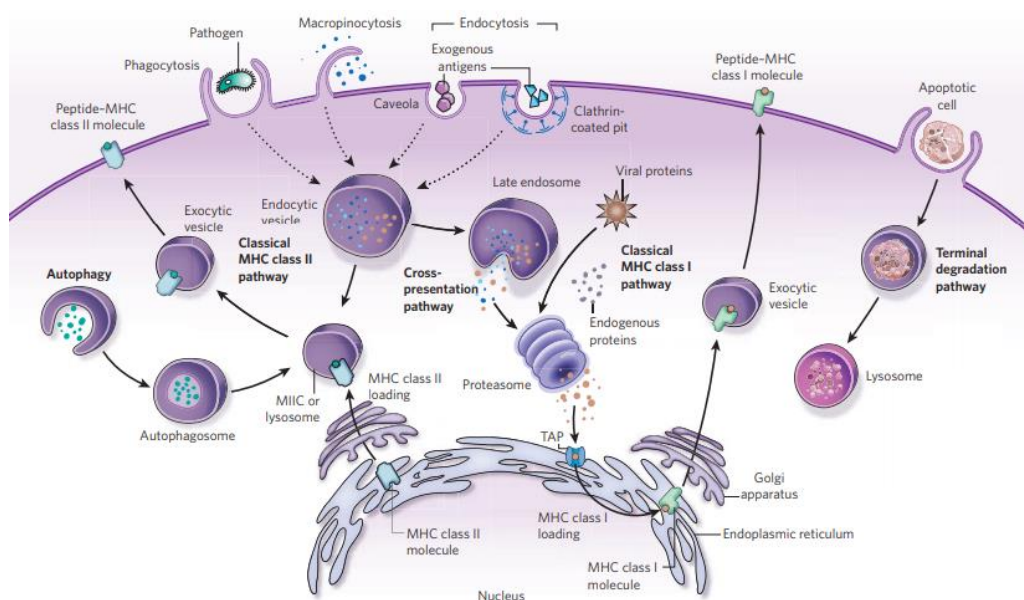
La macropinocitosis (Figura 10) al igual que la fagocitosis es una vía dependiente de y del citoesqueleto, esta vía permite a las células dendríticas capturar rápidamente al antígeno, sin embargo, no es específica (Al-Ashmawy, 2018). Esta vía absorbe antígenos solubles en la célula mediante macropinosomas, son transferidos a endosomas tempranos para finalmente ser fusionados al compartimento multivesicular, en este lugar los antígenos se degradan y cargan en MHC-II (Liu & Roche, 2015); cuando las células dendríticas se encuentran en estado inmaduro el proceso de macropinocitosis es sólido y constitutivo, sin embargo al cambiar su estado morfológico el mismo va desapareciendo (Sallusto et al., 1995).

En la endocitosis mediada por receptores (Figura 10) los antígenos solubles se unen a receptores específicos en la superficie celular, los cuales son internalizados en vesículas recubiertas con clatrina, se entregan a los endosomas tempranos previo a eliminar la clatrina para finalmente ser entregados al compartimento de procesamiento para la degradación proteolítica y formación de pMHC-II. Después de formar los compartimentos para el procesamiento de antígenos, los complejos pMHC-II exponen fragmentos peptídicos de este a la membrana plasmática para iniciar una respuesta inmune adaptativa específica funcionando como plataformas de presentación (Liu & Roche, 2015).

Durante la maduración las células dendríticas regulan de forma negativa la endocitosis limitando la cantidad de antígenos que pueden ser presentados al salir de tejidos periféricos, esta regulación ocurre por una disminución en la expresión superficial de los receptores y por la modulación descendente de macropinocitosis y fagocitosis (Al-Ashmawy, 2018)

Figura 10.

Mecanismos de internalización de antígenos.



Nota: tomado de Hubbell et al(2009).

Tabla 3

Resumen de mecanismos de absorción de antígenos.

Vía de absorción	Tipo y tamaño de antígeno	Mecanismo de ingreso	Vía de dependencia	Molécula presentadora
	Soluble			
Endocitosis	Caveolas → ~60nm. Clatrina → ~120nm.	Receptores específicos en la superficie celular	Clatrina	pMHC - II
Macropinocitosis	Soluble < 1 um.	Macropinosoma / endosoma Receptores	Citoesqueleto	MHC – II
Fagocitosis	Particulado > 1 um.	específicos en la superficie celular / fagosoma	Actina	pMHC - II

Nota: extraída de Liu y Roche (2015), Hubbell et al (2009).

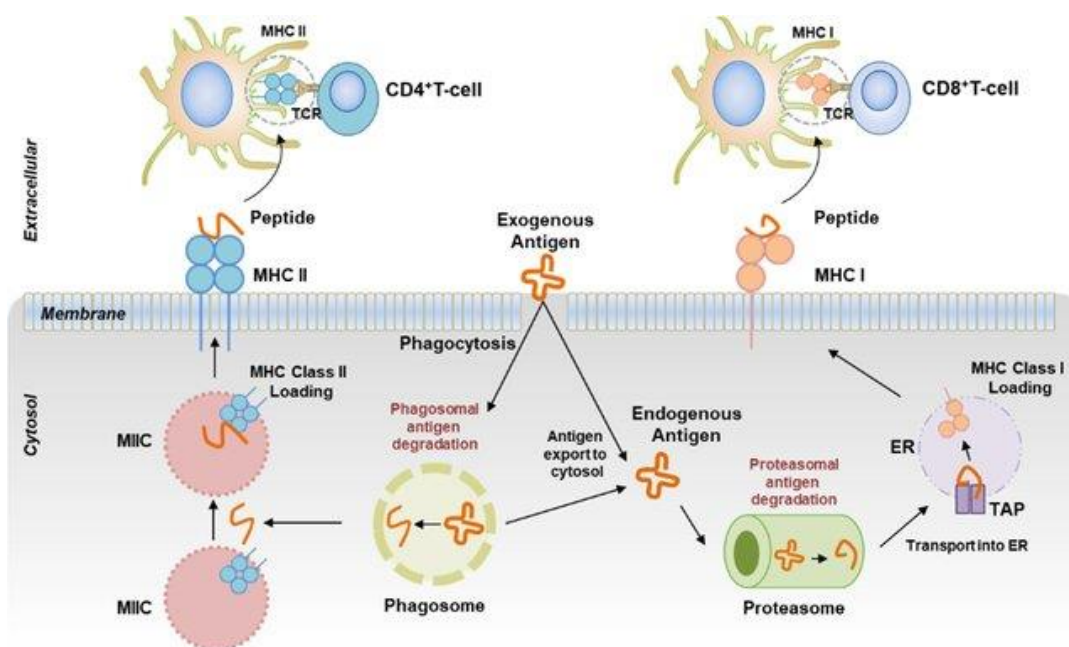
Presentación Cruzada de Antígenos

Una de las características principales de células dendríticas es su capacidad profesional de presentar antígenos, atraen y activan células T CD4⁺ y CD8⁺, las CD inmaduras captan antígenos exógenos particulados que pueden ser presentados por moléculas de MHC clase I mediante un proceso denominado como presentación cruzada (Nierkens et al., 2013).

Como se observa en la figura 11, la presentación cruzada se puede producir por dos vías: la vía de endosoma a citosol desde vesículas endosómicas hacia el citosol donde el antígeno es procesado por el proteasoma y cargado en moléculas MHC – I en el retículo endoplasmático, y la segunda vía en cambio es independiente del citosol y proteasoma; en ella las células dendríticas utilizan proteasas endosómicas para procesar y cargar los antígenos directamente a MHC – I (Nierkens et al., 2013). Sin embargo, esta capacidad tiene influencia de diferentes factores (Figura 12): tipo de antígeno (solubles, particulados o asociados a células), presencia de factores estimuladores de CD y sincronización y fase de la respuesta inmune

Figura 11.

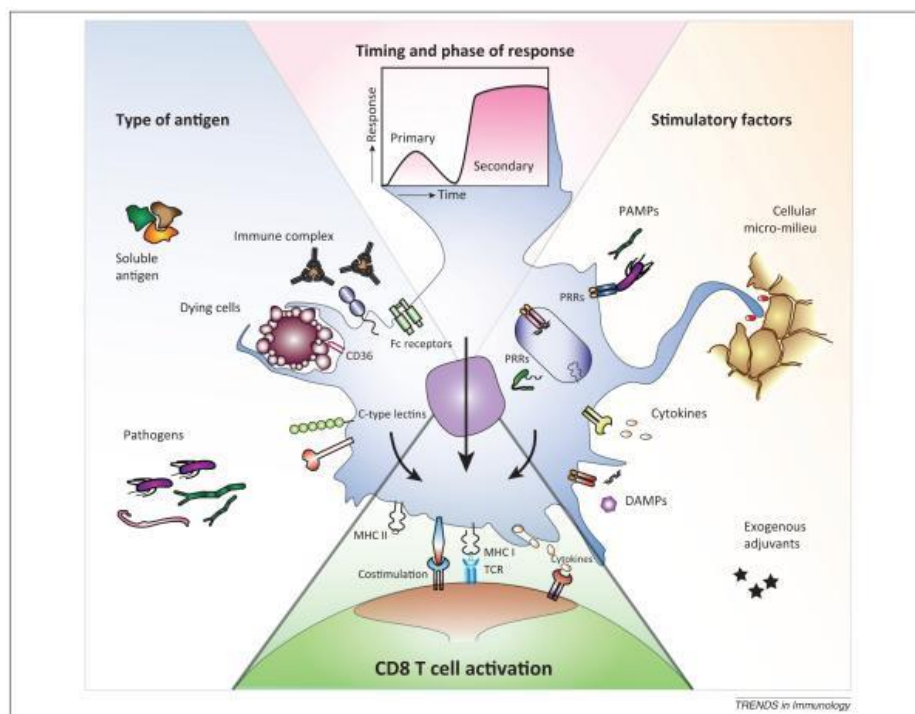
Presentación cruzada de células dendríticas.



Nota: tomado de Kumar et al (2019).

Figura 12.

Factores que intervienen en la presentación cruzada de antígenos.



Nota: tomado de Nierkens et al (2013).

Internalización de Nanopartículas por Células Dendríticas

La absorción, internalización y eliminación de nanopartículas por células dendríticas depende principalmente de su tamaño y carga (Y. P. Jia et al., 2017); la unión de proteínas a las nanopartículas alteraría sus propiedades físico químicas, las NPAu, principalmente, formarían una corona de proteínas alterando su carga superficial facilitando de esta manera la captación celular a través de endocitosis mediada por receptores, además de evitar la agregación de las mismas (Ahmad et al., 2017).

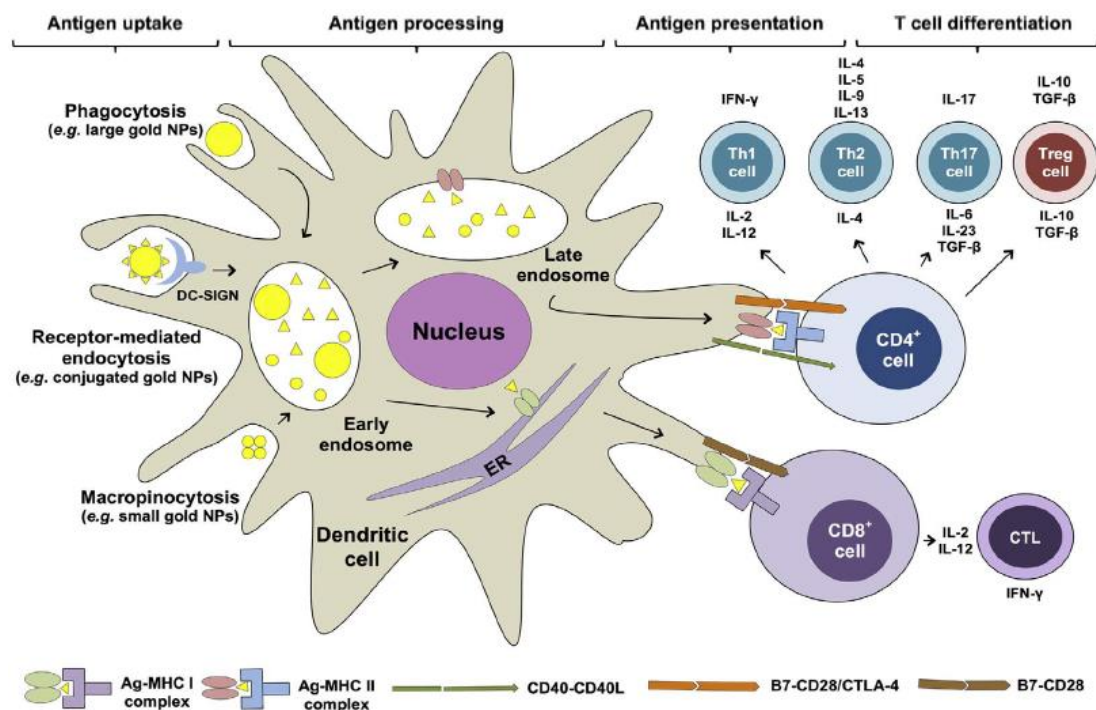
Según Jia et al (2018) mencionan que las células dendríticas reconocen a las nanopartículas y pueden utilizar las tres vías (Tabla 3) para permitir su ingreso, las de pequeño tamaño son fácilmente absorbidas pero su toxicidad es alta. Nanopartículas de 50 nm son

absorbidas de manera más eficiente sin embargo pueden agregarse dentro de las células (Ahmad et al., 2017), la relación entre tamaño y mecanismo de ingreso se describe en la figura 13.

Dependiendo su forma de activación, las células dendríticas pueden interactuar con células T auxiliares (Th) principalmente Th1, Th2 y Th17, en este caso las nanopartículas cuentan con la capacidad de inducir a las células dendríticas la activación de los Th mencionados anteriormente (Figura 13); la relación tamaño y la química de superficie de las nanopartículas de óxidos metálicos también lograrían potenciar la presentación cruzada de antígenos (J. Jia et al., 2018).

Figura 13

Mecanismos de ingreso de nanopartículas.



Nota: tomado de Ahmad et al (2017).

Terapia con Células Dendríticas

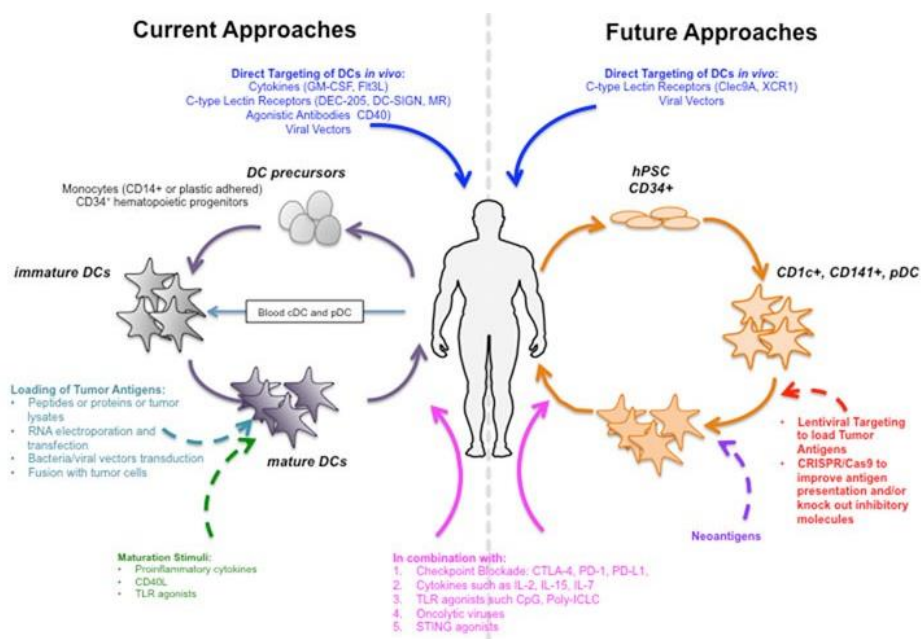
En las últimas décadas se han realizado amplios estudios con células dendríticas murinas y humanas, varios en fase preclínica y aproximadamente 1000 ensayos en las diferentes fases clínicas registrados en Clinical Trials y EU Clinical Trials Register; la mayoría de los ensayos clínicos buscan aprovechar su prevalencia mediante manipulación *in vivo* y *ex vivo* de precursores de células dendríticas como MoDC para provocar la inmunidad de células T. Una de sus principales aplicaciones es el uso de células dendríticas tolerogénicas como base de vacunas contra diferentes enfermedades como: diabetes (NCT02354911), artritis reumatoide (NCT01352858), enfermedades autoinmunes como Crohn y tumores, además de su papel importante en el trasplante de órganos (NCT02252055) (Flórez-Grau et al., 2018).

En ensayos *in vivo* murinos, para lograr la cantidad necesaria de células dendríticas se emplea MoDC cultivadas a partir de precursores de médula ósea con la ayuda de diferentes factores de diferenciación: GM-CSF sin la necesidad de IL-4 debido a que IL-4 no es necesaria en ratón a diferencia de humanos (Santana-Magal et al., 2018). Las MoDC comprenden aproximadamente el 10-15 % de las poblaciones de células dendríticas a diferencia de los precursores de bazo cuyo total de células es de 0.3-0.8 %, sin embargo, el uso de MoDC para el desarrollo de vacunas es limitado debido a que el procedimiento no se puede realizar en humanos, además no existe suficientes señales tumorales para ser activadas (Santana-Magal et al., 2018); Según Vourekas y colaboradores (2016) el uso de MoDC a partir de precursores BM activados con IgG pueden prevenir el crecimiento tumoral en entornos proliferativos y conducir a la erradicación de tumores.

En humanos no se conoce el mejor subconjunto de células dendríticas, debido a que no son comparables entre sí, por ello se requiere conocer el rendimiento, número de CD a inyectar en un rango de 0.3×10^6 a 200×10^6 , dosis de administración y ruta de inyección; para conseguir una respuesta inmune eficiente, potente y de largo plazo (Figura 14) (Sabado et al., 2017).

Figura 14.

Inmunoterapia con células dendríticas en humanos.



Nota: tomado de Sabado et al (2017).

Fuentes de Aislamiento de Células Dendríticas en Humanos y Ratones

En humanos las células dendríticas se pueden aislar a partir de células mononucleares de sangre periférica o del progenitor común de células dendríticas que se encuentra en sangre de cordón umbilical, médula ósea y tejidos linfoides (Solano-Gálvez et al., 2018), las CD representan aproximadamente el 0.2 % del total de células mononucleares; *ex vivo* son fenotípica y funcionalmente similares a las que se encuentran en sangre, por ello para su aislamiento se requiere centrifugación en gradiente de densidad de sangre periférica, la

población de baja densidad resultante contiene de 20 % a 80 % de células dendríticas libres de linfocitos; o se puede realizar un proceso de leucoféresis para devolver a circulación el resto de sangre (Nair et al., 2012).

En el ratón el aislamiento de células dendríticas de los diferentes tejidos de su cuerpo es complejo debido a la baja cantidad de células aisladas, sin embargo su cultivo facilita experimentos que las involucran, las CD se encuentran en diferentes áreas: piel, bazo, pulmones y sangre (Allen & Walker, 2013). Su aislamiento a partir del bazo da como resultado una población celular rica en células accesorias y presentadoras de antígenos, para ello se debe realizar una digestión con colagenasa a suspensiones de esplenocitos logrando un aumento en el número de células dendríticas con un total del 95 %, en cambio, a partir de células progenitoras de médula ósea se obtiene mayor cantidad de CD (APC endógenas) cuando se cultivan en presencia de GM-CSF obteniendo aproximadamente de 5 a 10×10^6 células para su uso en estudios de biología celular e inmunización *in vivo* (Inaba et al., 1998).

Nanomedicina

Según Fornaguera y García (2017) la nanomedicina es considerada como un campo de investigación interdisciplinado resultante de la aplicación de nanotecnología y medicina empleando herramientas a nanoescala para diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades gracias a la versatilidad para adaptar un medicamento transformándolo a una molécula bioactiva que asegura su liberación en la ubicación, concentración y tiempo adecuado.

El término aparece en 1990 y fue hasta 1995 cuando la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) aprueba por primera vez el uso de un producto nanoterapéutico denominado Doxil a base de nanoliposomas PEGligados como tratamiento al cáncer (Zingg & Fischer, 2019). Sin embargo, es necesario conocer las precauciones sobre los

posibles efectos secundarios, para ello se debe comprender las propiedades físico químicas del nanoportador o nanomedicina las cuales pueden influenciar en su destino y varias respuestas biológicas (Pelaz et al., 2017). Hasta 2017 de todas las publicaciones realizadas en base a nanomedicina aproximadamente el 10 % de ellas se encuentran comercializados y aprobados por la FDA y en igual cantidad por la EMA en Europa debido a la falta de información acerca de la seguridad y eficacia de su uso (Fornaguera & García-Celma, 2017).

Nanopartículas

Las nanopartículas son pequeñas partículas que oscilan entre 1 a 100 nm de tamaño con propiedades físicas, químicas y biológicas únicas a nanoescala en comparación a las partículas de gran tamaño debido a que su área superficial es mayor al volumen, por ello, poseen mayor reactividad y estabilidad (Ealias & Saravanakumar, 2017). En la actualidad se han introducido nanopartículas en diferentes áreas de interés, en biología y medicina desde diagnóstico hasta terapia de enfermedades, para realizar transfecciones, silenciamiento génico, administración de fármacos como transporte e inmunización.

Según Sokolova y colaboradores (2018) la absorción y citotoxicidad de nanopartículas depende de su tamaño que les permite infiltrarse en tejidos y posteriormente a células, y carga superficial; algunas nanopartículas son químicamente activas porque liberan iones o se disuelven y químicamente inertes cuando actúan solo en presencia de tejidos o células. La mayoría de las líneas celulares eucariotas incluyendo células dendríticas captan nanopartículas fácilmente mediante endocitosis o mecanismos similares, las cuales causan implicaciones importantes en los sistemas biológicos celulares (Panariti et al., 2012).

El impacto generado en las células se ha visto reflejado en la membrana plasmática, tráfico intracelular y perturbación en las funciones celulares básicas ante la posibilidad de usar

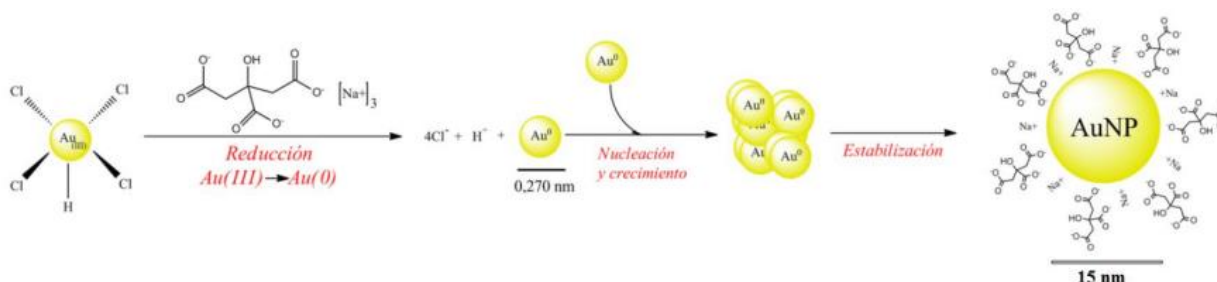
nanopartículas para administrar fármacos o biomoléculas terapéuticas; una de las ventajas de su uso es la posibilidad de cargar nanopartículas con altas concentraciones de fármacos y modular la biodistribución y atravesar la bicapa lipídica, además se las puede emplear como agentes de contraste de imágenes, sin embargo, el uso práctico de nanopartículas se ha visto limitado por falta de conocimiento sobre su toxicidad. En las células endoteliales y epiteliales las nanopartículas provocan estrés oxidativo generando reacciones inflamatorias y daño en el citoesqueleto y disminución en la producción de ATP, los efectos dependerán del tamaño, forma, carga y composición de las nanopartículas, por ello varias podrán ser consideradas biocompatibles (Panariti et al., 2012)

Nanopartículas de Síntesis Química. Con el uso de síntesis química para la formación de nanopartículas se puede obtener partículas estables en cuanto a su estructura superficial, fase, forma y tamaño ya que permite ajustar las condiciones de reacción como: temperatura, concentración de sustrato, aditivos o pH. Este es un proceso de generación de enfoque ascendente, es decir, a partir de la materia prima hasta la nanopartícula (Nikam et al., 2018).

Los parámetros de reacción como el tipo de precursor, método y velocidad de calentamiento y enfriamiento, temperatura, concentración, propiedades de solvente y adición de este decidirán la forma y tamaño de las nanopartículas. En este procedimiento de generación se requiere un agente reductor y estabilizador durante la síntesis, la forma depende directamente del reductor como por ejemplo: el uso de citrato como reductor y estabilizador (Figura 15) (Kimling et al., 2006).

Figura 15

Síntesis química de nanopartículas de oro.



Nota: tomado de Nikam et al (2018).

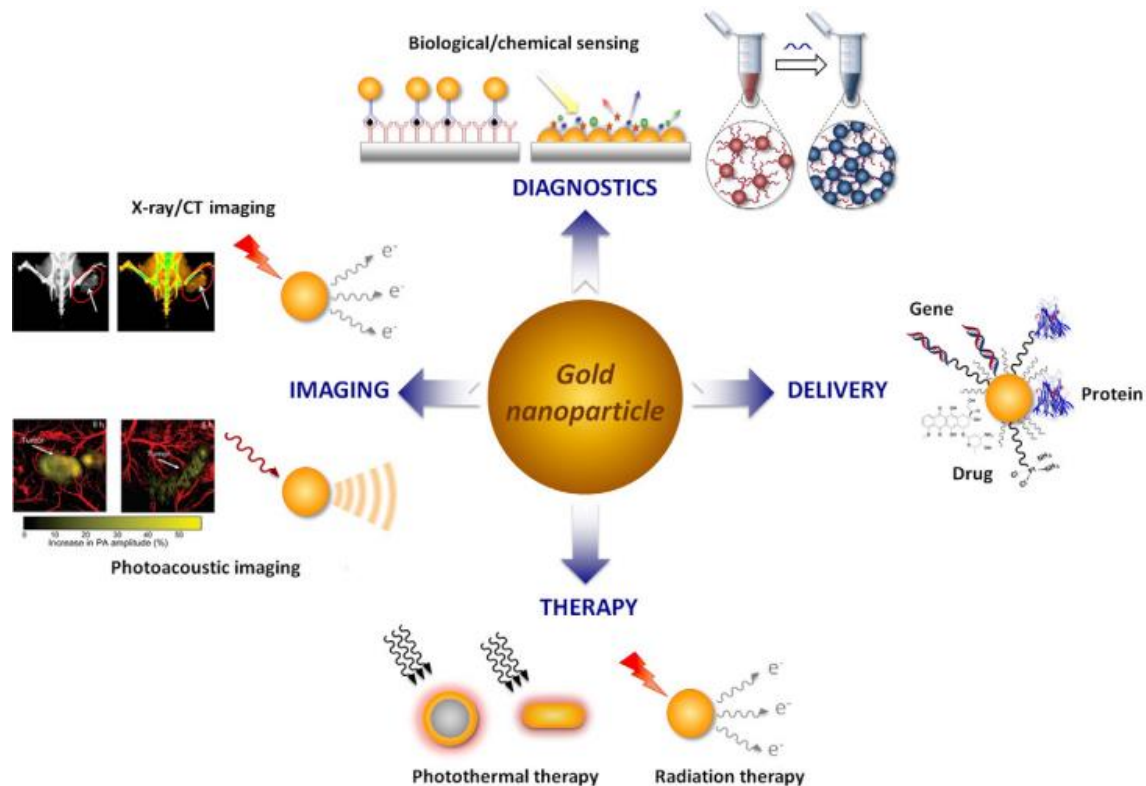
Nanopartículas y Nanomateriales Biocompatibles. A mediados de la década de 1990 entra en el mercado el primer nanofármaco aprobado por la FDA desarrollado en Israel y Estado Unidos, en la actualidad se encuentran más de 35 nanopartículas aprobadas por esta organización y 152 productos en ensayos clínicos reportados hasta 2019 (Anselmo & Mitragotri, 2019) la mayor parte en estudios preclínicos, entre ellas se encuentran: nanopartículas poliméricas, liposomas combinados con medicamentos, nanopartículas micelares, nanocristales, nanopartículas de metales inorgánicos como hierro; gran parte de nanopartículas aprobadas por la FDA y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) son utilizadas como mecanismos de administración de fármacos (Gitanjali et al., 2014).

En la lista de productos aprobados por la FDA se encuentran principalmente nanopartículas liposomales y poliméricas, para el año 2015 aumenta significativamente a partículas micelares, metálicas y proteicas; solo tres productos a base de nanopartículas de hierro han sido aprobadas por la FDA completando los ensayos clínicos necesarios para el tratamiento de anemia relacionada con la enfermedad renal crónica, terapia tumoral o agente de imagen, de los cuales dos fueron retiradas del mercado debido a que las moléculas eran absorbidas por células sanas (Bobo et al., 2016).

Las nanopartículas de oro (NPAu) son las más usadas en biomedicina debido a que el oro es considerado biológicamente no reactivo, por lo que se las recomienda en aplicaciones *in vivo* como se observa en la figura, poseen fuertes propiedades ópticas, térmicas, de superficie fácilmente controlable y su control en forma y tamaño durante la síntesis (Gitanjali et al., 2014), sin embargo, no se han registrado ensayos clínicos aprobados por la FDA con nanopartículas pero si como oro en estado coloidal (Bobo et al., 2016)

Figura 16

Aplicaciones biológicas de las nanopartículas de oro.



Nota: tomado de Her et al (2017).

Nanopartículas de Oro

Gracias a diferentes características, las nanopartículas de oro han sido propuestas como herramientas en inmunoterapias; son personalizables en cuanto a su forma y tamaño, de estas características depende la interacción con células objetivo. Nanopartículas menores a 2 nm son internalizadas fácilmente por la célula a través de la difusión pasiva, la elevada energía superficial y la afinidad de ellas con otras moléculas permiten su unión mediante enlaces covalentes y no covalentes, son químicamente inertes y relativamente estables (Ahmad et al., 2017).

Poseen propiedades ópticas únicas como una fuerte dispersión y absorción de luz mejorada por la resonancia de plasmón superficial y la estabilidad coloidal importante para su introducción en un medio biológico (Arosio et al., 2011), se caracteriza por una densidad de carga superficial negativa garantizando estabilidad coloidal lo que evita efectos tóxicos (Fogli et al., 2017).

Su preparación, química de superficie y biocompatibilidad justifican el uso de nanopartículas de oro en bioprocesos (Arosio et al., 2011); en cuanto al tamaño de NPAu pueden variar entre 14 y 100 nm debido a que se incorporan fácilmente a células de mamíferos y no indican citotoxicidad, nanopartículas menores a 13 nm indujeron varios efectos adversos relacionados con la viabilidad celular; por lo tanto, su citotoxicidad se encuentra relacionada con el tamaño, concentración y carga superficial (Yen et al., 2009).

Síntesis de Nanopartículas de Oro. El tamaño y forma de las nanopartículas depende del método de síntesis y los agentes reductores y estabilizantes empleados, generalmente para la síntesis química se emplean sales de oro (III), tetracloroaurato de hidrógeno (HAuCl_4); el método

más utilizado es el descrito por Turkevich en 1951 el mismo que fue modificado años más tarde por Frens, quien introdujo citrato trisódico que actúa como agente reductor y estabilizador (Ahmad et al., 2017).

El oro trivalente (Au^{3+}) se reduce a oro monovalente (Au^0) por el citrato, este se oxida a dicarboxilato de acetona (DC^{2-}), la relación molar de citrato de sodio empleado durante la reacción tiene efecto en el tamaño resultante de nanopartículas, a mayor relación molar de citrato, mayor velocidad de nucleación por lo tanto, NPs más pequeñas, el orden de adición de ácido cloroáurico y citrato de sodio permite una distribución homogénea del tamaño de partícula, en cambio, la temperatura no juega un papel importante durante la síntesis, el pH en el medio de reacción se encuentra relacionado con el tamaño y cinética de la nanopartícula debido a su efecto en la hidrólisis de citrato y HAuCl_4 . La etapa de nucleación es rápida a valor de pH entre 3.7 – 6.5 como consecuencia el tamaño de las nanopartículas disminuye de 22 a 11 nm, cuando el pH aumenta de 5.4 a 7.5, aumenta a 28 nm el tamaño de la nanopartícula (Gao & Torrente-Murciano, 2020).

Para aplicaciones biológicas la estabilidad juega un papel importante, una disminución conlleva una pérdida parcial o total de propiedades a nanoescala alterando su absorción celular, biodisponibilidad y toxicidad; la aglomeración, agregación, dispersión, sedimentación y disolución son procesos relevantes de estabilidad, estos procesos dependen de propiedades fisicoquímicas de las partículas que intervienen en la formación (Islam et al., 2019).

Según Gao y Torrente (2020) las nanopartículas de oro sintetizadas con el protocolo de Turkevich son estables al menos 5 meses debido a la presencia de DC^{2-} (producto intermedio de la oxidación de citrato) y citrato durante la reacción.

Aplicaciones Biológicas de las Nanopartículas de Oro. Gracias a sus propiedades este tipo de nanopartículas han sido estudiadas y utilizadas para inmunoterapias y desarrollo de vacunas, por su pequeño tamaño tienden a acumularse principalmente en células inmunes y de forma pasiva en tumores sólidos o en fugas, para desarrollar su capacidad inmunomoduladora depende de varios factores como: selección de células u órganos, capacidad de absorción celular y cinética de liberación (Hubbell et al., 2009).

Las nanopartículas de oro podrían ser un método alternativo a la quimioterapia convencional con efectos secundarios nulos o poco agresivos, también tienen la capacidad de ser conjugadas a medicamentos específicos, es decir, utilizadas como vehículo; varios usos ya se encuentran en ensayos preclínicos y clínicos para su posterior aplicación.

En células dendríticas, las nanopartículas de oro se han visto involucradas en inmunomodulación ayudando a mejorar la captación de antígenos, direccionamiento intracelular, o pueden funcionalizarse como moléculas de interés y generar direccionamiento efectivo para potenciar la absorción e inicio de la inmunidad adaptativa (Ahmad et al., 2017).

Citotoxicidad de Nanopartículas de Oro. A pesar de que las nanopartículas son inertes y biocompatibles pueden generar niveles de citotoxicidad relacionadas a tamaños pequeños debido a que tienen mayor relación de superficie en interacciones intra o extracelulares, por ejemplo: NP de 10 nm inducen apoptosis en células dendríticas débiles, mientras que NP de 50 nm no tienen efectos citotóxicos incluso al usar concentraciones elevadas de hasta 200 ug/ mL, la toxicidad local o sistémica puede afectar la interacción entre la célula y la NP, la concentración y moléculas de funcionalización también generan citotoxicidad, sin embargo, los niveles generados son menores en comparación con otro tipo de nanopartículas que causan daño al material genético (Ahmad et al., 2017).

In vivo los efectos tóxicos y bioacumulación dependen de la forma, tamaño y vía de administración de las nanopartículas de oro, se ha registrado acumulación en órganos como: hígado, riñón y bazo (Y. P. Jia et al., 2017); sin embargo, no se evidencian efectos tóxicos cuando las nanopartículas han sido sintetizadas con citrato y poseen carga negativa (Yen et al., 2009), en el sistema inmune las células se mantienen viables en un 90% con NP de hasta 100 nm. Las partículas más pequeñas catalizan la producción de NO a partir de especies reactivas de nitrógeno endógenas lo que desencadena necrosis celular o apoptosis, aquellas que producen ROS se pueden degradar mediante autofagia y ejercer menos daño al ADN celular (Y. P. Jia et al., 2017)

Uso de Modelos Animales

Es de vital importancia para realizar estudios en organismos similares anatómica y fisiológicamente al humano para que de esta manera se pueda evaluar nuevas terapias antes de ser aplicadas a humanos, a pesar de obtener resultados positivos en animales no se puede traducir directamente a personas. Una serie de avances en la ciencia e investigación médica se ha conseguido gracias a observaciones y pruebas en animales (Barré-Sinoussi & Montagutelli, 2015). El principio August Krogh (1929), ganador del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1920, fue la declaración que dió paso a la elección de modelos de especies de origen natural “Para una gran cantidad de problemas, habrá algún animal de elección, o unos pocos de esos animales, sobre el que se pueda estudiar más convenientemente”, sin embargo, la variabilidad genética fue una de las causas para crear animales endogámicos (Ericsson et al., 2013).

Principios Éticos con el Uso de Modelos Animales

Los animales de laboratorio pueden y deben ser utilizados como reactivos biológicos y ecológicos para beneficio de la salud pública y ciencia cuando en la investigación no se pueda sustituir por otro organismo; al ser seres vivos se debe garantizar el trato oportuno y merecido, evitando dolor innecesario, sufrimiento, estrés o lesiones prolongadas (Aller et al., 2000). En 1959, Russell y Burch publicaron la estrategia para la aplicación y uso de modelos animales denominado “3R”: reemplazo, refinamiento y reducción para considerar en la elaboración del diseño experimental (Committee for the Update of the Guide for the Animals, 2011).

Los animales de uso común para investigaciones científicas son los mamíferos, característicos por su capacidad homeotérmica, es decir, reaccionan y se adaptan a cambios producidos por su entorno provocando alteraciones fisiológicas y trastornos de conducta; por esta razón, se recomienda emplear animales con uniformidad genética y microbiológica en un ambiente homogéneo para no interferir con el metabolismo normal (Aller et al., 2000).

Mus musculus como Modelo Animal

Mus musculus o ratón doméstico es un roedor de pequeño tamaño de aproximadamente 12 a 30 g (Fundación Charles Darwin, 2014), de maduración sexual rápida en comparación con otras especies de mamíferos, presentan variedad de especies endogámicas, de fácil manejo, cuidado simple y económico; son una herramienta importante para modelar la biología (Society for mucosal immunology, 2014). Genéticamente el ratón y el humano son 95 a 98 % similares en su genoma, fisiología y anatomía, en la tabla 3 se detalla la información básica del genoma de ambas especies.

Tabla 4

Comparación genética entre humanos y ratones.

CARACTERÍSTICA	VALOR PARA RATÓN	VALOR PARA HUMANO
Número de cromosomas	Número haploide = 20 Número diploide = 40	Número haploide = 23 Número diploide = 46
Número de genes	23000 identificados	20000 - 25000
Centimorgans	1500 (75cM entre cromosomas)	3000 (130cM entre cromosomas)
Pares de bases	2,700,000,000	3,200,000,000

Nota Extraído de The Jackson Laboratory (2009).

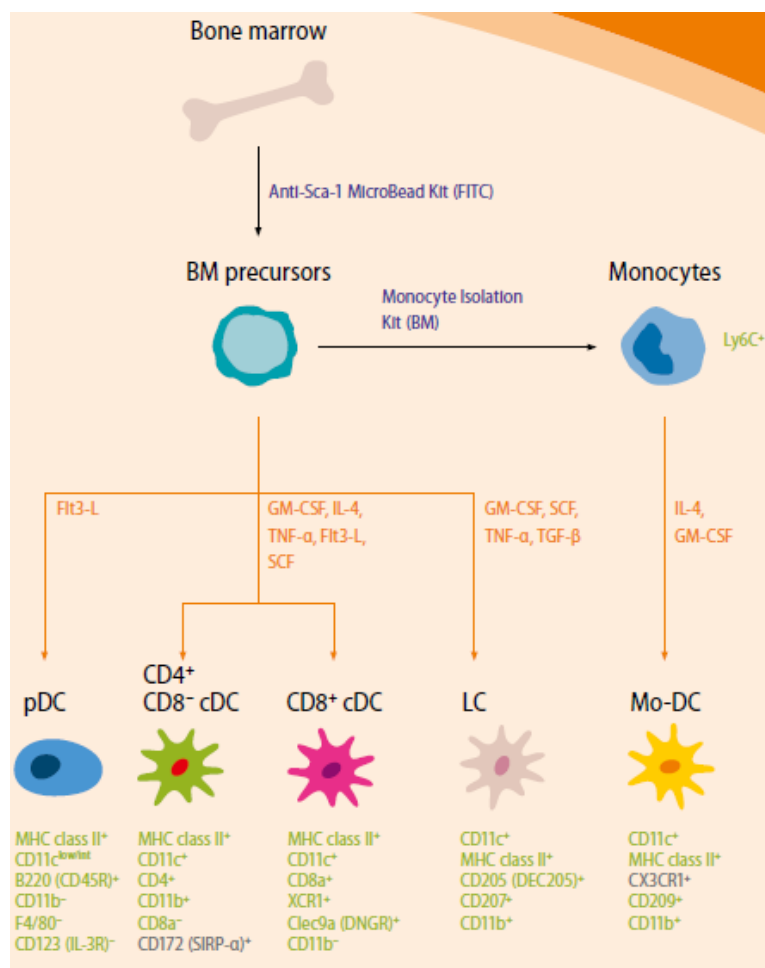
Células Derivadas de Médula Ósea de Ratón (Mus musculus)

Este tipo de células son heterogéneas, se encuentran junto a macrófagos y células de poco interés, se activan fácilmente cuando se encuentran con efectos ex vivo durante su proceso de separación, cultivo y purificación (Jiang et al., 2008). Su principal uso se dirige a aplicaciones terapéuticas, las células derivadas de médula ósea con cualidades adherentes son conocidas como células madre mesenquimales, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos celulares incluyendo hueso y cartílago.

Generalmente se obtienen de ratones jóvenes hembra o macho de 6 a 8 semanas de edad debido a la viabilidad y densidad celular, son similares a las células dendríticas primarias aisladas del bazo, con características mieloides después de exponer a sus progenitores a factores de diferenciación; sin embargo, las BMDC contienen fenotipos variados con respecto a la expresión del MHC - II y diferentes moléculas coestimuladoras como se observa en la figura 17 (Bros et al., 2007).

Figura 17.

Precusores de células dendríticas.



Nota: tomado de Bros et al (2007).

Una de las principales limitantes durante su cultivo es el número relativamente bajo que se puede obtener y la manipulación que requieren, por ello se han desarrollado protocolos basados en la diferenciación de células de médula ósea murina en presencia de citoquinas como: factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) o ligando FLT-3 teniendo como resultado células dendríticas derivadas de médula ósea con propiedades fisiológicas similares a células dendríticas o macrófagos primarios (Kralova et al., 2018).

Líneas Celulares

Líneas Celulares Primarias

Células derivadas de un tejido extirpado, cultivos inicialmente heterogéneos con características fisiológicas similares al estado *in vivo*; tienen una vida útil limitada, dejan de dividirse después de un corto número de divisiones celulares en un proceso denominado senescencia. Las líneas celulares comunes dentro del campo de la investigación son: células epiteliales, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células musculares, células madre hematopoyéticas y mesenquimales (European Collection of Authenticated Cell Cultures, 2018).

Líneas Celulares Continuas o Infinitas

A diferencia de las células primarias, las células continuas tienen la capacidad de proliferar de forma indefinida, es decir, se pueden cultivar durante largos períodos de tiempo (S. R. Wang, 2017) debido a una modificación genética que puede alterar sus propiedades fisiológicas, son más robustas y de fácil manejo a diferencia de las células primarias (European Collection of Authenticated Cell Cultures, 2018).

Inmunoterapia y Nanomedicina

La inmunoterapia ha sido considerada un enfoque de transformación como tratamiento a posibles enfermedades como el cáncer, se ha establecido que esta técnica de terapia dirigida confiere resultados superiores en comparación a los tratamientos estándar debido a que se alteraría la tolerancia inmune local mas no la sistémica; los desarrollos nanotecnológicos y bioingenieriles han permitido mejorar la seguridad y eficacia de la inmunoterapia, de esta manera su acción se concentra en células y ubicaciones particulares (Goldberg, 2019). Las nanopartículas son procesadas y reconocidas por células inmunes entre ellas macrófagos ,donde

su interacción produce IL – 8, quimiocina con la función de atraer y activar neutrófilos potenciando la respuesta inmune innata, además, se ha identificado un aumento en la adhesión y estimulación de células T mejorando la inmunidad adaptativa (Brzicova et al., 2019).

De acuerdo con la normativa vigente de la FDA (2017), previo a ensayos *in vivo* se debe tomar en cuenta la estabilidad y biocompatibilidad de los nanomateriales en contacto con proteínas del medio de cultivo y sangre, debido a que se evidencia una interacción múltiple formando una corona de proteínas. *In vivo* las rutas de administración y bioacumulación son considerados factores determinantes para la implementación de inmunoterapia con nanomateriales, se conoce que las nanopartículas de oro se acumulan en hígado, riñón y bazo sin presentar efectos tóxicos y con posibilidad de ser excretadas (Y. P. Jia et al., 2017).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Localización Geográfica

El proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Inmunología – Virología y Laboratorio de Caracterización de Nanomateriales, pertenecientes al Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, ubicada en Sangolquí, Av. El Progreso s/n, Cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador.

Obtención de Células Mononucleares Derivadas de Médula Ósea

Selección y sacrificio de individuos de experimentación

Se seleccionó ratones hembra y macho de raza BALB/c, entre 9 y 24 semanas de edad, del biomódulo de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE perteneciente al laboratorio de Inmunología y Virología. Para cada ensayo se utilizó de uno a tres ratones, la eutanasia se realizó por dislocación cervical cumpliendo las 3R's.

Obtención de BMDC

Los huesos obtenidos fueron 4 (2 tibias y 2 fémures), se colocaron en etanol al 75 % durante 1 minuto y 2 minutos en PBS 1X estéril, se preparó un microtubo de 1.5 mL y dentro un microtubo de 0.6 mL con un hueco en la base y las tapas cortadas donde se colocó los huesos con las epífisis retiradas después de su exposición a PBS 1X. A los tubos ensamblados se colocó 75 uL de medio RPMI 1640, se centrifugó a 5000 RPM durante 2 minutos, este paso se realizó por duplicado, añadiendo 75 uL más de RPMI, posteriormente se llevó a cabo la lisis de glóbulos rojos, para ello se añadió 500 uL de tampón lisis con homogenización constante durante un minuto y se añadió 500 uL de RPMI 1640, el proceso de lisis finalizó con una centrifugación a

5000 RPM durante 2 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet de células resuspendido en 1 mL de medio RPMI 1640.

Viabilidad Celular en Cámara de Neubauer, Siembra y Condiciones de Cultivo

Para determinar la cantidad de células viables disponibles mediante cámara de Neubauer se realizó una tinción de azul de tripán y se aplicó las siguientes fórmulas:

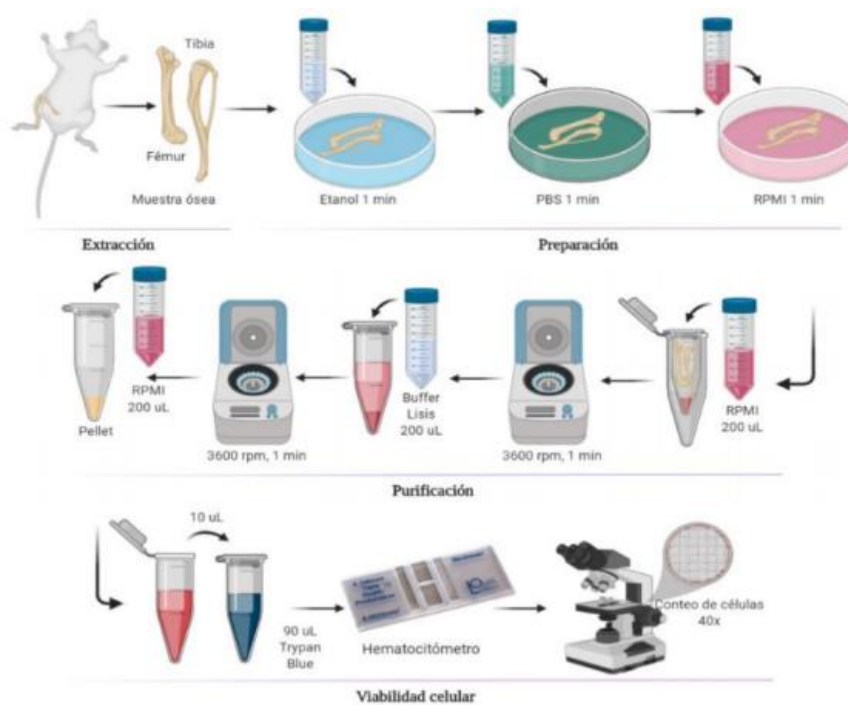
$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{\text{Número de células contadas} * \text{factor de dilución} * 10000}{\text{Número de cuadrantes contados}}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen final}}{\text{Volumen de células}}$$

La cámara de Neubauer se cargó con 10 uL de la dilución para su observación en microscopio óptico de campo claro.

Figura 18

Obtención de BMDC y viabilidad celular.



Nota: Realizado por Alex Gavilanes (2020). Creado en BioRender.com

Una vez conocido el número de células viables se sembró 5×10^6 células en cada caja de cultivo celular con 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 1 % de L-glutamina, 10 % de suero bovino fetal, 0,1 % de β -mercaptoetanol 50 mM, 1 % de penicilina /estreptomicina /anfotericina, 1 % de MEM no esencial y 1 % de MEM piruvato; las células se incubaron a 37 °C y una atmósfera humidificada de CO₂ al 5 %.

Diferenciación a Células Dendríticas y Maduración

A las 24 horas de cultivo se retiró 2 mL de medio a cada una de las cajas de cultivo, posteriormente se añadió 3 mL de RPMI 1640 completo más 20 ng/mL de GM-CSF como control positivo, nanopartículas de oro de aproximadamente 30 nm como tratamiento a 5, 12.5, 25, 62.5, 100, 112.5 y 200 ug/mL de concentración y únicamente medio como control negativo. Las células fueron cambiadas de medio de acuerdo con su requerimiento, cuidando cada tratamiento y controles, es decir, manteniendo las condiciones de cultivo durante 12 días con observación periódica en microscopio invertido. A los 12 días previo a levantar el ensayo las células cultivadas para control positivo fueron expuestas a *Escherichia coli*, se colocó 100 bacterias por cada célula durante 2 horas aproximadamente para lograr la maduración de las células dendríticas diferenciadas.

Para finalizar el ensayo, se realizó dos lavados con 1.5 mL de PBS 1X cada uno, se colocó 2 mL de RPMI 1640 y se levantó las células adheridas, a continuación se centrifugó a 5000 RPM durante 2 minutos; el pellet celular fue resuspendido en 1 mL de medio para calcular la viabilidad celular de acuerdo con el protocolo descrito en el punto 3.2.5, para finalizar se realizó una centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente, se desechó el sobrenadante y el pellet fue almacenado a -20°C.

Extracción de ARN Celular

La extracción de ARN se realizó según las indicaciones del kit SV Total RNA Isolation System, el pellet de células se mantuvo congelado, se añadió 175 uL de buffer lisis y se realizó vortex para destruir las células, se añadió 350 uL del buffer de dilución de RNA para finalizar el proceso de lisis celular se incubó 70°C durante 3 minutos. Luego se centrifugó a 13000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió 200 uL de etanol al 95 %, la mezcla fue transferida a un ensamblaje de tubos (tubo columna y tubo recolector) y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto, se descartó el líquido del tubo recolector y se añadió en la columna RNA wash solution para volver a centrifugar.

En este paso, se preparó la DNAsa y colocó en la columna de extracción, una vez añadida se dejó incubar durante 17 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadió 200 uL de DNase Stop Solution se centrifugó y se añadió 600 uL de RNA wash solution. Para finalizar, se añadió 30 uL agua libre de nucleasas. El ARN obtenido fue cuantificado en el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), la calidad ideal para realizar síntesis de cDNA a partir de ARN se encontró aproximadamente en 2.0 para el ratio 260/280 y entre 1.8 a 2.2 para el ratio 260/230 (Thermo Scientific, 2012), las muestras fueron almacenadas a -80°C para cuidar su integridad.

Síntesis de cDNA

Para obtener cDNA se trabajó con el kit High – Capacity cDNA Reverse Transcription manteniendo condiciones estériles y cadena de frío, inicialmente preparó la mezcla como se describe en la tabla 5.

Tabla 5.

Componentes y volumen para síntesis de cDNA (1X).

COMPONENTE	VOLUMEN (uL)
10X RT Buffer	2.0
25X dNTP Mix (100mM)	0.8
10X Random primer	2.0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1.0
Agua libre de nucleasas	4.2
VOLUMEN TOTAL	10

A continuación, se añadió 10 uL de RNA a una concentración de 200 ng con un volumen total de 20 uL por cada reacción; finalmente, las muestras fueron centrifugadas brevemente e incubadas de acuerdo con el ciclo de termociclado que se describe en la tabla 6.

Tabla 6.

Condiciones de termociclado para síntesis de cDNA.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo
Paso 1	25	10 min
Paso 2	37	120 min
Paso 3	85	5 min
Mantenimiento	4	∞

Diseño de Primers para el Reconocimiento de Células Dendríticas en Ratones (*Mus musculus*)

Para diseñar los primers del ARNm de las proteínas de interés se utilizó los programas Primer Blast y Primer 3, las secuencias para los marcadores de maduración de superficie como CD40, CD11c, CLEC9A, CIITA, MHC-II, y CD86 fueron tomadas de NCBI, para el organismo de interés *Mus musculus*. Los primers diseñados se detallan en la tabla 7.

Tabla 7

Primers para detección de células dendríticas maduras.

PROTEÍNA	SECUENCIAS	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA MELTING (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN
CD40	Forward TTCGGGTTAAGAAGGAGGGCAC	22	62.26	139 pb
	Reverse GCCATCTCCATAACTCCAAAGCC	23	61.56	
CD11c	Forward CACATGGACGGTGCTGAGTTCGG	23	65.89	394 pb
	Reverse TACCCGAGCCATCAATCAGGAACAC	25	64.61	
CLEC9A	Forward GTGGTCTGTATGGGCTTGTTAGC	23	61.48	138 pb
	Reverse CCTCTGCCACTGTGTAAGGTTTC	22	60.87	
CIITA	Forward TCTATGTCCCCTGTCATTGCTTGGA	25	63.59	557 pb
	Reverse AGGTAGCTGGGCCTCTGTGC	20	64.08	

PROTEÍNA	SECUENCIAS	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA MELTING (°C)	TAMAÑO AMPLICÓN
MHC – II	Forward CAACAACACTCCAGATGCCAACGTG	25	64.88	381 pb
	Reverse ACCAGACCCACAAACAACCCAAGAG	25	65.12	
CD 86	Forward AGTGATCGCCAACTTCAGTGAACCT	25	64.45	388 pb
	Reverse GAGCAGCATCACAAGGAGGAGGG	23	64.98	

PCR Punto Final

Se llevó a cabo la amplificación de los segmentos de marcadores de maduración empleando una PCR de punto final, los componentes y condiciones de la PCR se describen en las tablas 8 y 9.

Tabla 8

Componentes de PCR.

Componentes	Concentración final	Volumen final (uL)
Agua DEPC	-	7,5
Cebador Forward	0.1 – 1 uM	1,5
Cebador Reverse	0.1 – 1 uM	1,5
GoTaq Green Master Mix	1X	12,5
cDNA	100 ng/uL	2
Volumen total		25

Tabla 9*Condiciones de amplificación.*

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	
Hibridación	65	30 seg	35
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	7 min	1
Mantenimiento	4	∞	

Las temperaturas de unión de cebadores (hibridación) y el número de ciclos variaron dependiendo el par de primers que se empleó durante la experimentación.

Electroforesis Horizontal en Gel de Agarosa

El producto de la PCR fue identificado por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.5 %, para lo cual, se cargó 10 uL del producto en cada pocillo y 3 uL del marcador de peso molecular de 1 Kb más 2 uL de buffer de carga, la corrida electroforética fue a 90 voltios y 300 mA durante 60 minutos, al finalizar la corrida se reveló el gel en el equipo ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Observación de Células Dendríticas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Las células con las diferentes condiciones de cultivo (tratamientos: 5, 12.5, 25, 62.5, 100, 112.5 y 200 ug/mL de nanopartículas y control +: GM-CSF) se adhirieron a cubreobjetos, fueron lavadas con 500 uL de agua destilada estéril, posteriormente se fijaron con 300 uL de

paraformaldehído al 4 % más 300 uL de RPMI 1640 durante 5 minutos evitando de esta manera shock osmótico, a continuación, se retiró la mezcla y se añadió 600 uL de paraformaldehído al 2 % en PBS 1X durante 40 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se eliminó el paraformaldehído, las células fueron lavadas con 500 uL de agua destilada, para finalizar, se realizó la deshidratación de células fijadas con una secuencia ascendente de etanol (20 %, 40 %, 60 %, 80 % y absoluto) con tiempos de incubación de 15 minutos, el etanol absoluto se dejó evaporar durante 1 hora a 37°C. Una vez fijadas y deshidratadas las células fueron recubiertas con oro durante 90 segundos y se observaron en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) Tescan MIRA 3, detector de electrones secundarios (SE) a 10.0 kV.

Observación de Células Dendríticas Mediante Microscopía Confocal

Se colocó cubreobjetos en diferentes cajas de cultivo para contar con células adheridas al vidrio después de 12 días de cultivo, al finalizar el ensayo con tratamientos (100 ug/mL de NPAu y 20 ng/mL GM-CSF), los cubreobjetos fueron lavados con 1 mL de PBS 1X y transferidos a una placa de 6 pocillos para realizar las diferentes tinciones. Para teñir el citoplasma se colocó 50 uL del marcador fluorescente IMRM 50 uM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente cuidando de la luz.

Posteriormente se realizó dos lavados con PBS 1X y se añadió 4 uL de DAPI (marcador fluorescente para núcleos) en 1000 uL de PBS 1X, se incubó durante 15 minutos y se realizó dos lavados con PBS 1X para retirar el exceso de colorante, todo el procedimiento se realizó en cámara oscura.

Para la observación de las muestras se añadió 30 uL de medio de montaje para fluorescencia, para finalizar se eliminó burbujas y se retiró el exceso de medio, las placas fueron almacenadas a 4°C hasta su observación.

La observación se realizó bajo el microscopio confocal Olympus Fluoview FV1200 con los láseres 458 Multi Argon para DAPI cuya longitud de onda de excitación es 341 nm y de emisión 452 nm de acuerdo con el manual de instrucciones del fluoróforo, y 635 LD para Alexa Fluor 633 con longitud de onda de excitación de 633 nm. En el caso de las nanopartículas de oro, se generó un canal virtual de fluorescencia debido a que por su elevado número atómico ($Z = 79$) en comparación con la materia orgánica, los electrones cruzan la muestra y se dispersan en ángulos dependiendo el número Z generando de esta manera su propia fluorescencia (Jim et al., 2019).

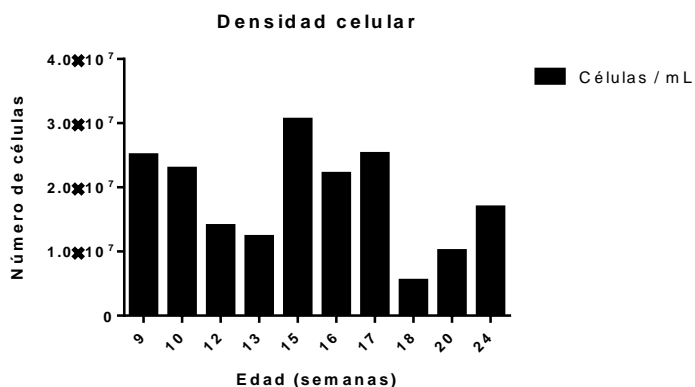
Capítulo III: Resultados

Obtención de Células Mononucleares Viables Derivadas de Médula Ósea de Ratón (*Mus musculus*) (bmDC).

De cada ratón sacrificado se obtuvo 4 huesos (2 fémures y 2 tibias) pertenecientes a sus extremidades posteriores, las células mononucleares murinas viables fueron aisladas de la médula ósea de cada hueso. El análisis estadístico reveló una media de densidad celular de 1.8×10^7 células/mL para un ratón, en la figura 1 se observa que, de los ratones de 9, 15 y 17 semanas de edad se puede obtener mayor densidad celular viable.

Figura 19

Histograma de densidad celular y edad del ratón.

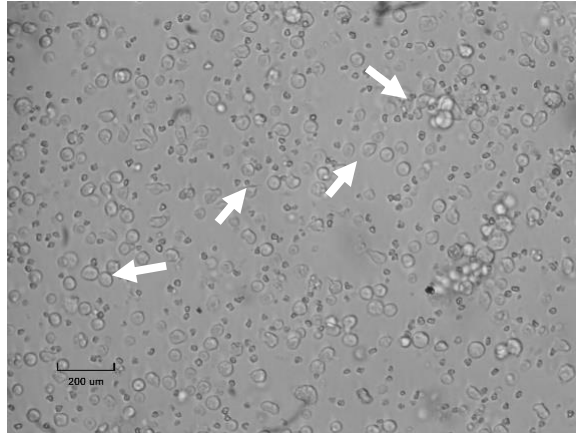


Nota: las densidades celulares se encuentran entre 5.5×10^6 y 3.05×10^7 células/mL para ratones BALB/c de 9 a 24 semanas de edad.

Se sembró 5×10^6 células en cada caja de cultivo, las células fueron observadas en microscopio invertido, donde se evidencia (Figura 20) una población heterogénea de células en suspensión.

Figura 20

Observación microscópica de células mononucleares.



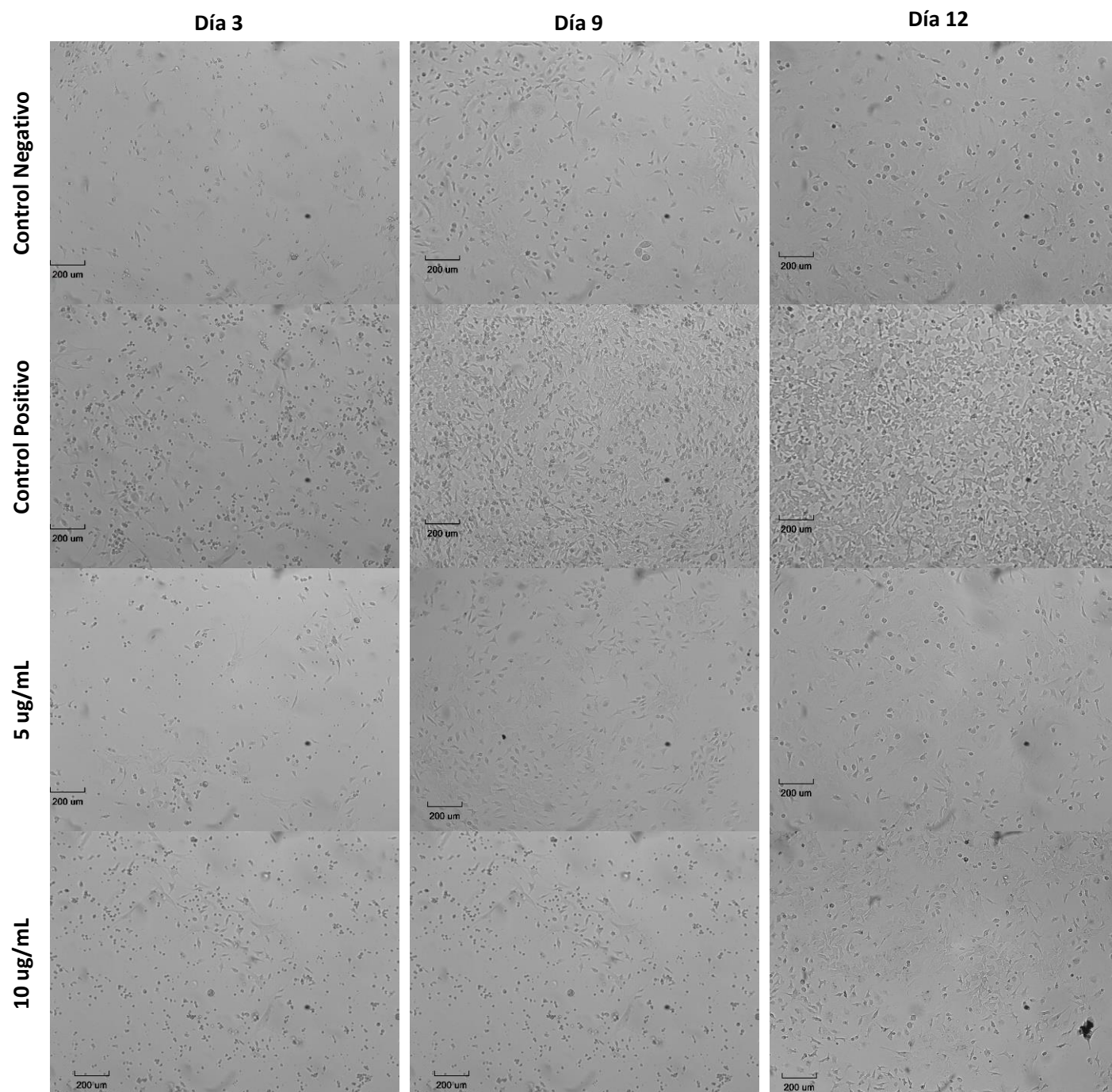
Nota: micrografía a campo claro de células mononucleares derivadas de médula ósea de ratón en suspensión (flechas), tiempo de cultivo = 0 días, magnificación 400X.

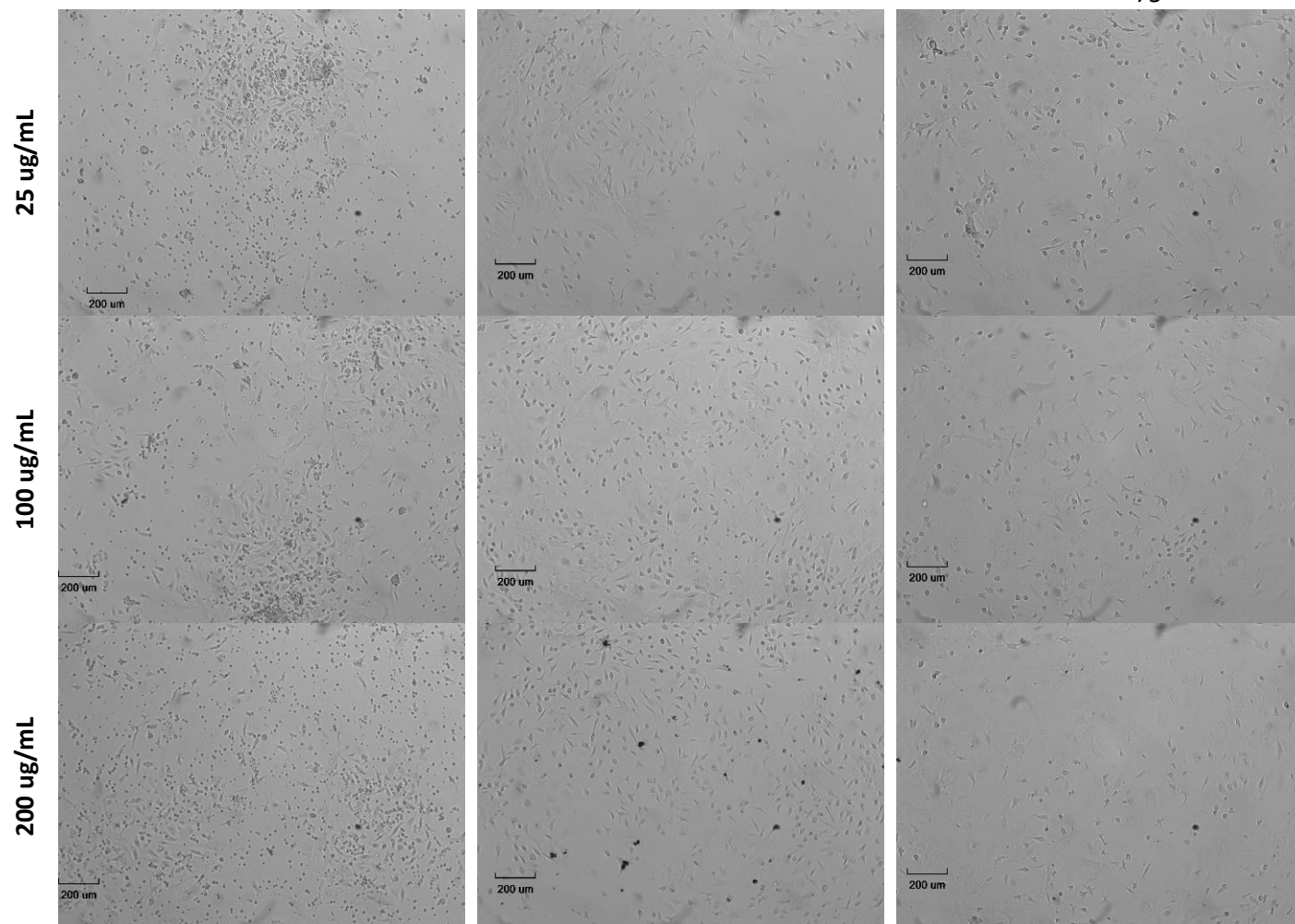
Ensayo de Diferenciación a Células Dendríticas y Maduración con Nanopartículas de Oro

Tras 24 horas de cultivo las células adheridas y semi adheridas recibieron dosis de nanopartículas de oro en solución a diferentes concentraciones (5, 25, 100 y 200 ug/mL) y GM – CSF como control de diferenciación, sus cambios morfológicos fueron observados bajo el microscopio invertido Austria a los 3, 9 y 12 días de cultivo como se observa en la figura 21.

Figura 21

Ensayo de diferenciación y maduración de células dendríticas.



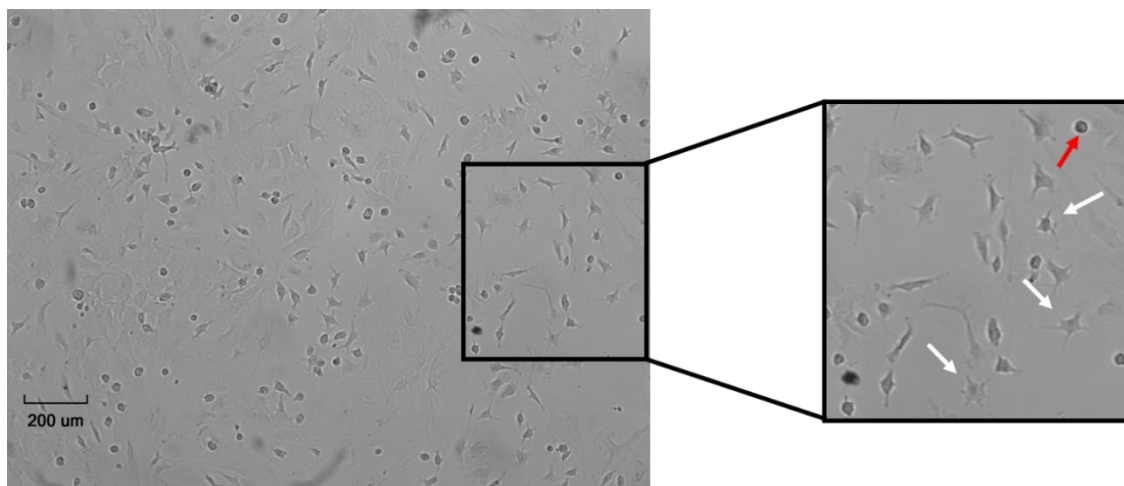


Nota: micrografías a campo claro de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) a los 3, 9 y 12 días de cultivo. Condiciones de ensayo: Control basal, GM-CSF como control positivo, 5 ugNPAu/mL, 10 ugNPAu/mL, 25 ugNPAu/mL, 100 ugNPAu/mL y 200 ugNPAu/mL. Magnificación 400X. Software Microvisible.

Las células con tratamiento (25 ug/mL) semi adheridas a los 12 días de cultivo presentan una estructura circular con proyecciones de membrana semejantes a una estrella como se observa en la figura 22, las células adheridas presentan morfología similar al control positivo (Figura 23) que muestra una formación en monocapa con alta confluencia.

Figura 22

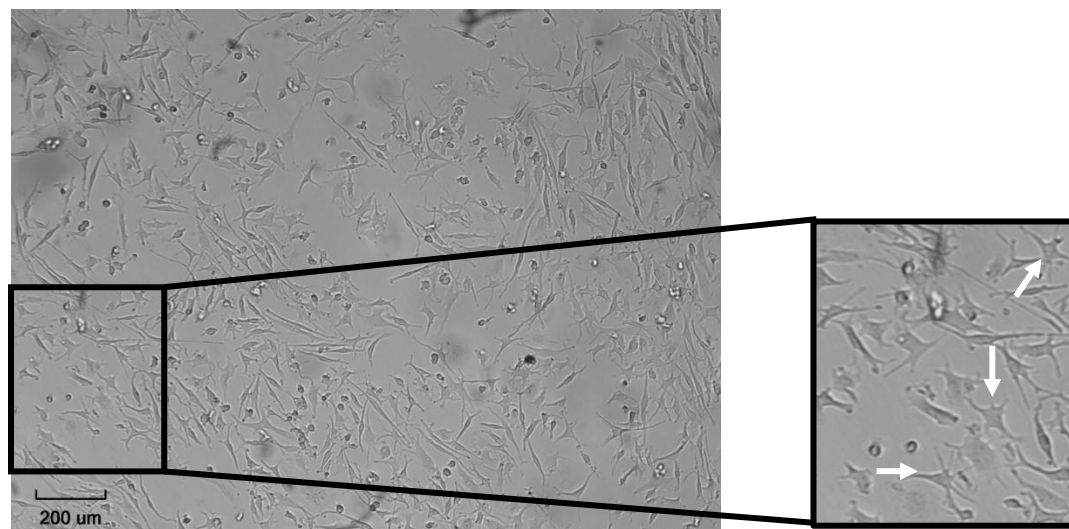
Células dendríticas con nanopartículas de oro aisladas de médula ósea de ratón.



Nota: CD observadas con magnificación 100X, (blanco), las células no diferenciadas permanecen circulares (rojo). Tratamiento: 25 ng/mL, tiempo de cultivo = 12 días.

Figura 23

Células dendríticas con gm-csf aisladas de médula ósea de ratón.



Nota: CD con magnificación 100X, (blanco), las células no diferenciadas permanecen circulares (rojo). Tratamiento: 20 ng/mL GM-CSF, t de cultivo = 12 días.

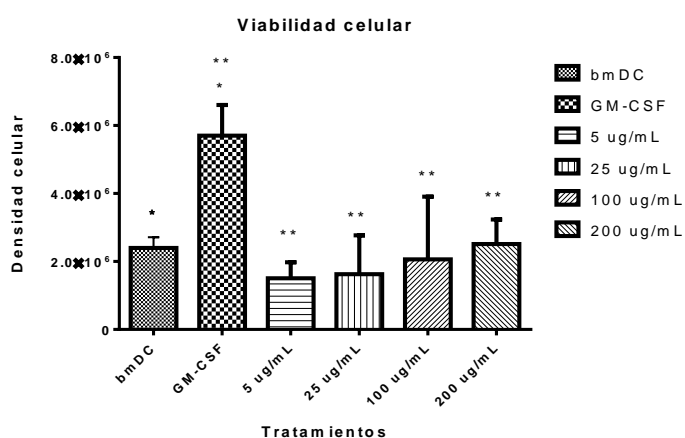
Comprobación de Diferenciación y Maduración de Células Dendríticas

Viabilidad Celular

Al cabo de 12 días de cultivo, 11 con tratamientos (5, 25, 100 y 200 ug/mL NPAu), finalizó el ensayo. Las células se examinaron para determinar la viabilidad celular inducida por las diferentes concentraciones de nanopartículas de oro mediante tinción con azul de tripán, en la figura 24 se observa al control positivo con una densidad celular de 5.6×10^6 células/mL significativamente mayor a los tratamientos y control basal.

Figura 24

Viabilidad celular tras 11 días de tratamiento.



Nota: gráfico de medias y desviación estándar para las diferentes concentraciones del ensayo. *: diferencia de medias entre tratamientos.

Al realizar un análisis de varianza de un solo factor se determinó un valor de significancia de 0.05, del cual se concluyó una diferencia de medias ($p_{\text{valor}} < 0.05$). Con una prueba de Holm Sidak la diferencia se encontró entre los tratamientos con NP y el control basal con el control +, es decir, GM-CSF; entre concentraciones de nanopartículas no se evidencia diferencia significativa ($p_{\text{valor}} > 0.05$).

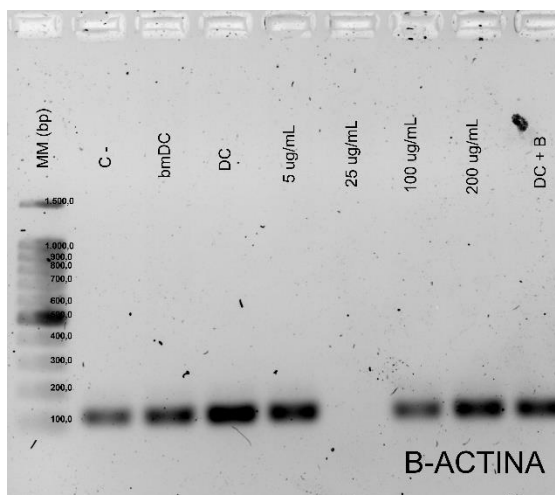
Caracterización de Células Dendríticas derivadas de Médula Ósea de Ratón Mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Electroforesis en Gel de Agarosa

La expresión de factores de coestimulación como: CD40, CD11c, CLEC9A y DC86, y la presencia de MHC-II y CIITA, así como β – actina, gen constitutivo, y P53 indicador de apoptosis o muerte celular se evaluaron mediante PCR y gel de agarosa al 1.5 %.

Las células fueron expuestas a concentraciones de NPAu de 5, 25, 100 y 200 ug/mL; en la figura 25 se observan los amplicones correspondientes a β – actina con un peso molecular aproximado de 121 pb, de igual forma para MHC – II (Figura 26) con un peso molecular aproximado de 381 pb, la banda es más intensa en el control positivo y no se presenta en el control negativo, en las células sin estímulos (bmDC) la banda indica menor intensidad.

Figura 25

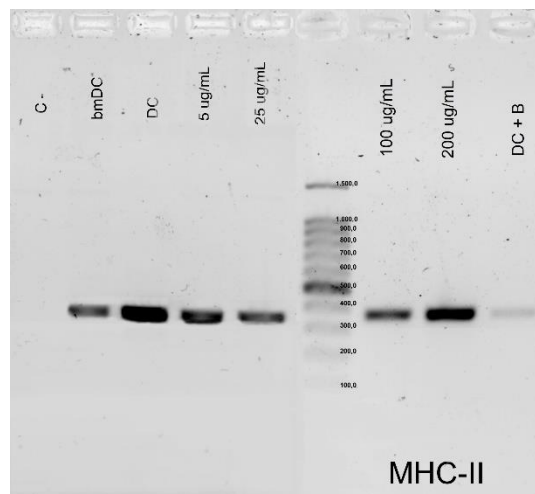
Electroforesis para β - actina.



NOTA: gel de agarosa al 1.5 %. M: 100bp DNA Ladder. C-: células control (0 días de cultivo), bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo, DC+B: células estimuladas con GM-CSF y maduradas con exposición a *E.coli*. En 25 ug/mL error de pipeteo por el operador.

Figura 26

Gel de agarosa para MHC – II.

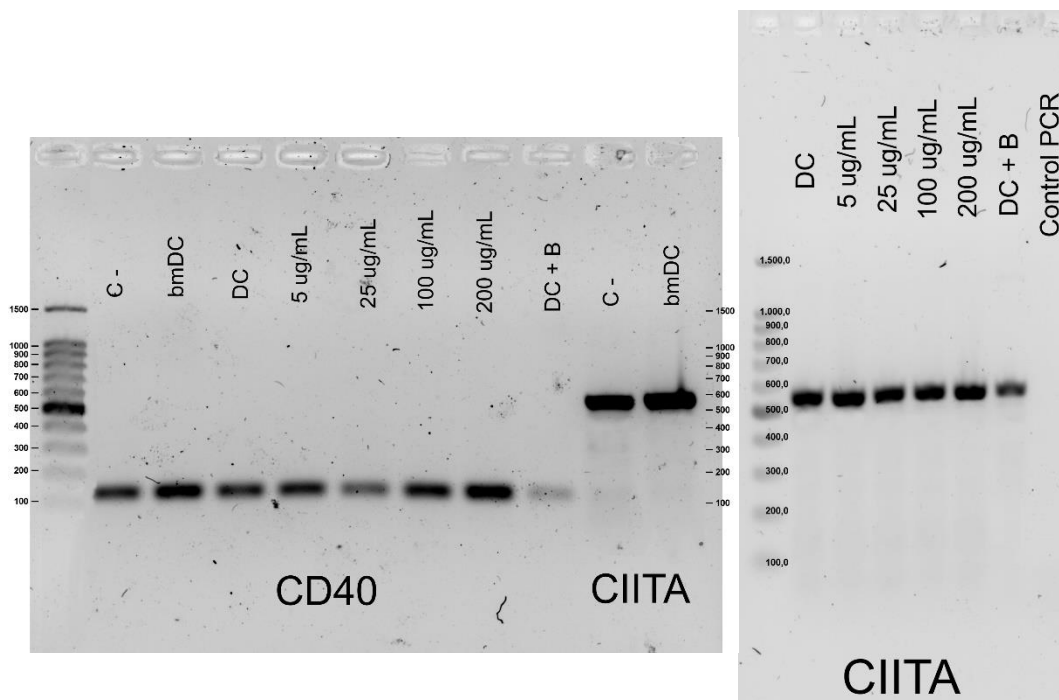


NOTA: Gel de agarosa al 1.5 %. M: 100bp DNA Ladder. C-: células control (0 días de cultivo), bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo, DC+B: células estimuladas con GM-CSF y maduras con exposición a *E.coli*.

En la figura 27 se observa la presencia de bandas únicas para el amplicón del factor de coestimulación CD40 en un peso molecular aproximado de 139 pb, en cambio para la proteína transactivadora de MHC-II, CIITA, el amplicón presentó un peso aproximado de 557 pb, las bandas presentan similar intensidad para todas las muestras.

Figura 27

Electroforesis para CD40 y CIITA.

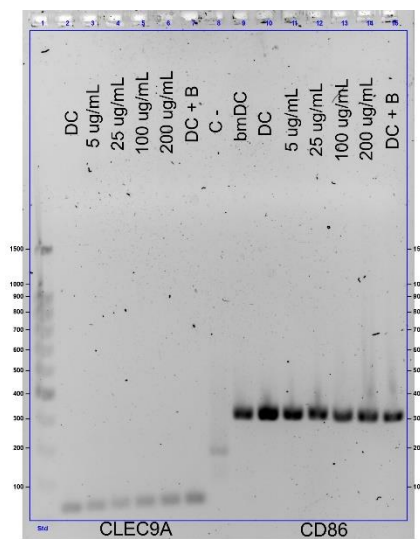


NOTA: Gel de agarosa al 1.5 %. M: 100bp DNA Ladder. C-: células control (0 días de cultivo), bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo, DC+B: células estimuladas con GM-CSF y maduras con exposición a *E.coli*.

En la figura 28 se evidencia bandas únicas para CLECC9A (138 pb) con baja intensidad en todas las muestras y el cofactor indicador de maduración CD86 con un peso molecular aproximado de 388 pb, no se presenta una banda para el cofactor en el control negativo (C-).

Figura 28

Electroforesis para CLEC9A Y CD86.

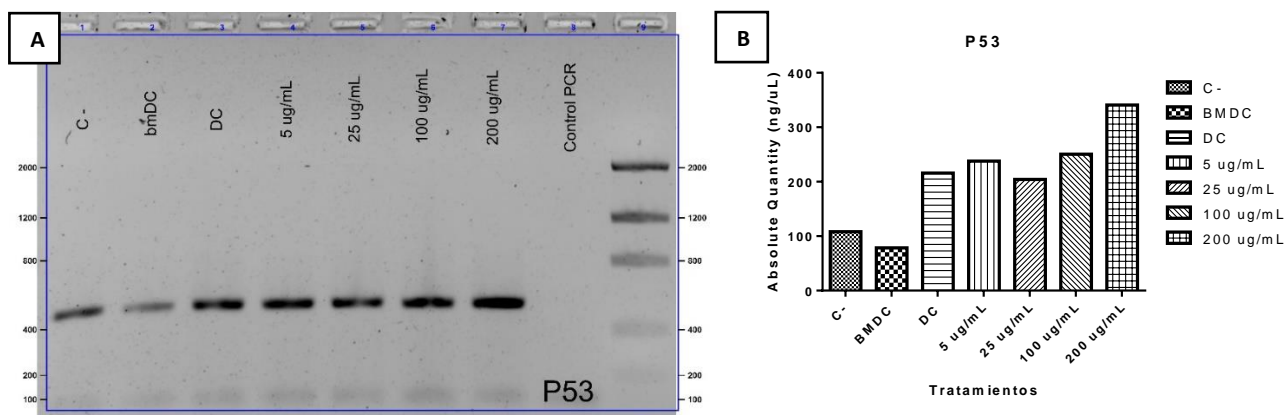


NOTA: gel de agarosa al 1.5 %. M: 100bp DNA Ladder. C-: células control (0 días de cultivo), bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo, DC+B: células estimuladas con GM-CSF y maduras con exposición a *E.coli*.

Finalmente, los resultados para el gen p53 indicador de apoptosis se observan en la figura 29 A, las bandas presentan un peso molecular aproximado de 514 pb, su expresión es mayor para las concentraciones de 5, 100 y 200 ug/mL de nanopartículas (Figura 29 B) indicando muerte celular o senescencia.

Figura 29

Electroforesis para P53 (muerte celular).



NOTA: A) Gel de agarosa al 1.5 %. M: *Low DNA Mass Ladder*. C-: células control (0 días de cultivo), bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo. B) Diagrama de barras de expresión de P53 por densitometría.

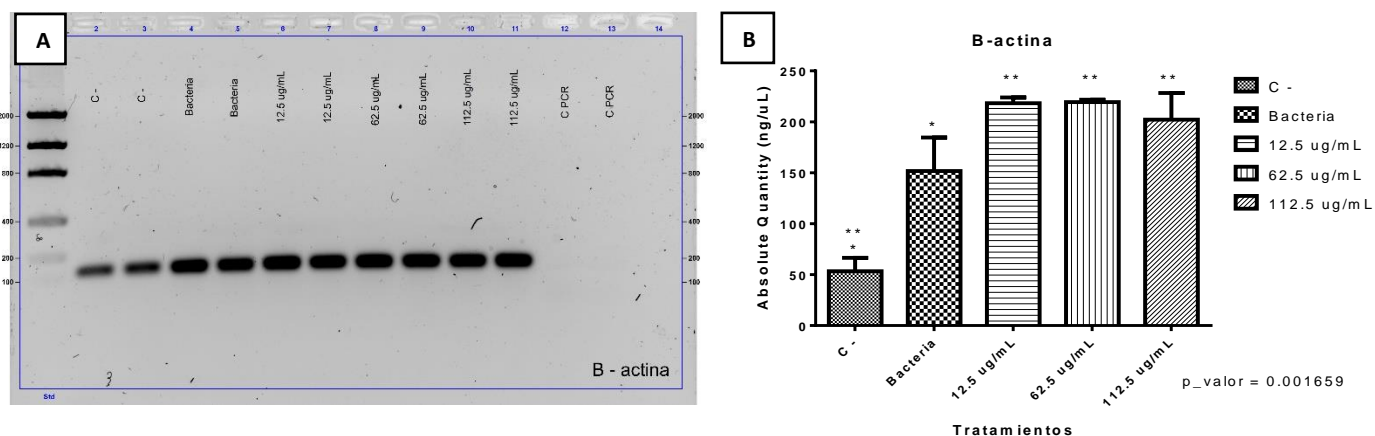
Análisis de Densitometría a partir de PCR End Point y Electroforesis en Gel de Agarosa.

Para el análisis se utilizó como tratamiento NPAu a concentraciones de 12.5, 62.5 y 112.5 ug/mL, células con 0 días de cultivo (control -) y células expuestas a 20 ng/mL de GM-CSF para la diferenciación a células dendríticas más 2 horas de exposición a *E. coli* (100 bacterias/célula) para la maduración de estas para su uso como control +.

Como se observa en la figura 30, la expresión de β – actina (121 pb) es mayor en los tratamientos y control positivo en comparación con el control negativo, la prueba de Dunnett con un p-valor < 0.05 respalda los resultados observados, sin embargo, entre tratamientos de NPAu (12.5, 62.5 y 112.5 ug/mL) no se evidencia una diferencia significativa.

Figura 30

Análisis de expresión de β - actina.



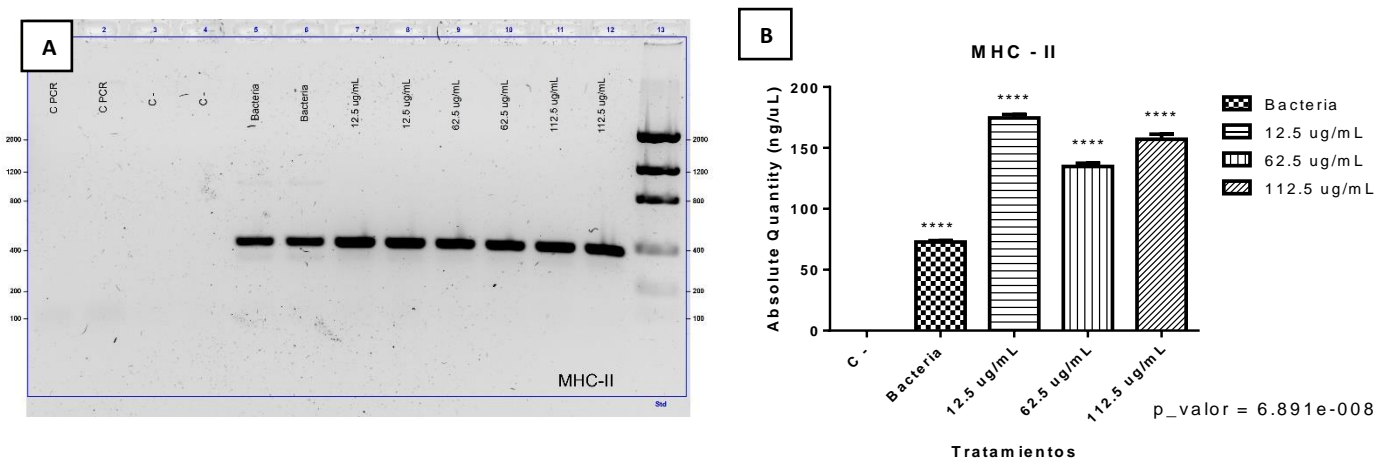
Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de β -actina (121 pb). C-: células no cultivadas.

M: *Low DNA Mass Ladder*. B) Diagrama de barras de expresión de β -actina mediante análisis densitométrico. * = desviación estándar, p_valor < 0.05

La expresión de MHC - II (381 pb) es mayor en células expuestas a 12.5 ug/mL de NPAu (Figura 31) lo que se comprueba con un ANOVA de un solo factor con una significancia de 0.05 y p_valor < 0.05, existe una diferencia significativa de medias entre los tratamientos de NPAu y el control negativo, de igual forma al comparar las medias de los tratamientos con el control positivo mediante una prueba de comparación múltiple de Dunnett.

Figura 31.

Análisis de expresión de MHC – II.



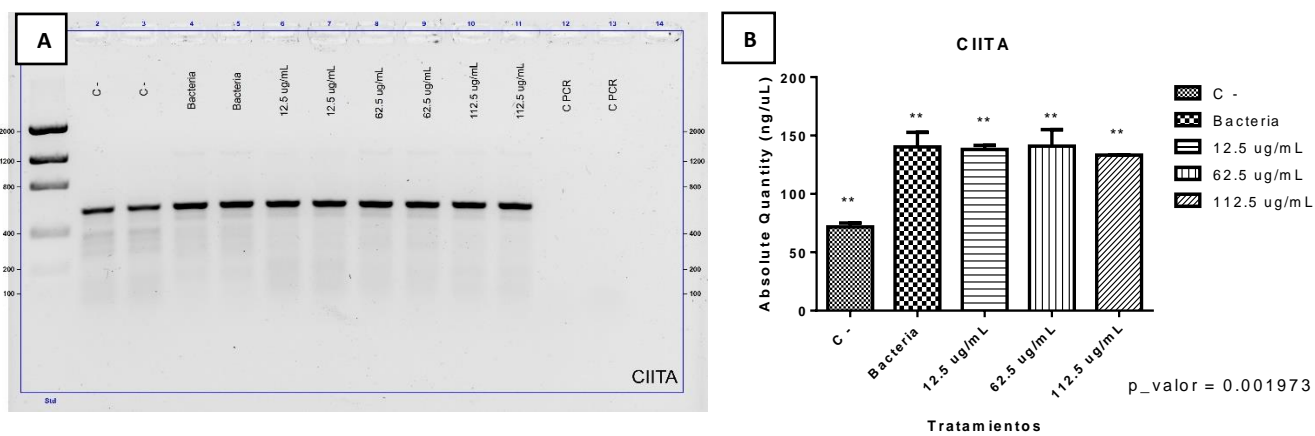
Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de MHC - II (381 pb). C-: células no cultivadas.

M: Low DNA Mass Ladder. B) Diagrama de barras de expresión de MHC- II mediante análisis densitométrico. * = desviación estándar ($p_valor < 0.05$)

La proteína transactivadora de MHC – II, CIITA, con peso molecular de 557 pb (Figura 32 A) se expresó en mayor cantidad en el control positivo y en los tratamientos de nanopartículas de oro (Figura 32 B), con una significancia de 0.05 y $p_valor < 0.05$ se concluye que hay una diferencia significativa entre las medias de los tratamientos y el control positivo con relación al control negativo, en cambio, no se evidencia una diferencia significativa de medias de la expresión del gen entre el control positivo y los tratamientos de NPAu.

Figura 32

Análisis de expresión de la proteína CIITA.

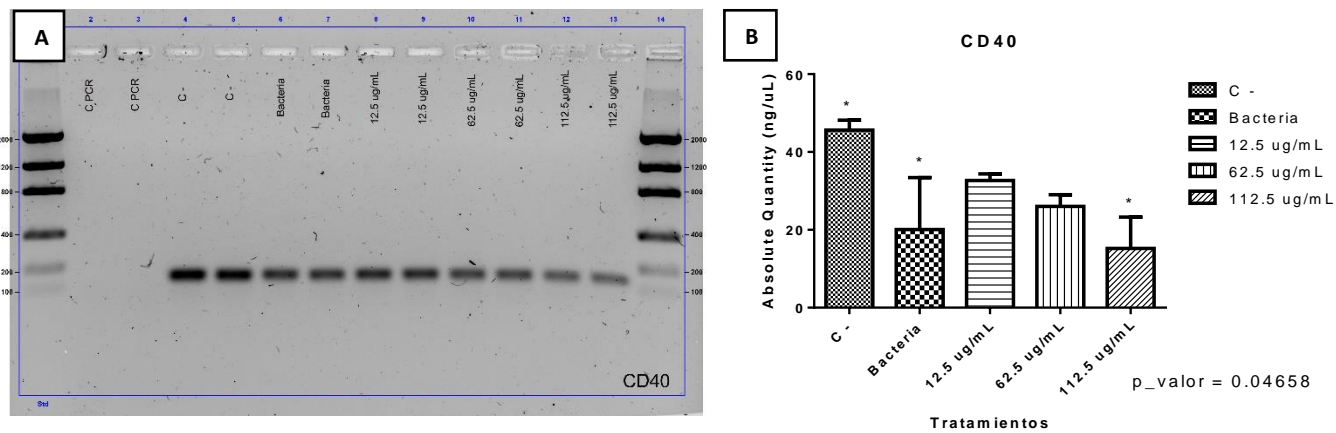


Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de CIITA (557 pb). C-: células no cultivadas. M: *Low DNA Mass Ladder*. B) Diagrama de barras de expresión de CIITA mediante análisis densitométrico. * = desviación estándar, p_valor < 0.05.

El gen que codifica para la proteína CD40 con un peso molecular de 139 pb como se observa en la figura 33 se expresó en mayor cantidad en el control negativo seguido de los tratamientos 12.5 y 62.5 ug/mL a diferencia del control positivo y el tratamiento con mayor concentración, estos resultados concuerdan con el ANOVA y test comparación múltiple de Dunnett, sin embargo, no hay una diferencia significativa de medias entre el control positivo y los tratamientos 12.5 y 62.5 ug/mL de NPAu.

Figura 33

Análisis de expresión del cofactor CD40.

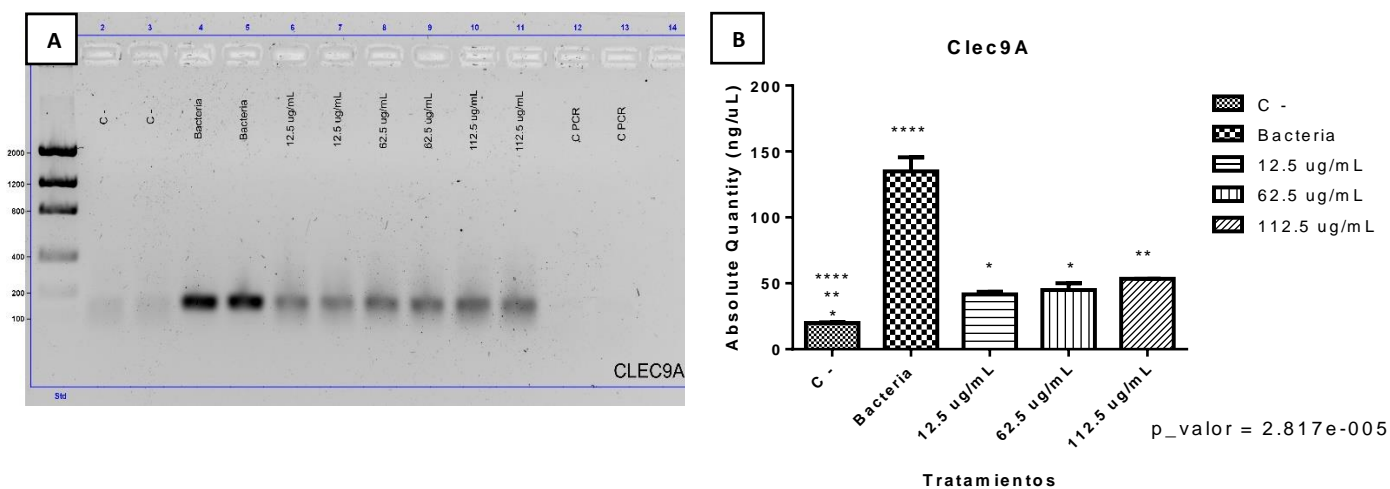


Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de CD40 (139 pb). C-: células no cultivadas. M: Low DNA Mass Ladder. B) Diagrama de barras de expresión de CD40 mediante análisis densitométrico. * = desviación estándar, $p_valor < 0.05$.

En la figura 34 se observa la expresión de Clec9A, cuyo peso molecular es de 138pb, la expresión es significativamente mayor en el control positivo, al realizar la prueba de comparación múltiple de Dunnett se encontró una diferencia significativa en relación con la expresión de Clec9A en el control negativo con el control positivo y los tratamientos de NPAu. No se registra una diferencia significativa al comparar la expresión entre tratamientos con nanopartículas.

Figura 34

Análisis de expresión del gen *CLEc9A*.



Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de *Clec9A* (138 pb). C-: células no cultivadas. M:

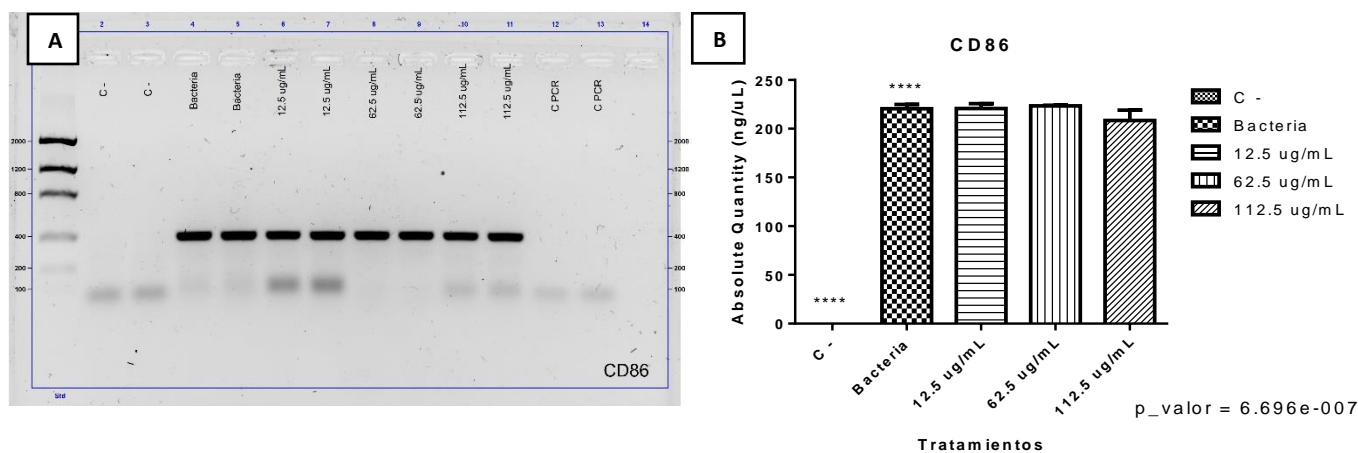
Low DNA Mass Ladder. B) Diagrama de barras de expresión de *Clec9A* mediante análisis

densitométrico. * = desviación estándar, p_valor < 0.05.

El gen que codifica a CD86 con un peso molecular aproximado de 388 pb (Figura 35 A) no se expresó en el control negativo, al realizar la prueba de comparación múltiple de Dunnett no se encontró diferencia significativa entre la expresión de CD86 en el control positivo y los tratamientos con nanopartículas (Figura 35 B).

Figura 35

Análisis de expresión del cofactor CD86.



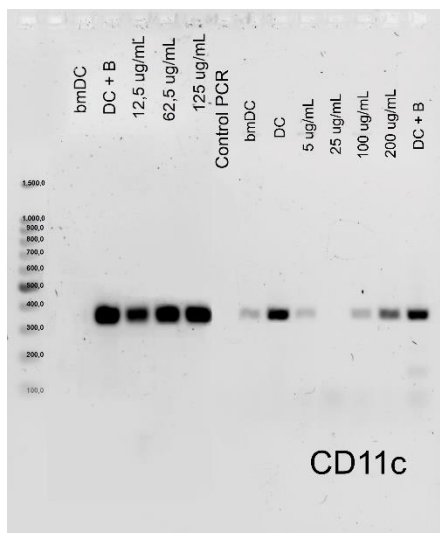
Nota: A) Gel de agarosa al 1.5 % con amplicones de CD86 (388 pb). C-: células no cultivadas. M: Low DNA Mass Ladder. B) Diagrama de barras de expresión de CD86 mediante análisis

densitométrico. * = desviación estándar, p_valor < 0.05.

En todas las concentraciones de nanopartículas de oro incluyendo el control positivo se observa (figura 36) la presencia de bandas que indican la expresión del cofactor CD11c con un peso aproximado de 394 pb; en bmDC, 5 y 100 ug/mL la intensidad de las bandas es baja y en 25 ug/mL no hay la presencia de esta (posible error de operador)

Figura 36

Electroforesis para el cofactor CD11c.



NOTA: Gel de agarosa al 1.5 %. M: 100bp DNA Ladder. C-: células sin estímulos y 0 días de cultivo, bmDC: control basal con 12 días de cultivo sin estímulos, DC: células estimuladas con 20 ng/mL de GM-CSF durante 12 días de cultivo, DC+B: células estimuladas con GM-CSF y maduradas con exposición a *E.coli*.

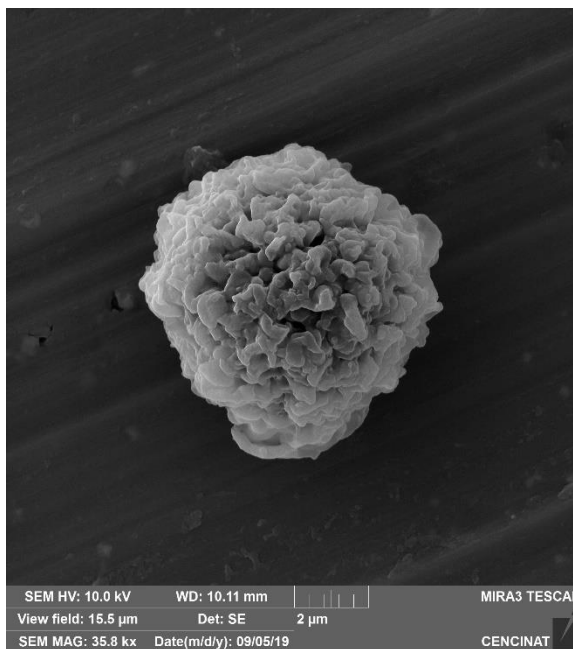
De acuerdo con los resultados obtenidos todas las concentraciones de nanopartículas (de 5,12.5, 25, 62.5, 100, 112.5 y 200 ug/mL) estimulan la diferenciación y maduración de células dendríticas; sin embargo, al emplear 5 y 200 ug/mL de NPAu las células presentaron mayor muerte celular, comparando estos resultados con los de viabilidad (Figura 24) la cantidad de células obtenidas con 5 ug/mL indicaría que esta concentración es tóxica para su uso como tratamiento. Las concentraciones ideales de nanopartículas de oro fueron 12.5 y 25 ug/mL debido a que la expresión de genes de coestimulación y maduración es significativamente mayor.

Observación de Cambios Morfológicos de Células Dendríticas Mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

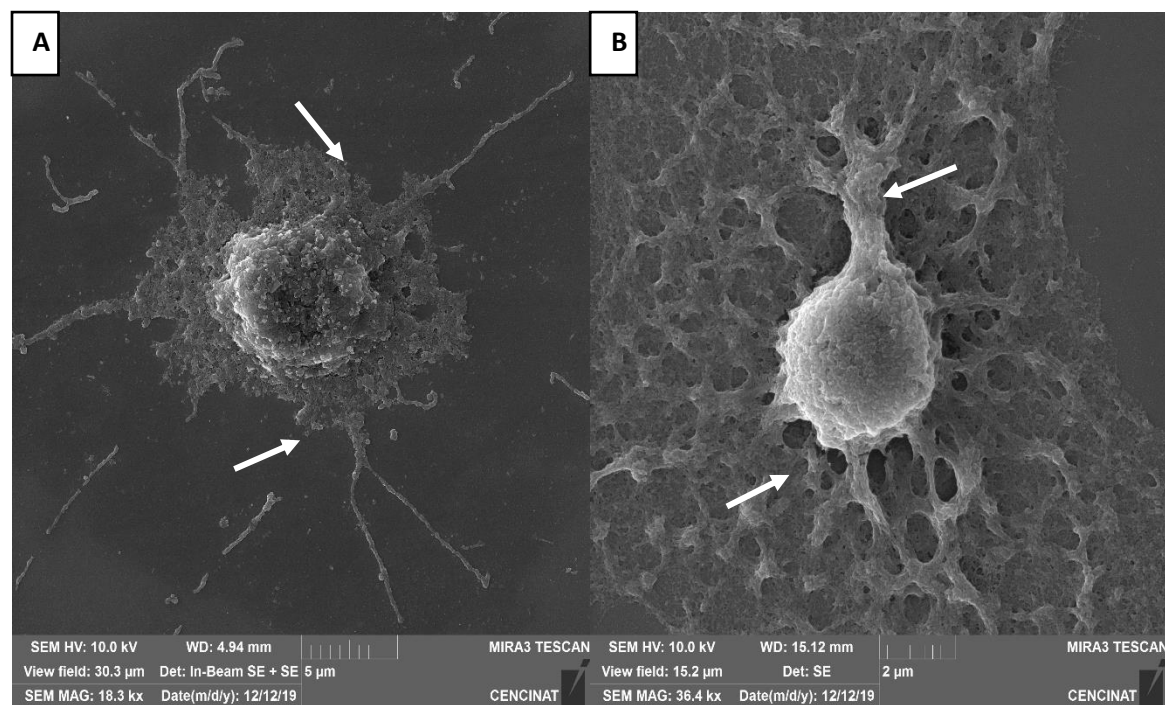
La observación en microscopio electrónico de barrido permitió diferenciar células mononucleares, es decir, no diferenciadas (Figura 37) y células dendríticas maduras (Figura 38) que presentan proyecciones que sobresalen de ellas denominadas dendritas, en la célula control positivo (A) dichas proyecciones son más delgadas a comparación de la célula expuesta a NPau (B). Presentan una forma similar a una estrella característica de una célula dendrítica madura.

Figura 37

Células mononucleares derivadas de médula ósea.



NOTA: células mononucleares derivadas de médula ósea de ratón, sin tratamiento (control basal), tiempo de cultivo = 12 días. Observación SEM a 10.0 kV con detector SE.

Figura 38*Células dendríticas maduras.*

NOTA: A) Célula dendrítica diferenciada con 20 ng/mL de GM-CSF. B) Célula dendrítica diferenciada con 12.5 ng/mL de nanopartículas de Oro. Blanco: dendritas. Tiempo de cultivo = 12 días. Observación SEM a 10.0 kV con detector SE.

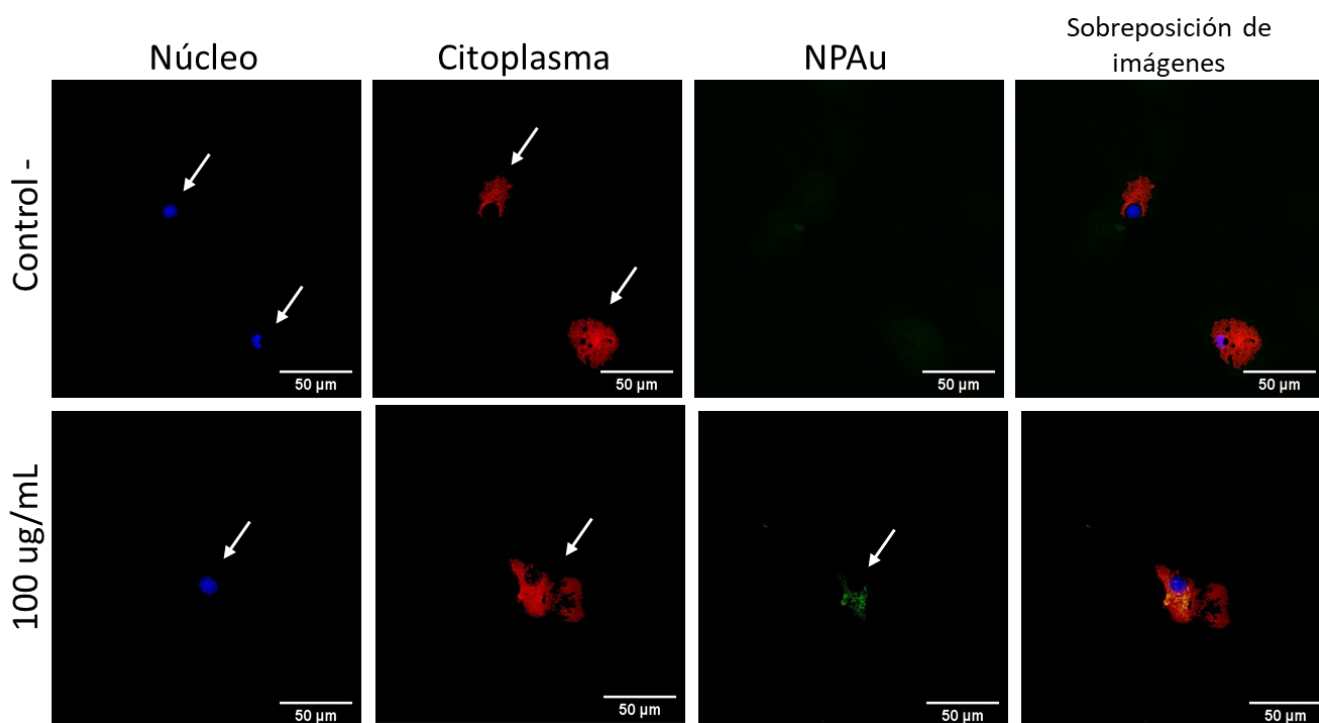
Localización de Nanopartículas de Oro en Células Dendríticas Bajo Microscopía Confocal.

Los marcadores fluorescentes DAPI para núcleo e IMRM para citoplasma facilitaron la observación de células dendríticas derivadas de médula ósea posterior a su localización en campo claro, esta técnica permitió observar las nanopartículas de oro dentro de las células bajo fluorescencia.

En la figura 39 se aprecia la presencia de nanopartículas de oro de color verde (flecha amarilla) en el citoplasma de color rojo (flechas blancas) cerca al núcleo de coloración azul (flechas rojas), se encuentran agrupadas, se diferencian del control negativo debido a que la imagen observada se sobrepone completamente sobre toda la célula descartando de esta manera la presencia de nanopartículas.

Figura 39

Micrografías en microscopio confocal de células dendríticas.



NOTA: Magnificación: 600X, tinción núcleo: DAPI (flechas rojas), tinción citoplasma: Alexa Fluor 633 (flechas blancas), Nanopartículas de oro (flecha amarilla).

Capítulo V: Discusión

La nanomedicina es un campo de investigación interdisciplinaria que conjuga la aplicación de nanotecnología, nanociencia y nanoingeniería con la medicina para tratamiento, prevención y diagnóstico de enfermedades, emplea herramientas a nanoescala con un amplio potencial en fines terapéuticos (Fornaguera & García-Celma, 2017); las nanopartículas son consideradas un componente clave dentro de esta disciplina, presentan propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas dependientes del método utilizado para su síntesis, purificación y caracterización, son utilizadas como medio de transporte para fármacos, materiales bioactivos o componentes de implantes (Pelaz et al., 2017).

Gracias a sus propiedades físico químicas y ópticas únicas las nanopartículas de oro han sido ampliamente utilizadas en biomedicina, sin embargo, su toxicidad se encuentra íntimamente relacionada con la forma, tamaño y carga superficial debido a que pueden afectar directamente el reconocimiento y aceptación por parte de las CD (Y. P. Jia et al., 2017), por lo tanto, el uso de nanopartículas de oro esféricas de síntesis química, con citrato como estabilizador, de aproximadamente 30 nm de diámetro, con carga superficial negativa cumple con factores apropiados para evitar la muerte celular (Niikura et al., 2013) y, generar la diferenciación y maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea.

Los ratones BALB/c de entre 8 a 52 semanas de edad mostraron una celularidad total de la médula de 530 ± 20 millones de células por cada animal, desde las 8 hasta las 24 semanas de vida la densidad celular se muestra constante además, aproximadamente el 10 % del total de células madre hematopoyéticas se encuentra en los fémures y el 4 % en las tibias (Colvin et al., 2004), al emplear un lavado de médula como procedimiento de extracción, la cantidad de células viables extraídas es de aproximadamente 2.5×10^7 a 3.5×10^7 por animal (W. Wang et al., 2016) resultados que concuerdan con la densidad celular de este estudio donde se logró

obtener hasta 3.05×10^7 células en 1 mL de medio por animal, en la figura 19 se observa que el número de células se encuentra en los rangos mencionados, por consiguiente, los animales de estudio pueden encontrarse entre las 9 y 24 semanas de edad para alcanzar la mayor cantidad de células viables precursoras de células dendríticas.

Según Allen y Walker (2013), el tiempo de cultivo depende del uso que se va a dar a las células dendríticas, por ello, sugieren que las células sean utilizadas a partir de los 10 días de cultivo; en los primeros días Madaan y colaboradores (2014) describen una población celular heterogénea, donde las células progenitoras presentan una morfología esférica, membrana celular definida y pequeño tamaño, en la figura 20 se observan las células bajo microscopio invertido con las características mencionadas, poco adherentes y en gran cantidad; en el día 3 las BMDC muestran morfología esférica con la formación de pequeñas dendritas en la superficie celular, se presenta la formación de agregados celulares, sin embargo, se puede apreciar la aparición de granulocitos (Figura 21) que responden a los mismo factores de estimulación (Lutz et al., 1999) (GM-CSF y nanopartículas de oro). Las BMDC inmaduras se obtienen a partir del día 6 en presencia de GM-CSF, la formación de colonias esféricas adherentes y flotantes predomina, asimismo, la contaminación con granulocitos aumenta (Lutz et al., 1999), los mismos resultados se evidencian para las diferentes concentraciones de nanopartículas de oro. A partir de los 10 días las células dejan de crecer y experimentan una diferenciación parcial debido a una proliferación temprana (Jin et al., 2020), las protuberancias dendríticas irregulares de la superficie se han alargado y las células dendríticas maduras o inmaduras presentan una forma similar a una estrella como se observa en las figuras 22 y 23 (W. Wang et al., 2016).

Tras 12 días de cultivo con 20 ng/mL de GM-CSF Lutz y colaboradores (1999) reportan 5×10^6 células con un 70 % de pureza, en este caso se obtuvo 5.6×10^6 células/mL como se

observa en la figura 24, sin embargo, si la concentración de GM-CSF disminuye a partir del día 10 la densidad celular aumentaría (Jin et al., 2020); al encontrarse expuestas con nanopartículas de oro la viabilidad celular es significativamente menor al control positivo, pero se evidencia lo contrario en relación al control basal (células sin estímulo), incluso la viabilidad se mantiene entre concentraciones de nanopartículas ($1.39 \times 10^6 - 2.7 \times 10^6$ células/mL). Según Niikura et al (2013) esferas de entre 20 a 40 nm inducen menor citotoxicidad, además nanopartículas recubiertas de citrato entre 10 a 50 nm no generaron daño en fibroblastos embrionarios hasta una concentración de 300 mmol/L con la cual se reportó cambios en la morfología celular, sin embargo, altas cantidades de citrato libre si pueden causar la pérdida de viabilidad, asimismo, la carga positiva despolariza la membrana, por lo tanto, se podría generar un aumento de $[Ca^{2+}]$ inhibiendo la proliferación celular (Y. P. Jia et al., 2017), en otras palabras, las células sometidas a tratamiento se estarían diferenciando y madurando mas no proliferando.

La presencia de β – actina (Figura 25 y 30) indica integridad celular, incluye procesos de división celular y regulación de expresión génica (Bunnell et al., 2011), por ello la expresión del gel es fundamental en todas las células con los diferentes tratamientos incluyendo controles.

Cuando las CD se exponen a estímulos extraños mejoran su capacidad de presentación de antígenos provocando cambios fenotípicos, es decir, pasan de estado inmaduro a maduro acompañadas de un aumento en la expresión de MHC – II y moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 (Castro et al., 2019), al cabo de 12 días la interacción entre GM-CSF y *E. coli* (LPS) estimula la expresión en el 50 % de células de MHC – II, CD 86 y en un 95 % de CD11c, la interacción de las 4 moléculas coestimuladoras y MHC – II genera un estado de maduración completa (Jin et al., 2020) en las figuras 26 y 31 se observa que la expresión del complejo es mayor en los tratamientos con nanopartículas en comparación a los controles, incluso en las concentraciones más elevadas; el cofactor CD40 (Figuras 27 y 33) se expresó en mayor cantidad

en células sin estímulos externos, sin embargo, en comparación con el control + su presencia en los tratamientos es mayor o igual, en la expresión de CD86 (Figuras 28 y 35) no hay diferencia significativa entre los tratamientos y el control +, CD86 se encuentra ausente en el control -, para finalizar, CD11c (Figura 36) presenta mayor intensidad en las concentraciones más elevadas de nanopartículas de oro (100 – 200 ug/mL), por lo tanto, las células analizadas presentan características de células maduras, sin embargo Helft y colaboradores (2015) reportan dos tipos de fagocitos mononucleares CD11c⁺ MHC – II⁺ adherentes uno similar a DC y uno inmaduro semejante a macrófagos.

Durante la maduración de células dendríticas aumenta la expresión de MHC – II, análogamente, disminuye la biosíntesis de novo del ARNm del complejo, el cual se debe a la reducción acelerada de la proteína transactivadora de clase II (CIITA), cuando la célula se encuentra inmadura las isoformas I y III son abundantes (Landmann et al., 2001), la presencia de CIITA (Figuras 27 y 32) se debe a que según Jin y colaboradores (2020) a los 12 días de cultivo únicamente el 50 % de las células genera condiciones de maduración completa.

DNGR – 1 codificado por Clec9A es un receptor de lectina de tipo C restringido a células dendríticas convencionales tipo 1 (cDC1) progenitores comunes de DC (CDP) y pre – DC y en menor cantidad en pDC, sin embargo, no induce características de activación en cDC1 a diferencia de moléculas coestimuladoras (Cueto et al., 2020), por lo tanto su presencia (Figuras 28 y 34) indica la posible diferenciación en cDC1 para las células del control positivo y significativamente menor para los tratamientos con nanopartículas de oro.

La presencia la proteína p53 indica procesos asociados a la vida y muerte celular, regula e induce apoptosis cuando el daño del ADN es grave, regula la etapa de senescencia y la entrada y salida de las células en las etapas posteriores del ciclo celular (Wawryk et al., 2014), en este caso P53 se expresa en mayor cantidad en 5 y 200 ug/mL de nanopartículas de oro (Figura 29),

en los otros tratamientos la expresión es similar al control positivo, sin embargo, no se puede determinar el proceso mediado por p53. Por lo tanto, las concentraciones de NPAu ideales para la estimulación de células dendríticas evitando daño celular son: 12.5 y 25 ug/mL.

Las DC inmaduras experimentan una serie de cambios después de la absorción y el procesamiento del antígeno y, obtienen fenotipos y funciones de maduras, entre ellos cambios morfológicos (W. Wang et al., 2016); según Quéré et al (2013) al observarlas mediante microscopía electrónica de barrido las células mononucleares derivadas de médula ósea son circulares y de pequeño tamaño (Figura 37), en cambio, las células dendríticas maduras presentan una apariencia estrellada con numerosas protuberancias “dendritas” de diferente tamaño, además presentan superficie rugosa, siendo estas sus características morfológicas típicas. Estas características coincidan con las micrografías obtenidas en esta investigación (Figura 38).

Singh et al (2018) describen la formación de una corona en la superficie de las nanopartículas debido a la interacción con las proteínas presentes en su entorno fisiológico, esta formación interviene directamente en la distribución y vía de internalización de las nanopartículas; el complejo corona – NP contiene opsinas en la superficie lo que facilitaría su reconocimiento por células inmunes, por su tamaño (30 nm) el mecanismo de ingreso sería por fagocitosis (Ahmad et al., 2017), sin embargo la presencia de proteínas en el suero del medio de cultivo crearía la formación de la corona direccionando su ingreso por endocitosis mediada por receptores.

Tomić et al (2014) reportaron la presencia de las NP de oro dentro de endosomas / lisosomas después de su internalización, en la figura 39 las nanopartículas se encuentran agrupadas y fuera del núcleo, por lo tanto, tendrían la misma ubicación.

La inmunobioingeniería es un término utilizado para la aplicación de diversos materiales dirigidos hacia la mejora del sistema inmunológico y sus componentes contribuyendo de esta manera a la creación de posibles vacunas autólogas frente a enfermedades autoinmunes, infecciosas, cáncer o alergias (Hubbell et al., 2009). Nanopartículas de entre 10 – 100 nm se internalizan de manera más eficiente, además, emplear 12.5 ug/mL de NPAu *in vivo* no generó citotoxicidad y se registró bioacumulación en hígado, riñón y bazo cuando son sintetizadas con citrato (Y. P. Jia et al., 2017), cuando las nanopartículas se encuentran en sangre y linfa son capturadas principalmente por macrófagos, en cambio, al encontrarse en hígado, riñón y bazo interactuarán con células dendríticas inmaduras y sus precursores (J. Jia et al., 2018) obteniendo como resultado su diferenciación y maduración para de esta manera potenciar la respuesta inmune adaptativa frente a una patología.

Capítulo VI: Conclusiones

La concentración ideal de nanopartículas de oro para obtener células dendríticas maduras y activas fue 12.5 ug/mL, las concentraciones mayores a excepción de 200 ug/mL no generaron toxicidad, sin embargo, la expresión de factores de coestimulación y MHC – II fue mayor a la concentración mencionada.

Se obtuvo una media de 1.8×10^7 células mononucleares derivadas de médula ósea de los 4 huesos las dos patas posteriores (2 fémures y 2 tibias) de un ratón de entre 9 y 24 semanas de edad, siendo 15 semanas la edad óptima para realizar el ensayo. Tras 12 días de cultivo con NPAu (5, 12.5, 25, 62.5, 100, 112.5 y 200 ug/mL) se obtuvo una media de 1.96×10^6 células/mL, 5.6×10^6 células/mL para el control positivo y 2.5×10^6 células/mL para el control basal; entre el control basal y las diferentes concentraciones de NPAu no hay diferencia significativa.

Se estimuló la diferenciación y maduración de células dendríticas con GM-CSF más *E. coli* (control positivo) y nanopartículas de oro de aproximadamente 30 nm a diferentes concentraciones entre 5 ug/mL y 200 ug/mL en solución, de acuerdo con la expresión del gen p53 y análisis de viabilidad celular, 5 ug/mL de NPAu resulta tóxico para las células, sin embargo, se registra 1.39×10^6 células dendríticas maduras para esta concentración.

Las bmDC se diferenciaron posiblemente en células dendríticas cCD1 y se determinó mediante la caracterización de factores de coestimulación CD40, CD86 y CD11c, además la presencia de MHC – II y CIITA la maduración y activación de las células dendríticas al tener contacto con nanopartículas de oro principalmente al emplear 12.5 y 25 ug/mL. Su estado morfológico se confirmó mediante la observación en microscopio electrónico de barrido; las micrografías obtenidas de microscopía confocal revelaron la presencia de nanopartículas dentro de las células, cerca al núcleo posiblemente dentro de endosomas.

Capítulo VII: Recomendaciones

Con el fin de conocer la cuantificación de expresión de genes se recomienda realizar técnicas como citometría de flujo para la caracterización de células dendríticas.

Para conocer el comportamiento de las nanopartículas al interactuar con las proteínas del medio de cultivo se recomienda realizar análisis de estabilidad como: verificación de carga, agregación, forma, tamaño y estado durante el ensayo *in vitro*.

Realizar ensayos *in vivo* con las células dendríticas obtenidas para la implementación de una posible terapia inmunomoduladora, además de conocer efectos relacionados a la forma de administración, distribución, metabolismo y excreción de nanopartículas de oro.

Referencias

Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular* (Octava). Elsevier Inc.

Ahmad, S., Zamry, A. A., Tan, H. T. T., Wong, K. K., Lim, J. K., & Mohamud, R. (2017). Targeting dendritic cells through gold nanoparticles: A review on the cellular uptake and subsequent immunological properties. *Molecular Immunology*, *91*(September), 123–133.

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.001>

Al-Ashmawy, G. (2018). Dendritic Cell Subsets, Maturation and Function. *Intech, i(tourism)*, 13.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>

Allen, I. C., & Walker, J. M. (2013). *Mouse Models of Innate Immunity Methods and protocols*.

<https://doi.org/10.1007/978-1-62703-481-4>

Aller, M., Rodríguez, J., & Rodríguez, F. (2000). Ethical norms for the care and use of experimental animals. *Cirugía Española*, *67*(1), 10–13. <https://www.elsevier.es/es-revista-cirurgia-espanola-36-articulo-normas-eticas-el-cuidado-utilizacion-8848>

Anderson, D. A., Grajales-Reyes, G. E., Satpathy, A. T., Vasquez Hueichucura, C. E., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2017). Revisiting the specificity of the MHC class II transactivator CIITA in classical murine dendritic cells in vivo. *European Journal of Immunology*, *47*(8), 1317–1323.

<https://doi.org/10.1002/eji.201747050>

Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2019). Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioengineering &*

Translational Medicine, *4*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1002/btm2.10143>

Aravena, O. (2006). *Células dendríticas inductoras de una respuesta tolerogénica*. Universidad de Chile.

Arosio, D., Manzoni, L., Araldi, E. M. V., & Scolastico, C. (2011). Cyclic RGD functionalized gold nanoparticles for tumor targeting. *Bioconjugate Chemistry*, *22*(4), 664–672.
<https://doi.org/10.1021/bc100448r>

Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J., & Strasser, A. (2018). How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death and Differentiation*, *25*(1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y., Pulendran, B., & Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *18*(Figure 1), 767–811. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.767>

Barré-Sinoussi, F., & Montagutelli, X. (2015). Animal models are essential to biological research: Issues and perspectives. *Future Science OA*, *1*(4), 4–6. <https://doi.org/10.4155/fso.15.63>

Bio-Rad. (n.d.). *Complejo mayor de histocompatibilidad*. Retrieved March 30, 2020, from <https://www.bio-rad-antibodies.com/mhc-hla-h-2-rt1-markers-antibodies.html>

Bobo, D., Robinson, K. J., Islam, J., Thurecht, K. J., & Corrie, S. R. (2016). Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharmaceutical Research*, *33*(10), 2373–2387. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1958-5>

Bros, M., Jährling, F., Renzing, A., Wiechmann, N., Dang, N. A., Sutter, A., Ross, R., Knop, J., Sudowe, S., & Reske-Kunz, A. B. (2007). A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood*, *109*(9), 3820–3829.

<https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-035576>

Brzicova, T., Javorkova, E., Vrbova, K., Zajicova, A., Holan, V., Pinkas, D., Philimonenko, V., Sikorova, J., Klema, J., & Topinka, J. (2019). Molecular Responses in THP-1 Macrophage-Like Cells Exposed to Diverse Nanoparticles. *Nanomaterials*, 1–19.

<https://doi.org/10.3390/nano9050687>

Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y., & Ervasti, J. M. (2011). β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Molecular Biology of the Cell*, 22.

<https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0582>

Burgdorf, S., & Kurts, C. (2008). Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current Opinion in Immunology*, 20(1), 89–95.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.12.002>

Castro, S., Garcia, M., Piñon, G., Rojas, M., Jarquin, K., Herrera, M., Fortoul, T., Toledano, Y., Garcia, T., Pestryakov, A., Castell, A., & Bogdanchikova, N. (2019). Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. *Journal of Immunotoxicology*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2019.1584652>

Chung, N., Chen, Y., Chan, V., Tam, P., & Lin, C. (2014). *Dendritic cells: sentinels against pathogens*. *Histology and Histopathology*. <https://doi.org/10.14670/HH-19.317>

Collins, M., Ling, V., & Carreno, B. M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands.

Genome Biology, 6(6), 1–7. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-6-223>

Colvin, G., Lambert, J., Abedi, M., Hsieh, C., Carlson, J., Stewart, F., & Quesenberry, P. (2004).

Murine marrow cellularity and the concept of stem cell competition: geographic and quantitative determinants in stem cell biology. 575–583.

<https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403268>

Committee for the Update of the Guide for the Animals, and U. of L. (2011). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. In *Institute for Laboratory Animal Research* (Vol. 39, Issue 4).

Cruvinel, W. D. M., Júnior, D. M., Antônio, J., Araújo, P., Tiekó, T., & Catelan, T. (2010).

Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Bras J Rheumatol*, 55(11).

Cueto, F. J., del Fresno, C., & Sancho, D. (2020). DNGR-1, a Dendritic Cell-Specific Sensor of Tissue Damage That Dually Modulates Immunity and Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 10(February), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03146>

Đokic, J., Anz, I., Milosavljevic, P., & Rajkovic, J. (2014). Size-Dependent Effects of Gold Nanoparticles Uptake on Maturation and Antitumor Functions of Human Dendritic Cells In Vitro. *Plos One*, 9(5), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096584>

Ealias, A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 263(3). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>

Ericsson, A. C., Crim, M. J., & Franklin, C. L. (2013). A brief history of animal modeling. *Missouri Medicine*, 110(3), 201–205.

European Collection of Authenticated Cell Cultures. (2018). *Fundamental Techniques in Cell Culture Laboratorio Handbook* (Sigma Aldrich (ed.); 4th ed., p. 68).

Flórez-Grau, G., Zubizarreta, I., Cabezón, R., Villoslada, P., & Benitez-Ribas, D. (2018).

Tolerogenic dendritic cells as a promising antigen-specific therapy in the treatment of multiple sclerosis and neuromyelitis optica from preclinical to clinical trials. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01169>

Fogli, S., Montis, C., Paccosi, S., Silvano, A., Michelucci, E., Berti, D., Bosi, A., Parenti, A., & Romagnoli, P. (2017). Inorganic nanoparticles as potential regulators of immune response in dendritic cells. *Nanomedicine*, 12(14), 1647–1660. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0061>

Food and Drug Administration. (2017). *Drug Products , Including Biological Products , that Contain Nanomaterials Guidance for Industry Drug Products , Including Biological Products , that Contain Nanomaterials Guidance for Industry. December.*

Fornaguera, C., & García-Celma, M. J. (2017). Personalized nanomedicine: A revolution at the nanoscale. *Journal of Personalized Medicine*, 7(4), 14–21. <https://doi.org/10.3390/jpm7040012>

Fundación Charles Darwin. (2014). *Mus musculus (Linnaeus, 1758)*. <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=5228>

Fytianos, K., Rodriguez-Lorenzo, L., Clift, M. J. D., Blank, F., Vanhecke, D., von Garnier, C., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2015). Uptake efficiency of surface modified gold nanoparticles does not correlate with functional changes and cytokine secretion in human dendritic cells in vitro. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11(3), 633–644. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.11.004>

Gao, Y., & Torrente-Murciano, L. (2020). Mechanistic insights of the reduction of gold salts in the Turkevich protocol. *Nanoscale*, 12(4), 2740–2751. <https://doi.org/10.1039/c9nr08877f>

- GeneCards. (n.d.). *CIITA Gene - GeneCards | Proteína C2TA | Anticuerpo C2TA*. Retrieved March 30, 2020, from <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CIITA>
- Gitanjali, A., Brahmkhatri, V. P., & Atreya, H. S. (2014). Nanomaterial based magnetic resonance imaging of cancer. *Journal of the Indian Institute of Science*, *94*(4), 423–454.
- Goldberg, M. S. (2019). Improving cancer immunotherapy through nanotechnology. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0186-9>
- Hara, M., Yokoyama, H., Fukuyama, K., Kitamura, N., Shimokawa, N., Maeda, K., Kanada, S., Ito, T., Usui, Y., Ogawa, H., Okumura, K., Nishiyama, M., & Nishiyama, C. (2013). Transcriptional regulation of the mouse CD11c promoter by AP-1 complex with JunD and Fra2 in dendritic cells. *Molecular Immunology*, *53*(3), 295–301.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.08.004>
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B., Goubau, D., & Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*, 1197–1211.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.018>
- Her, S., Jaffray, D., & Allen, C. (2017). Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy : Mechanisms and recent advancements. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *109*, 84–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.012>
- Hespel, C., & Moser, M. (2012). Role of inflammatory dendritic cells in innate and adaptive immunity. *European Journal of Immunology*, *42*(10), 2535–2543.
<https://doi.org/10.1002/eji.201242480>
- Hubbell, J. A., Thomas, S. N., & Swartz, M. A. (2009). Materials engineering for

- immunomodulation. *Nature*, 462(7272), 449–460. <https://doi.org/10.1038/nature08604>
- Huppa, J. B., & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, 3(12), 973–983. <https://doi.org/10.1038/nri1245>
- Iijima, N., Yanagawa, Y., Iwabuchi, K., & Onoé, K. (2003). Selective regulation of CD40 expression in murine dendritic cells by thiol antioxidants. *Immunology*, 110(2), 197–205. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01723.x>
- Inaba, K., Swiggard, W. J., Steinman, R. M., Romani, N., & Schuler, G. (1998). Isolation of Dendritic Cells. *Current Protocols in Immunology*, 25(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0307s25>
- Islam, N. U., Jalil, K., Shahid, M., Rauf, A., Muhammad, N., Khan, A., Shah, M. R., & Khan, M. A. (2019). Green synthesis and biological activities of gold nanoparticles functionalized with *Salix alba*. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 2914–2925. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.025>
- Jackson Laboratory. (2009). *The Jackson Laboratory Handbook on Genetically Standardized Mice*.
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., & Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.04.002>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 9(1), 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jia, J., Zhang, Y., Xin, Y., Jiang, C., Yan, B., & Zhai, S. (2018). Interactions Between Nanoparticles

- and Dendritic Cells: From the Perspective of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Oncology*, 8(September), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00404>
- Jia, Y. P., Ma, B. Y., Wei, X. W., & Qian, Z. Y. (2017). The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Chinese Chemical Letters*, 28(4), 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.01.021>
- Jiang, X., Shen, C., Rey-Ladino, J., Yu, H., & Brunham, R. C. (2008). Characterization of murine dendritic cell line JAWS II and primary bone marrow-derived dendritic cells in *Chlamydia muridarum* antigen presentation and induction of protective immunity. *Infection and Immunity*, 76(6), 2392–2401. <https://doi.org/10.1128/IAI.01584-07>
- Jim, G., Maury, P., Stefancikova, L., Laurent, G., Chateau, A., Hoch, F. B., Denat, F., Pinel, S., Porcel, E., Lacombe, S., & Bazzi, R. (2019). Fluorescent Radiosensitizing Gold Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*.
- Jin, D., Sprent, J., & Alerts, E. (2020). *GM-CSF Culture Revisited: Preparation of Bulk Populations of Highly Pure Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800031>
- Kim, M. K., & Kim, J. (2019). Properties of immature and mature dendritic cells: phenotype, morphology, phagocytosis, and migration. *RSC Advances*, 9(20), 11230–11238. <https://doi.org/10.1039/C9RA00818G>
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., & Plech, A. (2006). Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>
- Kralova, J., Glatzova, D., Borna, S., & Brdicka, T. (2018). Expression of Fluorescent Fusion

- Proteins in Murine Bone Marrow-derived Dendritic Cells and Macrophages. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 140, 1–9. <https://doi.org/10.3791/58081>
- Krogh, A. (1929). The progress of physiology. *American Journal of Psychiatry*, 90(July), 887–894.
- Kumar, S., Jeong, Y., Ashraf, M. U., & Bae, Y. S. (2019). Dendritic cell-mediated th2 immunity and immune disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9).
<https://doi.org/10.3390/ijms20092159>
- Landmann, S., Mühlethaler-mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J., Masternak, K., Arrighi, J., Hauser, C., Fontana, A., & Reith, W. (2001). Maturation of Dendritic Cells Is Accompanied by Rapid Transcriptional Silencing of Class II Transactivator (CIITA) Expression. *Journal of Experimental Medicine*, 194(4).
- Liu, Z., & Roche, P. A. (2015). Macropinocytosis in phagocytes: Regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Frontiers in Physiology*, 6(JAN).
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00001>
- Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L. J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods*, 223(1), 77–92.
[https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(98\)00204-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(98)00204-X)
- Ma, D. Y., & Clark, E. A. (2010). *The role of CD40 and CD40L in dendritic cells*. 21(5), 265–272.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.05.010>.The
- Madaan, A., Verma, R., Singh, A. T., Jain, S. K., & Jaggi, M. (2014). *A stepwise procedure for isolation of murine bone marrow and generation of dendritic cells*. 1, 8–10.
<https://doi.org/10.14440/jbm.2014.12>

- Mokhtar, D. M., & Hussein, M. M. (2019). Morphological characteristic and functional dependencies of dendritic cell in developing rabbit lung during fetal and neonatal life. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.013>
- Nair, S., Archer, G. E., & Tedder, T. F. (2012). Isolation and generation of human dendritic cells. In *Current Protocols in Immunology* (Issue SUPPL.99). <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0732s99>
- National Institutes of Health. (2003). Understanding the immune system. *Science Education*, 16(SUPPL. 1), 22.
- NCBI. (2020). *Actb actin, beta [Mus musculus (house mouse)]*. Gene. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11461>
- Nierkens, S., Tel, J., Janssen, E., & Adema, G. J. (2013). Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: One general or all sergeants? In *Trends in Immunology* (Vol. 34, Issue 8, pp. 361–370). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.007>
- Niikura, K., Matsunaga, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Yamaguchi, H., Orba, Y., Kawaguchi, A., Hasegawa, H., Kajino, K., Ninomiya, T., Ijiro, K., & Sawa, H. (2013). Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. *ACS Nano*, 7(5), 3926–3938. <https://doi.org/10.1021/nn3057005>
- Nikam, A. V., Prasad, B. L. V., & Kulkarni, A. A. (2018). Wet chemical synthesis of metal oxide nanoparticles: A review. *CrystEngComm*, 20(35), 5091–5107. <https://doi.org/10.1039/C8CE00487K>
- Nussenzweig, M. C. (2011). Ralph Steinman and the discovery of dendritic cells. *Nobel Lecture*, 1–31.

- Panariti, A., Misericocchi, G., & Rivolta, I. (2012). The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, Science and Applications*, 5(1), 87–100. <https://doi.org/10.2147/NSA.S25515>
- Patente, T. A., Pinho, M. P., Oliveira, A. A., Evangelista, G. C. M., Bergami-Santos, P. C., & Barbuto, J. A. M. (2019). Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 10(JAN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03176>
- Patrinostro, X., Roy, P., Lindsay, A., Chamberlain, C. M., Sundby, L. J., Starker, C. G., Voytas, D. F., Ervasti, J. M., & Perrin, B. J. (2018). Essential nucleotide- and protein-dependent functions of Actb/ β -actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(31), 7973–7978. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807895115>
- Pelaz, B., Alexiou, C., Alvarez-Puebla, R. A., Alves, F., Andrews, A. M., Ashraf, S., Balogh, L. P., Ballerini, L., Bestetti, A., Brendel, C., Bosi, S., Carril, M., Chan, W. C. W., Chen, C., Chen, X., Chen, X., Cheng, Z., Cui, D., Du, J., ... Parak, W. J. (2017). Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano*, 11(3), 2313–2381. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06040>
- Puhr, S., Lee, J., Zvezdova, E., Zhou, Y. J., & Liu, K. (2015). Dendritic cell development-History, advances, and open questions. *Seminars in Immunology*, 27(6), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.012>
- Quére, P., Pierre, J., Hoang, M. D., Esnault, E., Domenech, J., Sibille, P., & Dimier-Poisson, I. (2013). Presence of dendritic cells in chicken spleen cell preparations and their functional interaction with the parasite *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 153(1–2), 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.02.007>

- Repasky, E. (2016). *Immune Cells and Organs Immune system*.
- Sabado, R. L., Balan, S., & Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research*, 27(1), 74–95. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.157>
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., & Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: Downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 389–400. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.389>
- Santana-Magal, N., Rasoulouniriana, D., Saperia, C., Gutwillig, A., Rider, P., Engleman, E. G., & Carmi, Y. (2018). Isolation protocol of mouse monocyte-derived dendritic cells and their subsequent in vitro activation with tumor immune complexes. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(135), 1–6. <https://doi.org/10.3791/57188>
- Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M. C., Bessis, N., Rammensee, H. G., & Decker, P. (2013). The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*, 218(1), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.01.021>
- Singh, P., Pandit, S., Mokkalpati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms19071979>
- Society for mucosal immunology. (2014). *An Introduction to the Laboratory Mouse: Mus Musculus*. <http://www.socmucimm.org/1038/>
- Sokolova, V., Loza, K., Knuschke, T., Heinen-Weiler, J., Jastrow, H., Hasenberg, M., Buer, J., Westendorf, A. M., Gunzer, M., & Eppler, M. (2018). A systematic electron microscopic

study on the uptake of barium sulphate nano-, submicro-, microparticles by bone marrow-derived phagocytosing cells. *Acta Biomaterialia*, 80, 352–363.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.026>

Solano-Gálvez, S., Tovar-Torres, S., Tron-Gómez, M., Weiser-Smeke, A., Álvarez-Hernández, D., Franyuti-Kelly, G., Tapia-Moreno, M., Ibarra, A., Gutiérrez-Kobeh, L., & Vázquez-López, R. (2018). Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. *Medical Sciences*, 6(4), 88. <https://doi.org/10.3390/medsci6040088>

Steinman, R., & Zanvil, C. (1973). Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. *J Exp Med*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>

Thermo Scientific. (2012). *T123-TECHNICAL BULLETIN Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. www.thermoscientific.com/nanodrop

Tibúrcio, R., Nunes, S., Nunes, I., Ampuero, M. R., Silva, I. B., Lima, R., Tavares, N. M., & Brodskyn, C. (2019). Molecular aspects of dendritic cell activation in leishmaniasis: An immunobiological view. *Frontiers in Immunology*, 10(FEB). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00227>

Ting, J. P. Y., & Trowsdale, J. (2002). Genetic control of MHC class II expression. *Cell*, 109(2 SUPPL. 1), 21–33. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00696-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00696-7)

van Furth, R., & Zanvil, C. (1968). The Origin and Kinetics of Mononuclear Phagocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 278(1), 161–175. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1976.tb47027.x>

Van Spriel, A. B., & Jong, E. C. (2013). Dendritic cell science: more than 40 years of history. *Journal of Leukocyte Biology*, 93(1), 33–38. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512263>

- Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Dendritic cells I: Basic biology and functions. *Inmunologia*, 31(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2011.10.001>
- Vourekas, A., Alexiou, P., Vrettos, N., Maragkakis, M., Mourelatos, Z., & Medicine, T. (2016). Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induces anti- tumor T cell immunity. *Nature*, 531(7594), 390–394. <https://doi.org/10.1038/nature17150>. Sequence-dependent
- Wang, S. R. (2017). Diagnosis and Methods. In Academic Press (Ed.), *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* (pp. 47–62). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800838-6.00004-7>
- Wang, W., Li, J., Wu, K., Azhati, B., & Rexiati, M. (2016). Culture and identification of mouse bone marrow-derived dendritic cells and their capability to induce T lymphocyte proliferation. *Medical Science Monitor*, 22, 244–250. <https://doi.org/10.12659/MSM.896951>
- Wawryk, E., Chylinska, P., Lis, M., Chlapek, K., Bulak, K., Jedrych, M., & Jodlowska, B. (2014). P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma*, 525–533. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0548-1>
- Wood, Z. (2020). *Tumour suppressor genes and cancer*. Bristol Science. <https://bristolsciencetutor.com/2014/11/11/tumour-suppressor-genes-and-cancer/>
- Yadav, D., & Sarvetnick, N. (2007). B7-2 Regulates Survival, Phenotype, and Function of APCs. *The Journal of Immunology*, 178(10), 6236–6241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6236>
- Yen, H. J., Hsu, S. H., & Tsai, C. L. (2009). Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small*, 5(13), 1553–1561.

<https://doi.org/10.1002/sml.200900126>

Zhou, Q., Zhang, Y., Du, J., Li, Y., Zhou, Y., Fu, Q., Zhang, J., Wang, X., & Zhan, L. (2016). Different-Sized Gold Nanoparticle Activator/Antigen Increases Dendritic Cells Accumulation in Liver-Draining Lymph Nodes and CD8+ T Cell Responses. *ACS Nano*, *10*(2), 2678–2692.

<https://doi.org/10.1021/acsnano.5b07716>

Zingg, R., & Fischer, M. (2019). The consolidation of nanomedicine. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *11*(6), 1–6.

<https://doi.org/10.1002/wnan.1569>