



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Estudio de las Vesículas Extracelulares derivadas de células dendríticas estimuladas con el Virus de la Fiebre Aftosa en su forma inactivada y su participación en la modulación de la respuesta inmune anti-viral. Implicancias para el diseño racional de nuevas vacunas contra la Fiebre Aftosa

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. MENAY, Florencia

Director de tesis: Dra. Claudia Mongini

Consejero de estudios: Dr. Luis Scolaro

Lugar de Trabajo: Laboratorio de microvesículas, exosomas y miRNA

Instituto de Virología e Innovaciones Tecnológicas (IVIT-INTA-CONICET)

Marzo 2022, Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Agradecimientos

Esta tesis tiene muchas manos detrás, manos que ayudaron experimentalmente, manos que me sostuvieron y manos que me levantaron cada vez que tropecé y me dieron un abrazo. Fui una afortunada y pude hacer la tesis rodeada de miles de personas lindas a las que quiero agradecerles.

En primer lugar, quiero darle las GRACIAS (aunque esa palabra queda muy chica) a Clau, mi directora. Gracias por darme un doctorado feliz, pocos pueden decir eso, pero yo puedo. Cualquiera que me conozca sabe lo orgullosa que estoy de que seas mi directora, lo afortunada que fui al encontrarte y lo afortunada que soy de que hoy sigas acompañándome a la par. Hace 10 años que estamos juntas, me conociste siendo muy chiquita, me viste crecer y ayudaste a crecer. Todo lo que soy hoy como profesional es gracias a vos, y gran parte de lo que soy como persona también. Gracias por abrirme todas las puertas, gracias por alentarme a crecer, por siempre darme prioridad. Quizás alguien piense que exagero, pero cualquier que te conozca sé que me va a dar la razón. Gracias por guiarme en todo este camino, por formarme, por acompañarme y tener siempre una solución. Gracias por estar siempre para mí en lo laboral y en lo personal aún más. Todavía me acuerdo aquel día, antes de presentarme a beca, que me sentaste y me planteaste las posibilidades que tenía para mi futuro, yo decidí seguirte, yo quería seguir aprendiendo de vos y no me equivoque. Todavía tengo mucho que aprender de vos así que voy a seguir cerca. Todo el trabajo de esta tesis se logró gracias al sostén que me diste, no me soltaste la mano nunca, y aun en pandemia y a la distancia estuviste presente 24/7 para mí. Trabajando a la par y acompañándome de todas las maneras posibles. Gracias por no dejarme sola nunca!

GRACIAS a Clau W por ayudarnos en este trabajo, por estar siempre atenta a todas las consultas, por ver nuestros resultados y siempre alentarnos. Por acompañarnos de cerca este último tiempo y siempre tirarnos buenas energías y darnos buenos consejos. Por los cafés con leche en la merienda que espero vuelvan pronto.

GRACIAS a Maria José por ayudarnos siempre, por estar ahí desde el comienzo y por siempre estar disponible para nuestras consultas y colaborar en las soluciones buscando trabajos que nos ayuden.

GRACIAS a la Dra. Eliana Smitsaart, la Dra Cecilia Caldevilla y la Dra. Sabrina Cardillo de Biogénesis Bagó, por asistirnos en los pedidos del virus inactivado, por siempre estar a disposición de nuestras consultas y siempre estar disponibles para nosotros. Muchas Gracias también a Biogénesis Bagó por permitirnos desarrollar este proyecto y brindarnos uno de los reactivos base sobre los que se realizó esta tesis.

GRACIAS Patri, por acompañarnos, por ayudar a armar nuestro lugar en INTA y por siempre estar ahí para ayudarnos con una sonrisa

GRACIAS a todos los chicos del lab D que ayudaron siempre que lo necesitamos, gracias por integrarnos al grupo. Gracias particularmente a Clau K por adoptarme como amiga, arrancamos el camino doctoral juntas y hoy lo estamos terminando juntas, espero el destino tenga más cosas para que compartamos en el futuro.

GRACIAS a Ivi por tenerme infinita paciencia en todo, por pasar milquichientos tubos de citometría, por siempre estar disponible a cualquier día/ hora y estar para consultas, inquietudes y para la vida en general.

AGRADECIMIENTOS

GRACIAS a las chicas del locutorio, Flor B, Maru, Flor M, Ceci, Ale, Ana, Jose, Cruz, Ani y Myr. Por qué ir a trabajar sabiendo que iba a verlas me cambiaba el día, reía a carcajadas. Hicieron que estos años pasen volando.

GRACIAS a Javi y Ana, primero gracias por su amistad y compañía en estos años en INTA, armamos un hermoso grupo. Segundo gracias por todas las manos que dieron en los experimentos, siempre estuvieron disponibles y atentos a las cosas que necesitábamos y nos ayudaron desinteresadamente.

GRACIAS al resto de la gente de INTA que nos recibieron con los brazos abiertos y nos hicieron parte del grupo enseguida, siempre nos sentimos muy bienvenidas desde el comienzo.

GRACIAS a mis amigos de toda la vida de Chivilcoy y a los SOCLA: que acompañaron de cerca o lejos todo el trabajo de la tesis.

GRACIAS a Lu mi amiga, compañera, vecina que siempre me acompañó en todo y siempre fue ese ratito de distracción renovador y necesario. La vida nos cruzó en jardín de infantes y por suerte nos unió aún mas de grandes.

GRACIAS a Coli mi compañera, mi amiga del alma que estuvo codo a codo desde la facultad y hoy sigue estando a mi lado. Gracias por hacerme parte de tu familia cuando extrañaba a la mía.

GRACIAS Coquii, mi amigo que la distancia no lo logró separar. Estuviste ahí siempre, estas ahí siempre, siempre te alegraste con cada resultado y siempre escuchabas atento cada nuevo avance. Gracias por ayudarnos con la medición de las muestras, por destinar las últimas dos horas de cada visita tuya a Buenos aires para darte las instrucciones. Gracias también a tu laboratorio por brindarnos la posibilidad de llevar las muestras y colaborar con nosotras.

GRACIAS a mi familia entera, por acompañarme y estar siempre pendiente de mis proyectos, y por bancarme desde la distancia siempre.

GRACIAS a mi prima Dai/pipi, porque desde el comienzo estuviste ahí al ladito mío y te alegras de cada logro incluso más que yo. Aunque estemos más a la distancia sé que siempre estás cerca.

GRACIAS a Juan mi compañero en todo este camino que está ahí firme desde el día cero de esta tesis. Gracias por abrazarme cuando lo necesitaba y alentarme a que todo iba a salir bien. Por preocuparte cuando estaba preocupada y sacarme una sonrisa cuando estaba estresada. Por mimarme y estar pendiente de mis todos los días.

GRACIAS GRACIAS GRACIAS GRACIAS a mis papás, mis pilares en la vida. Gracias por alertarme siempre en mis proyectos, por acompañarme de cerca, por confiar en mí, por inculcarme la cultura del trabajo y del estudio. Por mimarme, abrazarme, besarme, y atender las mil videollamadas por días que hago. Los extraño todos los días y los siento cerca, aunque estén a kilómetros y pasen meses. Esta tesis es para ustedes.

También quiero darles las gracias a los jurados por tener la mejor predisposición desde el comienzo y por dedicar parte de su valioso tiempo a la lectura, evaluación y corrección de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
ABREVIATURAS Y SIGLAS	V
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estudio de las VEs y de los exosomas a lo largo de la historia	3
1.2 Vesículas extracelulares: estructura y biogénesis	5
1.2.1 Vía de biogénesis con origen endosomal	6
1.2.1.1 Vía dependiente de <i>ESCRT</i>	7
1.2.1.2 Vía independiente de <i>ESCRT</i>	8
1.2.2 Transporte y secreción de exosomas	8
1.2.3 Composición	9
1.2.3.1 Proteínas	10
1.2.3.2 Lípidos	12
1.2.3.3 Material genético	13
1.3 Rol biológico de las vesículas extracelulares	14
1.4 VEs y su función en la regulación del sistema inmune	17
1.4.1 Activación del sistema inmune por las VEs	17
1.4.2 Inhibición del sistema inmune por VEs	22
1.5 Células dendríticas y su importancia en la respuesta inmune	26
1.5.1 VEs derivadas de CDs: Rol en la activación de los linfocitos	27
1.5.1.1 Rol de las VEs en la activación de LT: VEs y presentación antigénica	29
1.5.1.2 Rol de las VEs en la activación de LB: VEs como vehículo de antígenos	32
1.6 Fiebre aftosa	35
1.6.1 Virus: estructura, composición y ciclo infectivo	35
1.6.2 Generalidades de la enfermedad y patogenia	38
1.6.3 Distribución geográfica de la enfermedad e importancia económica	39
1.6.4 Control y prevención de la FA	42
1.6.5 Respuesta inmune contra VFA	43
1.6.5.1 Respuesta innata frente al VFA	43

1.6.5.2	Respuesta adaptativa frente al VFA	47
1.6.6	Modelo murino para el estudio de la respuesta inmune contra la FA	51
1.6.6.1	Respuesta inmune contra VFA en hospedadores naturales en comparación con el modelo murino	52
2	OBJETIVOS	52
3	HIPÓTESIS	52
4	MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.1	Animales de experimentación	53
4.2	Medios de cultivos	53
4.3	Factores de diferenciación	53
4.4	Virus inactivado y vacuna monovalente contra FA	54
4.5	Obtención de CDs murinas a partir de precursores de médula ósea	54
4.6	Citometría de flujo para marcación en membrana de células	55
4.7	Purificación de VFai por gradiente de sacarosa (fracción 140 S)	56
4.8	Internalización del VFai O1 Campos por las CDs	56
4.9	Purificación de IgG específica para VFA a partir de suero bovino	57
4.10	Detección de Inmunoglobulinas específicas contra VFA	58
4.11	Cargado de las CDs con VFai O1 Campos	58
4.11.1	Determinación de la concentración óptima de virus a utilizar	58
4.11.2	Cinética de secreción de VEs: Determinación del tiempo de pulsado y tiempo de recolección de VEs	59
4.12	Aislamiento de las VEs derivadas de CDs	60
4.13	Citometría de flujo de VEs derivadas de CDs	61
4.14	Determinación del tamaño por <i>Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)</i>	62
4.15	Microscopía electrónica (ME)	62

4.16	Protocolo de inmunización para la obtención de esplenocitos sensibilizados contra el VFAi	63
4.17	Ensayo de proliferación utilizando CFSE (Éster de succinimidil- carboxifluoresceína)	63
4.18	Análisis estadístico	65
5	RESULTADOS	66
5.1	Las CDs son capaces de internalizar el antígeno vacunal VFAi O1 Campos y activarse <i>in vitro</i>	66
5.1.1	Obtención y caracterización de las CDs diferenciadas de precursores de médula ósea	66
5.1.2	Interacción del VFAi con las CDs	69
5.1.2.1	Internalización de VFAi por parte de las CDs.	69
5.1.2.2	Activación de CDs con VFAi O1 Campos	71
5.2	Las CDs derivadas de médula ósea cargadas con el VFAi secretan VEs que expresan proteínas virales	74
5.2.1	Aislamiento y caracterización de las VEs derivadas de las CDs cargadas con VFAi	74
5.2.1.1	Cinética de secreción de las VEs: las CDs liberan VEs que expresan proteínas virales durante las primeras 24 h post-internalización	74
5.2.1.2	Caracterización proteica por citometría de flujo de las VEs secretadas por las CDs	78
5.2.1.3	Caracterización de las VEs derivadas de CDs según su tamaño y morfología	83
5.3	Las CDs liberan VEs que expresan antígenos del VFA y son capaces de estimular una respuesta inmune celular <i>in vitro</i>	86
5.3.1	Estudio de las propiedades inmunomoduladoras de las VEs derivadas de CDs en la respuesta inmune frente a VFA	86
5.3.1.1	Linfoproliferación antígeno específica utilizando las VEs derivadas de CDs pulsadas con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos. Análisis sobre la población de células CD3 ⁺ y B220 ⁺	86
5.3.1.2	Linfoproliferación antígeno específica utilizando las VEs derivadas de CDs pulsadas con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos. Análisis sobre las subpoblaciones de células CD21 ⁺ /CD23 ⁻ y CD21 ⁺ /CD23 ⁺	94
6	DISCUSIÓN	98
7	CONCLUSIONES	116
8	ANEXOS	119

8.1 Anexo 1: Puesta a punto del protocolo de diferenciación de CDs a partir de precursores de médula ósea	119
8.1.1 Diferenciación de CDs utilizando el factor GM-CSF	119
8.1.2 Diferenciación de CDs utilizando el factor GM-CSF+IL-4	122
8.1.3 Optimización del protocolo de diferenciación, disminución de posibles fuentes de activación de las CDs	123
8.2 Anexo 2: Purificación de VFAi O1 Campos por gradiente de sacarosa (fracción 140S)	125
8.3 Anexo 3: Determinación de la concentración óptima de VEs para ser utilizada en la caracterización por citometría de flujo.	127
8.4 Anexo 4: Puesta a punto de la inmunización utilizando la vacuna comercial monovalente para la cepa VFA O1 Campos	130
9 BIBLIOGRAFÍA	133

Estudio de las vesículas extracelulares derivadas de células dendríticas estimuladas con el virus de la fiebre aftosa en su forma inactivada y su participación en la modulación de la respuesta inmune antiviral. Implicancias para el diseño racional de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa.

La fiebre aftosa es una infección de importancia económica a nivel mundial causada por el virus de la fiebre aftosa (VFA) que afecta a animales de pezuña hendida. Hoy, la principal estrategia de prevención y control para esta enfermedad es la vacunación con el virus inactivado químicamente con etilenimida binaria (VFAi). Tanto en la infección con VFA como en la vacunación, la respuesta de los linfocitos B (LB) desempeña un papel importante al proporcionar anticuerpos neutralizantes/protectores. La respuesta de linfocitos T (LT), por otra parte, también es fundamental y participa en generación de anticuerpos a largo plazo, mediante la colaboración con los LB.

Las vesículas extracelulares (VEs) y en particular las pequeñas VEs (pVEs) como los exosomas tienen un rol muy importante en la comunicación celular. Dependiendo de las moléculas de membrana expresadas y de su contenido intraluminal pueden modular el sistema inmune activando o inhibiendo una respuesta inmune. Las VEs secretadas por las células dendríticas (CDs) expresan moléculas inmunomoduladoras que participan en la activación de los linfocitos. Pueden presentar antígenos nativos asociados a la membrana (activando a los LB) o transferir péptidos asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), e incluso antígenos completos, activando a otras CDs y participando en la activación de LT.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue aislar, caracterizar y evaluar las propiedades inmunológicas de las VEs derivadas de CDs pulsadas con el antígeno vacunal VFAi de la cepa O1 Campos. Como primera instancia, utilizando un modelo murino, se diferenciaron CDs a partir de precursores de médula ósea. Al día 8 se obtuvieron CDs con un fenotipo concordante con las CDs convencionales/inflamatorias que expresan CD11c y CMH-II, y que son capaces de interactuar con el VFAi internalizándolo. Esta interacción desencadena la activación de las CDs reflejada en un aumento de los marcadores de maduración como el CMH-II y CD86. A partir de estas células se aislaron pVEs que expresaban los marcadores clásicos de VEs como CD9, CD81, CD63, y también las moléculas del CMH-II y CD86. Presentaban, además, la morfología

característica descrita para exosomas con un tamaño promedio de 155 nm. Interesantemente, estas VEs expresaban proteínas/péptidos virales de VFA (pVEs-VFAi) que fueron detectadas por citometría de flujo. La secreción de estas pVEs-VFAi es acotada en el tiempo y solo se logró aislarlas dentro de las primeras 24 h post-activación. Al evaluar la función inmunomoduladora de las pVEs-VFAi, se demostró que inducían la proliferación específica de LB *in vitro*. Las subpoblaciones de linfocitos CD21⁺CD23⁻ (linfocitos B de la zona marginal, BZM) y CD21⁺CD23⁺ (LB foliculares, LBf) estaban involucradas en esa proliferación. La activación B se desencadenaría por el reconocimiento específico de epitopes virales en la membrana de las pVEs-VFAi. También se observó una expansión de LT, dada por la presencia de las pVEs. Esta activación se induciría a través de una presentación directa por parte de péptidos virales unidos al CMH de las pVEs-VFAi o por una activación indirecta independiente del antígeno. Tanto para los LB como LT la estimulación inducida por las pVEs-VFAi fue mayor en aquellos esplenocitos que previamente habían tenido contacto con el antígeno viral *in vivo*.

En conclusión, nuestros resultados revelaron que las pVEs-VFAi presentan antígenos que podrían estar en conformación nativa o parcialmente procesada. Estos péptidos pueden ser reconocidos por el BCR y así estimular la respuesta específica de LB contra el VFA. Además, las pVEs-VFAi también tienen un efecto directo o indirecto sobre los LT que podría favorecer la activación de los LB indicando que las pVEs-VFAi podrían expresar epitopes tanto B como T.

En este trabajo de tesis se demuestra por primera vez que las CDs activadas con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos secretan pVEs que poseen proteínas/péptidos virales que son capaces de estimular una respuesta inmune específica para VFA. Este trabajo profundiza el rol de las CDs en la generación de la respuesta inmune frente al antígeno vacunal de VFAi y propone a las pVEs derivadas de CDs como un nuevo protagonista de la respuesta inmune generada con la vacuna. Nuestros resultados ayudan a comprender mejor los mecanismos inmunes que se desencadenan luego de la vacunación y podrían colaborar con el diseño racional de nuevas plataformas vacunales.

Palabra claves: vesículas extracelulares, virus de la fiebre aftosa, respuesta inmune antiviral, células dendríticas, linfocitos B, célula presentadora de antígeno.

The role of extracellular vesicles derived from dendritic cells stimulated with inactivated foot-and-mouth disease virus in modulating the antiviral immune response. Implications for the rational design of new foot-and-mouth disease vaccines.

Foot-and-mouth disease (FMD) is a globally and economically important infection caused by the foot-and-mouth disease virus (FMDV) that affects cloven-hoofed animals. Today, the main prevention and control strategy for this disease is vaccination with a binary-ethylenimide inactivated virus (VFAi). In both FMDV infection and vaccination, B cells response plays an important role in providing neutralizing antibodies. T cells response, on the other hand, is also critical and participates in a long-term antibody generation by collaborating with B cells. Extracellular vehicles (EVs) and small EVs (pVEs) such as exosomes, have an important role in cellular communication. Depending on the membrane molecules expressed and their intraluminal content they can regulate the immune system by activating or inhibiting an immune response. EVs secreted by dendritic cells (DCs) express immunomodulatory molecules involved in lymphocyte activation. They can present native membrane-associated antigens to B cells or transfer peptides associated with major histocompatibility complex (MHC), molecules and even complete antigens to DCs, consequently participating in T cells activation. The aim of this thesis was to isolate, characterize and evaluate the immunological properties of EVs derived from DCs pulsed with the FMDVi O1 Campos vaccine-antigen. As a starting point, DCs were differentiated from murine bone marrow precursors. DCs with a phenotype concordant with conventional/inflammatory DCs expressing CD11c and MHC-II were obtained at day 8. These cells interact with the FMDVi by internalizing it. This interaction triggers the activation of DCs reflected by an increase in maturation markers such as MHC-II and CD86. From these cells, pVEs expressing classical pVEs markers (CD9, CD81, CD63), MHC-II and CD86 molecules, were isolated. They also displayed the morphology described for exosomes with an average size of 155 nm. Interestingly, these EVs expressed FMDV viral proteins/peptides (pVEs-VFAi) that were detected by flow cytometry. The secretion of these pVEs-VFAi is time-dependent and they were only isolated within the first 24 h post-activation. When assessing the immunomodulatory function of pVEs-VFAi, it was shown that they induce B cells specific proliferation *in vitro*. This proliferation comprised CD21+CD23- (marginal zone

ABSTRACT

B cells, BZM) and CD21⁺CD23⁺ (follicular B cells, Lbf) cell subpopulations. B cells activation would be triggered by specific recognition of viral epitopes on the membrane of pVEs-VFAi. An expansion of T cells induced by pVEs was also observed. This activation would be elicited by a direct presentation of viral peptides bound to the MHC molecules expressed on pVEs-VFAi or by an indirect antigen-independent stimulation. B and T cell expansion induced by pVEs-VFAi was greater in those splenocytes that had previous contact with viral antigens *in vivo*.

Our results revealed that pVEs-VFAi express antigens that could be in native or partially processed conformation. These peptides can be recognized by the BCR and thus stimulate the specific B cells response against FMDV, involving MZB and Fo B cells. In addition, pVEs-VFAi also have a direct or indirect effect on T cells that could favor B cells activation, indicating that pVEs-VFAi could express both B and T epitopes.

In this thesis we demonstrated for the first time that DCs activated with the FMDVi O1 Campos vaccine-antigen secrete pVEs expressing viral proteins/peptides that stimulate FMDV-specific immune response. This work expands the current knowledge of the role of DCs in the antiviral immune response, proposing pVEs derived from these cells as a new player in regulating the adaptative immunity against FMDV. Our results help to better understand the immune mechanisms triggered after vaccination and could contribute to the rational design of new vaccine platforms.

Key words: extracellular vesicles, foot and mouth disease virus, antiviral immune response, dendritic cells, B lymphocytes, antigen presenting cell.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

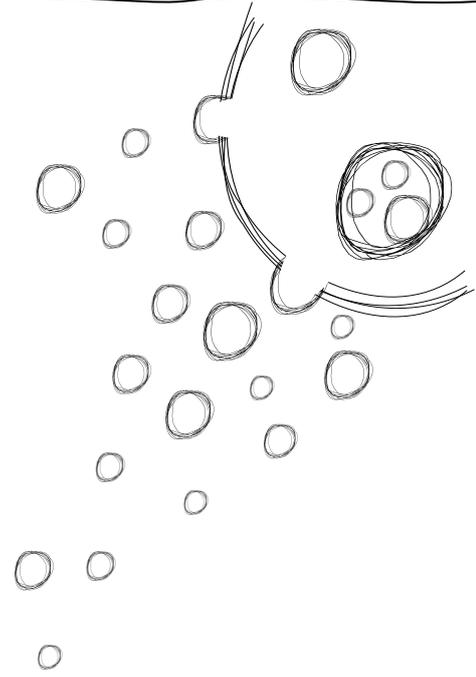
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
BCR	Receptor de linfocito B (del inglés <i>B-cell receptor</i>)
BEI	Etilenimina binaria (del inglés <i>Binary ethylenimine</i>)
BSA	Seroalbúmina Bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BZM	Linfocitos B de la zona marginal del bazo
CDF	Célula dendrítica folicular
CDs	Células dendríticas
CFSE	Éster de succinimidil- carboxifluoresceína
CG	Centro germinal
CMH-I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
CMH-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
CMV	Cuerpo multivesicular
Con A	Concanavalina A
CPA	Célula presentadora de antígeno
dcARN	Ácido ribonucleico de doble cadena
d.p.v	Días post-vacunación
ESCRT	Complejos de clasificación endosómica necesarios para el transporte (del inglés: <i>Endosomal sorting complexes required for transport</i>)
FA	Fiebre aftosa
FITC	fluoresceína-5-isotiocianato (del inglés: <i>Fluorescein isotiocyanate</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (del inglés: <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>)

ABREVIATURAS

i.p	Intraperitoneal
Ig	Inmunoglobulina
ISEV	Sociedad internacional de vesículas extracelulares (del inglés: <i>International Society For Extracellular Vesicles</i>)
LB	Linfocitos B
LBf	Linfocitos B foliculares o linfocitos B2
LPS	Lipopolisacárido
LT	Linfocitos T
m/g VEs	Vesículas extracelulares medianas y grandes
miARN	MicroARN
MO	Médula ósea
MVs	Microvesículas
NTA	Análisis de seguimiento de partículas. (del inglés: <i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
OLS	Órgano linfático secundario
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
p-CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad asociado a un péptido antigénico
pCDs	Célula dendrítica plasmocitoide
PE	Ficoeritrina
PECy5	Fluorocromo en tándem compuesto por un donante de R-ficoeritrina (PE) y un colorante aceptor, cianina5
p.i	Post infección
POLI I:C	Ácido poliinosínico:policitidílico
pVEs	Vesículas extracelulares pequeñas
pVEs-LPS	Vesículas extracelulares pequeñas derivadas de células dendríticas activadas con lipopolisacárido.

ABREVIATURAS

pVEs-RPMI	Vesículas extracelulares pequeñas derivadas de células dendríticas cultivadas en medio RPMI
pVEs-VFAi	Vesículas extracelulares pequeñas derivadas de células dendríticas cocultivadas con virus de la fiebre aftosa inactivado
RGD	Motivo de aminoácidos (arginina, glicina y ácido aspártico)
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
scARN	Ácido ribonucleico de simple cadena
SFB	Suero fetal bovino
snoARN	Pequeño ARN nuclear (del inglés: <i>Small nucleolar RNAs</i>)
TCR	Receptor de linfocitos T (del inglés: <i>T-cell receptor</i>)
TD	T dependiente
Th	Linfocito T colaborador (del inglés: <i>T helper cell</i>)
Thf	Linfocito T colaborador folicular (del inglés: <i>T follicular helper</i>)
TI	T independiente
TLR	Receptor tipo Toll (del inglés: <i>Toll like Receptor</i>)
Treg	Linfocito T regulatorio
VEs	Vesículas extracelulares
VFA	Virus de la fiebre aftosa
VFAi	Virus de la fiebre aftosa inactivado con etilamina binaria
VILs	Vesículas intraluminales



Introducción

1 INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que las células de prácticamente todos los organismos (desde procariotas hasta eucariotas) pueden liberar vesículas al entorno extracelular y esta liberación puede ser tanto autocrina como paracrina (Graça Raposo & Stoorvogel, 2013). Estas vesículas secretadas reciben el nombre de vesículas extracelulares (VEs). La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV de su nombre en inglés *International Society for Extracellular Vesicles*) las define más estrictamente como: “Partículas liberadas naturalmente por la célula que están delimitadas por una bicapa lipídica y no pueden replicarse, es decir, no contienen un núcleo funcional” (Théry, Witwer, Aikawa, Alcaraz, Zuba-Surma, et al., 2018).

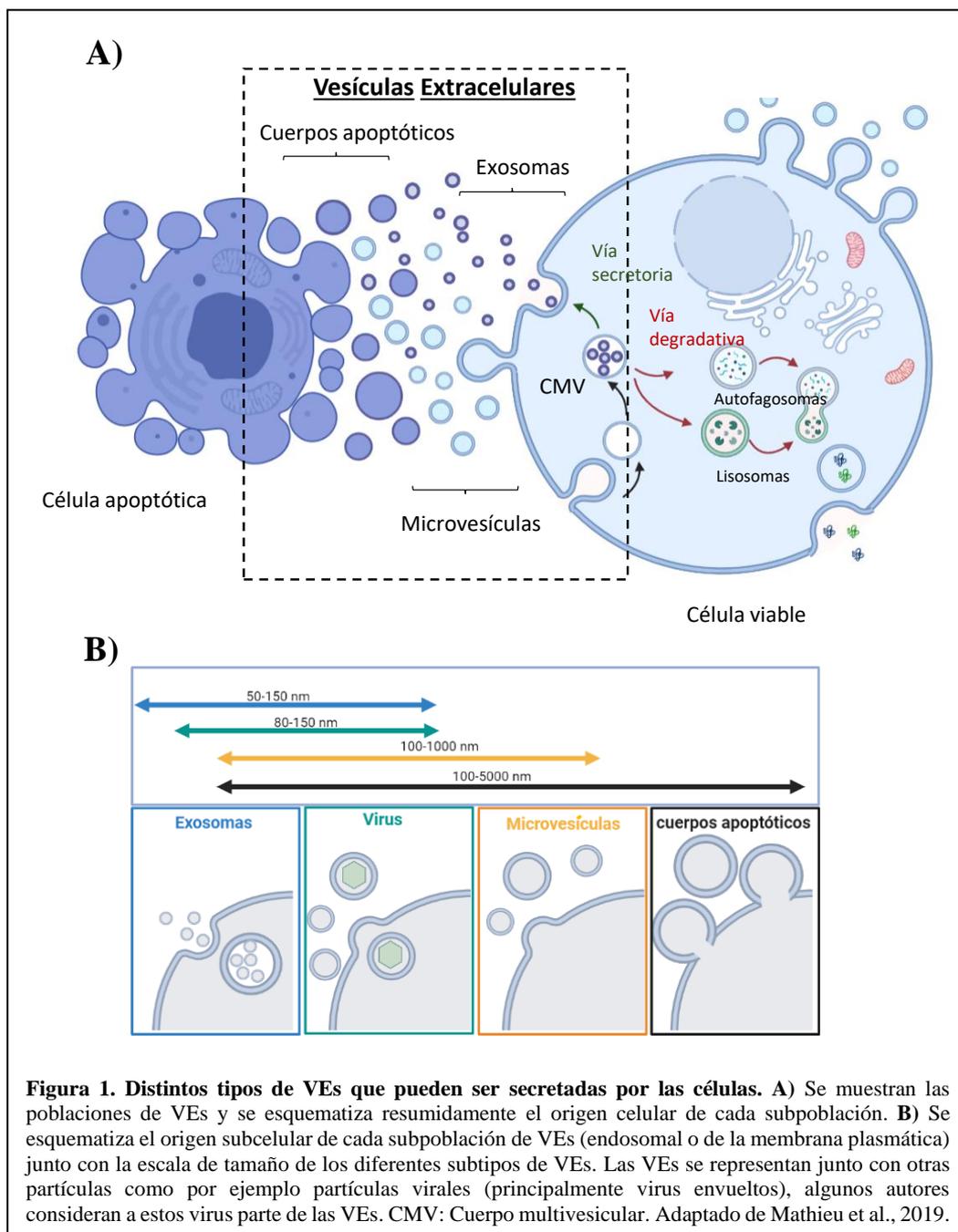
Existen diferentes clasificaciones, pero principalmente hay tres categorías de VEs: cuerpos apoptóticos, microvesículas (MVs) o ectosomas y exosomas (**Figura 1 A**). Los cuerpos apoptóticos se originan a partir de la fragmentación de la membrana celular producto de un proceso de muerte celular programada y poseen un tamaño de 500 a 5000 nm de diámetro. Las MVs o ectosomas son vesículas generadas por la gemación directa de la membrana plasmática celular hacia el exterior y rondan el rango de tamaño de 50 a 1000 nm de diámetro. Por el contrario, los exosomas son de origen endosómico y su tamaño es más pequeño de alrededor de 40 a 160 nm de diámetro (100 nm de media) (**Figura 1 B**).

A lo largo de los años fueron muchos los roles y funciones que se les atribuyeron a las VEs. En sus inicios, el rol principal atribuido a los exosomas y MVs era el de transportar proteínas innecesarias y desechos celulares, siendo catalogados como “basureros celulares”. Con el avance de la investigación se logró demostrar que son mucho más que una vía alternativa de liberación de proteínas obsoletas. Hoy sabemos que forman parte de numerosos procesos biológicos, que abarcan desde la presentación antigénica y modulación de una respuesta inmune, hasta la comunicación intercelular y la transferencia de proteínas y ARN, entre otras moléculas.

La población de VEs es muy heterogénea y esta heterogeneidad se refleja tanto en su biogénesis, como en el tamaño, composición y funciones. Hoy es un gran desafío descifrar esa heterogeneidad y se han establecido bases de datos de libre acceso para ayudar mitigar estos problemas. Por ejemplo, ExoCarta (<http://www.exocarta.org>) y Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/>) contienen conjuntos de datos actualizados que

especifican el tipo de células de origen, proteínas, lípidos y especies de ARN que se encuentran en diferentes tipos de VEs.

En este trabajo de tesis vamos a enfocar nuestro estudio y, por ende, también el contexto teórico a las vesículas extracelulares pequeñas dentro de las que se encuentran los exosomas.



1.1 Estudio de las VEs y de los exosomas a lo largo de la historia

El avance en las investigaciones de VEs está creciendo constantemente y es una de las áreas con mayor expansión en el último tiempo. Si se realiza una recorrida histórica del estudio de las VEs se puede ver como hubo cambios incluso en los términos utilizados para referirse a ellas. Por ejemplo, la palabra “exosoma” en la década de los setenta tenía otro significado y se utilizaba para describir fragmentos móviles de ADN extra-genómicos que podían transferirse entre *Drosophila* y células de *Neurospora* (Fox et al., 1970, 1971; Fox & Yoon, 1970; Mishra & Tatum, 1973). Recién en la década del ochenta, comenzó a utilizarse el término exosoma como actualmente lo conocemos, definiendo a vesículas de pequeño tamaño que tenían origen en un endosoma (Johnstone et al., 1987). A partir de allí, las VEs y en particular los exosomas se convirtieron en el foco de estudio de muchas investigaciones.

Haciendo un rápido vistazo a la literatura, menos de 20 artículos utilizando la palabra "exosomas" se registraron en PubMed a principios del año 2003, poco más de 60 en 2007, más de 3000 publicaciones se han publicado a partir del 2015, y al día de hoy superan las 6000 por año (**Figura 2**) (Théry, 2011; Théry, Witwer, Aikawa, Alcaraz, Lowry, et al., 2018; Bazzan et al., 2021). Esta “explosión” en el estudio de exosomas no solo se vio reflejada en las publicaciones, sino también en la constitución de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV de su nombre en inglés *International Society for Extracellular Vesicle*) que se creó en el año 2011 para discutir los importantes avances y descubrimientos en este campo. Se creó también en el año 2009 una base de datos gratuita llamada Exocarta (<http://exocarta.org>) destinada a compilar proteínas, ARN y lípidos identificados en exosomas con el fin de compartir la información y de ampliar recursos (Mathivanan & Simpson, 2009). En 2012 se creó otra página, Vesiclepedia (<http://microvesicles.org/>), con el fin de recopilar información no solo de los exosomas, sino de todas las poblaciones de VEs (Kalra et al., 2012).

La heterogeneidad en la población de VEs es una de las principales consideraciones que se deben tener en cuenta a la hora de realizar trabajos de investigación en el área de VEs y es muy importante que cada investigador realice una caracterización proteica,

morfológica, etc, que permita detallar a la población de VEs con la que trabaja y que dependerá del sistema biológico que utilice.

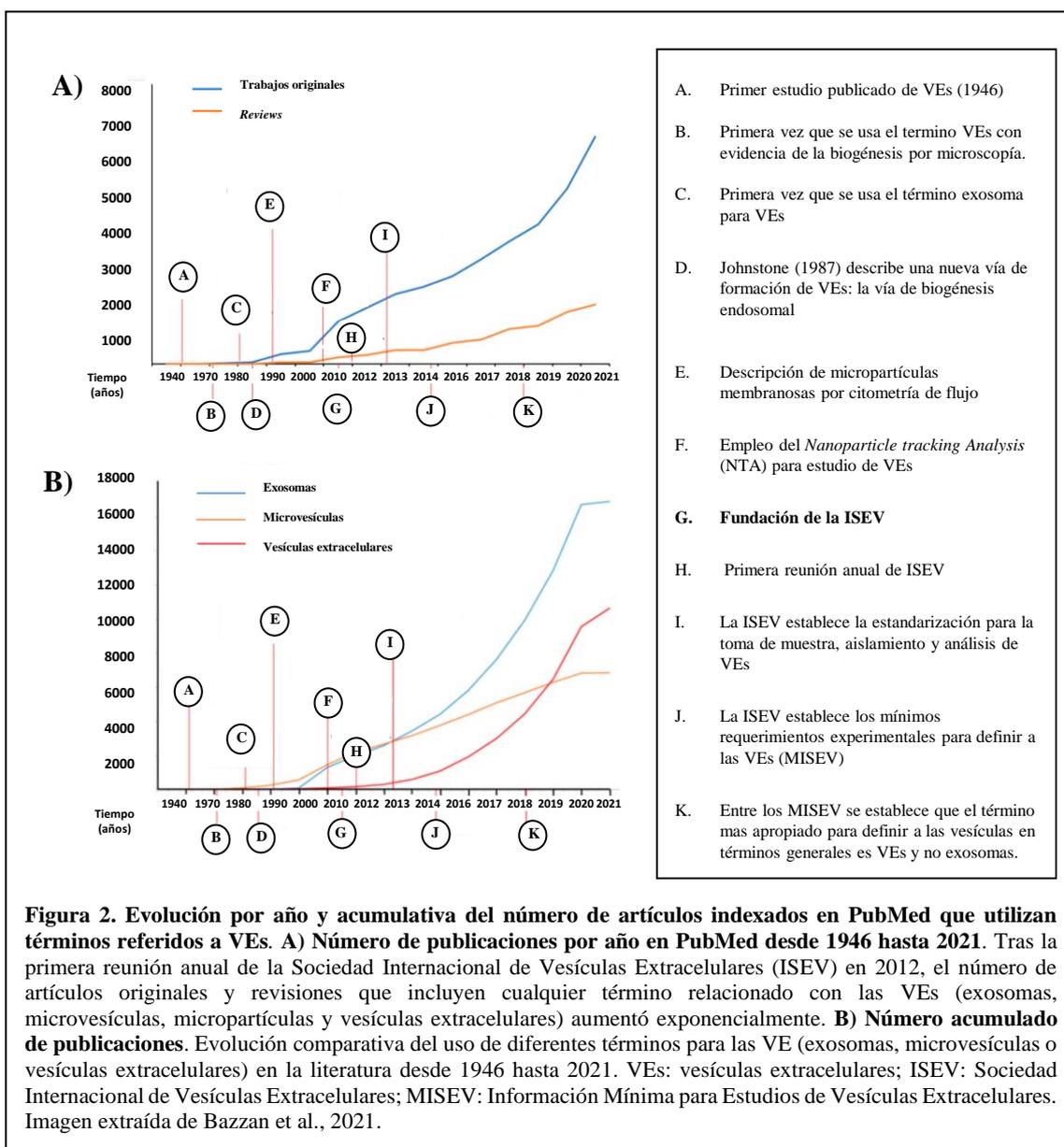


Figura 2. Evolución por año y acumulativa del número de artículos indexados en PubMed que utilizan términos referidos a VEs. A) Número de publicaciones por año en PubMed desde 1946 hasta 2021. Tras la primera reunión anual de la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) en 2012, el número de artículos originales y revisiones que incluyen cualquier término relacionado con las VEs (exosomas, microvesículas, micropartículas y vesículas extracelulares) aumentó exponencialmente. **B) Número acumulado de publicaciones.** Evolución comparativa del uso de diferentes términos para las VE (exosomas, microvesículas o vesículas extracelulares) en la literatura desde 1946 hasta 2021. VEs: vesículas extracelulares; ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares; MISEV: Información Mínima para Estudios de Vesículas Extracelulares. Imagen extraída de Bazzan et al., 2021.

Gracias a numerosos análisis de proteómica se han identificado las proteínas comúnmente encontradas en preparaciones de exosomas y otras VEs. Sin embargo, aún no existe un consenso, desde la ISEV, sobre los marcadores proteicos específicos que permitan asignar una vía de biogénesis y permitan diferenciar experimentalmente "exosomas" de "ectosomas". Por esta razón surge la necesidad de unificar criterios y sumar rigurosidad a las investigaciones. Uno de los principales temas de controversia en el área de VEs es la nomenclatura. Los primeros trabajos publicados en el área de las VEs solían hacer

referencia al término exosoma, definiéndolos como nanovesículas extracelulares con diversas funciones. Este término comenzó a tomar popularidad y hoy en día continúa creciendo la cantidad de publicaciones que lo utilizan tanto en el texto como en el título (**Figura 2**). Sin embargo, con el avance del conocimiento comenzó a generar controversias la aparición del término exosoma en muchas publicaciones que no contaban con la caracterización necesaria para afirmar que las VEs utilizadas eran de origen endosómico. Fue así que comenzaron a aumentar los requisitos experimentales en las publicaciones, aumentando los detalles en los métodos de obtención, métodos de caracterización y protocolos funcionales (Gould & Raposo, 2013; Witwer et al., 2013). Para unificar criterios en la nomenclatura, la ISEV recomienda usar "vesícula extracelular" como el término genérico para "partículas liberadas naturalmente de la célula que están delimitadas por una bicapa lipídica y no pueden replicarse". Sobre este término está permitido realizar modificaciones en función de características claras y medibles tales como la célula de origen, marcadores moleculares, tamaño, densidad, función, etc (Lötvall et al., 2014 ;Théry, Witwer, Aikawa, Alcaraz, Lowry, et al., 2018). Con estas nuevas directrices el término vesícula extracelular comenzó a tomar protagonismo los últimos años (**Figura 2**).

1.2 Vesículas extracelulares: estructura y biogénesis

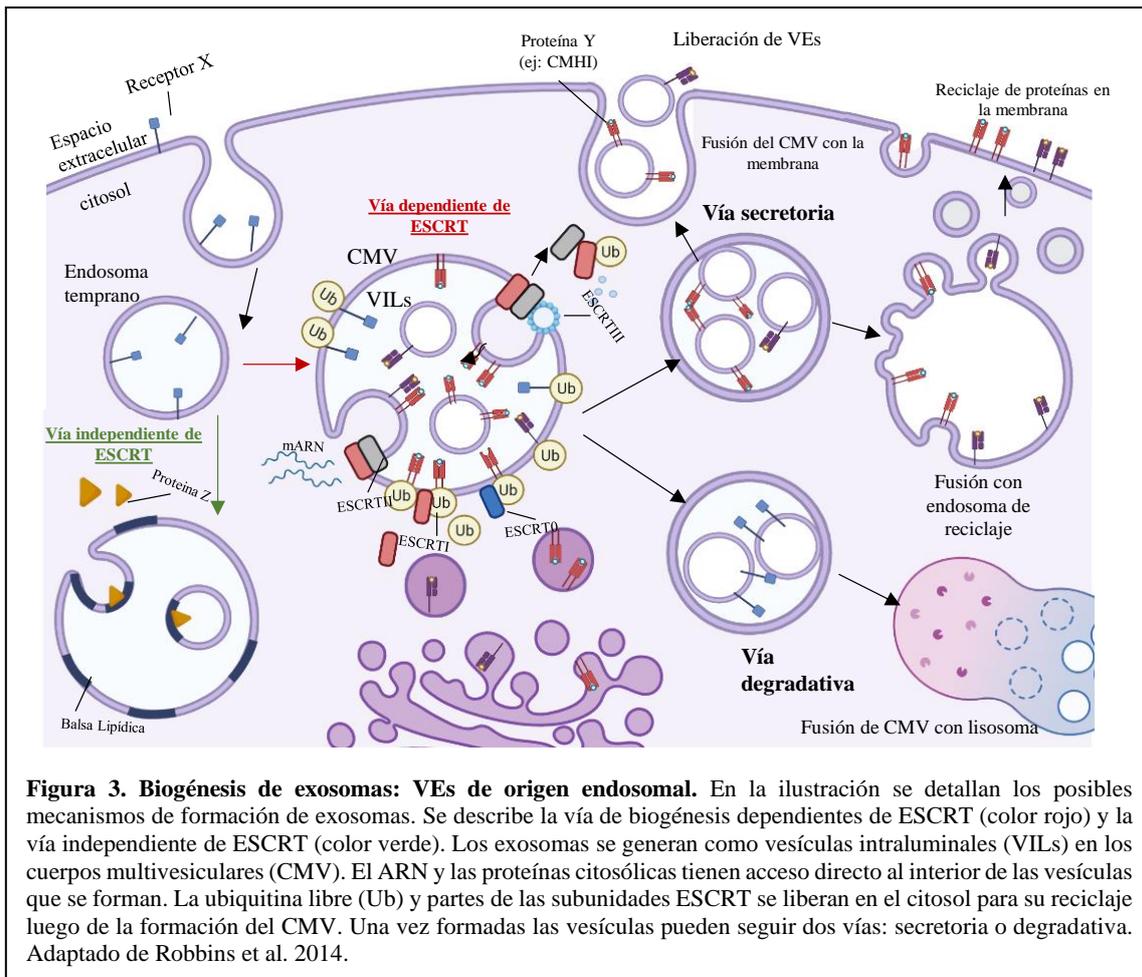
El término exosomas como hoy lo conocemos surgió por primera vez a finales de 1980; en estos mismos años los Dres. Stahl y Johnstone se encontraban estudiando la maduración de reticulocitos hacia eritrocitos enfocándose en la pérdida del receptor de transferrina. Observaron que durante la maduración el receptor se encontraba en endosomas multivesiculares, más específicamente asociado a pequeños cuerpos intraluminales de aproximadamente 50 nm de diámetro (Harding et al., 1983; Pan & Johnstone, 1983; Harding et al., 2013) que luego eran secretados por fusión del endosoma con la membrana plasmática.

Hasta entonces, se asumía que la liberación de VEs ocurría solo a partir de evaginaciones de la membrana plasmática hacia el exterior y posterior fisión. Sin embargo, estos nuevos descubrimientos daban lugar a una nueva vía no descrita hasta el momento: la vía endosomal.

1.2.1 Vía de biogénesis con origen endosomal

Con el avance de la investigación y el creciente interés en las VEs se logró definir y detallar con más profundidad el proceso de biogénesis endosomal. Hoy sabemos que los exosomas son generados por la invaginación de la membrana del endosoma temprano. Este proceso resulta en la formación de vesículas intraluminales (VILs) dentro del endosoma que ahora recibe el nombre cuerpo multivesicular (CMV) o endosoma tardío (Théry, Zitvogel, et al., 2002). Este endosoma puede seguir dos vías: la vía degradativa o la vía secretoria (**Figura 3**). En la vía degradativa, también llamada vía lisosomal, el endosoma se fusiona con el lisosoma y libera las VILs dentro del lumen del lisosoma para su degradación (Doyle & Wang, 2019). En la vía secretoria, el CMV se fusiona con la membrana plasmática de la célula y esto resulta en la liberación de las VILs al medio extracelular. Actualmente sigue siendo una incógnita el mecanismo que define a los "CMV secretores" y a los "CMV degradativos". Pero se estima que el destino de los CMV puede cambiar en respuesta a las diferentes condiciones celulares. Por ejemplo la "inanición celular", induce la degradación de CMV por fusión con autofagosomas y esto resulta en una disminución de la liberación de exosomas (Claudio M. Fader et al., 2008; Claudio M. Fader & Colombo, 2006; Gudbergsson & Johnsen, 2019; Zheng et al., 2019; Lin et al., 2019; Larios et al., 2020).

La formación de exosomas por gemación inversa de la membrana endosomal provoca que queden retenidos componentes citoplasmáticos (proteínas, lípidos y citosol). Todos estos componentes requieren de un proceso de selección o *sorting* específico para tener como destino último el interior del exosoma. Existen varios mecanismos para el direccionamiento de proteínas solubles y de membrana hacia los exosomas. Por ejemplo, muchas proteínas citoplasmáticas pueden ingresar al exosoma por interacción con proteínas chaperonas. Otras, como las proteínas ancladas a glucosilfosfatidilinositol (GPI), pueden ingresar gracias a su afinidad a las balsas lipídicas presentes en los CMV. También existen señales específicas de direccionamiento como la ubiquitinación de proteínas o motivos específicos en microARNs (miARNs) que hacen que la incorporación de estas moléculas sea de forma más regulada.



1.2.1.1 Vía dependiente de ESCRT

La vía de biogénesis endosómica esta mediada en parte por la acción de un complejo proteico conocido por sus siglas en inglés como *ESCRT* (*endosomal sorting complex for transport*) (**Figura 3**). Este gran complejo, formado por subunidades funcionales (ESCRT0, ESCRTI, ESCRTII, ESCRTIII y proteínas asociadas) no solo está involucrado en la selección de contenido, sino que participa en la formación de los brotes y también en el ruptura de las membrana que van a dar origen a las VILs (Olmos & Carlton, 2016). El proceso de biogénesis dependiente de ESCRT es iniciado por ESCRT0, que reconoce y retiene las proteínas ubiquitinadas en la membrana del endosoma. La invaginación inicial de la membrana del CMV es activada por ESCRT-I/ II, la escisión de la membrana es mediada por ESCRT-III que junto con proteínas accesorias (VPS4, VTA1 y ALIX) forman una estructura en forma de espiral que facilita la fisión de la membrana dando como resultado la formación de VILs (Schöneberg et al., 2016 ; Larios et al., 2020).

1.2.1.2 Vía independiente de ESCRT

Si bien este complejo es de gran importancia para la biogénesis, existe otro mecanismo de formación y selección de carga mucho menos estudiado, pero igual de importante: la vía definida como independiente de *ESCRT* (**Figura 3**). Esta vía es dependiente de microdominios altamente enriquecidos en esfingomielinasas que favorecen la formación de ceramida. Estas regiones ricas en ceramida facilitarían la invaginación espontánea de la membrana endosomal, formándose de esta manera el CMV. Al mismo tiempo la ceramida puede metabolizarse en esfingosina-1-fosfato activando así su receptor cumpliendo un rol importante en la selección de moléculas (Kajimoto et al., 2013). Otro componente muy importante en ambas vías, que favorece tanto la biogénesis así como también la clasificación específica de moléculas, son los microdominios ricos en tetraspaninas (CD63, CD9 y CD81) (Trajkovic et al., 2008; Van Niel et al., 2011; Yuan Zhang et al., 2019). Estas proteínas pueden formar agrupaciones y plataformas dinámicas en las membranas asociándose a otras proteínas de transmembrana o citosólicas favoreciendo la formación de VILs (Tschuschke et al., 2020).

Que el origen de los exosomas pueda suceder por más de una vía es prueba de que existen varios mecanismos para garantizar la correcta formación de vesículas y clasificación de moléculas exosomales dentro de la célula. El hecho de que varias vías de biogénesis co-existan en la misma célula puede verse reflejado en la existencia de múltiples subpoblaciones de exosomas (Van Niel et al., 2001; Colombo et al., 2013; Bobrie & Théry, 2013).

1.2.2 Transporte y secreción de exosomas

El proceso de biogénesis de VEs culmina en un proceso de secreción que varía según el origen de las vesículas. Las MVs son liberadas directamente luego de la fisión de la membrana plasmática, pero en los exosomas el proceso es un poco más complejo. El tráfico de los CMV hacia la periferia celular, la fusión posterior con la membrana plasmática y la liberación de exosomas requieren cambios coordinados en las interacciones del citoesqueleto con la membrana plasmática, la activación de motores moleculares, así como también de la maquinaria de fusión.

El proceso de secreción de exosomas se divide principalmente en dos grandes etapas, una etapa de transporte intracelular de los CMV y una etapa final de fusión con la membrana y posterior liberación de las VILs. La familia de proteínas RAB que son pequeñas

proteínas con actividad GTPasas cumplen un rol fundamental en ambos procesos (Stenmark, 2009; Dutta & Donaldson, 2015; Hyenne et al., 2018). Participan en la gemación, en el transporte y en el direccionamiento y fusión de las vesículas (Ostrowski et al., 2010; Pfeffer, 2013) Los motores moleculares son otro conjunto de proteínas que cumplen un rol esencial en el transporte y son uno de los componentes que determinan el balance entre la vía secretoria y la vía lisosomal. La vía lisosomal, por ejemplo, ocurre por transporte retrogrado y es la proteína RAB7 junto a proteínas asociadas que reclutan a la dineína culminando esto en un transporte del CMV. Por otro lado, las proteínas RAB27A y B son esenciales para la secreción de exosomas y participan tanto en el transporte del CMV como en la fusión con la membrana (Ostrowski et al., 2010). Debido a que las proteínas encargadas del transporte no se expresan constitutivamente, cada tipo de célula puede adaptar sus propias maquinarias secretoras (Guillaume Van Niel et al., 2018; Mathieu et al., 2019).

En la etapa de fusión las proteínas involucradas no están tan definidas pero, podrían cumplir un rol importante la familia de receptores SNARE (*Soluble NSF Attachment Protein*) y la familia SYTs (*synaptotagmin*) (Inoue et al., 2015). Estas proteínas de membrana se encuentran sobre la superficie de las vesículas (v-SNARE) o sobre la membrana blanco (t-SNARE) y son los responsables de la especificidad. La participación de estas proteínas en la liberación de los exosomas se encuentra muy poco estudiada (Mathieu et al., 2019; Peak et al., 2020; Verweij et al., 2018) pero su rol en otros procesos similares las convierten en las principales candidatas (Fader et al., 2009; Wang et al., 2018; Messenger et al., 2018). Si bien hoy en día la fusión con la membrana continúa siendo un campo desconocido, se cree que la gran diversidad en estas familias de proteínas hace que el proceso de secreción varíe según el organismo, el tipo celular y el subtipo de VEs.

Una vez finalizado el proceso de secreción las vesículas pueden interaccionar con las células vecinas o con la matriz extracelular, o ser transportadas pasivamente por el flujo sanguíneo o fluidos corporales (Buzás et al., 2018).

1.2.3 Composición

Los exosomas transportan una amplia gama de moléculas que incluyen proteínas, ADN, ARNm y microARN (**Figura 4**), estos componentes van a depender en gran medida del tipo celular del cual se originan. El contenido de las VEs es muy heterogéneo y no solo

varía según el tipo celular sino que también podría estar relacionado con los diferentes mecanismos empleados en su biogénesis (Jeppesen et al., 2019). A continuación, se detallan, con algunos ejemplos, los tres grandes grupos de moléculas que pueden encontrarse en las VEs.

1.2.3.1 Proteínas

Los exosomas contienen un amplio repertorio de proteínas que incluyen tanto proteínas de membrana, proteínas asociadas a lípidos, asociadas a la periferia de la membrana y proteínas solubles presentes en el lumen del exosomas (Pegtel & Gould, 2019). La caracterización proteica de las VEs es un campo de estudio muy explotado y la información disponible en las bases de datos como Exocarta aumenta constantemente. Por esta razón, vamos a hacer un amplio resumen del contenido proteico identificado en exosomas.

Algunas proteínas importantes para comprender la proteómica de los exosomas son aquellas relacionadas con la biogénesis. En un principio estas proteínas eran consideradas “marcadores exosomales”; uno de los más renombrados son las proteínas ALIX y TSG-101 pertenecientes a la vía dependiente de ESCRT (Kalra et al., 2012; Choi et al., 2013). La familia de las tetraspaninas (CD9, CD81 y CD63) son otras de las moléculas que se encuentran muy representadas en la membrana de los exosomas y en un principio también se las consideraba marcadores. Hoy sabemos que no solo están presentes en los exosomas si no también en MVs y por esta razón pasaron a considerarse proteínas marcadoras de VEs (Doyle & Wang, 2019). Si bien hoy en día se encuentran mucho más estudiada las poblaciones de VEs, sigue siendo un gran desafío la identificación y caracterización de cada subpoblación. Por esta razón, la caracterización debe abordarse desde distintos aspectos considerando tanto los marcadores proteicos, como características morfológicas, composición lipídica, densidad, contenido de miARN, etc.

Dentro de la composición proteica de los exosomas también existen moléculas que, si bien no son parte de los marcadores, son de gran importancia ya que provienen de la célula parental. Por ejemplo, VEs derivadas de células tumorales expresan proteínas supresoras como PD-L1 al igual que lo hace la célula tumoral que le dio origen (Chen et al., 2018). Otro ejemplo, son los exosomas derivados de células presentadoras de antígenos (CPA) que pueden activar una respuesta adaptativa ya que expresan moléculas coestimuladoras junto al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II)

(Raposo et al., 1996; Lindenberg & Stoorvogel, 2018; Kowal, 2019). Las VEs también pueden transportar diferentes factores asociados a la membrana como el TGFβ (Borges et al., 2013), TNF (Zhang et al., 2006; W Gao et al., 2016), citoquinas (Fitzgerald et al., 2018; Gao et al., 2019), entre otros. En la **Figura 4** se indica un resumen de la gran variedad de proteínas presentes en los exosomas.

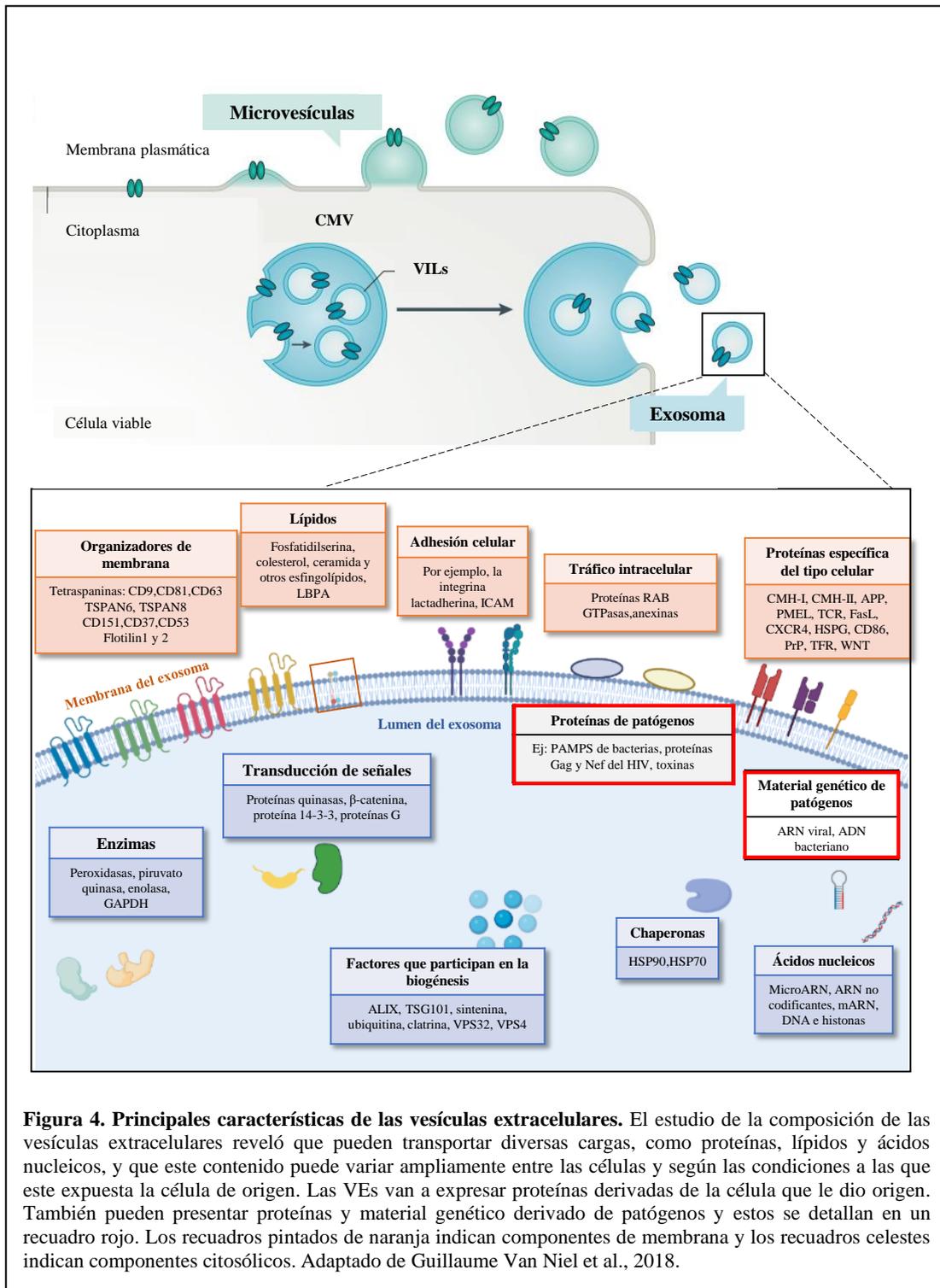


Figura 4. Principales características de las vesículas extracelulares. El estudio de la composición de las vesículas extracelulares reveló que pueden transportar diversas cargas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y que este contenido puede variar ampliamente entre las células y según las condiciones a las que este expuesta la célula de origen. Las VEs van a expresar proteínas derivadas de la célula que le dio origen. También pueden presentar proteínas y material genético derivado de patógenos y estos se detallan en un recuadro rojo. Los recuadros pintados de naranja indican componentes de membrana y los recuadros celestes indican componentes citosólicos. Adaptado de Guillaume Van Niel et al., 2018.

Múltiples trabajos han demostrado que las VEs también pueden expresar proteínas provenientes de ciertos patógenos que pueden activar o inhibir al sistema inmune e incluso promover la propagación de la infección (Spencer & Yeruva, 2021). Por ejemplo, VEs derivadas de macrófagos infectados con *Mycobacterium* son capaces de promover la activación del sistema inmune gracias a la presencia de proteínas bacterianas fuertemente inmunogénicas (Giri et al., 2010; Smith et al., 2017). La presencia de antígenos en VEs de células infectadas fue también demostrada para otras infecciones bacterianas como las causadas por *Salmonella*, *Pseudomonas pneumoniae*, *Mycoplasma*, entre otras (Y. Cheng & Schorey, 2020). Muchas infecciones virales se encuentran fuertemente relacionadas a las VEs y esto es en gran parte porque muchos virus pueden “secuestrar” la maquinaria de biogénesis exosomal y utilizarla para la propagación o ensamblado de partículas. Por esta razón es que muchas veces se encuentran componentes virales en las VEs (Urbanelli et al., 2019; Fleming et al., 2014). Un ejemplo lo constituyen las proteínas pro-virales Gag y Nef transportadas por las VEs derivadas de células infectadas por HIV para promover la infección en células vecinas (Gould et al., 2003; Booth et al., 2006; Mukhamedova et al., 2019). Los exosomas también pueden transportar toxinas como se ha demostrado con el factor letal α , (Abrami et al., 2013) y la toxina diftérica (Colino & Snapper, 2006).

1.2.3.2 Lípidos

Como mencionamos anteriormente una característica de las VEs es su doble membrana lipídica, la cual tiene una composición particular y muy distinta a la composición de la membrana celular. Si bien el contenido lipídico de los exosomas no está totalmente definido se conocen ciertos componentes que están en mayor abundancia (Record et al., 2018). Estas VEs parecen contener más colesterol, esfingolípidos, fosfatidilinositol (PI) -3-fosfato [PI (3) P] y bis (monoacilglicero) fosfato (BMP) que la membrana del CMV y la membrana celular. Esta composición lipídica es dinámica y se considera que puede variar según la etapa de maduración de los CMV, habiendo una mayor presencia de colesterol en las primeras etapas y más BMP en las últimas etapas (Skotland et al., 2019). Además de los lípidos estructurales, las VEs contienen también lípidos bioactivos, como las prostaglandinas, leucotrienos y los lisofosfolípidos (Subra et al., 2010; Record et al., 2014; Skotland et al., 2017; Boilard, 2018; Record et al., 2018; Umari & Singh, 2018; Kalluri & LeBleu, 2020). El hecho de que las VEs posean una composición lipídica particular y diferente a la de la célula hace que tengan también distintas propiedades

físicas (He et al., 2022). Por ejemplo, los exosomas tienen una mayor estabilidad frente a los detergentes que las células e incluso que otras VEs, esta estabilidad hace que tengan un mayor tiempo de vida media en el medio extracelular (Skotland et al., 2019). Al igual que ocurre con las proteínas, el contenido lipídico de las VEs también varía según la vía de biogénesis y esta variabilidad refuerza la heterogeneidad de la población de VEs.

1.2.3.3 Material genético

Otra característica importante de las VEs es su alto contenido de material genético que tiene un rol fundamente en la regulación y comunicación intercelular. La aplicación de métodos de secuenciación avanzadas reveló la presencia de varias especies de ARN dentro de las subpoblaciones de VEs. La presencia de ARNs mensajero (mARN), miARNs y ARNs largos no codificantes (lncARN) dentro de exosomas y MVs (O'Brien et al., 2020; Fischer & Deindl, 2021) se ha demostrado consistentemente en múltiples trabajos con microarrays y técnicas RT-qPCR. El contenido de ARN característico de exosomas y MVs derivados de un tipo celular, podría tener un enorme potencial como biomarcador no invasivo para múltiples patologías (Gezer et al., 2014; Turchinovich et al., 2019; Lässer et al., 2017; Beylerli et al., 2022). En particular ya se utiliza como biomarcador para el diagnóstico de cáncer de próstata (Nilsson et al., 2009; García-Flores et al., 2021; Z. Gao et al., 2021; Mugoni et al., 2022). Los exosomas también contienen distintos tipos de ADN, ADN monocatenario, ADN bicatenario, ADN genómico, ADN mitocondrial, entre otros. La función del ADN exosomal no está muy clara pero podría tener un impacto en la regulación de la inflamación, y puede resultar un marcador útil, tanto para tumores como para infecciones virales o resistencia a quimioterapia (Pegtel & Gould, 2019). Al igual que ocurre con las proteínas, también se ha identificado material genético proveniente de patógenos en VEs derivadas de células infectadas. Un ejemplo muy claro de esto es el material genético de algunos virus que puede encontrarse en las VEs (Chugh et al., 2013; Hoshina et al., 2016; Urbanelli et al., 2019). Las VEs también pueden contener material genético bacteriano, un ejemplo es el ADN de bacterias intracelulares como *Listeria*, *Legionella pneumophila*, y *Franciscella tularensis*. (Nandakumar et al., 2019).

Al igual que todas las moléculas presentes en los exosomas el contenido genético puede variar dependiendo de la subpoblación de VEs que se esté estudiando y esto podría facilitar su caracterización (Lázaro-Ibáñez et al., 2019).

Todas estas moléculas transportadas en las VEs reflejan su rol fundamental en la señalización y comunicación celular. Todo este contenido se puede transferir de las células de origen a una célula diana elaborando así una compleja red de comunicación intercelular (Graça Raposo & Stahl, 2019), siendo esta área una de las principales áreas de estudio en la actualidad.

1.3 Rol biológico de las vesículas extracelulares

Las VEs están presentes en fluidos biológicos y están involucradas en múltiples procesos fisiológicos y patológicos. Estas vesículas ejercen su efecto sobre los procesos biológicos de manera pleiotrópicas, una vez liberadas pueden llegar a las células receptoras y generar en esta última diferentes tipos de respuestas (EL Andaloussi et al., 2013). Las VEs pueden transmitir información a una célula receptora de dos maneras: 1) interacción del tipo ligando-receptor seguida de la activación de los receptores y señalización, o 2) incorporación del contenido por internalización directa de las vesículas por parte de la célula receptora (**Figura 5**) (McKelvey et al., 2015; Van Niel et al., 2018; Mathieu et al., 2019).

Para que todo esto ocurra se requiere en primer lugar, la unión de la VEs con la membrana plasmática de la célula receptora. Esta interacción puede estar mediada por proteínas de membrana como receptores y / o moléculas de adhesión como las integrinas y los proteoglicanos a las cuales pueden unirse las VEs (Robbins & Morelli, 2014; Q. Li et al., 2019; Soung et al., 2019 ;Gonda et al., 2019; Shimaoka et al., 2019).

Cuando la interacción es del tipo ligando-receptor (**Figura 5** punto **1**) las VEs pueden activar directamente los receptores de la superficie de la célula diana a través de ligandos proteicos o lipídicos y activar una cascada de señalización. Un ejemplo de esto es la interacción del CMH presente en la VEs con el TCR (de su nombre en inglés *T cell receptor*) del linfocito T (LT); esta interacción permite la presentación de antígenos por parte de las VEs derivadas de células dendríticas (CDs) (EL Andaloussi et al., 2013).

En otros casos la información es mucho más que una señalización de membrana y requiere la incorporación del contenido por internalización de la VEs (**Figura 5** punto **2**). Esto puede ocurrir por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la endocitosis mediada por receptores de membrana, la macropinocitosis (Tian et al., 2014) (Costa Verdera et al., 2017; Eguchi et al., 2019; Urbanelli et al., 2019; Gao et al., 2020) o la fagocitosis. (Shah et al., 2019; Glassman et al., 2020). Otras veces, la incorporación de

las moléculas de la VEs se realiza de una manera más rápida, produciéndose la fusión directa de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática de la célula vertiéndose todo el contenido en el citosol.

Aún no está claro si la interacción entre la VEs y la célula aceptora ocurre con alguna especificidad o si el proceso no es específico y es estocástico, pero la literatura brinda apoyo para ambas teorías (Valadi et al., 2007; Fitzner et al., 2011); Horibe et al., 2018). La especificidad de las VEs por un cierto tipo celular podría estar definida por las proteínas presentes en la membrana. Si bien existen muchas proteínas candidatas que puedan mediar la captación de VEs (Morelli et al., 2004) aún no se ha encontrado un receptor específico para VEs que muestre ser necesario y suficiente para la interacción e internalización (Mathieu et al., 2019 ; Gonda et al., 2019).

Los lípidos también juegan un rol importante en la interacción VEs-célula. La composición lipídica de la membrana celular puede contribuir a la internalización y por ejemplo, la disrupción de las balsas lipídicas por la falta de colesterol reduce la captación de VEs (Escrevente et al., 2011; Pfrieder & Vitale, 2018).

Por medio de qué mecanismo interacciona la VEs con la célula diana va a depender principalmente de la naturaleza de la VEs y de la naturaleza de la célula diana. Una misma VEs puede ser incorporada por mecanismos distintos en distintas células blanco. Esto puede desencadenar distintas respuestas (Kalluri & LeBleu, 2020). De esta manera cada interacción en particular dependerá de los elementos que participan, así como también del contexto en el que ocurra.

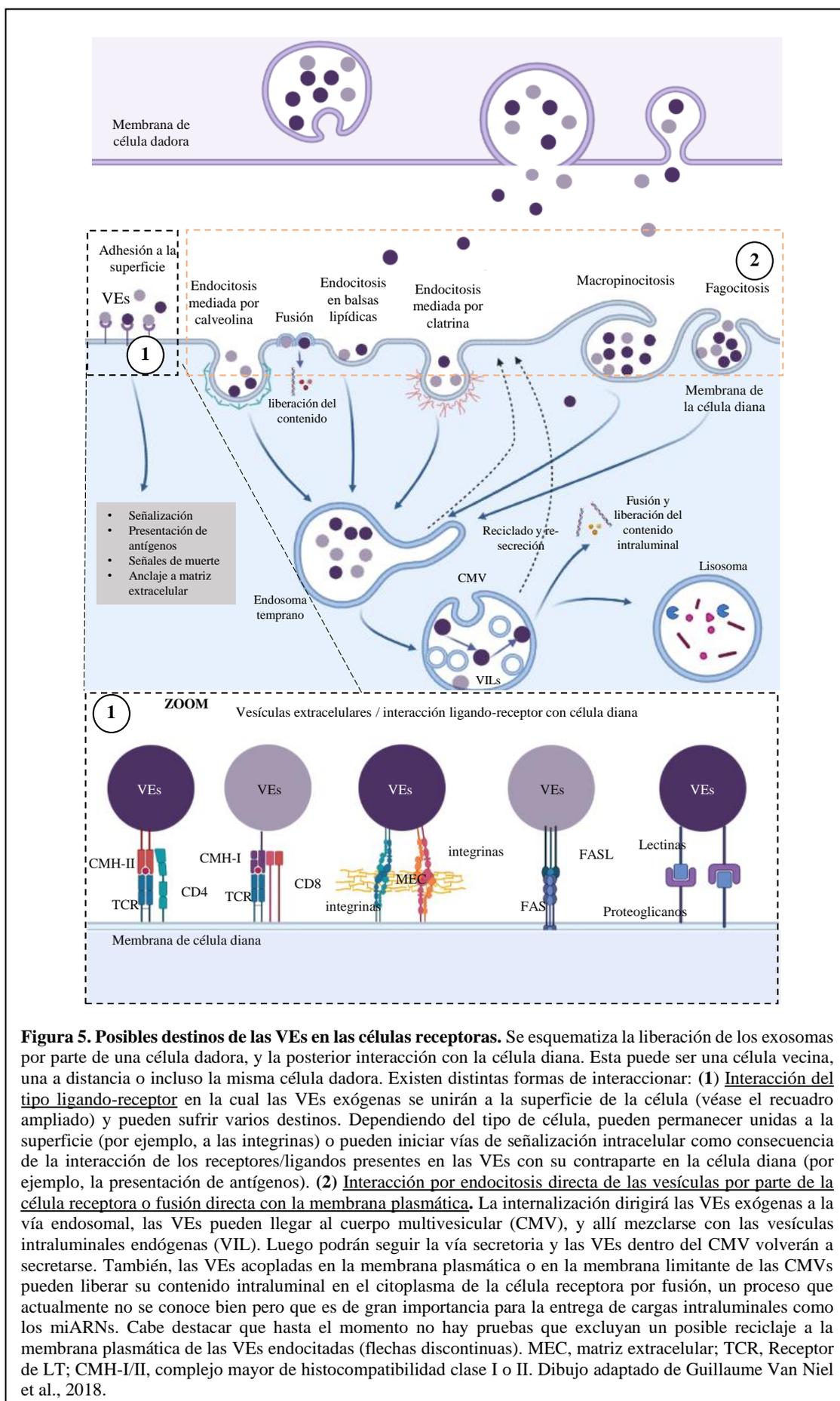


Figura 5. Posibles destinos de las VEs en las células receptoras. Se esquematiza la liberación de los exosomas por parte de una célula dadora, y la posterior interacción con la célula diana. Esta puede ser una célula vecina, una a distancia o incluso la misma célula dadora. Existen distintas formas de interactuar: **(1) Interacción del tipo ligando-receptor** en la cual las VEs exógenas se unirán a la superficie de la célula (véase el recuadro ampliado) y pueden sufrir varios destinos. Dependiendo del tipo de célula, pueden permanecer unidas a la superficie (por ejemplo, a las integrinas) o pueden iniciar vías de señalización intracelular como consecuencia de la interacción de los receptores/ligandos presentes en las VEs con su contraparte en la célula diana (por ejemplo, la presentación de antígenos). **(2) Interacción por endocitosis directa de las vesículas por parte de la célula receptora o fusión directa con la membrana plasmática.** La internalización dirigirá las VEs exógenas a la vía endosomal, las VEs pueden llegar al cuerpo multivesicular (CMV), y allí mezclarse con las vesículas intraluminales endógenas (VIL). Luego podrán seguir la vía secretoria y las VEs dentro del CMV volverán a secretarse. También, las VEs acopladas en la membrana plasmática o en la membrana limitante de las CMVs pueden liberar su contenido intraluminal en el citoplasma de la célula receptora por fusión, un proceso que actualmente no se conoce bien pero que es de gran importancia para la entrega de cargas intraluminales como los miARNs. Cabe destacar que hasta el momento no hay pruebas que excluyan un posible reciclaje a la membrana plasmática de las VEs endocitadas (flechas discontinuas). MEC, matriz extracelular; TCR, Receptor de LT; CMH-I/II, complejo mayor de histocompatibilidad clase I o II. Dibujo adaptado de Guillaume Van Niel et al., 2018.

1.4 VEs y su función en la regulación del sistema inmune

El sistema inmune comprende diferentes tipos de células que residen en múltiples órganos en todo el cuerpo y esto lo convierte en una compleja red. Para mantener la homeostasis celular, proporcionar defensa al huésped, pero al mismo tiempo tolerar células sanas, bacterias comensales y otros compuestos ambientales no peligrosos, se requiere de un accionar coordinado de las partes y para que esto ocurra es fundamental la correcta comunicación. El sistema inmune utiliza vías eficientes de comunicación como el contacto directo entre células y la liberación de factores solubles (Veerman et al., 2019). A estas vías se le suma, a mediados de los años noventa, el intercambio de información por medio de la secreción de VEs. El grupo de la Dra. Raposo y colaboradores lograron determinar que los exosomas derivados de linfocitos B (LB) tenían la capacidad de presentar antígenos y activar a los LT (G Raposo & Nijman, 1996). Este hallazgo demostró el papel de los exosomas en la modulación de una respuesta inmune y cambió la idea que se tenía hasta entonces de las nanovesículas, dándoles un rol fundamental en la comunicación celular del sistema inmune.

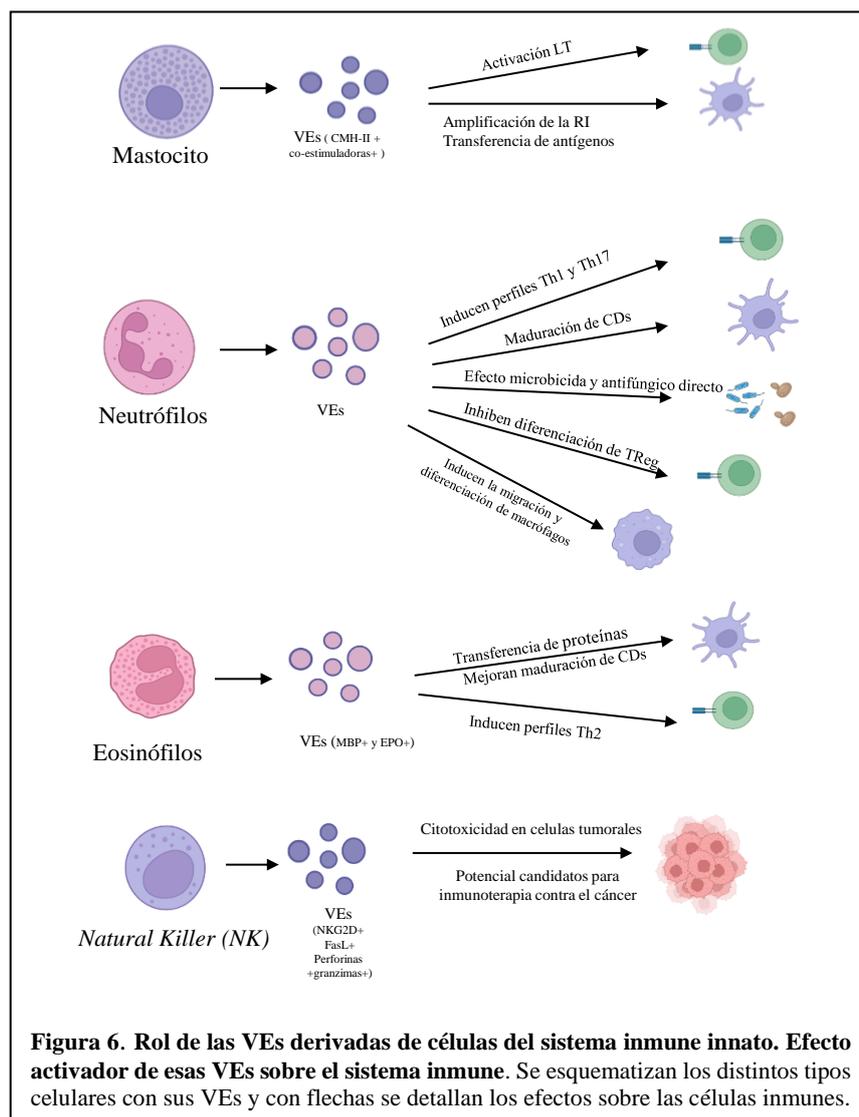
El papel de los exosomas y VEs en la modulación del sistema inmune se ha estudiado ampliamente. Hoy sabemos que las VEs secretadas tanto por células inmunes y no inmunes tienen papeles importantes en la inmunidad. Pueden mediar la estimulación o la supresión inmunitaria y pueden conducir a enfermedades patológicas inflamatorias, autoinmunes e infecciosas (Robbins & Morelli, 2014).

En esta sección se resumen las principales funciones inmunes en las que participan las VEs derivadas tanto de células inmunes como no inmunes.

1.4.1 Activación del sistema inmune por las VEs

El sistema inmune es activado por señales de daño que pueden ser censadas gracias a receptores presentes en las células inmunes. Estas células una vez que reciben las señales de daño sufren ciertos cambios que conllevan a la activación celular. Se ha comprobado que la secreción de VEs luego de esa activación es un medio para mejorar la respuesta. Existen muchas formas en que las células inmunes usan las VEs para activar el sistema inmunitario y a continuación realizaré una descripción general de algunos de estos procesos.

Las células inmunes innatas contribuyen a la primera línea de defensa del cuerpo, si ellas no logran contener al patógeno en primera instancia, se mejorará la respuesta mediante mecanismos inmunes adaptativos específicos. Para ello, es necesario una correcta comunicación entre el sistema innato y el adaptativo. Hoy se sabe que casi todas las células inmunes innatas pueden comunicarse con las CDs y/o LT y LB, y por lo tanto contribuir al desarrollo de las respuestas inmunes adaptativas. Es en esta comunicación en la cual entran en juego las VEs (Groot Kormelink et al., 2018).



En la **Figura 6** se resumen muy brevemente algunas de las funciones activadoras de VEs secretadas por células del sistema inmune innato. Se puede observar como las VEs de los **mastocitos** podrían tener un rol en la activación de la respuesta T (Groot Kormelink et al., 2016). ya que expresan CMH-II y moléculas coestimuladoras (Raposo et al., 1997),

también pueden amplificar la respuesta inmune al transferir antígenos endocitados y parcialmente procesados a las CD_s inmaduras *in vitro* e *in vivo* (Skokos et al., 2003). Las VEs derivadas de otras células innatas como los **neutrófilos** (Dalli et al., 2013; Gasser et al., 2003; Slater et al., 2017; Timár et al., 2013; Henry et al., 2016; Shopova et al., 2020; Lórinz et al., 2020) y **eosinófilos** (J. A. Cañas et al., 2017; Mazzeo et al., 2015); Shamri, Xenakis, & Spencer, 2011) pueden tener un potencial rol en la activación de la respuesta inmune al mejorar la maduración de CD_s y favorecer el desarrollo de células T *helper* 2 (Th2) (Sangaphunchai et al., 2020). Por otra parte, las VEs de las **células NK** también presentan moléculas con relevancia inmunológica como la proteína CD56, el receptor NKG2D, el ligando FAS, perforina, granzima A, granzima B y granulisina (Jong et al., 2017; Lugini et al., 2012) que las convierte en potenciales moduladores de la respuesta inmune.

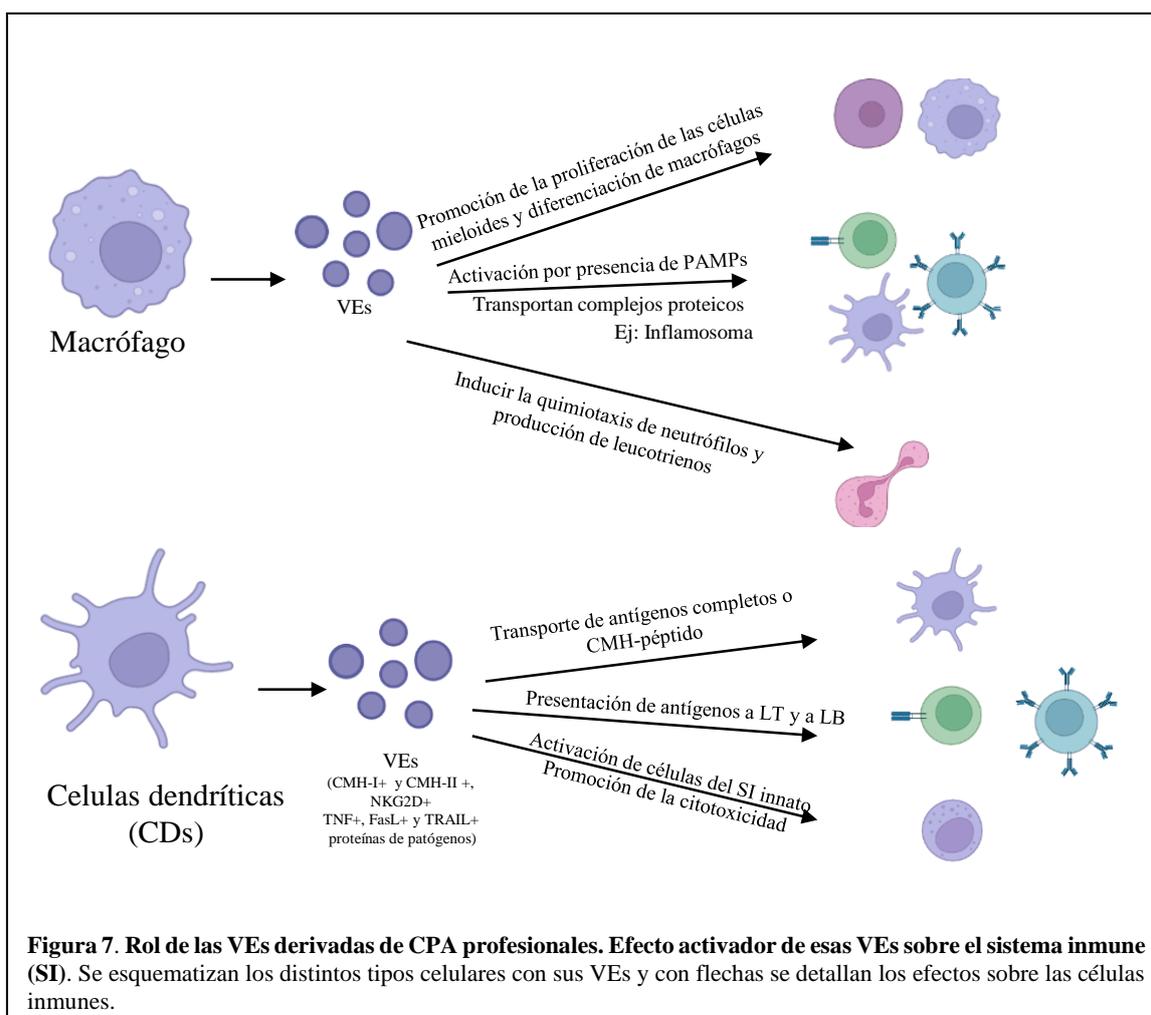
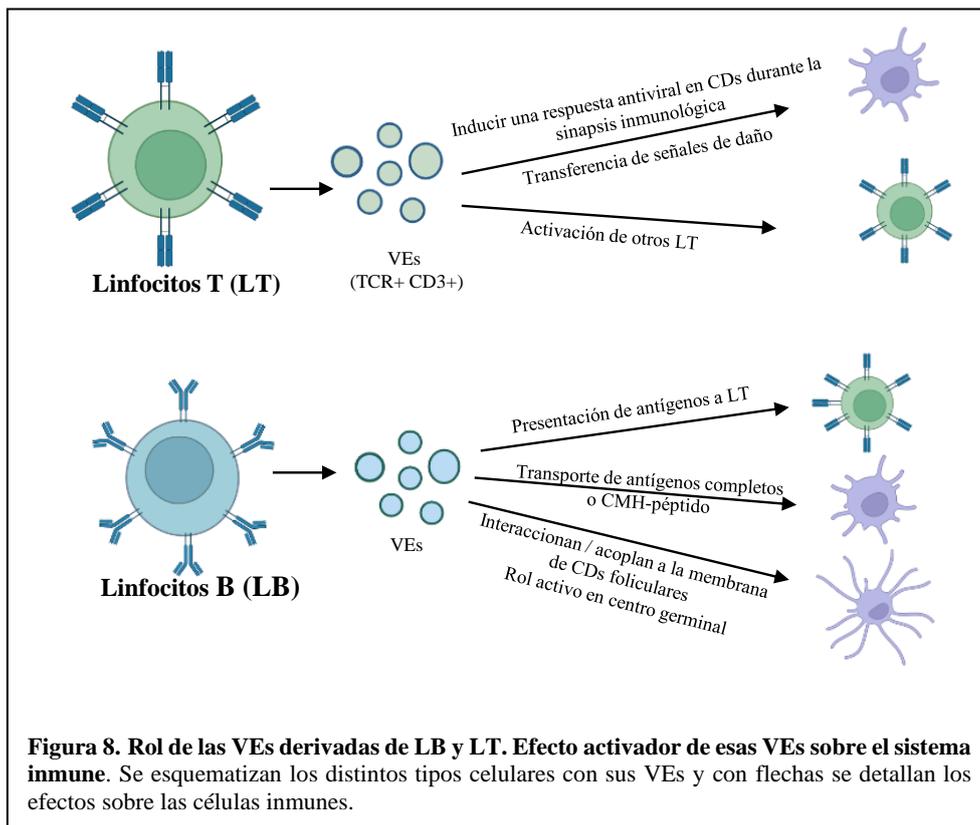


Figura 7. Rol de las VEs derivadas de CPA profesionales. Efecto activador de esas VEs sobre el sistema inmune (SI). Se esquematizan los distintos tipos celulares con sus VEs y con flechas se detallan los efectos sobre las células inmunes.

Otro grupo celular muy importante en la respuesta innata son las CPA profesionales. Dentro de este grupo figuran los **macrófagos y las CDs**. Las VEs derivadas de macrófagos (**Figura 7**) pueden ejercer múltiples funciones y participan en la promoción de la proliferación de las células mieloides y diferenciación de los macrófagos (Wen et al., 2017); Akbar et al., 2021). Pueden expresar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Bhatnagar et al., 2007; Giri & Schorey, 2008; Y. Cheng & Schorey, 2020) y complejos multi-proteicos como el inflamasoma (Yuehui Zhang et al., 2017). Sin duda las VEs secretadas por las **CDs** son de las más estudiadas ya que son claves en la respuesta inmune (**Figura 7**). Pueden transportar antígenos completos y también complejos CMH-péptidos que pueden activar a los LT específicos (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018). Al expresar en su membrana las moléculas CMH-I y CMH-II tienen la capacidad de activar respuestas T CD4 + y CD8 + directamente. (Näslund, Gehrman, & Gabrielsson, 2013; Graner, 2018). Las VEs también pueden amplificar la respuesta inmune a través de la transferencia de complejos CMH-péptido. Cuando una CDs se activa libera VEs que van a tener en su membrana el CMH asociado a un péptido del patógeno, estas VEs pueden ser captadas por otra CDs que no ha estado en contacto con el antígeno y el CMH-péptido de la VEs puede pasar a formar parte de la membrana de la CDs (por fusión de la VEs) o puede haber un procesamiento de los antígenos para su posterior presentación (Théry et al., 2009). También pueden participar en la activación de otras células inmunes innatas como las células NK.



Las VEs derivadas de las células del sistema adaptativo también cumplen roles importantes en la modulación del sistema inmune (**Figura 8**). Por ejemplo, cuando un **LT** se activa, libera grandes cantidades de exosomas que contienen el complejo TCR/CD3 en su membrana (Blanchard et al., 2002; Lu et al., 2018). Estas VEs se han asociado principalmente con la activación de respuestas inmunes antivirales y antitumorales (Torralba et al., 2018). Además, los **LB** siendo CPA profesionales, al igual que las CDs, liberan VEs que expresan las moléculas del CMH-I y CMH-II, y pueden activar a los LT (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018). Por otra parte, son una fuente importante de antígenos y, consecuentemente, cumplen una función esencial en el centro germinal (CG). (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018).

Si bien las VEs liberadas por células inmunes tienen la capacidad de modular la respuesta inmune también pueden hacerlo VEs secretadas por **células no inmunes**. Un claro ejemplo de ello son las **VEs derivadas de tumores** que contienen factores que pueden regular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, ya que poseen antígenos asociados al tumor (TAA) (Dai et al., 2005; Kharmate, Hosseini-Beheshti, Caradec, Chin, & Tomlinson Guns, 2016; C. Wang et al., 2020) y moléculas inmunorreguladoras (Chen et al., 2018). Las VEs de células tumorales pueden transferir antígenos tumorales a CDs

y por ello son postuladas como antígenos tumorales acelulares para el desarrollo de vacunas (Wolfers et al., 2001; Näslund, Gehrman, Qazi, et al., 2013b; Xiao et al., 2017; Menay et al., 2017).

Existen VEs que también pueden modular el sistema inmune que no son secretadas por células inmune e incluso ni siquiera por células propias del organismo. Son las VEs secretadas por ciertos **patógenos** tanto procariotas como eucariotas. Un ejemplo de esto son las OMV (de su nombre en inglés *Outer Membrane Vesicles*) secretadas por bacterias. Estas VEs pueden llevar componentes del espacio periplásmico y de la membrana (Toyofuku et al., 2019) y pueden activar la respuesta inmune ya que son un vehículo para la propagación de PAMPs (Santos et al., 2018; Mehanny et al., 2020; Nandakumar et al., 2019). Las bacterias no son los únicos patógenos que liberan VEs que activan el sistema inmune. Los hongos (Bielska & May, 2019) y los parásitos eucariotas también producen VEs (De Souza & Barrias, 2020; Drurey & Maizels, 2021). Las VEs secretadas por los distintos patógenos pueden inducir una inmunidad eficiente (Cronemberger-Andrade et al., 2014; Rodrigues et al., 2008; Buck et al., 2014; Erdogan et al., 2019; Jung et al., 2020) y eso las convierte en candidatos vacunales y también en nuevos enfoques de diagnóstico para infecciones parasitarias. (Khosravi et al., 2020) y bacterianas (Kuipers et al., 2018).

1.4.2 Inhibición del sistema inmune por VEs

Una vez que se genera la respuesta inmune y se logra contener la infección, el sistema atraviesa una etapa de contracción, en donde toda la actividad proliferativa de los linfocitos específicos disminuye como consecuencia de la falta de estímulo. Durante esta etapa todos los mecanismos activados deben ser “apagados”. La apoptosis es un mecanismo clave durante la contracción y puede inducirse por receptores de muerte como FasL así como también puede ser inducida por la presencia de citoquinas inhibitoras. (Kuby, 2012). No es sorpresa que estos mismos mecanismos de “apagado” que se presentan en las células también puedan ser enviados a través de la secreción de VEs. Cuando esto ocurre, se define una nueva función de las VEs en la modulación de la respuesta inmune que es la inmunosupresión. A continuación, se explicarán resumidamente algunas de las funciones inhibitoras de las VEs secretadas por células del sistema inmune.

Comenzando con las VEs derivadas de células que pertenecen al sistema inmune innato, (**Figura 9**) encontramos que las VEs provenientes de **neutrófilos** tienen en su mayoría

efectos inhibitorios sobre el sistema inmune. Estos efectos recaen principalmente sobre las CDs derivadas de monocitos, las VEs alteran su morfología y funcionalidad. Todo esto conlleva a una menor proliferación de LT producto de CDs con menor capacidad para activarlos (Eken et al., 2008). También presentan moléculas inmunomoduladoras como la fosfatidilserina (PS) (Gasser et al., 2003 ; Lorincz et al., 2015), que tiene efectos antiinflamatorios conocidos (Eken et al., 2013; Birge et al., 2016;).

También, las VEs derivadas de **células NK** tienen efectos inhibitorios y tienen un papel importante en la homeostasis inmune al inducir la lisis de células mononucleares de sangre periférica activadas (Lugini et al., 2012 ; Fais, 2013).

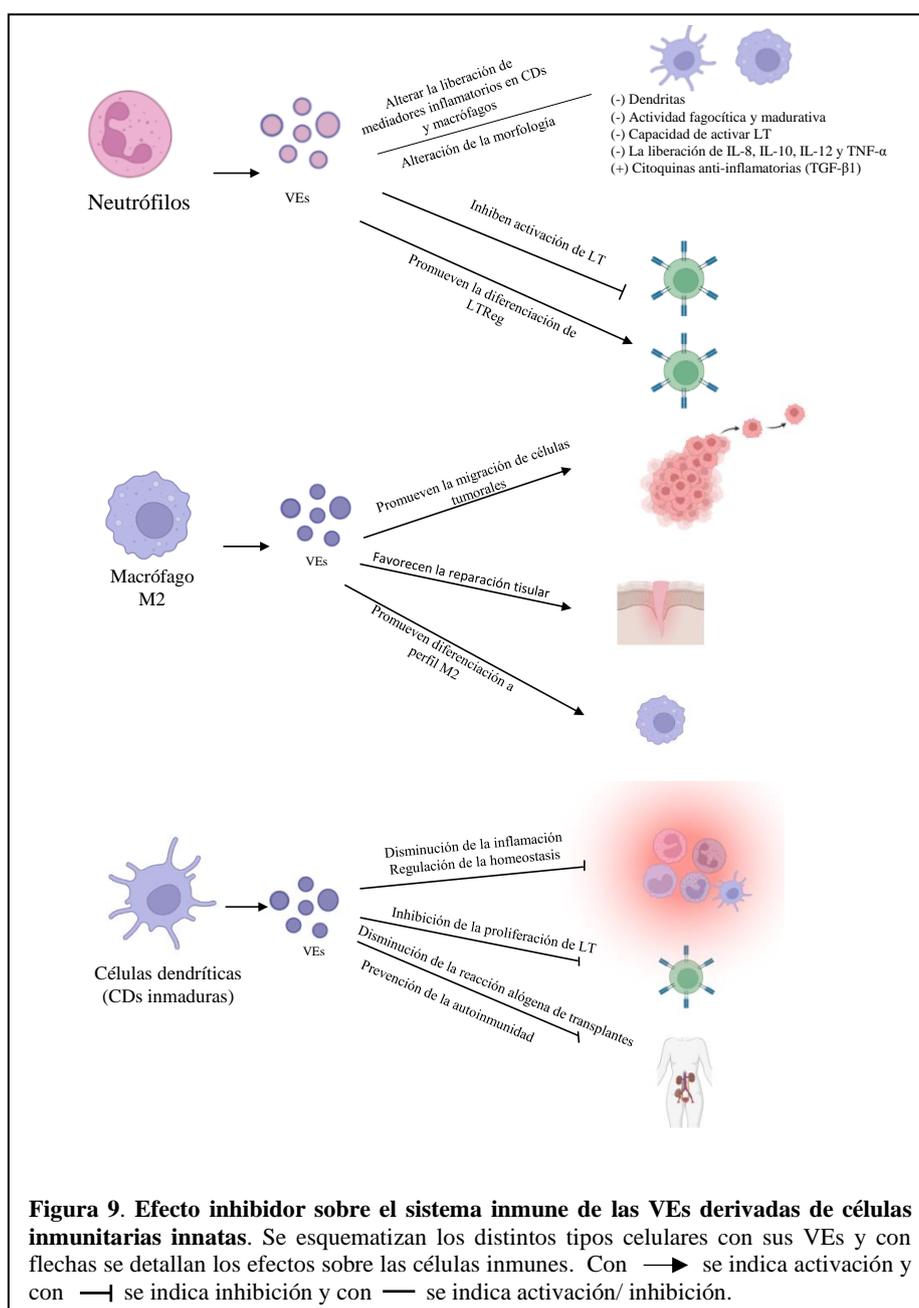
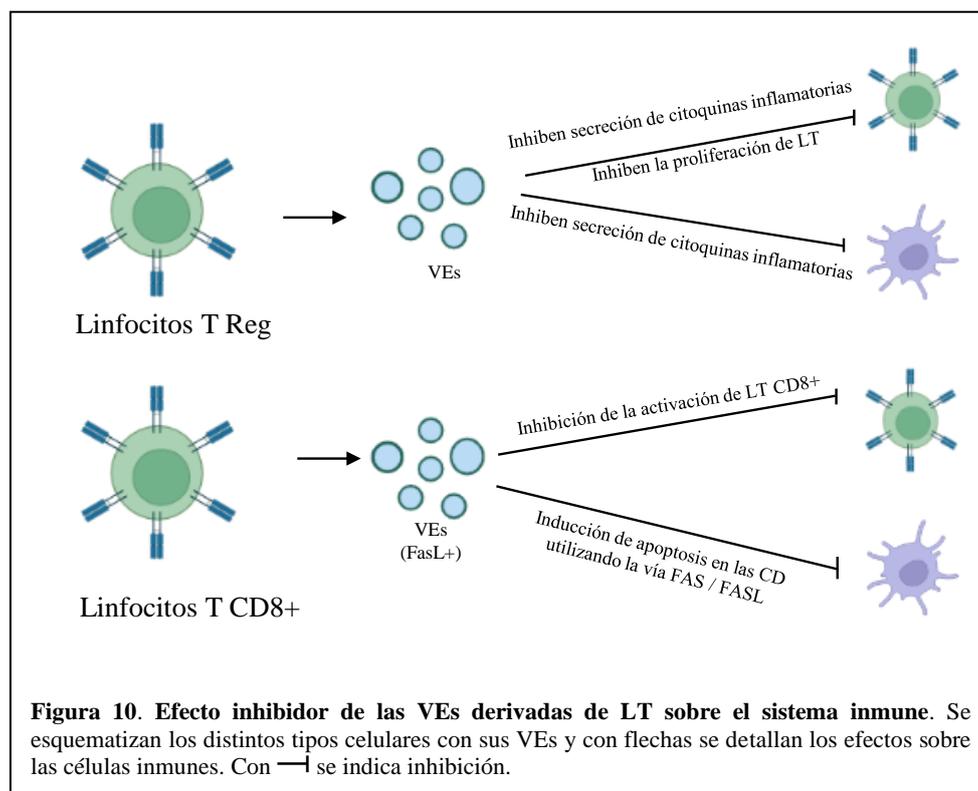


Figura 9. Efecto inhibitorio sobre el sistema inmune de las VEs derivadas de células inmunitarias innatas. Se esquematizan los distintos tipos celulares con sus VEs y con flechas se detallan los efectos sobre las células inmunes. Con \rightarrow se indica activación y con \dashv se indica inhibición y con \dashv se indica activación/ inhibición.

Como se mencionó anteriormente, la función de las VEs está relacionada, en su mayoría, con la función de la célula que le dió origen. Un claro ejemplo de ello se observa al analizar las VEs derivadas de macrófagos. (Garzetti et al., 2014). La función inmunomoduladora de las VEs va a depender del perfil de macrófago del que deriven (**Figura 9**) (Veerman et al., 2019). Es así como las VEs derivadas de **macrófagos M2** pueden promover la migración de células tumorales al igual que los macrófagos M2 (Noy & Pollard, 2014; P. Zheng et al., 2018; Cho et al., 2019). También estas VEs de M2 promueven la liberación de IL-4 e IL-10 por macrófagos y CDs (L. Cheng et al., 2017). Al igual que ocurre con los macrófagos las VEs derivadas de CDs tendrán funciones distintas dependiendo del estado de maduración de la CDs (Schorey et al., 2015; Kowal, 2019) Una **CDs inmadura** libera VEs con funciones inmunosupresoras que se demostraron principalmente en modelos autoinmunes y de trasplante (X. Li et al., 2012). Además de las VEs de CDs inmaduras, las VEs derivadas de las **CDs estimuladas con citoquinas anti-inflamatorias** también tienen funciones inmunoinhibidoras y pueden inhibir la proliferación de LT *in vitro* (Kim et al., 2005; Cai et al., 2012).



Dentro del sistema adaptativo existen células que se caracterizan por tener funciones inhibitorias del sistema inmune y son los **LT regulatorios (Tregs)**. Las VEs derivados de

Tregs (**Figura 10**) pueden bloquear la progresión del ciclo celular e inhibir la proliferación de LT (Aiello et al., 2017), pueden prevenir la inflamación sistémica al suprimir la síntesis de IFN- γ en los LT y la síntesis de citoquinas en las CDs (Okoye et al., 2014; Tung et al., 2018).

La contracción de la respuesta inmune no está a cargo únicamente de la inmunosupresión mediado por los LTreg. Los LT CD8⁺ también pueden inhibir el sistema inmune y se ha demostrado que los VEs liberadas por estas células pueden inducir la apoptosis en las células receptoras (**Figura 10**) (Xie et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmune no se encuentra regulado únicamente por factores internos si no que las VEs derivadas de células no inmunes poseen también un efecto inmunomodulador. Un mecanismo de escape inmunológico muy común de las **células tumorales** es inhibir al sistema inmune y para lograrlo utiliza muchos de los mecanismos que el propio sistema tiene para mantener su homeostasis (Robbins et al., 2016; L. Wang et al., 2021). Las VEs derivadas de las células tumorales pueden actuar sobre distintas células inmunes e inhibirlas, por ejemplo promoviendo la polarización de los macrófagos asociados al tumor hacia un perfil M2 (Linton et al., 2018) (Shinohara et al., 2017), también pueden suprimir la diferenciación de células dendríticas (Yu et al., 2007) y reducir la citotoxicidad de las células NK (Ludwig et al., 2017; Vulpis et al., 2019). La función de las VEs derivadas de tumores dependerá de la célula de origen, del microambiente, del estadio del tumor, entre otros factores.

Al igual que las células tumorales, **los patógenos** también tienen diferentes estrategias para evadir al sistema inmune y las VEs forman parte de esas estrategias. Por ejemplo, las vesículas derivadas de *Leishmania* contienen moléculas inmunosupresoras (Isnard et al., 2012) y tienen la capacidad de disminuir la secreción de TNF α y aumentar la liberación de IL-10 en monocitos infectados. También actúan sobre las CDs reduciendo su capacidad para activar una respuesta T *helper* 1 (Th1) (Silverman et al., 2010). Las VEs derivadas de *Neisseria gonorrhoeae* tienen porinas que aumentan la permeabilidad mitocondrial e inducen la apoptosis de macrófagos (Deo et al., 2018). Así, las VEs de diversos patógenos como *Escherichia coli* (Cañas et al., 2018; Kunsmann et al., 2015) *Cryptococcus neoformans*, entre otros, expresan moléculas que pueden inhibir al sistema inmune (Oliveira et al., 2010).

1.5 Células dendríticas y su importancia en la respuesta inmune

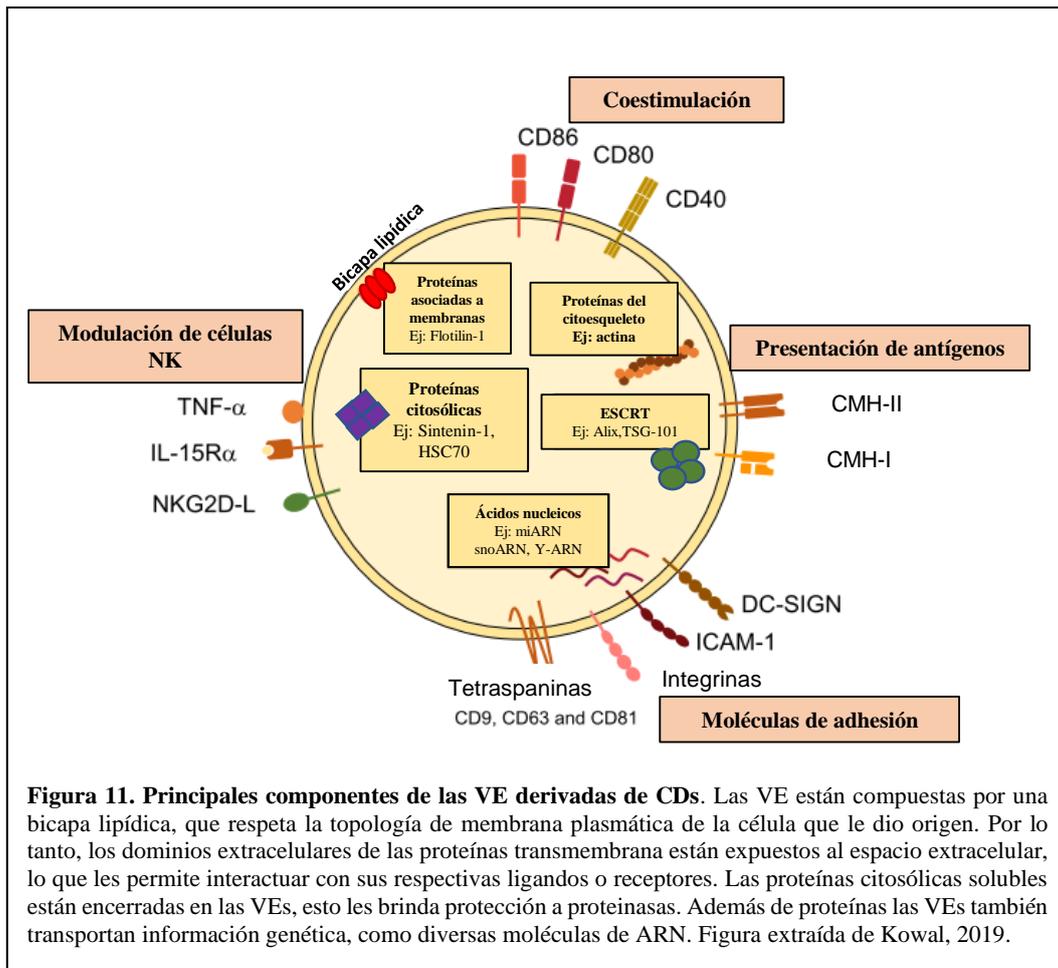
Las CDs forman parte del sistema inmune innato y son el principal nexo con el sistema adaptativo. La primera visualización de este tipo celular fue en 1868 con el descubrimiento de las células de Langerhans en la piel por parte del investigador Paul Langerhans (Langerhans, 1868; Tamaki et al., 1980). Pero, no fue hasta la década de 1970 que el Dr. Ralph Steinman, mientras estudiaba las células esplénicas de los ratones, observó unas células “estrelladas” que eran funcionalmente distinta al resto de los leucocitos (Steinman & Cohn, 1973). Fue este el origen de las CDs como hoy las conocemos, él las caracterizó y las incluyó dentro del conjunto de células del sistema inmune. Por este descubrimiento recibió el Premio Nobel en el año 2011.

Hoy, a 50 años de su descubrimiento, sabemos que las CDs son las encargadas de orquestrar la respuesta inmune, son las células centinelas por excelencias y son necesarias para activar a los LB y LT. Cumplen un rol fundamental como CPA profesionales siendo las únicas con la capacidad de activar a LT vírgenes. Basalmente, las CDs se encuentran en estado inmaduro y distribuidas en la mayoría de los tejidos periféricos en donde censan constantemente la presencia de antígenos (Kubach et al., 2005; Weisheit et al., 2015). En su estado inmaduro se caracterizan por la baja expresión en la superficie celular de las moléculas CD80, CD86, CD40 y CMH-II (Münz et al., 2005) y por su alta capacidad endocítica que les permite internalizar antígenos presentes en el medio (Murphy & Weaver, 2017; Land, 2018; Palm, 2019). Al reconocer un antígeno sufren una serie de cambios fisiológicos, que, en conjunto, se denominan maduración. Como resultado del estímulo, las CDs aumentan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD86 y las moléculas CMH-I y II, convirtiéndose en CD maduras y en excelentes presentadoras del antígeno para los LT vírgenes. Durante este proceso también adquieren la capacidad de migrar a los órganos linfáticos secundarios (OLS). Dependiendo del antígeno y dependiendo del contexto inflamatorio, la CDs puede generar una respuesta principalmente de linfocitos CD8+, de linfocitos CD4+ o contribuir a la activación de LB. Todas estas funciones hacen que el rol de las CDs en el orquestrado de la respuesta inmune frente a diversos patógenos sea protagónico.

1.5.1 VEs derivadas de CDs: Rol en la activación de los linfocitos

Las CDs secretan en su entorno diferentes tipos de VEs con origen intracelular diferentes y, por lo tanto, con propiedades estructurales y bioquímicas distintas (Kowal, 2019). Hoy sabemos que gran parte de las proteínas que están presentes en las VEs coinciden con las proteínas expresadas en la célula que dio origen a esas VEs. Es así como las VEs liberadas por CDs tienen una alta expresión de moléculas CMH-I y CMH-II (**Figura 11**) (Théry et al., 2009).

La secreción de VEs también puede ser modulada, y puede verse afectada por el microambiente y por diferentes estímulos (Yáñez-Mó et al., 2015); de esta manera, los cambios que ocurren en la célula pueden reflejarse en las VEs. Cuando una CDs madura y aumenta la expresión de moléculas coestimuladoras y de moléculas CMH, estos cambios también se producen en las VEs. Por ejemplo, se ha comprobado que las VEs secretadas a partir de CDs diferenciadas de medula ósea (MO) murina que fueron activadas con LPS o con IFN- γ contienen niveles aumentados de CMH-II, de CD86, y de la molécula de adhesión ICAM-I (Segura et al., 2005; Admyre et al., 2006; Qazi et al., 2009; Viaud et al., 2009). No solo varía la expresión de proteínas en las VEs, sino que también puede variar la cantidad de VEs secretadas por las CDs. Por ejemplo, la presencia de LT aumentan la secreción de VEs por parte de la CDs y esta secreción se estimula aún más cuando se agrega un péptido (Buschow et al., 2009). En estos cambios también entran en juego el contenido genético .y se ha demostrado que diferentes subconjuntos de CDs, tratadas con citoquinas inflamatorias o inmunosupresoras, presentan diferentes patrones de expresión de pequeños RNA nucleares (snoARN) que se reflejan en sus VEs (Nolte'T Hoen et al., 2012; Driedonks et al., 2018).



Todos estos indicios demuestran que las VEs son mediadores claves y que la información que transportan varía notablemente cuando la célula de origen se expone a distintos estímulos y, por lo tanto, frente a distintas condiciones la señal recibida en la célula diana desencadenará respuestas diferentes.

La activación de los linfocitos se basa principalmente en 3 señales: el reconocimiento del antígeno a través de su receptor específico, la señal de las moléculas coestimuladoras y la tercer señal que está dada por las citoquinas (Cantrell, 2015). Las VEs derivadas de las CDs expresan en su membrana moléculas que tienen la capacidad de brindar algunas de esas señales, como las moléculas de CMH I y II, las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (**Figura 11**) e incluso pueden tener antígenos nativos (Kowal, 2019). Esto las convierte en pequeñas entidades presentadoras de antígeno y potenciales activadores de LT y LB.

1.5.1.1 Rol de las VEs en la activación de LT: VEs y presentación antigénica

En la activación de los LT juega un rol muy importante la comunicación y la interacción específica con la CD. Durante la sinapsis inmunológica las moléculas del CMH que están cargadas con antígeno (CMH-péptido) pueden unirse a los receptores TCR específicos (Pettmann et al., 2018). Diversos trabajos demuestran que las VEs están involucradas directamente en esta sinapsis inmunológica. Y si bien se han aislado VEs que expresan CMH-II en sangre periférica (Morelli et al., 2004); (Ren et al., 2011; Saunderson et al., 2014; Lindenbergh & Stoorvogel, 2018), los experimentos sugieren que *in vivo* es más probable que la mayoría de las VEs sean secretadas *in situ* e interactúen con las células cercanas inmediatamente después de su liberación (Allan et al., 2006; Montecalvo et al., 2008).

El primer indicio de que las VEs/exosomas de CPA podían activar a los LT fue en el año 1996, cuando se demostró que los exosomas derivados de LB humanos podían presentar antígenos a los LT CD4, *in vitro* (Raposo & Nijman, 1996). De aquí en adelante comenzaron a aparecer numerosos trabajos que demostraron la presencia del CMH-I, CMH-II y las moléculas coestimuladores en las VEs de CPA y confirmaban su rol en la activación de LT *in vivo* e *in vitro* (Zitvogel et al., 1998; Théry, Duban, et al., 2002). (Wolfers et al., 2001). Más tarde, aparecieron reportes que afirmaban que las VEs derivadas de CPA además, podían transferir complejos pCMH a los LT (Mannie et al., 1998; PY & MD, 1999; Arnold y Mannie, 1999; Patel et al., 1999). Estos trabajos demostraron que las VEs derivadas de CPA participaban activamente en la presentación antigénica. De qué manera lo hacían y cuáles eran los mecanismos no estaban claros en ese momento, pero hoy en día sabemos que existen múltiples maneras en que las VEs pueden presentar antígenos a los LT y a continuación se detallará cada uno de los mecanismos.

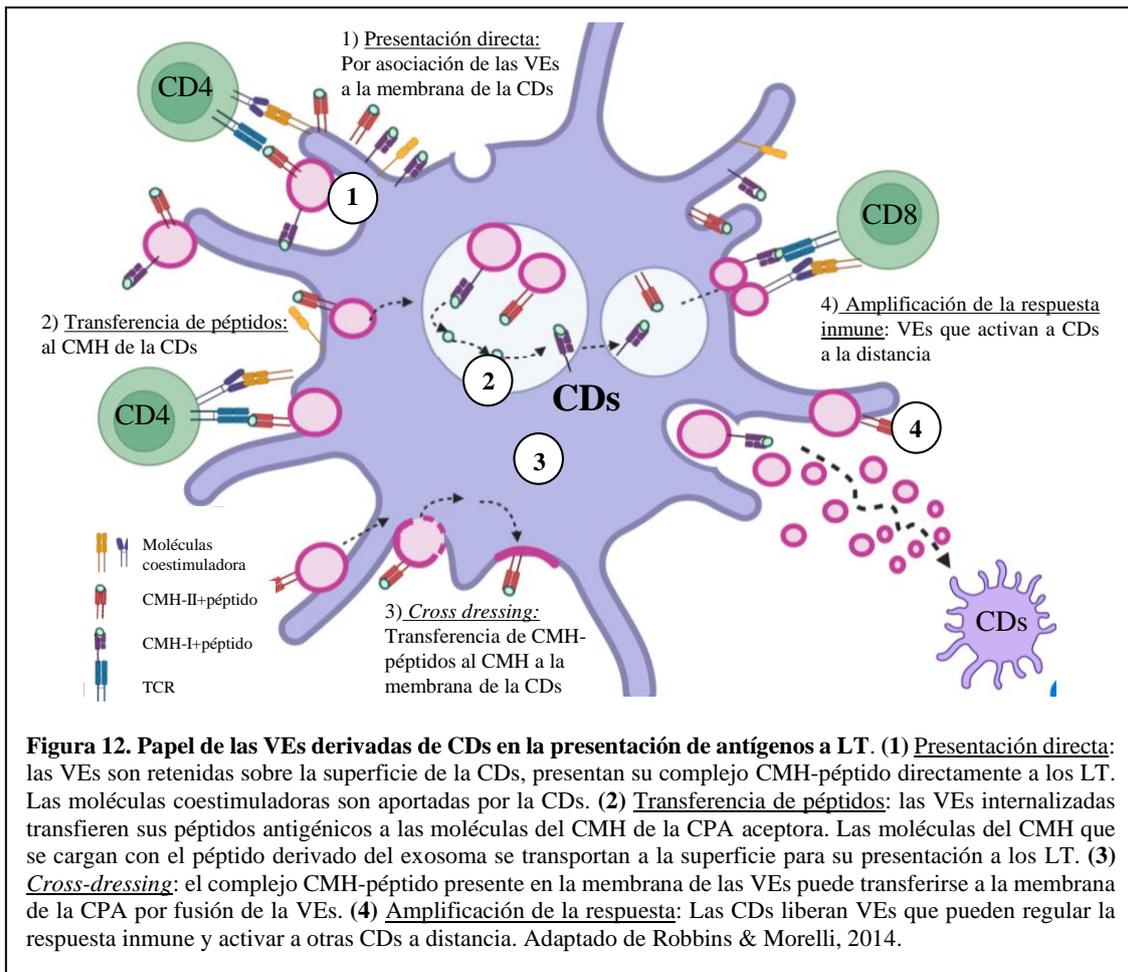
1.5.1.1.1 Presentación directa de antígenos por las VEs derivadas de CDs

La presentación directa de antígenos por las VEs derivadas de CDs está dada básicamente por la interacción de las moléculas presentes en las VEs (CMH) con las moléculas complementarias presentes en el LT (TCR) (Kowal, 2019). La estimulación directa por las VEs (**Figura 12** punto 1) es menos potente que la estimulación generada por las CDs directamente (Vincent-Schneider et al., 2002), y esto puede ser consecuencia de la dispersión que sufren las VEs (debido a su pequeño tamaño) que dificulta reclutar la

cantidad necesaria de entrecruzamientos entre el complejo TCR-CMH y las moléculas coestimuladoras que desencadenen la activación de un linfocito *naïve* (Robbins & Morelli, 2014). Sin embargo, sí pueden estimular a los LT que ya han reconocido un antígeno previamente, y que por lo tanto tienen un umbral de activación menor que los LT *naïve*. Esto sugiere que las VEs podrían ser necesarias para mantener el estado activado de los LT (Muntasell et al., 2007; Ochyl & Moon, 2019). Para poder activar directamente a un LT *naïve* las VEs necesitan la presencia de una CDs que sirva de soporte. Las VEs permanecen adheridas a la membrana de la CDs y utilizarán las moléculas coestimuladoras y demás moléculas de adhesión de la CDs para lograr activar a los LT *naïve*. La capacidad de activar a los LT también va a depender del origen de las VEs, las VEs derivadas de CD maduras tienen una capacidad mayor de estimular a los LT que las VEs secretadas por CDs inmaduras (Utsugi-Kobukai et al., 2003; Montecalvo et al., 2008). Esta mayor capacidad de activación puede estar asociada al incremento de las moléculas de adhesión y coestimulación (CD86 e ICAM1).

1.5.1.1.2 Presentación indirecta a través de la transferencia de antígenos o complejos CMH-péptido a CPA

La capacidad de las VEs de activar a los LT se incrementa significativamente cuando interactúan con las CDs, aún cuando estas no fueron expuestas al antígeno previamente (Segura et al., 2007). Se ha demostrado que las VEs pueden ser internalizadas por fagocitosis o macropinofagocitosis por las CDs. Si las VEs transportan antígenos enteros o complejos CMH-péptido, al ser internalizadas por las CDs podrán activarla y presentarse a través de la maquinaria de procesamiento propia de la CPA (**Figura 12** punto **2** y **4**) (Morelli et al., 2004; Montecalvo et al., 2008; Feng et al., 2010). Si la célula diana es una CD inmadura, ésta va a fagocitar las VEs con mayor eficiencia que una CD madura y se activará y presentará los antígenos que le brindaron las VEs endocitadas. En cambio, en una célula madura las VEs tenderán a permanecer asociadas a la membrana y aprovecharán las moléculas coestimuladoras de la CD para activar a los LT directamente (como se explicó anteriormente **Figura 12** punto **1**) (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018).



1.5.1.1.3 Presentación indirecta por cross-dressing

El sistema inmune posee otras herramientas que facilitan la presentación de antígenos y permite la transferencia de los complejos CMH-péptido preformados y funcionales de una célula a otra. Esta transferencia de moléculas entre células puede ocurrir por distintos mecanismos como la trogocitosis (K. A. Ahmed et al., 2008; Joly & Hudrisier, 2003; Miyake et al., 2017), por medio de puentes intercelulares que permiten la transferencia de materiales de membrana y citosólicos (Gerdes et al., 2013; Nawaz & Fatima, 2017 ; Dupont et al., 2018) o puede ocurrir por el mecanismo de *cross-dressing*. En este último mecanismo participan las VEs (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018; Kowal, 2019). Las VEs pueden quedar retenidas o fusionarse con la membrana de la célula diana (Campana et al., 2015). En cualquiera de las dos situaciones el complejo CMH-péptido-presente en la membrana de las vesículas puede “transferirse” a la membrana de la CPA diana y ser utilizado directamente para la presentación a los LT sin necesidad de un reprocesamiento (**Figura 12** punto 3)(Segura et al., 2007; Morelli et al., 2017). Con esta

herramienta se pueden presentar antígenos por fuera de la propia maquinaria de presentación de las CDs (Bonaccorsi et al., 2014). El *cross-dressing* es considerado un mecanismo complementario de la vía de presentación cruzada ya que las CDs pueden adquirir complejos CMH-péptido-I de células tumorales muertas o apoptóticas, o células infectadas por virus (Lindenbergh & Stoorvogel, 2018).

1.5.1.2 Rol de las VEs en la activación de LB: VEs como vehículo de antígenos

A diferencia de los LT, los LB pueden reconocer el antígeno en su forma nativa sin necesidad de procesamiento o de que otra célula se lo presente en el contexto de CMH. Con su receptor de membrana pueden reconocer directamente antígenos solubles o antígenos que estén asociados a las membranas celulares. En este último caso la estimulación es mayor ya que existe mayor probabilidad de que ocurra el entrecruzamiento de los receptores y esto lleve a la endocitosis del antígeno y posterior activación (Murphy & Weaver, 2017). Las CDs también participan en la activación de los LB actuando como células que presentan antígenos nativos o semiprocesados asociados a membranas, cumpliendo funciones similares a las CDs foliculares (CDF) y a los macrófagos del seno subcapsular del bazo. Las CDs puede incorporar antígeno y retenerlo en compartimentos que no van a degradación. De esta manera, esas moléculas pueden reciclarse luego en la superficie celular (Bergtold et al., 2005). Asimismo, pueden quedar retenidos antígenos por medio de receptores de complemento, o por interacción electrostática con la membrana plasmática (Qi et al., 2006). El resultado final es que las CDs presentarán antígenos intactos en su membrana y ellos quedaran accesibles para los LB (Kushnir et al., 1998; Ludewig et al., 2000).

Las VEs derivadas de CDs también participan en la activación de los LB, aunque existen muy pocos trabajos que detallen este rol de las VEs. La activación de LB por VEs de CDs se basa principalmente en la presencia de proteínas intactas o semiprocesadas en las VEs (**Figura 13**). Se ha demostrado la presencia de antígenos virales, tumorales, toxinas y proteínas como OVA en las VEs y se ha comprobado que esas proteínas pueden inducir y modular la inmunidad humoral. Un ejemplo de ello son los exosomas derivados de CDs pulsadas *in vitro* con el toxoide diftérico intacto. Estas VEs pueden inducir una respuesta humoral primaria específica para el toxoide *in vivo* y esto demuestra la presencia de antígenos intactos en las VEs (Colino & Snapper, 2006). Estos resultados sugieren que, para que las VEs activen a los LB deben poseer epitopes B expuestos del antígeno.

Al presentar antígenos intactos o semiprocesados y activar a los LB, las VEs podrían tener un rol importante en el centro germinal (CG) (Näslund, Gehrman, & Gabrielsson, 2013). Esto se respalda en experimentos que demuestran la interacción de las VEs con CDs y linfocitos B₂M (Näslund, Gehrman, Qazi, et al., 2013). Los linfocitos B₂M transportarían a las VEs hasta las CDF (**Figura 13 A punto 1**) y allí las VEs contribuirán a la activación de las LB siendo una fuente de antígeno nativo (**Figura 13 A punto 2**) (Denzer et al., 2000). En paralelo las VEs captadas por otras CDs podrán activar a LT que luego colaborarán con los LB. De esta manera, las VEs derivadas de CDs podrían cumplir funciones similares a las que cumple la CD, y podrían participar tanto en la activación de LB como en la activación de LT. Para que esto ocurra las VEs debe expresar epitopes tanto B como T (**Figura 13**).

Figura 13 en la página siguiente →

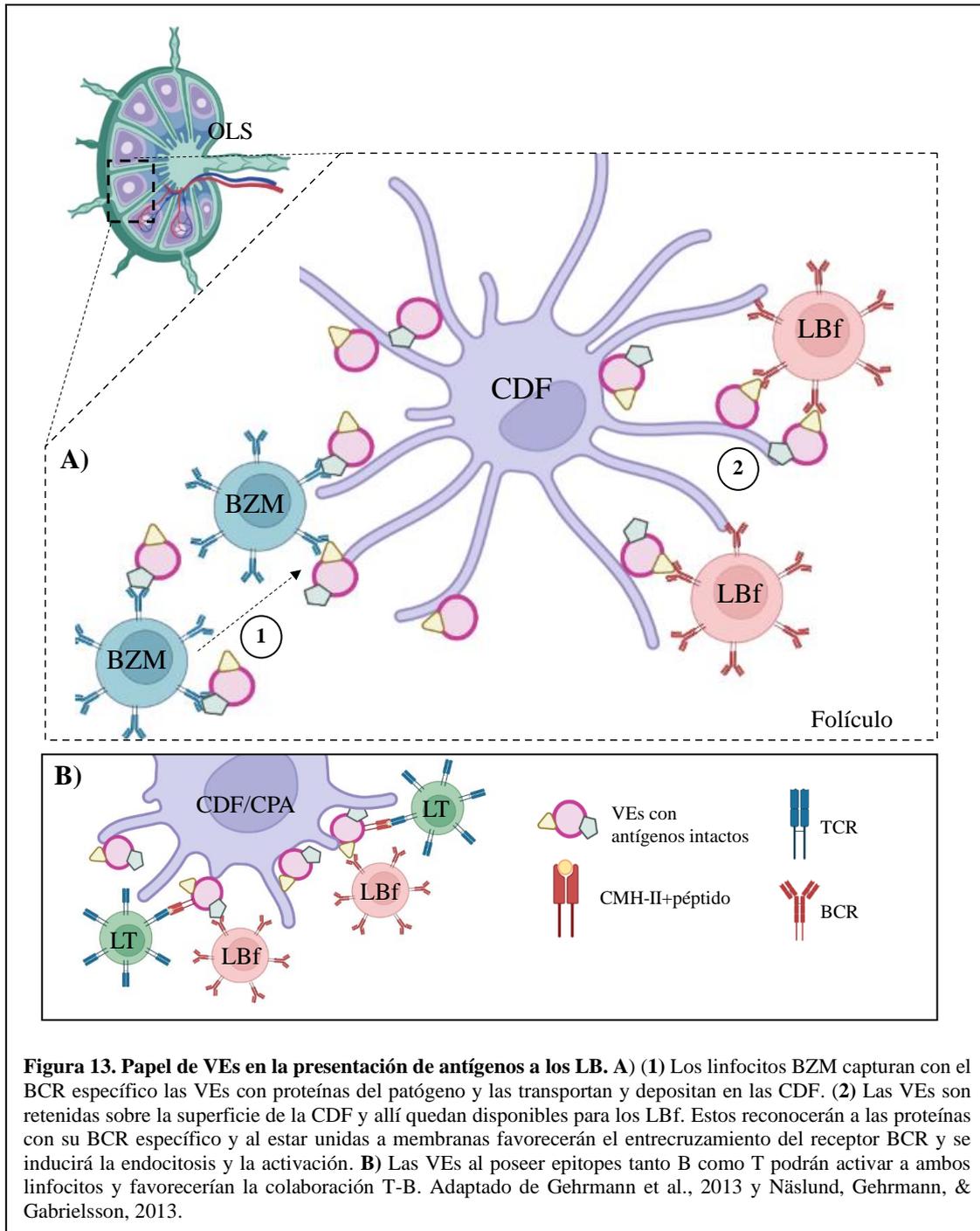
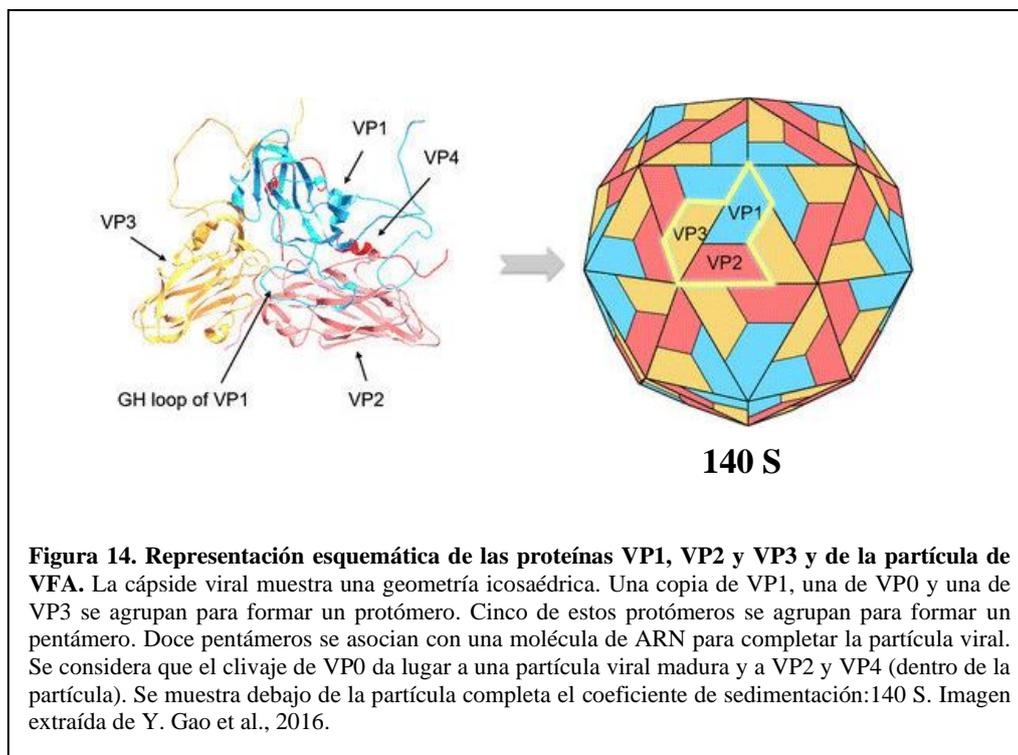


Figura 13. Papel de VEs en la presentación de antígenos a los LB. **A)** (1) Los linfocitos BZM capturan con el BCR específico las VEs con proteínas del patógeno y las transportan y depositan en las CDF. (2) Las VEs son retenidas sobre la superficie de la CDF y allí quedan disponibles para los LBf. Estos reconocerán a las proteínas con su BCR específico y al estar unidas a membranas favorecerán el entrecruzamiento del receptor BCR y se inducirá la endocitosis y la activación. **B)** Las VEs al poseer epitopes tanto B como T podrán activar a ambos linfocitos y favorecerán la colaboración T-B. Adaptado de Gehrman et al., 2013 y Näslund, Gehrman, & Gabrielsson, 2013.

1.6 Fiebre aftosa

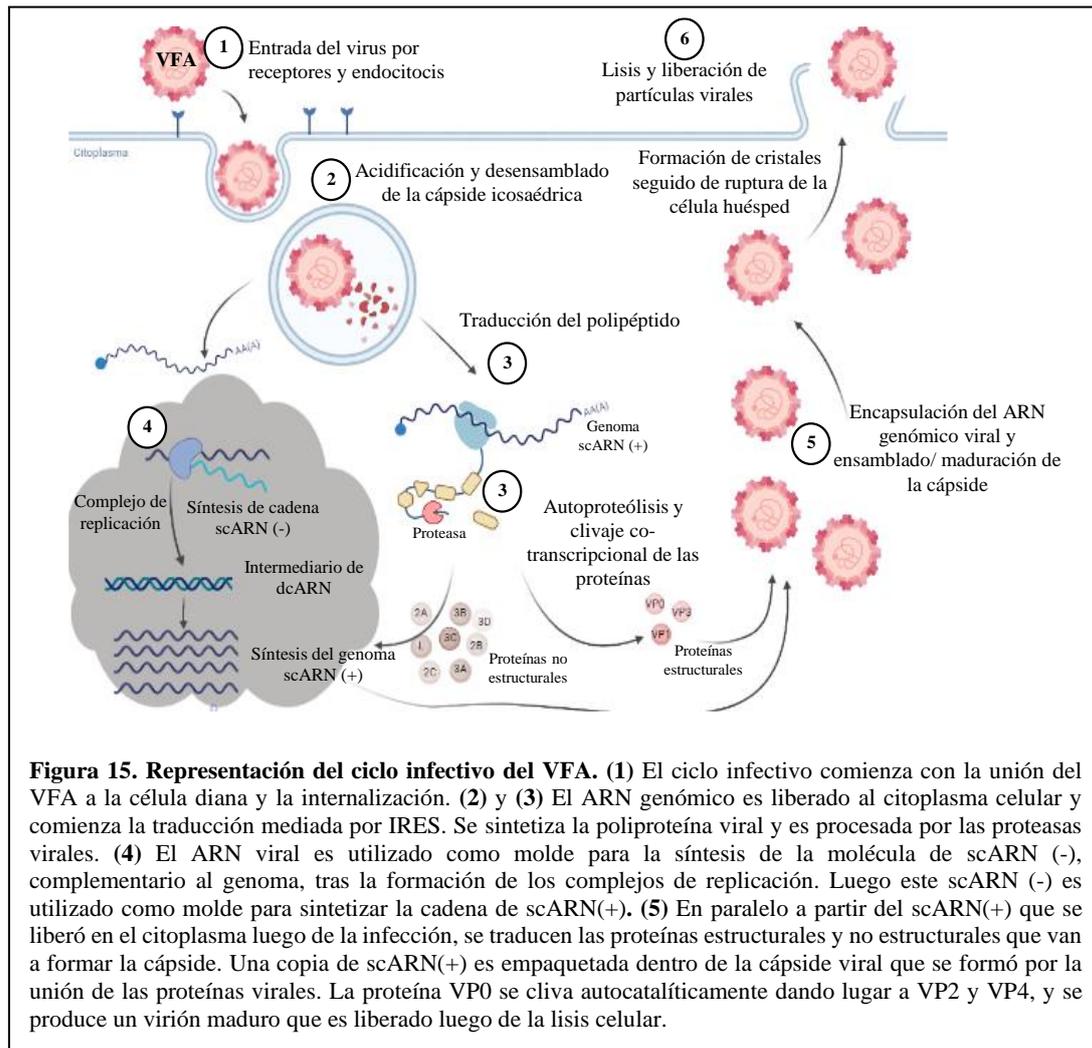
1.6.1 Virus: estructura, composición y ciclo infectivo

El virus de la fiebre aftosa (VFA) es un virus altamente contagioso responsable de causar enfermedades serias en el ganado. Este virus pertenece al género *Aphthovirus* dentro de la familia *Picornaviridae*. Como su nombre lo indica esta familia reúne a virus con genoma de ARN pequeños (Pico-rna-viridae; pequeño-RNA-virus). El VFA es un virus desnudo que tiene un diámetro de entre 28-30 nm y un peso molecular 8400 kDa (Strohmaier, 1976) y una densidad de 140S. Su estructura está conformada principalmente por la cápside de simetría icosaédrica que contiene en su interior el genoma viral de 8500 bases de largo que es una única molécula de ARN de cadena simple y sentido positivo, por lo que al ingresar a la célula ya puede ser traducido sin transcripción previa. La cápside está constituida por protómeros (**Figura 14**) formados a partir del ensamblaje asimétrico de las proteínas VP0, VP1 y VP3. Cinco de estos protómeros se asocian para formar un pentámero, y doce de estos pentámeros se ensamblan para conformar la cápside viral de simetría icosaédrica. (Flanegan et al., 1977; Lee et al., 1977).



INTRODUCCIÓN

La replicación viral tiene lugar en el interior de la célula (**Figura 15**), el virus ingresa gracias a las integrinas y receptores que reconocen el motivo RGD presente en el “loop” GH de la proteína VP1 (T Jackson et al., 1996 ; Alcalá et al., 2001; O’Donnell et al., 2009; Ruiz-Sáenz et al., 2009). Una vez dentro se desencadena el desensamblado de la cápside icosaédrica, el virión de 140S se desensambla en las subunidades pentaméricas de 12S y el ARN es liberado al citoplasma (Curry et al., 1995; Van Vlijmen et al., 1998; Ellard et al., 1999; Vázquez-Calvo et al., 2012). En el citoplasma ocurre la traducción, (Victor Ambros et al., 1978; V. Ambros & Baltimore, 1980) y como producto se obtiene la poliproteína viral que luego será escindida proteolíticamente hasta obtenerse los productos finales: las proteínas estructurales y no estructurales del virus (Belsham, 2009). Para generar nuevas partículas virales también debe replicarse el ARN y esto está a cargo de la polimerasa viral 3Dpol, la replicación ocurre en el “complejo de replicación” formado por asociaciones de proteínas a las membranas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Polatnick & Wool, 1983; Grubman & Baxt, 2004; Moffat et al., 2005) Midgley et al., 2013; Sun et al., 2018). Una vez sintetizadas las proteínas y el ARN se produce el ensamblado/maduración de la cápside y la encapsidación del ARN genómico viral (Jacobson & Baltimore, 1968; Curry et al., 1997; Hindiyeh et al., 1999; Han et al., 2015) El ciclo concluye con la liberación de las partículas virales, producto de la formación de cristales que provocan la desintegración de la célula huésped y consecuente liberación del virus. (Racaniello, 2001).



Durante el ciclo viral ocurren errores en la replicación del genoma, y el genoma del VFA, tiene altas tasas de mutaciones al igual que muchos virus ARN. Esto genera una alta variabilidad antigénica (Haydon et al., 2001). La estructura tridimensional de las proteínas estructurales junto con algunos residuos aminoacídicos, forman los principales sitios antigénicos y los sitios que median la unión a los receptores celulares para su internalización. Estas altas tasas de mutaciones facilitan la aparición de nuevas variantes antigénicas en los virus ARN y cuasi-especies constituidas por mezclas de genomas (Domingo et al., 1980; Domingo & Perales, 2019).

Esta variabilidad facilita la evolución del virus produciendo variantes antigénicas denominadas serotipos. Se han identificado 7 serotipos de VFA: A, O, C, Asia 1 y *Southern African Territories* (SAT) 1, SAT2 y SAT3. Cada serotipo incluye numerosos subtipos. Esta diversidad y heterogeneidad antigénica es un gran desafío a la hora de

diseñar las vacunas, ya que la protección cruzada entre las variantes es escasa debido a las diferencias en las propiedades antigénicas e inmunológicas. Esta variabilidad hace que sea necesario incluir las variantes más frecuentes en cada epidemia y especificar perfectamente los componentes inmunogénicos utilizados en la formulación vacunal. A su vez, demanda un estricto control de la enfermedad, exigiendo una vigilancia epidemiológica constante (Mahapatra & Parida, 2018).

1.6.2 Generalidades de la enfermedad y patogenia

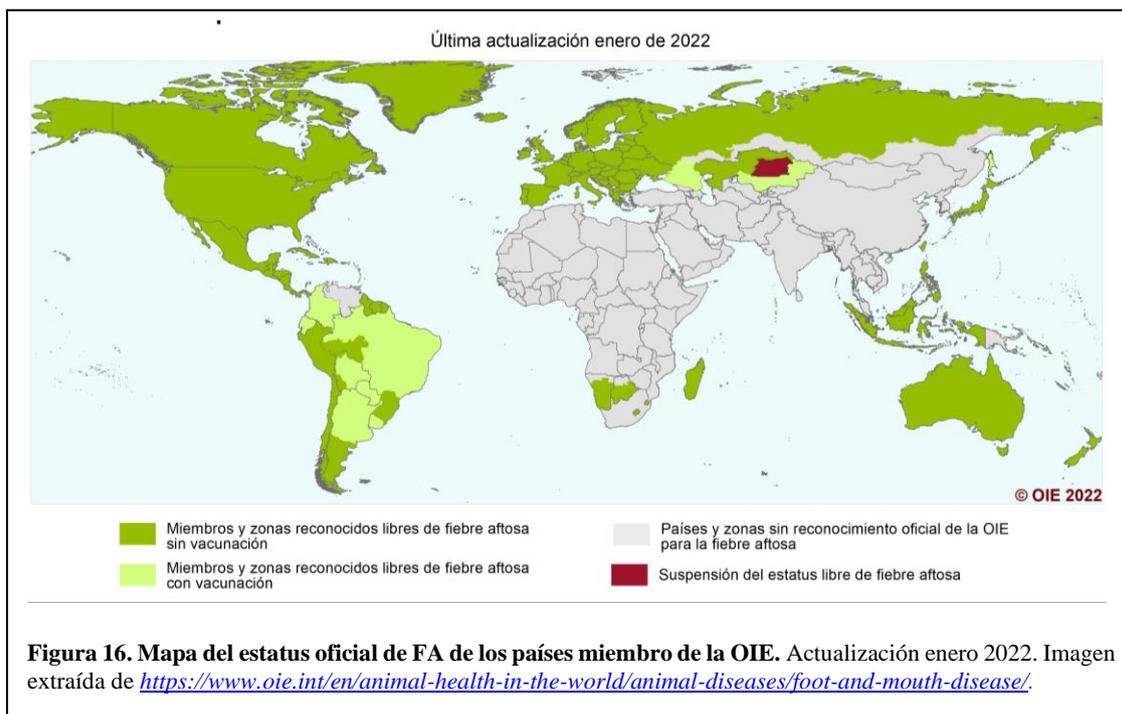
La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad infectocontagiosa aguda que fue observada por primera vez en 1514 y descrita en 1546 en Venecia por Hieronymus Fracastorius de Verona, en su publicación “De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione”. Siglos después se determinó que el agente etiológico de esta importante enfermedad era el VFA (Loeffler, 1897; Racaniello, 2001). En general, se considera que la FA es la más contagiosa de todas las enfermedades de animales de granja. Bovinos, porcinos, ovinos y caprinos son todos susceptibles. Esta alta tasa de propagación es consecuencia de la eliminación de virus por parte de los animales infectados, la cual se da por secreción viral en el epitelio vesicular, fluidos, saliva, leche, heces, orina, semen y secreciones vaginales. A esto se le suma el hecho de que el virus es excretado antes del desarrollo de signos clínicos. De esta manera, cuando el animal se infecta, la mayoría de los miembros del rebaño se infectarán. La enfermedad se caracteriza por la aparición de fiebre y lesiones vesiculares localizadas fundamentalmente en la cavidad bucal, lengua y alrededor de las pezuñas, y en algunos casos, también lesiones en el epitelio del hocico, ollares, patas, pezones, ubres y pilares del rumen. A medida que avanza la infección las vesículas generadas aumentan de tamaño y se rompen, provocando lesiones que producen salivación abundante o complicaciones para caminar dependiendo del lugar de la lesión. Esto lleva a una disminución del peso ya que se dificulta la alimentación. A su vez también se dificultan el ordeño y la lactancia lo que conlleva a una considerable baja en la producción de leche. Si bien la enfermedad no es mortal para los animales adultos, los animales jóvenes a menudo mueren.

Además de los animales de granja esta enfermedad también es capaz de extenderse a más de setenta especies silvestres tales como: bisontes, jabalíes, camellos, llamas, alpacas, vicuñas, guanacos, armadillos, nutrias, elefantes, carpinchos, entre otros (Blackwell, 1980; Alexandersen et al., 2003). A pesar de poder infectar a varias especies existen tres que son las principales involucradas en un brote de fiebre aftosa (FA). El ovino

considerado como el huésped de mantenimiento ya que se infecta, pero los síntomas son leves o subclínicos. El porcino considerado el amplificador, ya que después de infectado es un gran replicador y diseminador aéreo del VFA (Sellers & Parker, 1969; Ferris & Donaldson, 1980; Gibson & Donaldson, 1986; Donaldson & Kitching, 1989) y el bovino como indicador, ya que son los más susceptibles al contagio por vía aérea (Grubman & Baxt, 2004).

1.6.3 Distribución geográfica de la enfermedad e importancia económica

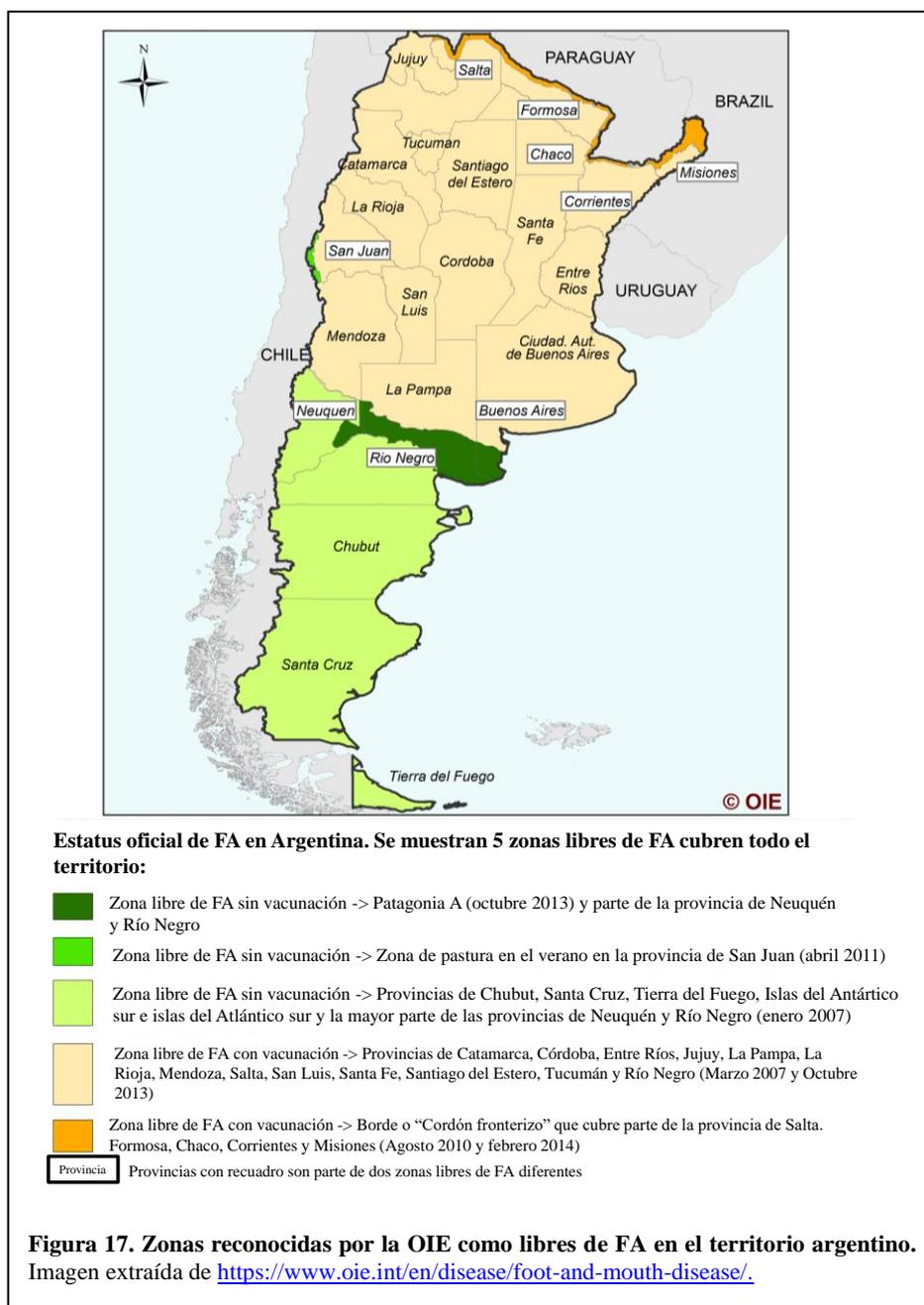
Las normas internacionales de sanidad y bienestar animal de la OIE (*Oficina Internacional Epizootias*), también llamada Organización Mundial de Sanidad Animal, están destinadas a prevenir y controlar las enfermedades animales, incluidas las zoonosis, a garantizar la seguridad sanitaria del comercio mundial de los animales terrestres y acuáticos y de sus productos, y a mejorar el bienestar animal. Las enfermedades de mayor importancia en sanidad animal son aquellas que poseen una alta transmisibilidad, rápida difusión, con graves consecuencias para la economía o para la salud pública y afectan el comercio internacional de animales y de sus productos. La FA cumple casi todos estos requisitos y hoy ocupa un lugar importante en esta lista única de enfermedades de declaración obligatoria de la OIE. Esta enfermedad es la primera para la cual la OIE estableció una lista oficial de países libres de enfermedades. Al analizar la distribución geográfica actual (**Figura 16**) se puede ver que la FA es endémica en varias partes de Asia y en la mayor parte de África y Oriente Medio. En América Latina, la mayoría de los países aplican la zonificación y están reconocidos como libres de FA, con o sin vacunación. Australia, Nueva Zelanda, Indonesia, América Central y del Norte y Europa occidental continental están actualmente libres de FA (**Figura 16**).



La República Argentina ha logrado el reconocimiento de la OIE como “libre de FA” en 5 zonas que en conjunto ocupan todo el territorio nacional. Dos zonas libres con vacunación (Centro-Norte, Cordón fronterizo) y 3 zonas libre sin vacunación (Patagonia Norte B y Patagonia Sur, Patagonia Norte A y Valles de Callingasta) (**Figura 17**). Este estatus se logró luego de la implementación del Plan Nacional de Erradicación de la FA (Resolución SENASA 5/2001), para hacer frente a la epidemia del 2000-2001. La vigilancia epidemiológica constante es fundamental para mantener el estatus y el país debe informar anualmente su situación (<https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/bovinos-y-bubalinos-produccion-primaria/fiebre-aftosa>).

Si bien la OIE es la organización intergubernamental encargada de mejorar la sanidad animal en el mundo, existe otro ente regulador que se encarga principalmente de los problemas referidos al comercio internacional y es la Organización Mundial del Comercio (OMC). Esta organización ha establecido un marco legal para el comercio de animales y productos de origen animal conocido como Acuerdo MSF (Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias) cuyo principal objetivo es facilitar el comercio de estos elementos entre países sin poner en riesgo la vida o salud de las personas, animales o plantas. Este acuerdo estableció que las barreras sanitarias sean las únicas legítimas para

el comercio de animales y productos animales, basándose para ello en las directrices y recomendaciones establecidas por la OIE (www.wto.org). De esta manera poseer un estatus de país libre de FA, así como también de otras enfermedades de declaración obligatoria, es un logro inclusivo que facilita el comercio de los productos nacionales en los mejores mercados internacional, con una buena categoría de carnes.



1.6.4 Control y prevención de la FA

Si bien la tasa de mortalidad de esta enfermedad es baja, genera un alto grado de morbilidad en los animales, y produce pérdidas debido a una baja en la productividad de la carne, leche y derivados. Además de estas pérdidas directas ocasionadas para los productores ganaderos y la industria relacionada, existe una pérdida mayor que está dada por las restricciones impuestas sobre el comercio internacional de ganado, y las medidas de emergencia para controlar un brote (Alexandersen y col., 2003; Grubman y Baxt, 2004). Las regulaciones de las importaciones es una de las principales medidas preventivas y evitan el ingreso del virus desde regiones endémicas ya sea por medio de animales infectados o alimentos contaminados.

Al ser un virus con una alta tasa de contagio y propagación es necesario tomar medidas inmediatas y extremas, las medidas incluyen las cuarentenas y las restricciones de movimiento, el sacrificio de los animales afectados y expuestos (rifle sanitario), y la limpieza y desinfección de las instalaciones afectadas, el equipo y los vehículos. Otra de las acciones es realizar la vacunación en anillo, realizada en todos los animales susceptibles presentes en un radio de 15km. También se deben eliminar las carcasas infectadas de manera segura y se puede solicitar que las personas expuestas al VFA eviten el contacto con los animales susceptibles durante un período de tiempo, además de descontaminar la vestimenta y otros fómites. En las granjas no infectadas se deben poner en práctica medidas adecuadas de bioseguridad para impedir la entrada del virus. Dependiendo del lugar también se debe tener en cuenta la transmisión en animales silvestres.

Cuando hablamos de prevención, uno de los principales componentes es la vacunación exitosa y regular de las especies susceptibles. Hoy, en la Argentina, el Plan Nacional de Erradicación tiene como una de sus principales estrategias la vacunación obligatoria de todos los bovinos y bubalinos en las 2 zonas que la OIE ha reconocido como libres de FA con vacunación: Centro – Norte y Cordón fronterizo. La Vacuna utilizada es la controlada por Senasa. Consiste en una vacuna oleosa, su principal componente antigénico es el VFA inactivado con etilenimina binaria (BEI) y esta formulada con adyuvante oleoso y saponina. La vacuna contiene las cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001 y C3 Indaial (tetavalente), que son las circulantes en Argentina. Se utilizan dosis de 2 ml por vía intramuscular profunda o subcutánea, son elaboradas por laboratorios privados nacionales y la aplicación se realiza siguiendo los lineamientos del Plan Nacional

diseñado por SENASA. Si bien Argentina posee laboratorios nacionales con la capacidad necesaria para producir el antígeno cumpliendo con todas las medidas de seguridad y normas GMP (*Good Manufacturing Practice*), para otros países en vías desarrollo la producción de vacunas representa un gran dilema. (Sobrino & Domingo, 2004).

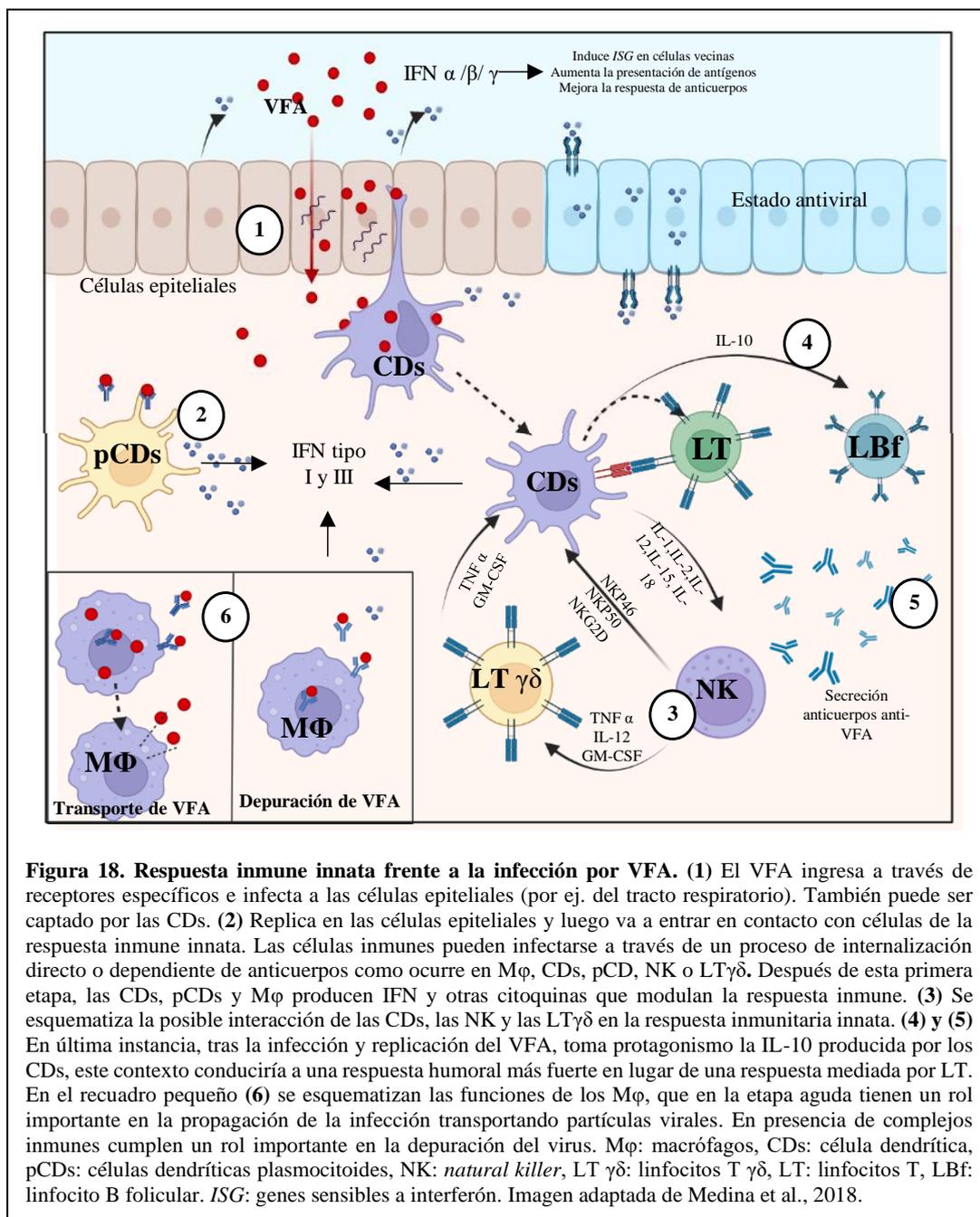
1.6.5 Respuesta inmune contra VFA

Los virus son patógenos intracelulares obligatorios que dependen para su supervivencia de hospedadores susceptibles donde replicar. El VFA es un virus citopático que se caracterizan por infectar al hospedador, replicar rápidamente causando daño celular extendido induciendo una respuesta de anticuerpos. La respuesta inmune contra estos virus se diferencia de la de otros patógenos ya que además de la respuesta propia se suma la respuesta producto del daño tisular causado debido la replicación viral. Si bien este daño tisular genera una inflamación extra, el principal protagonista de la respuesta continúa siendo la inducción anticuerpos neutralizantes específicos de alta afinidad y cantidad, la que se vió tanto en los modelos animales (McCullough et al., 1988; 1992) como en hospedadores naturales (Hamblin et al., 1987; Van Maanen & Terpstra, 1989; Archetti et al., 1995; Steward et al., 1991; McCullough et al., 1992; Eblé et al., 2007; Pacheco et al., 2010). La respuesta inmune de humoral (anticuerpos) contra VFA se inicia como T independiente (TI), pero a medida que avanza se torna T dependiente (TD). Se demostró que si bien la respuesta TI es suficiente para neutralizar el virus, la colaboración de los LT es necesaria para el mantenimiento a largo plazo de los títulos de anticuerpos en suero y para la maduración de la afinidad de los mismos (Habiela et al., 2014).

1.6.5.1 Respuesta innata frente al VFA

Al igual que en todos los procesos infecciosos, la **respuesta innata** es la primera en actuar y es primera línea de defensa. El sistema innato cuenta con receptores de reconocimiento de patrones (RRP) que le permiten reconocer agentes externos, frente a una infección viral estos receptores van a reconocer a los PAMPs, se activarán y desencadenarán una serie de señales de transducción en cascadas que van a inducir la producción de interferones y citoquinas proinflamatorias (Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, 2013). Estas citoquinas y quimioquinas proinflamatorias van a activar y reclutar rápidamente a las células inmunes para que lleguen a los focos de infección y eliminen al virus por fagocitosis o lisis (Murphy & Weaver, 2017). En la infección por VFA las células epiteliales y endoteliales son las primeras en responder mediante la producción de

quimioquinas, interferones y otras citoquinas. En conjunto también se activan las células inmunes asociadas a las mucosas (MALT) (Rodríguez-Habibe et al., 2020). Las quimioquinas secretadas van a reclutar otras células inmunes que van a contribuir a la eliminación del virus (Ku et al., 2005).



Para la activación de las células innatas los receptores de tipo *Toll* juegan un rol importante en el reconocimiento del VFA. Los principales receptores involucrados en

infecciones virales son el receptor TLR3 que reconoce ARN doble cadena (dcARN), los receptores TLR7/ TLR8 que son específicos para cadenas simple de ARN (scARN) y TLR9 que reconoce DNA no metilado. Los principales RRP involucrados en la infección por el VFA son: los receptores TLR7 y TLR8 que tienen un rol en la activación de células NK en cerdos. Los receptores TLR7 y TLR9 que demostraron ser importantes en el reconocimiento del genoma de VFA en CD plamocitoides (pCD) y desencadenan la expresión de IFN y citoquinas Th1 (Rodríguez Pulido et al., 2018). Otro TLR que también parece tener implicancias en la infección por VFA, curiosamente es el TLR4 que se ve aumentado en el tejido asociado a la nariz de bovinos infectados (Z. Zhang et al., 2006). En las infecciones virales existe otro grupo de receptores que son de suma importancia para la respuesta innata, son los receptores tipo RIG - I (RLR) que se encuentran presentes en el citoplasma de la célula aumentando la probabilidad de detección de ácidos nucleicos virales. Experimentos realizados en una línea celular de riñón porcino demostraron que el VFA puede ser detectado mediante el RLR- MDA5 (Hüsser et al., 2011; H. Kim et al., 2021). De hecho uno de los mecanismos de escape característicos del VFA se centra en la inhibición de IFN de tipo I por medio de la proteína viral Lpro que afecta la cascada de señalización de MDA5 (D. Wang et al., 2010; Visser et al., 2020; H. Kim et al., 2021).

Estos receptores RRP están presentes en todas las células innatas y al detectar al VFA van a desencadenar la activación de estas. En la **Figura 18** y en la **Tabla 1**, se resumen las principales células innatas que participan en la respuesta inmune generada por VFA. Se detallan algunas de las funciones principales definidas en base a investigaciones realizadas tanto en los hospedadores naturales como en los modelos de investigación.

Tabla 1 en página siguiente →

Tabla 1. Respuesta inmune innata frente a la infección por VFA. Se detallan los distintos tipos de células involucradas, la función y la bibliografía correspondiente.

	Función frente a la infección por VFA	Bibliografía
Keratinocitos y células	<p><u>Cerdos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • producción de TNFα luego de la infección por VFA <p><u>Bovinos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • se logró detectar mRNA de IL1α, TNFα y IFNα /β/ γ 	<p>(Ku et al., 2005). (Zhidong Zhang et al., 2009)</p>
Macrófagos (MΦ)	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden internalizar el VFA probablemente por macropinocitosis y esta internalización aumenta cuando el VFA está unido a anticuerpos • En los MΦ el ciclo infeccioso del VFA es abortivo y la infección no es progresiva • Actúan como portadores infecciosos y diseminan el virus a otras partes del cuerpo ya que pueden liberar partículas infecciosas • Rol importante en la depuración de los complejos inmunes mediante su receptor de Fc que induce la fagocitosis • Secreción de citoquinas • Síntesis de TNFα, IL12, IFN de tipo I, y la polarización M1 fenotípica y funcional de los MΦ 	<p>(McCullough et al., 1988) (Berinstein et al., 1995) (Rigden et al., 2002) (Quattrocchi et al., 2011) (Sebastian et al., 2020) (Summerfield et al., 2009)</p>
CDs convencionales y plasmocitoides	<p><u>(Resultados contradictorios se hallaron en la bibliografía)</u></p> <p><u>En todas las especies:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Internalizan el VFA por endocitosis <p><u>Cerdos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • VFA infecta a las CDs de piel y les induce daño • Son refractarias a la infección y hay un ciclo infeccioso abortivo y perfil más inmaduro • CDs plasmocitoides-> fuente de IFN tipo I \rightarrow endocitan VFA opsonizado <p><u>Modelo murino:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Infección de CDs derivadas de médula ósea es abortiva e induce un perfil más inmaduro, disminuye capacidad de activar a LT • Aumentan citoquinas supresoras como IL-10 <p><u>Bovinos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Susceptibles en baja frecuencia al VFA, pero significativamente susceptibles a la infección en presencia de VFA unido a anticuerpos neutralizantes • Disminución de la capacidad de activar a LT • Inducción de apoptosis • Concentraciones bajas y transitorias de IFN tipo I e IL-10 • CDs plasmocitoides-> principal fuente de IFN tipo I en infección por VFA 	<p>(Guzylack-Piriou et al., 2006) (Harwood et al., 2008) (Sobrinho & Domingo, 2004) (Harwood et al., 2008); (Martín-Acebes et al., 2011) (Robinson et al., 2011) (Lannes et al., 2012)</p> <p>(Ostrowski et al., 2005) (C. Langellotti et al., 2012)</p> <p>(Sei et al., 2016) (Robinson et al., 2011) (Reid et al., 2011) (Windsor et al., 2011) (Medina et al., 2018)</p>
Natural Killer	<ul style="list-style-type: none"> • Rol citotóxico muy importante en la infección por VFA • Durante la infección aguda son disfuncionales, y concuerdan con la naturaleza supresora de esa etapa de la infección \rightarrow no hay citotoxicidad • Infección de VFA induce disminución de CMH-I y consecuentemente la activación de NK y secreción de citoquinas como IFN γ y TNFα a lo que se le suman la secreción de granzimas y perforinas, así como la expresión del ligando de muerte como Fas 	<p>(Amadori et al., 1992)</p> <p>(Toka & Golde, 2013) (Pintarič et al., 2008) (Toka et al., 2009) (Boysen & Storset, 2009)</p>
Interferones	<p><u>IFN tipo I</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IFN α \rightarrow potente método bioterapéutico frente al VFA, expresión constitutiva en CDs porcinas e induce resistencia a la infección • IFN-μ o IFN δ \rightarrow reducen la replicación del VFA en células porcinas • IFN-τ \rightarrow efecto antiviral frente VFA <p><u>IFN tipo II</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IFN-γ \rightarrow la preincubación con el IFN-γ protege a células bovinas de la infección por VFA <p><u>IFN tipo III</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • IFN-λ \rightarrow el tratamiento protege a las células de los efectos citopáticos inducidos por el virus y se correlacionaron con una mayor regulación positiva de los mRNA de IFN e ISG 	<p>(Borrego et al., 2017) (Chinsangaram y col., 2001). (Bautista et al., 2005) (S. fang Li et al., 2018) (S. fang Li et al., 2019) (Usharani et al., 2017) (Parida et al., 2006) (Sharma et al., 2018) (Díaz-San Segundo et al., 2011) (Segundo et al., 2012)</p>

1.6.5.2 Respuesta adaptativa frente al VFA

La respuesta inmune adaptativa es fundamental cuando los mecanismos de defensa innatos son superados. Si bien algunas infecciones logran ser controladas únicamente con la inmunidad innata, la mayoría requiere de la participación de la inmunidad adaptativa (Jenni Punt, Sharon Stranford, Patricia Jones, 2018). Los elementos de reconocimiento del sistema inmunológico innato son rápidos, pero su especificidad es limitada y, por lo tanto, no pueden distinguir pequeñas diferencias entre antígenos diferentes. En cambio, la inmunidad adaptativa, está mucho más en sintonía con las diferencias moleculares siendo mucho más específica. Después del encuentro con el antígeno, los LT y LB se someten a selección, proliferación y maduración. Aunque tardan en actuar, estas células participan en excelentes mecanismos efectores que normalmente pueden resolver la infección. En la **Figura 19** y en la **Tabla 2** se resumen las principales células de la respuesta inmune adaptativa que participan en la respuesta inmune generada por VFA. Se detallan algunas de las funciones principales definidas en base a las investigaciones realizadas tanto en los hospedadores naturales como en los modelos de investigación.

Tabla 2 en la página siguiente →

Tabla 2. Respuesta inmune adaptativa frente a la infección por VFA. Se detallan los distintos tipos de células involucradas, la función y la bibliografía correspondiente.

	Función frente a la infección por VFA	Bibliografía
* Linfocitos B tipo inmato (B2M y B1) *	<p><u>Modelo murino:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Serían los encargados de la respuesta humoral temprana TI CDs derivadas de médula ósea murina infectadas con VFA pueden estimular a los linfocitos B2M para que secreten tempranamente IgM e IgG3 anti-VFA en un proceso dependiente de IL-6 secretada por la CDs e IL-10 secretada por el LB Responderían rápidamente a los antígenos repetitivos del VFA 	(Ostrowski et al., 2007) (Bachmann et al., 1997) (Dintzis et al., 1976)
Linfocitos B2 / foliculares (LBF)	<ul style="list-style-type: none"> Encargados de la respuesta TD y de la memoria B Se diferenciarán a las células plasmáticas y de memoria encargadas de la reposición continua de anticuerpos para mantener la inmunidad humoral protectora La respuesta sostenida de anticuerpos luego de la infección por VFA está dada por una estimulación continua de las células plasmáticas de vida corta generada por persistencia del antígeno en reservorios de virus en los centros germinales 	(Ndungu et al., 2009) (Gebauer, et al., 1988) (Juleff et al., 2008) (Piatti et al., 1991) (López et al., 1990) (Grant et al., 2016).
Linfocitos T CD4+	<p><u>Modelo murino:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Experimentos en ratones atímicos demostraron el papel funcional de los LT en el mantenimiento de títulos altos de anticuerpos seroneutralizantes en ratones después de la infección Participan, pero no son esenciales para el cambio de isotipo <p><u>Hospedadores naturales</u> (su función aún no está clara):</p> <ul style="list-style-type: none"> No jugarían un papel importante en la resolución de la infección aguda en el ganado; aunque no se descarta que contribuyan a la respuesta Al activarse producirían citoquinas que favorecen el aumento de la producción de IgM e IgG 	(López et al., 1990) (Juleff et al., 2009) (Collen et al., 1989)
Linfocitos T CD8+	<p><u>Hospedadores naturales:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> No participan en el control inicial de la infección por VFA. (consecuencia de la disminución de CMH-I en la infección aguda) La resolución relativamente rápida de la enfermedad probablemente contribuya a una baja respuesta citotóxica Son inducidos a partir del día 14 p.i en bovinos Linfopenia transiente de LT CD8 +; en el día 2 p.i que se resuelve a partir del día 4 	(Patch et al., 2011) (Juleff y col., 2009). (Childerstone et al., 1999) (Guzman et al., 2010) (Patch et al., 2011)
Linfocitos T$\gamma\delta$ (LT$\gamma\delta$)	<p>En bovinos y cerdos entre el 20 y el 50% de los linfocitos circulantes son LT$\gamma\delta$</p> <p>(Resultados contradictorios se hallaron en la bibliografía)</p> <ul style="list-style-type: none"> Se estimulan luego de la vacunación. Hay un aumento de la infiltración de los LT$\gamma\delta$ en las mucosas Efectos citostáticos y citotóxicos contra las células infectadas por VFA Posible efecto regulador \rightarrow la depleción <i>in vivo</i> de LT$\gamma\delta$ resulta en un período más corto de viremia en la infección por VFA El 15% de los LT$\gamma\delta$ pueden secretar IL10 <i>ex vivo</i> y proliferar en respuesta a IL10, IL4 y TGFβ demostrando que una subpoblación de los LT$\gamma\delta$ circulantes tienen un rol regulador y supresor 	(Abubakar & Ahmed, 2017) (Juleff y col., 2009). (Guzman et al., 2014).

(* Representan una interfase entre la inmunidad innata y adaptativa. Se los incluye en esta clasificación porque poseen la especificidad de la inmunidad adaptativa, aunque presentan la cinética y los requerimientos de activación típicos del sistema innato.

En la infección por VFA la respuesta humoral mediada por anticuerpos cumple un rol protagónico brindando protección tanto en modelos animales como en hospedadores naturales. Los animales infectados por VFA presentan anticuerpos seroneutralizantes a partir del tercer día post infección. Estos anticuerpos ayudan a eliminar al virus de la circulación y además otorgan protección contra la re-infección con un virus del mismo serotipo (Bautista et al., 2003). Esta respuesta rápida de anticuerpos neutralizantes es característica de virus citopáticos como el VFA. Tanto en bovinos como porcinos, se produce un primer pico de anticuerpos de isotipo IgM entre los días 3-5 post infección o vacunación, luego entre los 4-7 días y a medida que la respuesta madura ocurre el cambio a IgG (Sáiz et al., 2002). Esta rápida cinética de producción de anticuerpos seroneutralizantes al comienzo de la infección transcurre en un contexto de falta de colaboración T definida como timo independiente (TI) tanto en el modelo murino como en el ganado. En esta etapa TI los LB de tipo innato podrían tener un rol importante. A medida que se desarrolla la respuesta en el tiempo y una vez que los LT reconocen los antígenos en el contexto del CMH-II se establece una colaboración T-B para dar lugar a la respuesta específica y de largo plazo. La infección natural induce una inmunidad rápida y duradera en el ganado, que se caracteriza por el mantenimiento de títulos elevados de anticuerpos seroneutralizantes, por ejemplo, hasta 4,5 años, y se ha demostrado la protección frente al desafío hasta 5,5 años después de la infección inicial.

En la **Figura 19** se resumen los conceptos previamente mencionados (**Tabla 2**) relacionados con la respuesta inmune generada frente a la infección con VFA.

Figura 19 en la página siguiente →

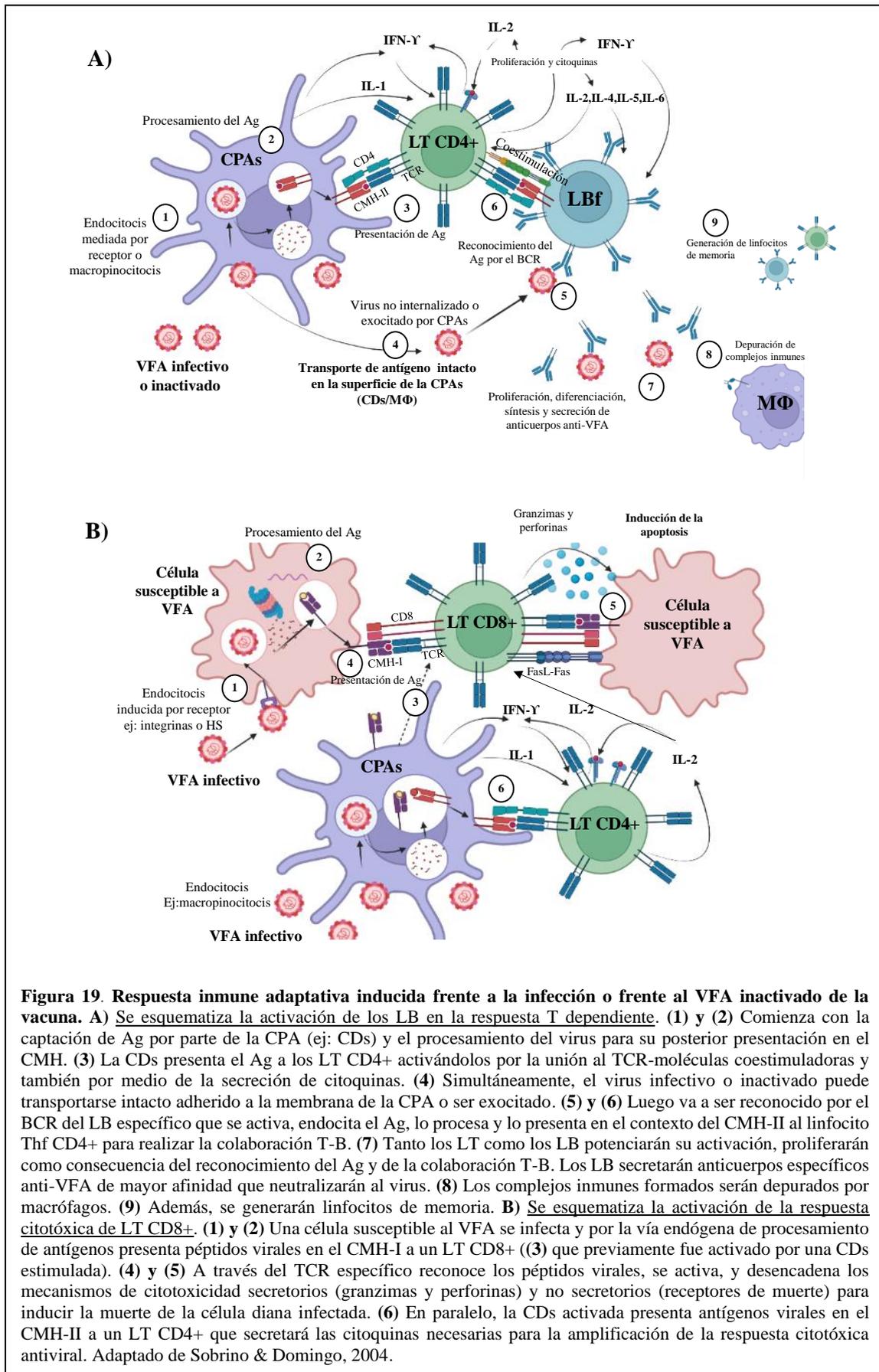


Figura 19. Respuesta inmune adaptativa inducida frente a la infección o frente al VFA inactivado de la vacuna. **A)** Se esquematiza la activación de los LB en la respuesta T dependiente. (1) y (2) Comienza con la captación de Ag por parte de la CPA (ej: CDs) y el procesamiento del virus para su posterior presentación en el CMH. (3) La CDs presenta el Ag a los LT CD4+ activándolos por la unión al TCR-moléculas coestimuladoras y también por medio de la secreción de citoquinas. (4) Simultáneamente, el virus infeccioso o inactivado puede transportarse intacto adherido a la membrana de la CPA o ser exocitado. (5) y (6) Luego va a ser reconocido por el BCR del LB específico que se activa, endocita el Ag, lo procesa y lo presenta en el contexto del CMH-II al linfocito Thf CD4+ para realizar la colaboración T-B. (7) Tanto los LT como los LB potenciarán su activación, proliferarán como consecuencia del reconocimiento del Ag y de la colaboración T-B. Los LB secretarán anticuerpos específicos anti-VFA de mayor afinidad que neutralizarán al virus. (8) Los complejos inmunes formados serán depurados por macrófagos. (9) Además, se generarán linfocitos de memoria. **B)** Se esquematiza la activación de la respuesta citotóxica de LT CD8+. (1) y (2) Una célula susceptible al VFA se infecta y por la vía endógena de procesamiento de antígenos presenta péptidos virales en el CMH-I a un LT CD8+ ((3) que previamente fue activado por una CDs estimulada). (4) y (5) A través del TCR específico reconoce los péptidos virales, se activa, y desencadena los mecanismos de citotoxicidad secretorios (granzimas y perforinas) y no secretorios (receptores de muerte) para inducir la muerte de la célula diana infectada. (6) En paralelo, la CDs activada presenta antígenos virales en el CMH-II a un LT CD4+ que secretará las citoquinas necesarias para la amplificación de la respuesta citotóxica antiviral. Adaptado de Sobrino & Domingo, 2004.

1.6.6 Modelo murino para el estudio de la respuesta inmune contra la FA

La interacción del VFA con el sistema inmune de las especies que son hospedadores naturales sigue sin comprenderse completamente, siendo aun hoy en día limitado su conocimiento. Esto se debe principalmente al excesivo costo y la logística de la experimentación con animales grandes, a la imposibilidad de trabajar con animales endocriados, así como la virtual imposibilidad de realizar estudios de mecanismos de acción *in vivo*. Por el contrario, el ratón ha sido utilizado como modelo experimental para diferentes infecciones virales. El modelo animal de ratón cuenta con varias ventajas, entre ellas está el exhaustivo conocimiento que se posee sobre su sistema inmune, su alta sensibilidad como instrumento para medir capacidad inmunogénica, la elevada repetitividad tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* y presenta un gran paralelismo en sus respuestas con respecto al hospedador natural. Estas características le confieren la virtud de ser un buen modelo para estudiar y predecir la respuesta que se desarrollará en los bovinos; a esto habría que añadir que se reducen notablemente los costos.

Los ratones demostraron ser susceptibles a la infección experimental por el VFA y esto facilitó el desarrollo del modelo murino para el estudio de la FA (Borca et al., 1986; (López et al., 1990; Borca et al., 1993; Wigdorovitz et al., 1997). La susceptibilidad puede variar entre las cepas de ratones y la edad (siendo más susceptibles los animales jóvenes). La virulencia depende de la cepa del virus que se utiliza, siendo algunas más letales que otras, similar a lo que ocurre en los hospedadores naturales. La infección con el VFA es posible en cepas CH3, Swiss, BALB/c y C57BL/6, (Fernández et al., 1986; Collen et al., 1989), dependiendo de la cepa del virus y de la cepa del ratón, la infección sistémica puede ser letal en adultos o transcurrir de manera subclínica (Salguero et al., 2005; Sanz-Ramos et al., 2008). Se ha demostrado que el VFA induce la formación de vesículas después de la inoculación subcutánea en la almohadilla plantar de cepas de ratón susceptibles, con características histológicas similares a las descritas en hospedadores naturales (Salguero et al., 2005). El principal órgano de replicación en el modelo murino adulto, al igual que en las especies objetivo, es el páncreas. Otro punto en común del modelo murino con los hospedadores naturales es la asociación de la infección con las patologías vinculadas al miocardio, sitio en donde también se replica extensamente el virus. (Salguero et al., 2005). Este miotropismo ocurre en los hospedadores naturales

jóvenes que a menudo mueren por miocarditis (Donaldson et al., 1984; Gulbahar et al., 2007).

El modelo murino de VFA se ha utilizado mucho para caracterizar las respuestas inmunitarias en los hospedadores naturales y para generar una plataforma para evaluar terapias y candidatos a vacunas a un costo reducido (Dus Santos et al., 2005 ; Gnazzo et al., 2020; Juan Bidart et al., 2020).

1.6.6.1 Respuesta inmune contra VFA en hospedadores naturales en comparación con el modelo murino

Hasta aquí podemos decir que la infección con VFA en el ratón tienen varias similitudes con el hospedador natural, siendo los sitios replicativos similares y siendo más susceptibles los animales jóvenes. Además de estos aspectos, para que un animal de laboratorio sea considerado un modelo para una infección también se debe modelar la inmunidad contra el virus en cuestión. Para ello, los animales además de ser susceptibles a la infección y replicar el virus deben generar una respuesta inmune que desempeñe un papel activo en el control de la infección. Es así como los ratones son el animal de laboratorio más utilizado para modelar la infección de VFA. Cuentan con la ventaja de tener bajo costo y de que exista una amplia disponibilidad de reactivos inmunes y variantes de ratones genéticamente modificados. La principal contribución del modelo de ratón en la infección con VFA han sido los hallazgos que permitieron comprender mejor la respuesta inmune generada frente a la infección y frente a la vacunación (Gnazzo et al., 2020). Muchas de estas respuestas concuerdan con los hallazgos realizados en los hospedadores naturales. A continuación, en la **Tabla 3** pueden observar punto a punto las similitudes y diferencias de la respuesta inmune comparando el modelo murino con los hospedadores naturales.

Tabla 3. Respuesta inmune generada por el VFA infeccioso o por la vacunación con VFA inactivado en el modelo murino y en huéspedes naturales. (*)

		HUÉSPED NATURAL	MODELO MURINO	
RESPUESTA INMUNE	HUMORAL	Infección (VFA)	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida y larga inmunidad con inducción de anticuerpos seroneutralizantes y mantenimiento de altos títulos hasta 4,5 años p.i. • IgM → detectable 3-7 d post desafío, pico entre los días 5-14 haciéndose indetectable al día 56 • IgG1 y IgG2 → detectable 4 días p.i, con pico a los 14 días • IgA → detectable 7 p.i, pico 14 d y comienza a descender (salvo en animales portadores). 	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida y larga inmunidad con inducción de anticuerpos seroneutralizantes y mantenimiento de título hasta 500 días p.i. • IgM → detectable a partir del día 3 p.i • IgG1 y IgG3 → detectable a partir del día 7 p.i, IgG2a y IgG2b → a partir del día 14 • IgA → bajos niveles en suero, y en mucosas no se estudió.
		Vacunación (VFAi)	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunidad de corta duración, recomendado vacunación cada 6 meses. • IgM → aumento rápido, detectable 3-4 d.p.v • IgG1 y IgG2 → detectable 4 -6 días p.v, con anticuerpos seroneutralizantes detectados al día 3-4 • IgA → no detectada (bovinos), IgA en saliva y suero si se detectó en porcinos d.p.v 	<ul style="list-style-type: none"> • Protege a los animales frente a desafío con dosis letales de VFA • IgG1 → adyuvante oleoso • IgG2a → adyuvante de hidróxido de aluminio • IgG2b → detección transiente de bajos títulos de anticuerpos a las 60 p.v. • IgA → detectada en saliva de ratones inoculados subcutáneo
	CELULAR	Infección (VFA)	<p>Respuesta de LB aguda de tipo TI que luego evoluciona hacia una TD</p> <p>LT → Participan, pero no son esenciales para el cambio de isotipo, posible función en el mantenimiento de la memoria inmunológica de larga duración.</p>	<p>Respuesta de LB aguda de tipo TI que luego evoluciona a una TD. Si bien los LT colaboran para el cambio se han reportado cambio de isotipo en ratones atímicos</p>
		Vacunación (VFAi)	<p>Respuesta aguda de LB de tipo TD, se necesita la colaboración T para generar anticuerpos neutralizantes.</p> <p>La memoria inducida no es duradera y se necesita la re-inoculación al menos 1 vez al año.</p>	<p>Respuesta aguda de LB de tipo TD, se necesita la colaboración T para generar anticuerpos neutralizantes, protección de vida corta</p>

(*) Estos datos fueron recolectados a partir de los trabajos de Habiela et al., 2014; Ostrowski et al, 2007 y Langellotti et al., 2012; 2015.

VFAi: Virus de la Fiebre Aftosa inactivado con etilamina binaria

Objetivos e Hipótesis

2 OBJETIVOS

En base al contexto teórico expuesto anteriormente como **objetivo general** del presente trabajo nos propusimos evaluar las propiedades inmunomoduladoras de las VEs derivadas de CDs pulsadas previamente con el antígeno utilizado para la vacuna comercial (VFAi) y su implicancia en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. El presente trabajo de tesis se enmarca dentro del proyecto general de estudio cuyo objetivo es profundizar los conocimientos actuales de los mecanismos inmunológicos que determinan que la respuesta inducida luego de la infección con el VFA presente una mayor rapidez, eficiencia y duración que la respuesta generada luego de la vacunación con el virus inactivado.

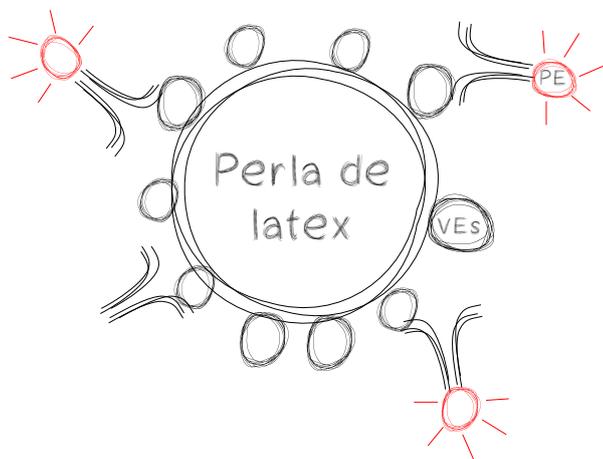
Planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- ❖ Aislar y caracterizar las VEs obtenidas a partir de CDs diferenciadas de médula ósea murina y pulsadas con el antígeno vacunal VFAi.
- ❖ Evaluar las propiedades inmunomoduladoras de las VEs obtenidas sobre el sistema inmune adaptativo.

3 HIPÓTESIS

En función a los antecedentes proponemos la siguiente hipótesis: *las CDs son estimuladas por el VFAi y secretan VEs que presentan antígenos virales ya sea asociados a membrana o al CMH. Estas VEs pueden modular la respuesta inmune antígeno específica favoreciendo la activación y/o amplificación de la inmunidad antiviral.*

Materiales y métodos



4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Animales de experimentación

Se emplearon ratones endocriados e inmunocompetentes de la cepa BALB/c de 4 a 12 semanas provenientes de la colonia del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires. Los animales se mantuvieron en estantes ventilados con un ambiente enriquecido, alimento balanceado, agua *ad libitum*, un período de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y una temperatura de entre 19 y 23°C. Todos los protocolos realizados fueron previamente evaluados y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

4.2 Medios de cultivos

Se empleó el medio base “*Roswell Park Memorial Institute*” (RPMI 1640 Biological Industries, Israel y Corning, USA) suplementado con L-glutamina 2 mM, HEPES 25 mM, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, polimixina B 10 U/ml y 10% SFB. Para la obtención de VEs derivados CDs el Suero Fetal Bovino (SFB) utilizado fue previamente ultracentrifugado a 100.000xg durante 18 h a 4°C para depletar las vesículas bovinas presentes en el mismo. Luego de la ultracentrifugación se filtró por una membrana de 0,22 µm para su esterilización (Théry, Clayton, et al., 2006).

De aquí en adelante el medio RPMI con los componentes previamente mencionados se definirá como medio RPMI completo.

4.3 Factores de diferenciación

Para la obtención de las CDs a partir de precursores de médula ósea se utilizó el factor recombinante murino comercial *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) (PeProtech). Dicho factor se comercializa en una presentación liofilizada. Para su reconstitución se siguieron las recomendaciones brindadas por el fabricante para la conservación a largo plazo a -70°C. Luego se alicuotó y se conservó a -70°C hasta su utilización. En la puesta a punto del protocolo de diferenciación (detalles en **Anexo 1**) también se probó la combinación de los factores GM-CSF e IL-4. La IL-4 es recombinante murina y al igual que el GM-CSF fue adquirida del laboratorio PeProtech.

4.4 Virus inactivado y vacuna monovalente contra FA

La cepa O1 Campos fue seleccionada para este estudio porque se ajusta a los bancos de antígenos que se utilizan en caso de brotes de VFA en todo el mundo (Galdo Novo et al., 2018). El virus de la fiebre aftosa O1 Campos fue proporcionado gentilmente por el laboratorio Biogénesis Bagó S.A. como una suspensión de virus inactivado con etilenimina binaria (VFAi) (Abaracón D, Giacometti H, 1979). Para los ensayos *in vitro* con células se utilizó únicamente VFAi purificado por gradiente de sacarosa siguiendo las indicaciones reportadas por Pega y colaboradores (Pega et al., 2013) (protocolo descrito en el **Anexo 2** y en el punto 4.7 de materiales y métodos).

La vacuna monovalente para VFA O1 Campos también fue brindada gentilmente por el laboratorio Biogénesis Bagó S.A y verificada en cuanto a su esterilidad, seguridad y pureza según la Resolución del SENASA (N° 609/2010).

4.5 Obtención de CDs murinas a partir de precursores de médula ósea

La diferenciación *in vitro* de las CDs se realizó a partir de precursores de médula ósea utilizando el factor recombinante GM-CSF (Inaba et al., 1992). La extracción del fémur se llevó a cabo en esterilidad siguiendo el protocolo detallado por Dong y col. (Dong et al., 2016). La suspensión celular se ajustó a una concentración final de $2,00 \times 10^6$ cél./ml en medio RPMI completo. Para la diferenciación se utilizaron placas de Petri plásticas de 10 cm de diámetro en donde se colocaron 5 ml de medio RPMI completo con el factor GM-CSF 20 ng/ml (PeproTech) y 5 ml de la suspensión de células ($10,00 \times 10^6$ cél./placa). Los cultivos se realizaron a 37°C en condiciones de humedad con 5% CO₂. Se registró el día 0 como el primer día en el que se inició el cultivo. A los días 3 y 6 se renovó la mitad del medio reemplazándolo con medio RPMI completo + GM-CSF (40 ng/ml).

Al día 8 se cosecharon las células no adherentes o levemente adheridas y se caracterizaron por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales específicos para proteínas marcadoras como CD11c, CD86, CMH-II. También se utilizaron los marcadores CD135, CD11b, F4/80, CD4 y CD8 para profundizar la caracterización. Por último también se utilizó el marcador GR1 para descartar la presencia de granulocitos como posibles células presentes en el cultivo ya que el factor utilizado (GM-CSF) también promueve la diferenciación de este tipo celular (Roberts, 2005; Metcalf, 2015). Luego de cada

protocolo de diferenciación se corroboró el fenotipo de las CDs por citometría de flujo y se evaluó la viabilidad por tinción con el colorante de exclusión Azul Tripán. Todos los anticuerpos utilizados para la caracterización se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para la caracterización de CDs obtenidas a partir de precursores de médula ósea

ANTICUERPO	LABORATORIO	CLON
CD11c APC	Miltenyi	N418
CD86 FITC	Miltenyi	PO3.3
CMH-II PE	Biolegend	M5/114.15.2
CD135 PE	Biolegend	A2F10
CD11b FITC	Becton Dickinson (BD)	M170
F4/80 PE	eBioscience	BM8
CD4 FITC	eBioscience	GK15
CD8 PE	eBioscience	53-6.7
GR1 FITC	eBioscience	RB6-8C5

4.6 Citometría de flujo para marcación en membrana de células

Para la citometría de células se utilizaron placas de 96 pocillos fondo en V. Se colocaron entre $2,50 \times 10^5$ y $1,00 \times 10^6$ células en *buffer* de marcación (PBS¹, Azida 0.1% y SFB5%) y 50 µl/pocillo del anticuerpo monoclonal (previamente titulado). La marcación se realizó incubando por 30 min. a 4°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados centrifugando las células a 250 xg por 5 min. En caso de utilizar anticuerpos que requieran una siguiente incubación con un anticuerpo secundario se repitieron los pasos efectuados con el anticuerpo monoclonal, pero utilizando el segundo anticuerpo conjugado al fluorocromo. Finalmente, se realizó una fijación con paraformaldehído (PFA 1% en PBS) durante 15 minutos, y se procedió a lavar tres veces por centrifugación. Para el análisis de las

¹ PBS: NaCl 0,138 M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ 0,078 M y KHPO₄ 0,015 M (pH 7)

muestras se utilizó el citómetro de flujo FACS scalibur. El análisis de los datos se realizó utilizando el programa FlowJo V10.

4.7 Purificación de VFAi por gradiente de sacarosa (fracción 140 S)

El virus inactivado se purificó previo a su utilización en cultivos celulares; para la purificación se utilizó un gradiente de sacarosa continuo que se preparó por congelamiento. El día de la purificación los gradientes se retiraron del *frezzer* y se dejaron a temperatura ambiente estáticos en la mesada hasta estar totalmente descongelados. El VFAi diluido en *buffer* NET² se sembró en la parte superior del gradiente y la purificación se realizó por ultracentrifugación a 33000xg seguida de una centrifugación de 100.000xg para la concentración final. El pellet obtenido enriquecido en particular 140S se resuspendió en PBS y filtro por 0,22 µm en esterilidad. La purificación se monitoreo con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelado con *Coomasie Blue* (los detalles de este protocolo y los resultados obtenidos se explican en detalle en el **Anexo 2**).

4.8 Internalización del VFAi O1 Campos por las CDs

Para evaluar la internalización del VFAi por las CDs, se utilizó el VFAi O1 Campos previamente purificado por gradiente y marcado con FITC. La marcación se realizó en el laboratorio incubando 1 h a 37°C el virus con el fluorocromo (1 mg de proteína viral/100µg FITC/ml) en *buffer* carbonato pH 9,6. El fluorocromo excedente se eliminó mediante diálisis frente a PBS a 4°C. Se realizaron dos diálisis cortas de 1 h y luego una diálisis más extensa de 16 h. Para el ensayo funcional de internalización se incubaron $2,00 \times 10^6$ CDs/ml con 10 µg/ml o 30 µg/ml de VFAi-FITC. La incubación se realizó a dos tiempos (40 o 120 min.) y a dos temperaturas (37°C y 4°C). Una vez transcurridos los tiempos de incubación, las células se cosecharon y $1,00 \times 10^6$ células se destinaron a la determinación de la internalización por citometría de flujo. Allí se midió la internalización antes y después de la adición de Azul Tripán (0,01 mg/ml). La adición de este colorante permite disminuir la fluorescencia externa y discriminar así el virus internalizado del retenido en la membrana. La fluorescencia se midió en un citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences, CA, EE. UU). El análisis de internalización se realizó dentro de la *gate* correspondiente a las CDs definida según la dispersión de la luz frontal

² NET: NaCl 0.1 M – Tris 0.05 M – Na₂EDTA2H₂O 0.004 M

frente a la lateral (*FSS* vs *SSC*). La internalización se confirmó también por microscopia confocal: brevemente, $5,00 \times 10^5$ CDs fueron marcadas utilizando un anticuerpo monoclonal específico para la proteína CD11c conjugado al fluorocromo Ficoeritrina (PE) ($0.5\mu\text{g}/1,00 \times 10^6\text{cél.}$). La marcación se realizó a 4°C durante 30 min. Posteriormente, se realizaron tres lavados con *buffer* de marcación (PBS 5% SFB filtrado por $0.22\ \mu\text{m}$) y se realizó una fijación con PFA al 1% en PBS durante 20 min. A 4°C . Finalmente, se realizaron dos lavados con *buffer* de marcación. Una vez finalizada la marcación de membrana se sembraron las CDs sobre un cubreobjetos y se centrifugaron utilizando una centrífuga *citospin*. Los cubreobjetos se montaron sobre el portaobjetos utilizando el medio de montaje Aqua-Poly/Mount, los preparados se sellaron utilizando esmalte. Las imágenes fueron tomadas utilizando un microscopio confocal *FluoView* FV1000 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con un objetivo Plapon 60x/NA 1.42. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el software *Image J* (NIH).

4.9 Purificación de IgG específica para VFA a partir de suero bovino

Para la detección de antígenos virales en las vesículas es necesario contar con anticuerpos específicos contra el virus estudiado. En este trabajo obtuvimos estos anticuerpos a partir de suero de bovinos previamente inmunizados utilizando la vacuna comercial tetravalente formulada con las cepas O1 Campos, A24 Cruzeiro, A Argentina 2001, C3 Indaial (<http://www.senasa.gob.ar>). La presencia de anticuerpos específicos en los sueros utilizados se determinó previamente por la técnica de ELISA. Para el control negativo de los ensayos utilizamos suero de bovinos sin inmunizar (suero normal). Las IgG de estos sueros se purificaron utilizando una columna comercial con proteína G la cual tiene alta afinidad por las IgG bovinas. La especificidad y título de los anticuerpos obtenidos se midieron por la técnica de ELISA (detallado en el punto 4.10) presentando títulos del rango de (1/31250). La purificación se monitoreó con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE revelado con *Coomasie Blue*. La concentración se cuantificó por espectrofotometría de microvolumen utilizando el equipo *Nano Drop* (*Thermo*), para determinar la concentración en $\mu\text{g}/\text{ml}$ se utilizó el correspondiente coeficiente de extinción para la IgG bovina. Para la utilización en citometría los anticuerpos se conjugaron al fluorocromo FITC siguiendo el protocolo previamente detallado para la marcación del VFA utilizado para el ensayo de internalización (detallado en el punto 4.8). La dilución de trabajo de la IgG anti VFA-FITC se determinó por citometría de flujo

utilizando perlas de *látex* recubiertas con aldehído/sulfato (*Dynabeads, Dynall*) incubadas con 1µg de VFAi O1 purificado y bloqueadas con Glicina 1M. Como control de especificidad se empleó una IgG purificada a partir de un suero bovino no inmune. Como control adicional de la técnica y control de bloqueo de las perlas, se incubaron con los distintos anticuerpos las perlas bloqueadas con glicina (pero sin VFAi).

4.10 Detección de inmunoglobulinas específicas contra VFA

La determinación de las inmunoglobulinas totales contra el VFA se determinó por ELISA. Se adhirió a placas suero de conejo anti VFA diluido a la concentración óptima en *buffer* carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante 18 h a 4°C. Como solución de lavado se utilizó PBS suplementado con Tween 20 al 0,05% (PBST) y como solución de bloqueo OVA al 1%. Para la determinación se agregaron en una placa los sueros en diluciones seriadas en *buffer* de bloqueo, luego se agregó una cantidad conocida y fija de antígeno y se incubó por 1 h a 37°C. Transcurrido el tiempo la mezcla de anticuerpo-antígeno se colocó en una nueva placa con anticuerpos de captura y bloqueada y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavaron las placas y se agregó el anticuerpo anti- IgG total para bovino conjugado a biotina y se incubó 1h a temperatura ambiente. Luego de dos lavados se añadió estreptoavidina-peroxidasa diluida en *buffer* de bloqueo y se reveló utilizando o-fenilenediamina-H₂O₂ como sustrato para la peroxidasa y se cuantificó por absorbancia a 492 nm. Fueron considerados sueros positivos aquellos que superan la DO del punto de corte establecido con la media de los sueros negativos +dos desvíos estándar. Esta metodología se utilizó para la determinación de las IgG purificadas a partir de sueros anti-aftosa.

4.11 Cargado de las CDs con VFAi O1 Campos

4.11.1 Determinación de la concentración óptima de virus a utilizar

Las CDs obtenidas se incubaron 16 h con 1, 5 y 10 µg de VFAi purificado. Transcurrido el tiempo, las células fueron lavadas dos veces para eliminar restos de antígenos, y cultivadas durante 24 h en medio RPMI completo. Las CDs se cosecharon y se realizó una marcación de membrana utilizando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas CD11c, CMH-II y CD86 (**Tabla 5**). La viabilidad de las CDs se monitoreó al

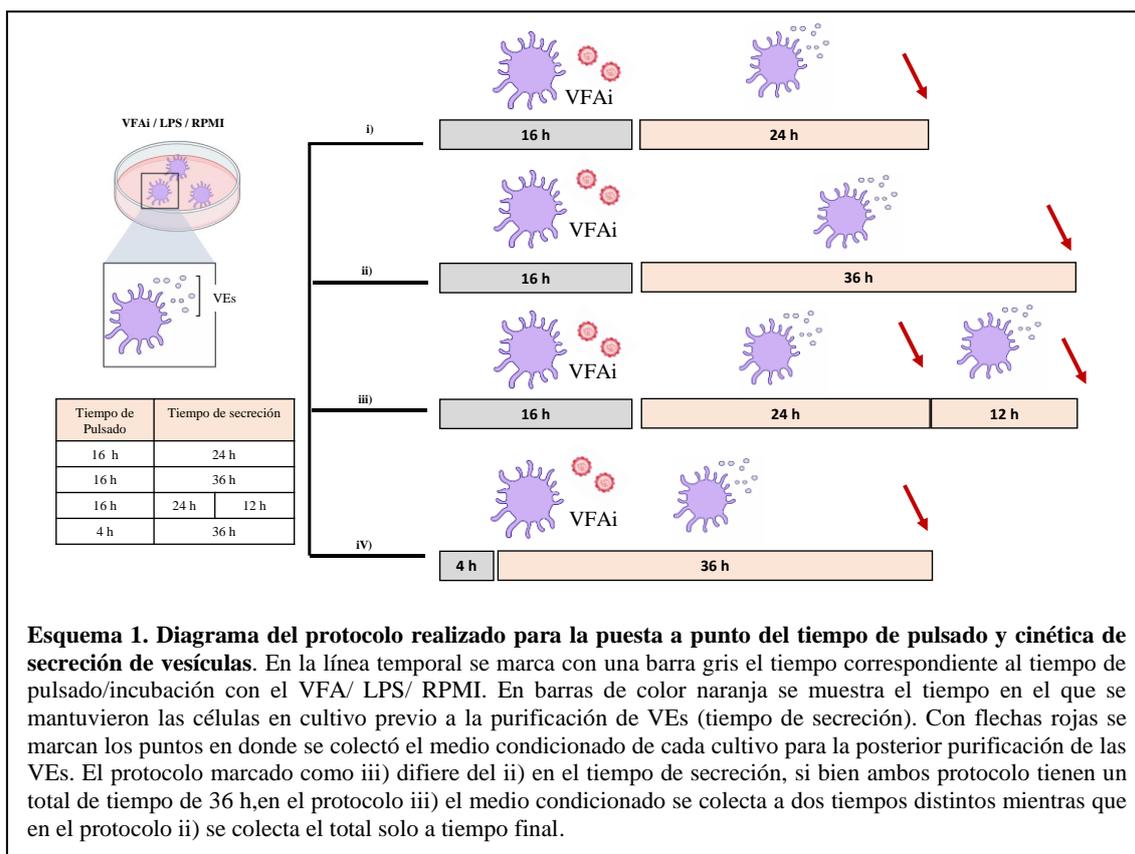
día 8 de diferenciación, al día 9 luego de la incubación con el VFAi y al día 10 cuando finalizó el experimento. Solo se utilizaron cultivos con viabilidad mayor a 85%. Como control negativo, se utilizó un pool de las CDs cultivadas en presencia de medio RPMI únicamente. Como control positivo de activación se utilizaron CDs activadas con 5 µg/ml de LPS o con POLI I:C 50 µg/ml (Singh-jasuja et al.,2013). La activación de las CDs se evaluó por citometría de flujo. Se determinó la expresión de los marcadores clásicos de activación como CMH-II y CD86 utilizando anticuerpos monoclonales específicos para cada proteína. También se agregó un anticuerpo específico para el marcador CD11c. La expresión de este marcador permitió definir la población sobre la que se analizaron los marcadores de activación.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para determinar el estado de maduración de las CDs luego de la estimulación *in vitro* con VFAi, LPS o POLI I:C

ANTICUERPO	LABORATORIO	CLON
CD11c APC	Miltenyi	N418
CMH-II PE	Biologend	M5/114.15.2
CD86 FITC	Miltenyi	PO3.3

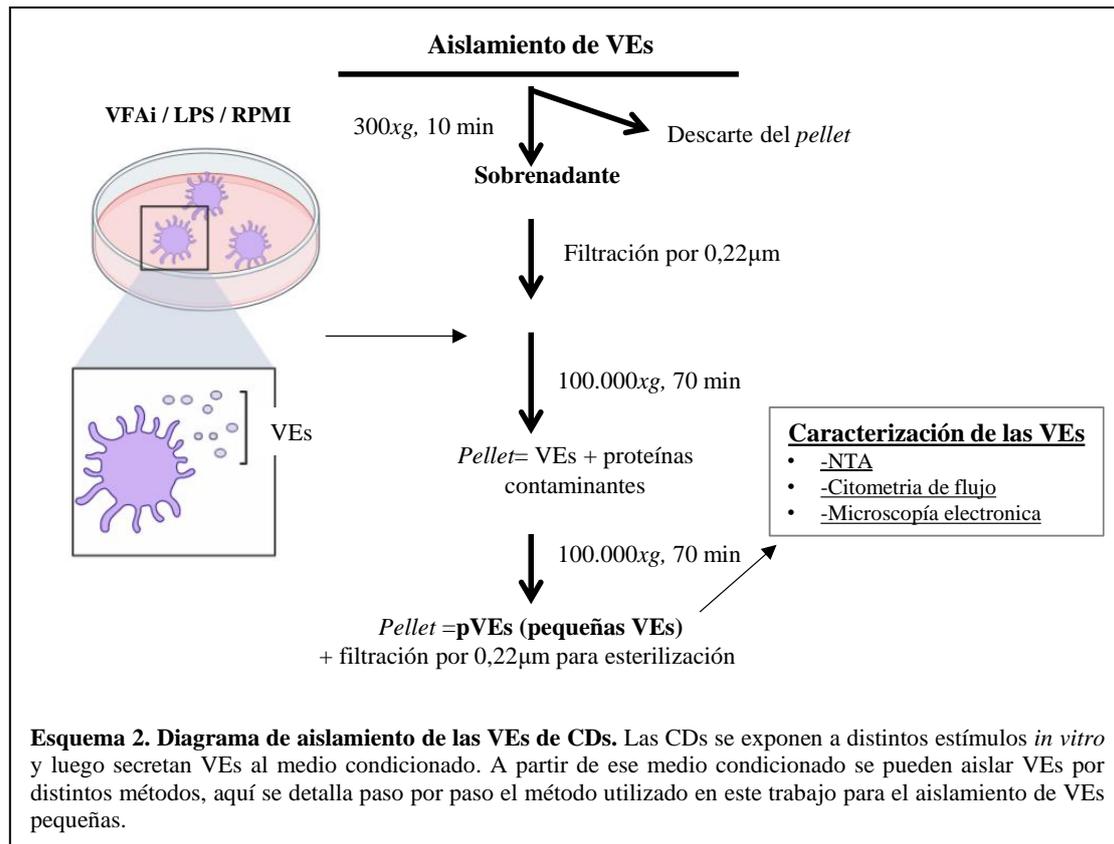
4.11.2 Cinética de secreción de VEs: Determinación del tiempo de pulsado y tiempo de recolección de VEs

Las CDs obtenidas a partir de precursores de médula ósea se incubaron 16 h o 4 h con 10 µg de VFAi. Las células fueron lavadas dos veces para eliminar restos de antígenos. Para el estudio de la cinética de secreción las VEs se aislaron de los sobrenadantes de cultivos a distintos tiempos luego de la incubación con el VFAi (0-24, 24-36 y 0-36 h). En el **Esquema 1** se detalla el protocolo previamente descripto, con los tiempos de incubación/pulsado de las CDs y los tiempos de secreción correspondiente al tiempo en el que las células permanecieron en cultivo secretando VEs. En todos los casos se utilizó como control negativo, un pool de las CDs cultivadas en presencia de medio RPMI únicamente y como control positivo de activación se utilizaron CDs pulsadas con 5 µg/ml de LPS.



4.12 Aislamiento de las VEs derivadas de CDs

Las VEs se aislaron a partir de los medios condicionados de las CDs. El método de aislamiento utilizado se basa en centrifugaciones, filtración por 0.22µm y ultracentrifugaciones a 100.000 xg como se detalla en el **Esquema 2**. El *pellet* obtenido se resuspendió en PBS y se filtró finalmente con filtro 0.22 µm para su esterilización. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su uso. Debido a que en la Argentina no contamos con el equipamiento que nos permita determinar la concentración de vesículas optamos por realizar una estandarización en la cual todos las VEs provenientes de 10,00 x 10⁶ CDs se resuspendieron en un volumen de 50 µl. Para el aislamiento de VEs solo se utilizaron cultivos con viabilidad >85%.



4.13 Citometría de flujo de VEs derivadas de CDs

Para el análisis de las VEs por citometría de flujo se desarrolló la metodología detallada por Théry y col (Théry, Clayton, Amigorena, & Raposo, 2006). Por su pequeño tamaño es necesario pegar las VEs a perlas de *látex* de 4 μm , para que puedan ser analizadas por el citómetro. Las VEs derivadas de $5,00 \times 10^6$ CDs (25 μl) fueron incubadas con 10 μl de perlas de *látex* recubiertas con aldehído/sulfato (*Dynabeads*, *Dynall*) durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió con PBS y se incubó en rotación 18 h a 4°C. Luego se agregó Glicina 1M para bloquear, y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Se centrifugó por 5 minutos a 800xg para bajar las perlas y se resuspendió en PBS/BSA 0,5 %. Este paso se repitió dos veces y luego el *pellet* se resuspendió en 0,5 ml de PBS/BSA. En una placa de 96 pocillos fondo en V se colocaron 10 μl de cada muestra de perlas-VEs y 50 μl de los anticuerpos monoclonales biotinilados específicos para las tetraspaninas CD9, CD81y CD63. Como conjugado se utilizó estreptavidina-PE. También se utilizaron anticuerpos específicos para proteínas propias de las células CDs como lo son CD86, CMH-II y CD11c. Se determinó la presencia de antígenos virales utilizando IgG anti-VFAi de un conjugada a FITC (metodología detallada en el punto 4.9). Como control de IgG se utilizaron IgG purificadas de suero

bovino de un animal normal sin inmunizar. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 6**. Esta metodología fue puesta a punto previamente y los detalles se encuentran en el **Anexo 3**.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las VEs derivadas de las CDs

ANTICUERPO	LABORATORIO	CLON
CD63 Biotina	Biolegend	<u>NVG-2</u>
CD9 Biotina	eBioscience	MEM-61
CD81 Biotina	eBioscience	Eat2
CMH-II PE	Biolegend	M5/114.15.2
CD86 FITC	Miltenyi	PO3.3
Estreptavidina-PE	eBioscience	-----

4.14 Determinación del tamaño por *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*

El tamaño de la población de las vesículas se determinó utilizando el equipo *ZetaView*. Este equipo no está disponible en la Argentina y por esta razón la medición de las muestras fue realizada con la colaboración de investigadores en el exterior (Colaboración con el licenciado Federico Cocozza perteneciente al grupo de la Dra Clotilde Théry en el Centre de recherche de l'Institut Curie, Paris, Francia). Para la determinación, un pequeño volumen de las muestras se transportó a temperatura ambiente para luego ser medidas en el Instituto *Curie* en Paris. Las mediciones se realizaron a partir de distintas diluciones de las muestras. Los datos fueron analizados por *ZetaView Software analyzed* y las mediciones se realizaron por triplicado.

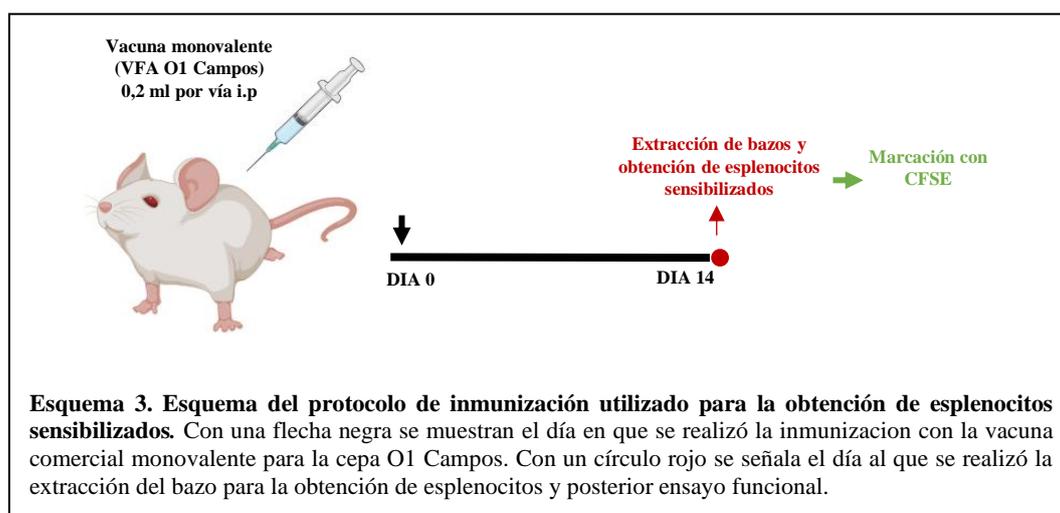
4.15 Microscopía electrónica (ME)

Para la observación por ME de las VEs, éstas fueron fijadas con PFA al 4% y cargadas en grillas para ME (Théry, Amigorena, et al., 2006). Las muestras fueron enviadas al Servicio de Microscopía Electrónica LANAIS (Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios de Resonancia Magnética en Sólidos) en la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires en donde se realizaron los preparados y se tomaron las imágenes. Se obtuvieron 9 imágenes de cada muestra en distintos aumentos (20.000X,

30.000X y 50.000X). Las imágenes se tomaron en un Microscopio Electrónico de transmisión *Zeiss EM 109T* equipado con cámara digital Gatan ES1000W.

4.16 Protocolo de inmunización para la obtención de esplenocitos sensibilizados contra el VFAi

Para la evaluación de la respuesta inmune *in vitro* se utilizaron linfocitos sensibilizados obtenidos de células del bazo de ratones inmunizados con la vacuna comercial monovalente. La inmunización se realizó por vía i.p con 0.2 ml de la vacuna comercial gentilmente brindada por el laboratorio de Biogenesis Bagó. Al día 14 dpv (**Esquema 3**) se extrajeron los bazos y se obtuvieron los esplenocitos por macerado del órgano en condiciones de esterilidad. El protocolo de inmunización utilizado de 0-14 días se determinó a partir de la puesta a punto del plan de inmunización que se explica en detalle en el **Anexo 4**. Una vez obtenidos los esplenocitos se realizó la marcación con CFSE (detallado en el punto 4.17).



4.17 Ensayo de proliferación utilizando CFSE (Éster de succinimidil- carboxifluoresceína)

Se utilizaron ratones BALB/c hembras entre 6-8 semanas *naive* y ratones que fueron inmunizados *in vivo* por vía intraperitoneal con 0,2 ml de la vacuna comercial monovalente (cepa VFA O1 Campos) cedida gentilmente por Biogénesis Bagó. Al día 14 se obtuvieron los bazos en esterilidad. La proliferación de las de células de bazo se evaluó a través de citometría de flujo por dilución del colorante CFSE en linfocitos marcados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la tinción con CFSE se realizó un *pool* a partir de las células obtenidas de los bazos y procedió a realizar la marcación. Los esplenocitos se resuspendieron en 1 ml de RPMI 1% SFB y se mezcló con 1 ml de CFSE 10 μ M diluido en PBS, quedando de esta manera una concentración final de 5 μ M de CFSE. Luego se incubaron 8 min. en un baño 37°C y la reacción se frenó agregando 5 volumen de medio RPMI frío y se incubó 5 min. más en hielo. Para eliminar el exceso de CFSE se realizaron 3 lavados con PBS 5% SFB. Entre el lavado 2 y el 3 se realizó una incubación de 15 min a 37°C para asegurar la eliminación de excedentes de CFSE y estabilización de la marca. Toda la marcación se realizó en condiciones de baja luz para proteger la fluorescencia. Las células marcadas con CFSE (300.000 células/pocillo) se cultivaron con los distintos estímulos: pVEs-VFAi y pVES-LPS provenientes de $2,5 \times 10^6$ CDs; 10 μ g/ml de VFAi y 0,5 μ g/ml de Con A, en placa de 96 pocillos durante 5 días a 37°C y 5% CO₂. Todas las condiciones experimentales se realizaron por triplicados. Como controles positivos se utilizaron esplenocitos marcados con CFSE e incubados con 0,5 μ g/ml de CON A. Para el control negativo se incubaron esplenocitos con el medio RPMI completo. Una vez transcurrido el tiempo se cosecharon las células y para el análisis de las sub-poblaciones de linfocitos, se incubaron con anticuerpos anti-CD3 conjugado a APC y anti-B220 conjugado al fluorocromo PE. También se utilizaron anticuerpos anti-CD21 APC y anti-CD23 Biot para el estudio de las subpoblaciones. Como conjugado se utilizó estreptoavidina-PECy5. La linfoproliferación se midió utilizando el citómetro BD FACSCalibur (BS Biosciences, CA, EE. UU). El análisis de los datos se realizó utilizando el *software FlowJo V10*. El índice de proliferación relativa (IPR) se definió como la relación entre el porcentaje de células estimuladas y el porcentaje obtenido para las células control de RPMI. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 7**.

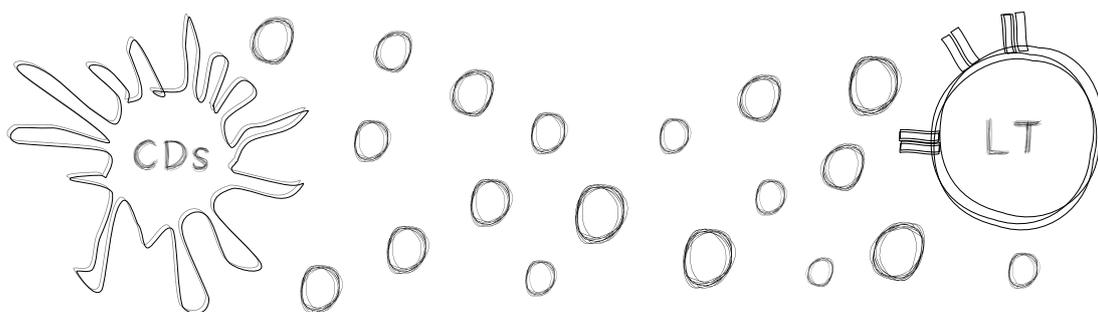
Tabla 7. Anticuerpos utilizados para los ensayos de linfoproliferación

ANTICUERPO / CONJUGADO	LABORATORIO	CLON
CD3 APC	TOMBO	17A2
B220 PE	TOMBO	RA3-6B2
CD21 APC	Miltenyi	7E9
CD23 Biotina	Miltenyi	B3B4
CD86 FITC	Miltenyi	PO3.3
Estreptavidina-PECy5	eBioscience	-----

4.18 Análisis estadístico

Los resultados experimentales obtenidos fueron analizados con métodos de estadística paramétrica o no paramétrica según el caso. Los valores obtenidos para los distintos parámetros evaluados entre los grupos experimentales se compararon por el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y luego el *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni cuando sólo se deseó comparar determinados pares de grupos o el *test* Tukey para comparar todos los pares de grupos. También se utilizó ANOVA de dos vías y luego Bonferroni. Para algunos análisis se utilizó el método no paramétrico Kruskal Wallis seguido del *test* de comparaciones múltiples de Dunn para comparar pares de grupos. Todos los análisis utilizados se detallan debajo de cada figura en la sección de resultados. Se utilizó el programa de procesamiento de datos y estadística *Graph Pad PRISM* versión 5.00 para Windows. En todos los casos se consideró una diferencia significativa con $p < 0,05$.

Resultados



5 **RESULTADOS**

5.1 **Las CDs son capaces de internalizar el antígeno vacunal VFAi O1 Campos y activarse *in vitro***

5.1.1 **Obtención y caracterización de las CDs diferenciadas de precursores de médula ósea**

Las CDs son el principal nexo entre la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa, cobran un papel muy importante en la generación y control de la respuesta frente a un patógeno. Se ha demostrado en un modelo murino que existen diferencias notorias en el impacto que el VFA infeccioso tiene sobre las CDs murinas en comparación con el VFA inactivado y que esto influye notablemente en la respuesta adaptativa que se genera posteriormente (Ostrowski et al., 2007; 2005). Considerando este antecedente y que las VEs pueden reflejar gran parte de los cambios que sufre la célula de la que derivan, decidimos enfocar el estudio a las VEs derivadas de las CDs pulsadas con el VFA de la cepa O1 Campos inactivado por BEI (VFAi) y evaluar su participación en la respuesta generada frente al VFA. Todo el estudio fue realizado utilizando el modelo murino utilizado para el estudio de la respuesta inmune contra la FA, previamente desarrollado y detallado por otros grupos (Borca et al., 1986; López et al., 1990; Ostrowski et al., 2007; 2005; Langellotti et al., 2012).

Como primer paso se determinó el protocolo de diferenciación de las CDs (detalles en **Anexo 1**), la metodología elegida se basa en un protocolo extensamente utilizado en trabajos de investigación que permite obtener CPA profesionales a partir de precursores pluripotentes obtenidos de la médula ósea murina. Para lograr esta diferenciación se pueden utilizar distintos factores. En la bibliografía pueden encontrarse varios trabajos en los que se utilizan factores como el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF) (Inaba et al., 1992; Brasel et al., 2014; Ndiaye et al., 2016), el ligando de Flt3 (Björck, 2001; Karsunky et al., 2003) o combinaciones de factores como por ejemplo: GM-CSF+IL4 (Son et al., 2002).

Durante la puesta a punto de la diferenciación de las CPA profesionales no solo se probaron los distintos factores de diferenciación detallados en bibliografía (GM-CSF y la combinación GM-CSF+IL4) (ver **Anexo 1**), sino que también se realizó una cinética de diferenciación que se monitoreó por microscopía y citometría de flujo. Con esta

metodología se determinó el día de cosecha de las células. La diferenciación y el trabajo *in vitro* con CPA requiere de una manipulación cuidadosa y de un mayor control de las variables ya que su maduración puede ser fácilmente inducible. Considerando que las CDs se encuentran constantemente censando su entorno (Kuby, 2012; Murphy & Weaver, 2017) y son muy sensibles a los cambios, se realizaron experimentos para disminuir las posibles fuentes de activación no controlada de las CDs. Todos los materiales plásticos, pipetas, medios, y reactivos utilizados fueron probados y se evaluó en cada prueba el estado de activación de las CDs. Todo este trabajo se explica en detalle en el **Anexo 1**.

Luego de realizar los experimentos de la puesta a punto, con el protocolo elegido se logró la diferenciación de CDs al cabo de 8 días con la utilización del factor GM-CSF únicamente (como se detalla en el punto 4.5 de materiales y métodos). A este tiempo se cosecharon las células y el rendimiento promedio fue de $7,86 \times 10^6 \pm 2,43$ CPA (partiendo de $10,00 \times 10^6$ precursores totales por placa). Esta cuantificación se realizó en cámara de Neubauer utilizando el colorante de exclusión Azul Tripán y se observó por microscopía óptica. Al final de cada protocolo de diferenciación se realizó de rutina el conteo del *pool* de CPA obtenidas y la determinación de la viabilidad. Solo se utilizaron cultivos celulares con viabilidad mayor al 85%.

La caracterización con marcadores específicos es de suma importancia cuando se utilizan células diferenciadas *in vitro*. La presencia de estos marcadores nos permite saber el éxito del protocolo de diferenciación, así como también el fenotipo de la población obtenida. Para esta caracterización se empleó el clásico marcador descrito en bibliografía para CDs murinas que es la molécula CD11c (Merad et al., 2013) y sumamos el CMH-II característico de CPA profesionales. Estos dos marcadores se utilizaron luego de todas las diferenciaciones para corroborar el éxito del protocolo. Como las células obtenidas con este protocolo fueron heterogéneas decidimos realizar una caracterización, sin intención de asignarlas a una subpoblación de CDs en especial. Por esta razón, también utilizamos otros marcadores descritos en la bibliografía (Macri et al., 2018) que suelen estar presentes en las CPA como son el CD11b, F4/80, CD86, CD135, entre otros.

Como puede observarse en la **Figura 20 A**, las células obtenidas expresaron en un porcentaje mayor al 90% el marcador CD11c característico de CDs murinas. Este resultado fue corroborado por microscopía confocal observándose la proteína CD11c presente en la membrana celular (**Figura 20 B**). Estas células CD11c⁺ expresaron las proteínas CMH-II de expresión bimodal característico de este tipo celular en un porcentaje mayor al 90%, y también la molécula coestimuladora del TCR, CD86. Las

moléculas CD11b y F4/80 características de CDs convencionales e inflamatorias (Merad et al., 2013) también se encontraron en las CPA obtenidas. Con el factor de diferenciación utilizado también pueden obtenerse algunos porcentajes de otros tipos celulares que no son CPA, como los granulocitos. Sin embargo, todos nuestros cultivos fueron negativos para la marca correspondiente a GR1 indicando una ausencia de estos. Tampoco se observó la expresión de los marcadores CD4, CD8 y CD135 presentes en otras subclases de CDs.

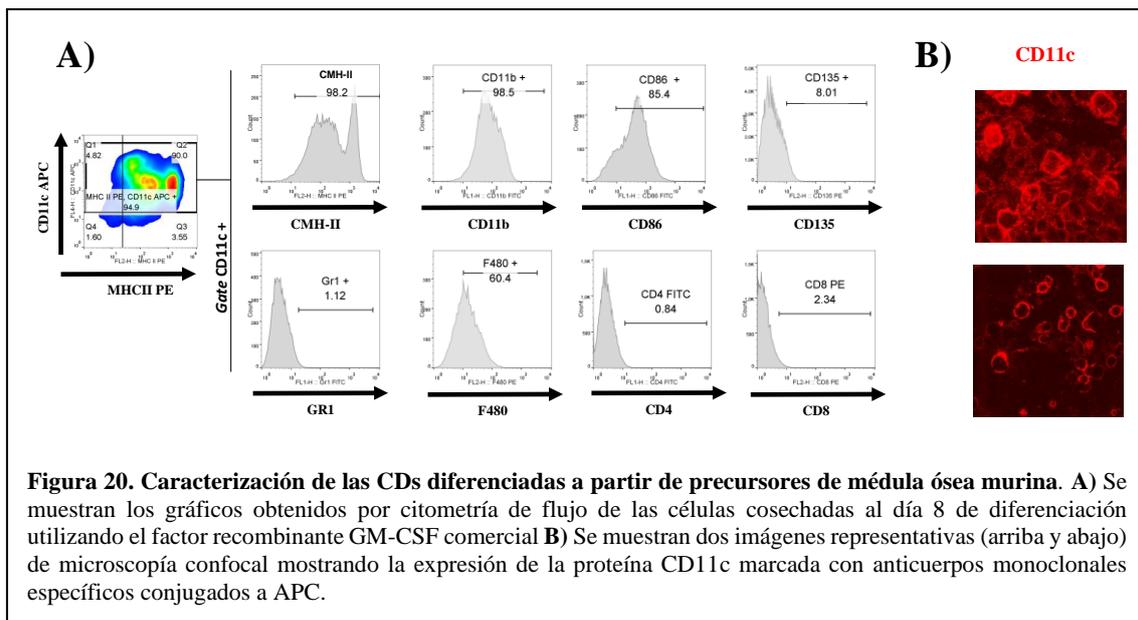


Figura 20. Caracterización de las CDs diferenciadas a partir de precusores de médula ósea murina. A) Se muestran los gráficos obtenidos por citometría de flujo de las células cosechadas al día 8 de diferenciación utilizando el factor recombinante GM-CSF comercial **B)** Se muestran dos imágenes representativas (arriba y abajo) de microscopía confocal mostrando la expresión de la proteína CD11c marcada con anticuerpos monoclonales específicos conjugados a APC.

Con el protocolo utilizado, detallado en materiales y métodos, se obtiene una población de células con viabilidad mayor al 85% y una expresión homogénea mayor al 80 % para el marcador CD11c. Sin embargo, para el resto de los marcadores la expresión fue heterogénea. Debido a la presencia de las moléculas CD11b y F4/80 y por las características morfológicas, se las podría incluir dentro de las subpoblaciones de las CDs inflamatorias o convencionales. Considerando la heterogeneidad de las células obtenidas se utilizó un concepto amplio para referirnos a ellas sin asignarlas a ninguna subpoblación (CDs convencionales o CDs inflamatorias) y de aquí en adelante en este trabajo siempre se nombrarán bajo el nombre general de CDs.

5.1.2 Interacción del VFAi con las CDs

5.1.2.1 Internalización de VFAi por parte de las CDs.

Las CDs son capaces de capturar y reconocer antígenos de diferentes maneras, internalizarlos y procesarlos para luego activar una respuesta adaptativa (Kuby, 2012; Murphy & Weaver, 2017). Para corroborar nuestra hipótesis y evaluar el impacto de los VEs derivados de CDs en la inmunidad contra el VFA es necesario realizar una primera aproximación de la interacción de las CDs con el VFAi. Trabajos anteriores han demostrado que las CDs derivadas de médula ósea murina pueden reconocer y ser activadas por el VFA inactivado por UV, y que este antígeno aumenta la capacidad de las CDs de estimular los LT (Ostrowski et al., 2007; 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre la interacción que existe con el antígeno utilizado para la vacuna comercial, el VFAi. Los pocos antecedentes que existen sobre esta interacción están realizados *in vivo* con la formulación completa de la vacuna y estudiando las poblaciones naturales de CDs (C. Langellotti et al., 2012). Solo se encontró un trabajo que reporta la interacción del antígeno vacunal y las CDs *in vitro*, aunque se centra más en el estudio del VFA infeccioso y la CDs (Cecilia Langellotti et al., 2015). Sin embargo, en ninguno de los antecedentes mencionados se estudia la interrelación del VFAi purificado con la CDs derivadas de médula ósea. Por esta razón se decidió comenzar realizando un experimento que permita responder este interrogante. Para ello, se incubaron $10,00 \times 10^6$ CDs con $10 \mu\text{g/ml}$ o $30 \mu\text{g/ml}$ de VFAi conjugado con el fluorocromo FITC (VFAi-FITC). La cinética de internalización se midió a los 40 y 120 min y se evaluó mediante microscopía confocal. En ambos tiempos y en ambas concentraciones de virus a 37°C , se observan CDs (CD11c^+) que internalizaron el VFAi-FITC (**Figura 21 A, C, E y G**). Estas células se pueden ver resaltadas en la imagen con un cuadrado de línea punteada. La fluorescencia no se observó en los controles negativos correspondientes a las células sin el virus (RPMI) o al grupo de células pulsadas con VFAi sin FITC (datos no mostrados). Esto indica que el aumento de la fluorescencia se debe a la interacción con VFAi-FITC. Al repetir la incubación, pero a 4°C la internalización disminuye como consecuencia de la ralentización del proceso debido a la disminución de la temperatura, esto se ve reflejado en la proporción de CDs $\text{CD11c}^+/\text{FITC}^+$ (**Figura 21 B, D, F y H**). Estos resultados también fueron corroborados por citometría de flujo, en la que se puede observar que la interacción con el VFAi-FITC es mayor a mayores concentraciones de virus utilizadas (I-L). En ambos tiempos la internalización se refleja como un desplazamiento de la

RESULTADOS

fluorescencia de la población hacia la derecha, siendo la población de CDs FITC⁺ de 17,5% y 39,5% a 40 y 120 min, respectivamente, para el grupo de 10 µg/ml y de 94,9 % y 97,5% a 40 y 120 min, respectivamente para el grupo de 30 µg/ml. La internalización del virus fue confirmada utilizando el colorante Azul Tripán. Este colorante de exclusión bloquea la fluorescencia de la membrana sin alterar la fluorescencia interna (**Figura 21 I-L**). En ambos tiempos (40 y 120 min) y para ambas concentraciones (10 y 30 µg/ml de VFAi), la fluorescencia disminuye en presencia del colorante de exclusión. Para el grupo correspondiente a 10 µg/ml de VFAi y 40 min de incubación se observó una disminución cercana al 7,5 % en la población positiva para FITC. En cambio, en el grupo correspondiente a 30 µg/ml de VFAi y 40 min la disminución fue de 17 %. Al evaluar ambas concentraciones (10 y 30 µg/ml VFAi) pero al tiempo de incubación de 120 min se observó una disminución de la fluorescencia cercana al 20 % para el grupo de 10 µg/ml y del 9% para el grupo de 30 µg/ml (**Figura 21 I-L**) Estos resultados indicaron que las CDs murinas interaccionan con el VFAi vacunal O1 Campos, y por algún mecanismo pueden internalizarlo. Esto se refleja en la aparición de partículas FITC⁺ en el interior celular y en la permanencia de la fluorescencia luego del agregado del Azul Tripán, demostrando que se encuentra en el interior.

Figura 21 en la página siguiente →

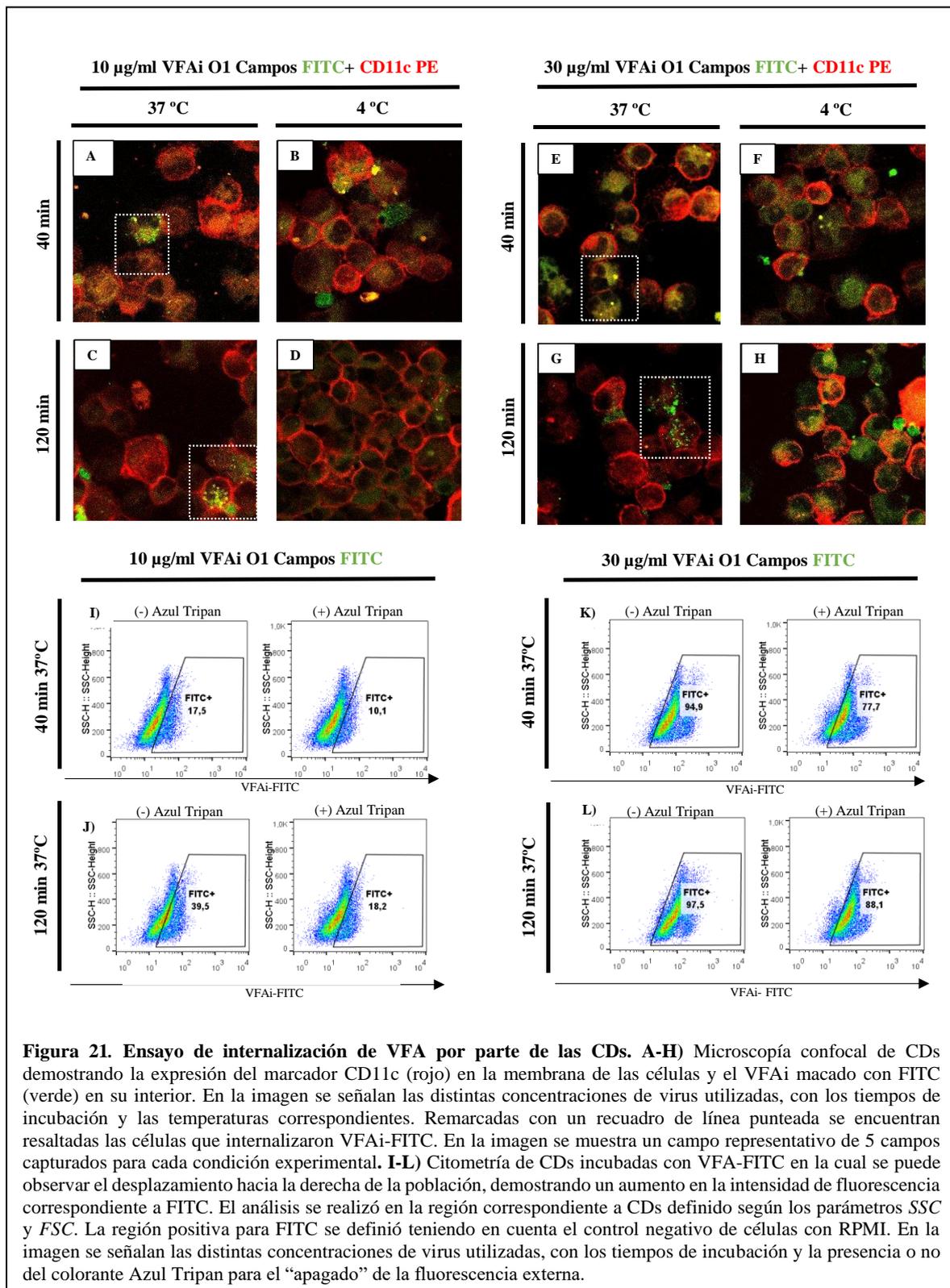


Figura 21. Ensayo de internalización de VFA por parte de las CDs. A-H) Microscopía confocal de CDs demostrando la expresión del marcador CD11c (rojo) en la membrana de las células y el VFAi macado con FITC (verde) en su interior. En la imagen se señalan las distintas concentraciones de virus utilizadas, con los tiempos de incubación y las temperaturas correspondientes. Remarcadas con un recuadro de línea punteada se encuentran resaltadas las células que internalizaron VFAi-FITC. En la imagen se muestra un campo representativo de 5 campos capturados para cada condición experimental. I-L) Citometría de CDs incubadas con VFA-FITC en la cual se puede observar el desplazamiento hacia la derecha de la población, demostrando un aumento en la intensidad de fluorescencia correspondiente a FITC. El análisis se realizó en la región correspondiente a CDs definido según los parámetros SSC y FSC. La región positiva para FITC se definió teniendo en cuenta el control negativo de células con RPMI. En la imagen se señalan las distintas concentraciones de virus utilizadas, con los tiempos de incubación y la presencia o no del colorante Azul Tripan para el “apagado” de la fluorescencia externa.

5.1.2.2 Activación de CDs con VFAi O1 Campos

Como se mencionó previamente cuando las CDs captan un antígeno maduran, produciéndose la pérdida de su capacidad endocítica y el incremento de las moléculas

coestimuladoras CD80/CD86, CD40 y las del CMH-II (Banchereau et al., 2000; C Théry & Amigorena, 2001). Las células procesan el antígeno y adquieren la capacidad de migrar hacia los OLS para montar una respuesta. Hasta aquí, se demostró que las CDs pueden internalizar el VFAi, pero poco sabíamos del estado de activación de las CDs después de esta internalización.

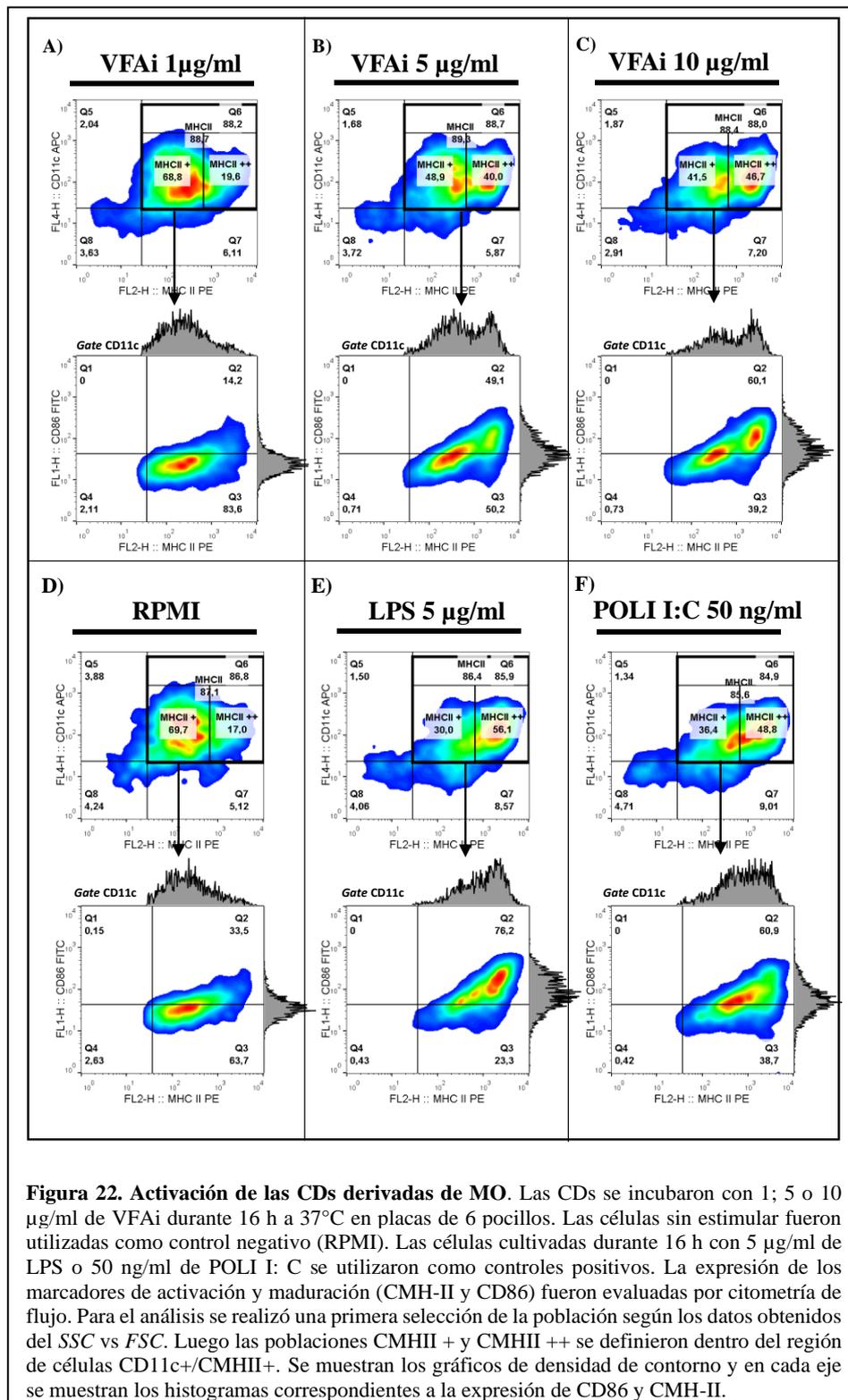


Figura 22. Activación de las CDs derivadas de MO. Las CDs se incubaron con 1; 5 o 10 µg/ml de VFAi durante 16 h a 37°C en placas de 6 pocillos. Las células sin estimular fueron utilizadas como control negativo (RPMI). Las células cultivadas durante 16 h con 5 µg/ml de LPS o 50 ng/ml de POLI I: C se utilizaron como controles positivos. La expresión de los marcadores de activación y maduración (CMH-II y CD86) fueron evaluadas por citometría de flujo. Para el análisis se realizó una primera selección de la población según los datos obtenidos del SSC vs FSC. Luego las poblaciones CMHII + y CMHII ++ se definieron dentro del región de células CD11c+/CMHII+. Se muestran los gráficos de densidad de contorno y en cada eje se muestran los histogramas correspondientes a la expresión de CD86 y CMH-II.

Para evaluar el estado de activación y definir la concentración óptima de VFAi a utilizar, se incubaron CDs con concentraciones crecientes de VFAi (1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$), y luego se evaluó por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación como CMH-II y CD86. La activación basal se determinó con el control células cultivadas solo con medio (RPMI). El estado de activación máxima de las CDs se estableció estimulando con dos activadores de TLR frecuentemente utilizados como lo son el lipopolisacárido (grupo LPS) (Wei et al., 2017) y el ácido poliinosínico:policitidílico (grupo POLI I:C) (Fortier et al., 2004; Singh-jasuja et al., 2013).

Como se puede observar en la **Figura 22**, al analizar la expresión de la molécula CMH-II podemos ver que se establece una distribución bimodal presentándose dos poblaciones que poseen distintos niveles de expresión. Una población con niveles más bajos pero que permanece positiva (CMH-II⁺) y una población con niveles mayores (CMH-II⁺⁺). Para evaluar la activación se estudió la variación de estas dos poblaciones teniendo en cuenta que, a medida que las CDs, se activan aumenta la expresión de CMH-II y se desplaza hacia la población CMH-II⁺⁺. Al analizar las poblaciones de CDs en los grupos experimentales pulsados con VFAi se puede observar la progresiva activación de las CDs al aumentar la concentración del virus con el que se pulsa. Esto se ve reflejado en un aumento del porcentaje de células en la región CMH-II⁺⁺ pasando de un 19,6 % en el grupo de menor concentración de VFAi a un 46,7 % en el de 10 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi (**Figura 22 A-C**). Un comportamiento similar se observa al analizar la expresión de la molécula coestimuladora CD86, concordante con el fenotipo de las células activadas. Como se muestra en la **Figura 22 A-C**, las células que expresan altos niveles de CD86 (14,1 %; 49,1% y 60,1% para VFA 1 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente) también expresan altos niveles de CMH-II indicando el estado de maduración de las CDs. Si observamos el control negativo correspondiente a las células con RPMI podemos ver que un pequeño porcentaje de las células se encuentran en la región CMH-II⁺⁺ (17%) mientras que el resto se encuentra en la región CMH-II⁺, indicando que solo una pequeña población se activó en condiciones basales (**Figura 22 D**). Al analizar los controles positivos (LPS y POLI I:C) se pudo observar que las CDs se activan en respuesta a ambos estímulos presentando niveles similares a la concentración máxima de virus utilizada en este ensayo (56,1 % y 48,8% para LPS y POLI:IC, respectivamente) (**Figura 22 E y F**). Con este experimento pudimos afirmar que las partículas virales inactivadas tienen la capacidad de activar a las CDs induciendo el aumento de CMH-II y de CD86 necesarias para la

generación de una respuesta adaptativa. Además, pudimos comprobar que las CDs diferenciadas *in vitro* con nuestro protocolo tienen la capacidad de activarse y los marcadores de activación varían de manera similar a lo reportado en bibliografía para las CDs *in vivo* (Steinman, 1991). A partir de estos resultados, la concentración de trabajo elegida para la estimulación de las CDs con VFAi fue la de 10 µg /ml, concentración en la que se logró el mayor porcentaje de células activadas CMH-II⁺/CD86⁺ sin alterar la viabilidad del cultivo.

En resumen: se logró diferenciar CDs a partir de precursores de médula ósea que expresan en un porcentaje mayor al 85 % el marcador CD11c y, además, en base al resto de los marcadores analizados, tendrían un fenotipo similar al de las CDs convencionales o inflamatorias. Las CDs obtenidas pueden internalizar el VFAi O1 Campos y como consecuencia pueden madurar reflejándose esto en un aumento en la expresión de los marcadores clásicos de activación como el CMH-II y CD86.

5.2 Las CDs derivadas de médula ósea cargadas con el VFAi secretan VEs que expresan proteínas virales

5.2.1 Aislamiento y caracterización de las VEs derivadas de las CDs cargadas con VFAi

5.2.1.1 Cinética de secreción de las VEs: las CDs liberan VEs que expresan proteínas virales durante las primeras 24 h post-internalización

Como se mencionó anteriormente, las VEs derivadas de CPA profesionales expresan en su membrana las moléculas del CMH-I y CMH-II y las demás moléculas necesarias para una correcta estimulación; por lo tanto, poseen la capacidad potencial de estimular directamente a los LT *in vitro* e *in vivo* promoviendo la respuesta inmune (Robbins & Morelli, 2014; Kowal, 2019). Como antecedentes, se sabe que las CDs murinas reaccionan de diferente manera al VFA, dependiendo de si está en su forma infectiva o inactivada (Ostrowski et al., 2007; 2005) . Si el VFA puede generar en la misma célula dos perfiles tan distintos entonces, las vesículas derivadas de esas células también podrían influir de

diferente manera en la respuesta inmune antiviral. En los experimentos anteriores pudimos comprobar que las CDs obtenidas son funcionales y pueden reconocer al VFAi vacunal. Las VEs obtenidas a partir de esas CDs podrían tener un rol activo en la generación de la respuesta inmune contra el VFA. Para evaluar esto, se incubaron CDs en presencia o ausencia de VFAi y se aislaron las VEs a partir del medio condicionado.

En base a la experiencia de nuestro grupo en el aislamiento de VEs se decidió realizar un primer abordaje obteniendo las VEs a partir del sobrenadante de 36 h de cultivo (VEs-36h). Este tiempo se basa en los protocolos utilizados en las investigaciones previas del grupo para la obtención de VEs a partir de células tumorales (Menay et al., 2017; Coccozza et al., 2019). Las vesículas obtenidas se caracterizaron por citometría de flujo y se evaluó la expresión de marcadores clásicos para VEs como lo son las tetraspaninas (CD9 y CD81) y marcadores propios de las CDs de las que derivan, como la molécula CMH-II. A partir de los resultados de citometría que se muestran en la **Figura 23** se pudo determinar que en el sobrenadante de cultivo de 36 h de las CDs pulsadas con VFAi existen VEs, ya que se detectó la expresión de CD9 y CD81. Por otra parte, también se confirmó el origen de las VEs a partir de CDs por la presencia de la molécula CMH-II.

Es sabido que las VEs muchas veces pueden presentar antígenos provenientes de algún patógeno que infectó a la célula o, en el caso de las CDs, proteínas de patógenos que hayan incorporado. Por esta razón se decidió buscar en las VEs la presencia de algún antígeno del VFAi. Para ello se utilizó una IgG específica para VFA purificada a partir de un suero bovino inmunizado con la vacuna comercial contra la FA. Al analizar por citometría de flujo la expresión de antígenos virales en la población de VEs se observó que entre el 33- 40% de las VEs resultaban positivas para proteínas de VFA. Si bien este resultado fue alentador, surgió en paralelo otra cuestión a resolver. Si bien se podían detectar antígenos en las vesículas esta detección no era homogénea en toda la población, reflejando que gran parte de las vesículas no las expresaban.

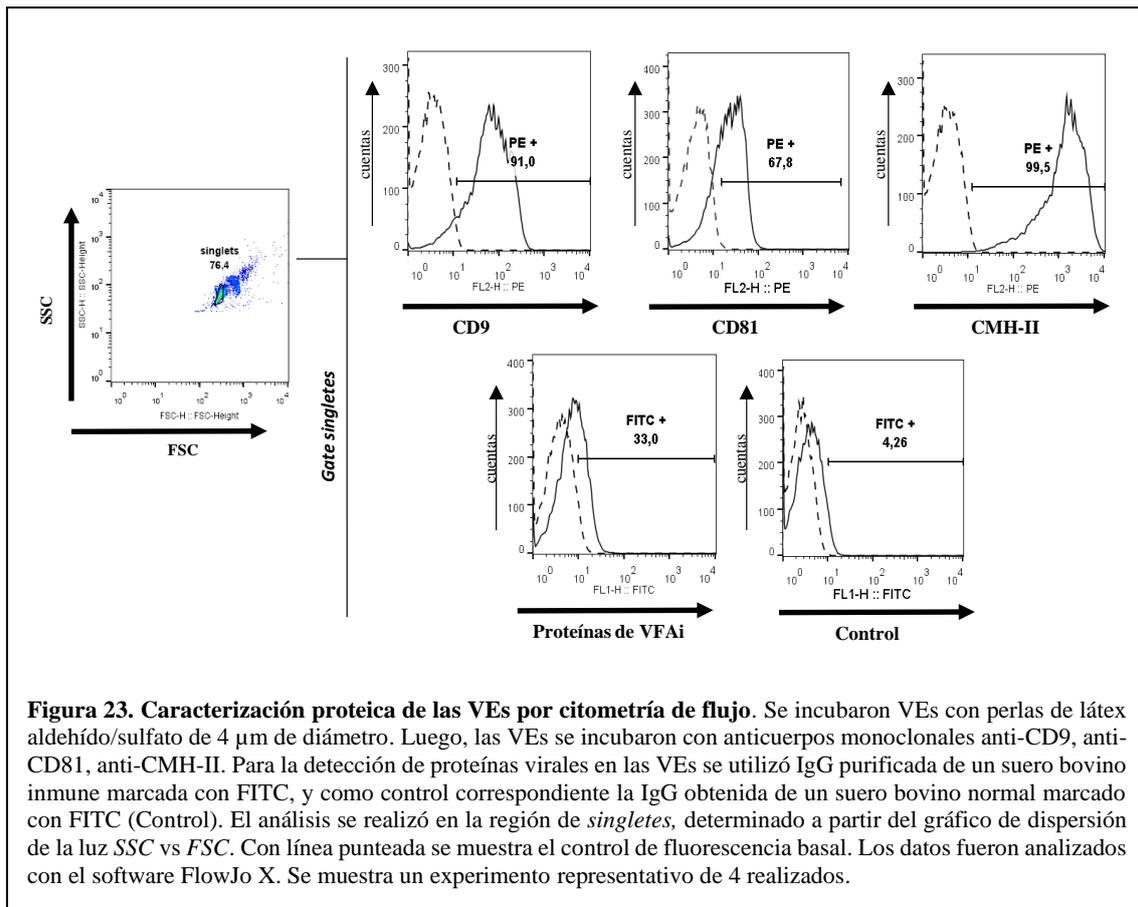
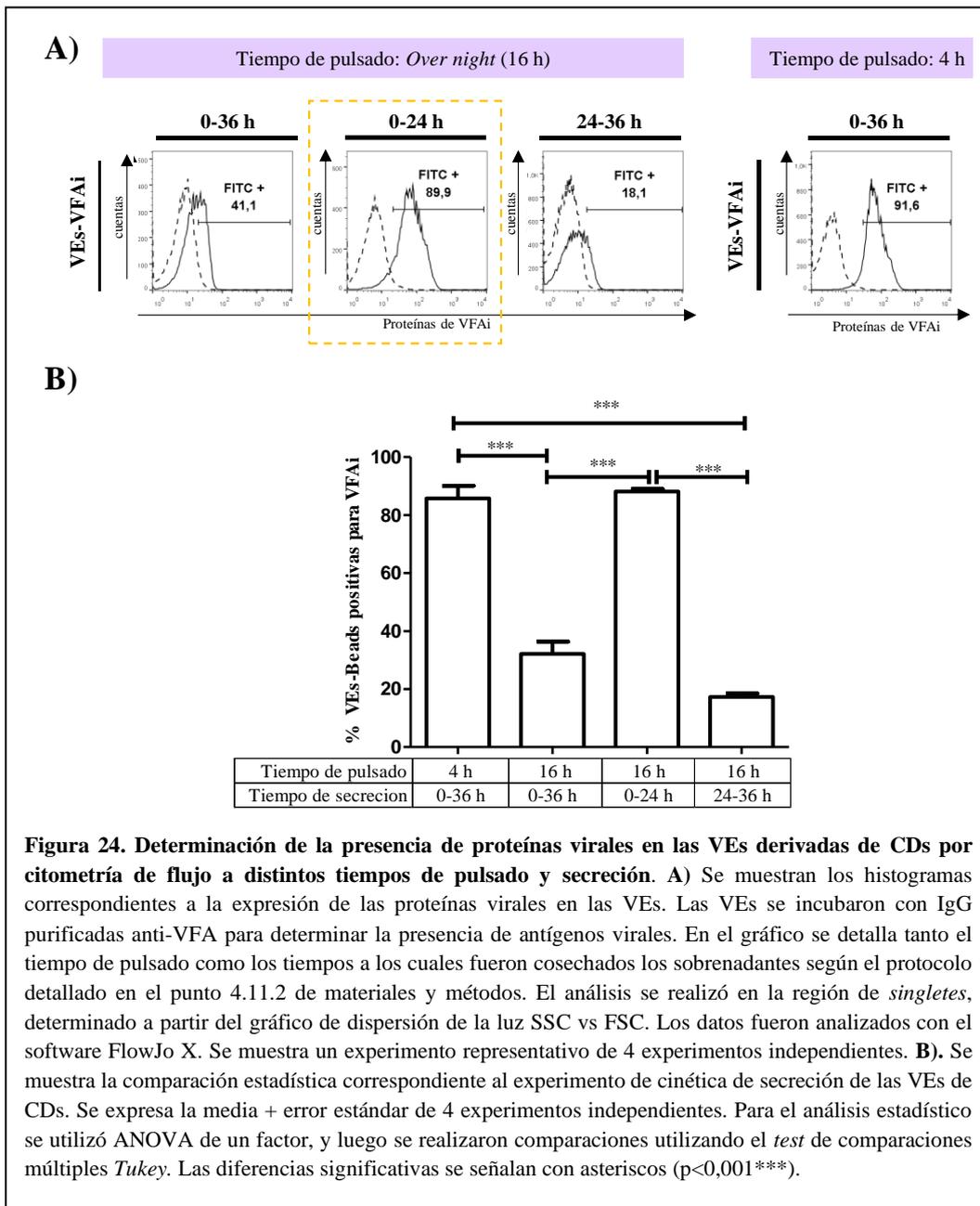


Figura 23. Caracterización proteica de las VEs por citometría de flujo. Se incubaron VEs con perlas de látex aldehído/sulfato de 4 μm de diámetro. Luego, las VEs se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-CD9, anti-CD81, anti-CMH-II. Para la detección de proteínas virales en las VEs se utilizó IgG purificada de un suero bovino inmune marcada con FITC, y como control correspondiente la IgG obtenida de un suero bovino normal marcado con FITC (Control). El análisis se realizó en la región de *singlets*, determinado a partir del gráfico de dispersión de la luz SSC vs FSC. Con línea punteada se muestra el control de fluorescencia basal. Los datos fueron analizados con el software FlowJo X. Se muestra un experimento representativo de 4 realizados.

Esta heterogeneidad resulta en un problema a la hora de querer probar su efecto sobre la estimulación del sistema inmune, ya que el antígeno de interés no estaba presente en toda la población. Por esta razón, se ideó una estrategia para aumentar el porcentaje de la población positiva para antígenos virales (VEs-VFAi⁺) y así contar con una población más homogénea. Sabiendo que la vida media de las VEs varía y que al purificar a un tiempo determinado solo estamos “tomando una foto” de un proceso dinámico, ya que parte de las vesículas secretadas pueden dejar de estar en el sobrenadante al interactuar o ser endocitadas por otras células. Además, considerando que los antígenos que buscamos no son propios de la CDs si no que están presentes solo cuando la célula interactúa con el antígeno, se planteó la posibilidad de que quizás el tiempo elegido de purificación no era el apropiado y que parte de las vesículas secretadas con proteínas virales podrían estar sub-estimándose. Fue entonces que decidimos realizar una cinética de secreción, proponiendo dos tiempos de pulsado, uno corto de 4 h y uno más extenso de 16 h. Los tiempos de secreción también variaron para realizar una cinética de secreción y lograr así encontrar, el tiempo en el cual la mayor parte de las VEs expresaban proteínas virales. Utilizamos principalmente 3 tiempos de secreción (24 h, 36 h y un tercer grupo

en el cual el total de 36 h se dividió en dos: las primeras 24 h y las últimas 12 h). Como se muestra en los gráficos de las **Figura 24 A** al pulsar las células con VFAi durante 16 h podemos observar que a las 24 h de secreción alrededor del 88% de la población de VEs expresan proteínas virales (VEs-VFAi). Resultados similares se obtuvieron al disminuir el tiempo de pulsado a 4 h, pero extendiendo el tiempo de secreción a 36 h.



En la **Figura 24 B** se muestra el gráfico de barras que representa la compilación de los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados de manera independiente con el correspondiente análisis estadístico. Allí se muestra, que existe un aumento

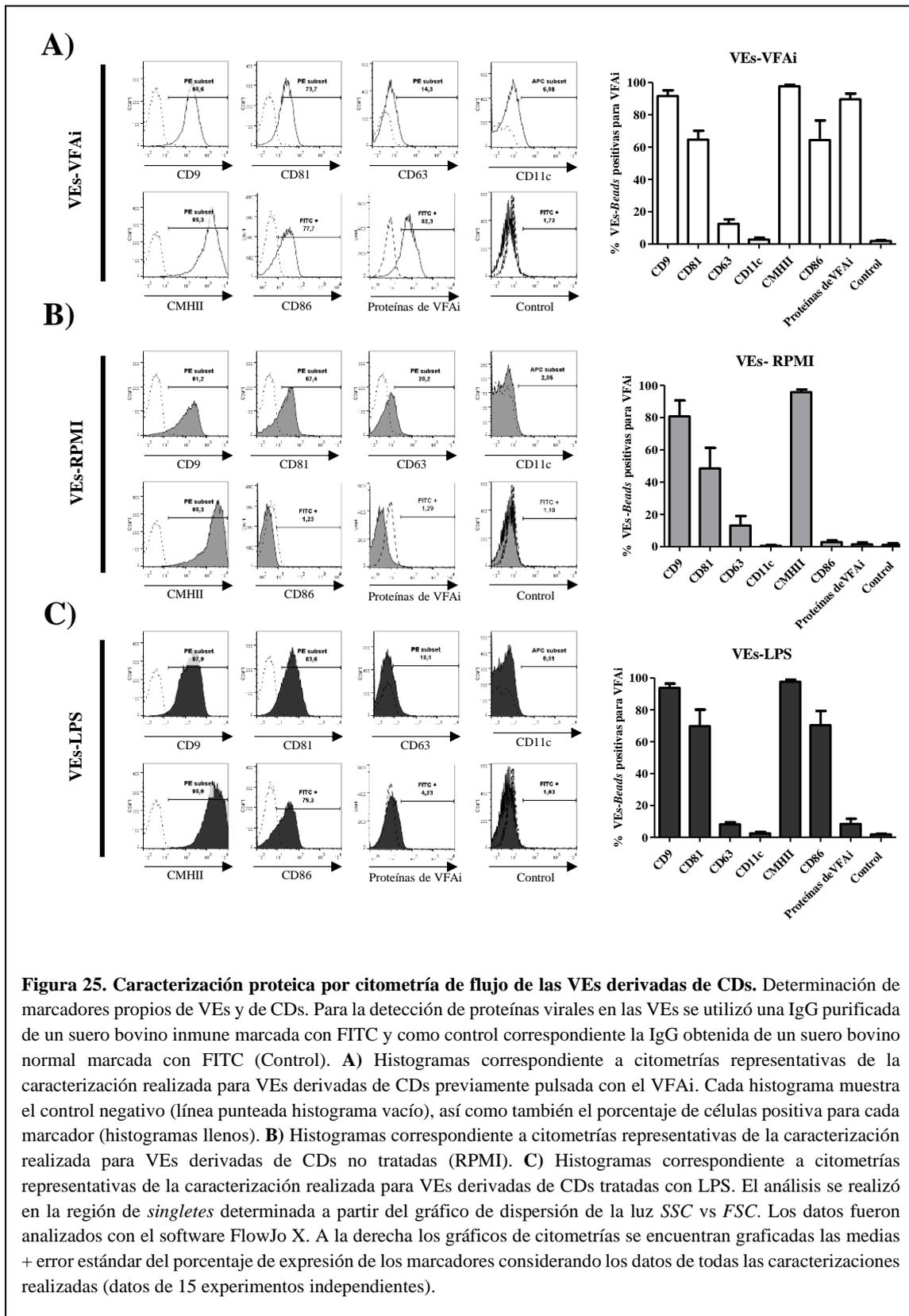
significativo de la secreción de VEs que expresan proteínas de VFA en las primeras 24 h luego del pulsado ($p < 0,001^{***}$ al comparar 24 h con el grupo de 0-36 h). Al disminuir el tiempo de secreción de 36 h a 24 h se incrementó el porcentaje de VEs con proteínas de VFA de un 33 % a un 88% (**Figura 24 B**). La obtención de VEs en todos los tiempos se corroboró con citometría de flujo a partir de la marcación de las proteínas CD9 y CD81 (datos no mostrados). Los resultados derivados de este experimento indicaron que las CDs secretaron VEs con proteínas virales ($CD9^+/CD81^+/VFAi^+$) durante las primeras 24 h y luego siguieron secretando vesículas, pero sin antígenos virales durante las siguientes 12 h ($CD9^+/CD81^+/VFAi^-$). Estas últimas VEs pudieron generar un efecto de dilución sobre las VEs $CD9^+/CD81^+/VFAi^+$ que justificarían que solo un porcentaje menor al 50% expresaron las proteínas virales al aislarlas a partir del sobrenadante de 36 h de incubación. A partir de todos los protocolos estudiados podemos concluir que pulsando durante 16 h y cosechando el sobrenadante a las 24 h se obtiene una población VEs en la que más del 85% expresan proteínas virales (**Figura 24 B**). Resultados similares ($85\% \pm 4,26$) se obtuvieron pulsando 4 h y aislando las VEs del sobrenadante de 36 h de cultivo. Por comodidad en los tiempos de trabajo seleccionamos el protocolo de 16 h de pulsado y 24 h de secreción que fue el que se utilizó para la obtención de las VEs de aquí en adelante (**Figura 24**). Las VEs que expresan proteínas del VFA en un porcentaje mayor al 85% las llamaremos de aquí en más VEs-VFAi y siempre nos referiremos a las vesículas de las CDs control como VEs-LPS y VEs-RPMI.

5.2.1.2 Caracterización proteica por citometría de flujo de las VEs secretadas por las CDs

Habiendo establecido el tiempo de recolección de los sobrenadantes para el aislamiento de VEs en donde se logra obtener una población más homogénea en la que por lo menos el 85% expresa antígenos del VFAi, se procedió a realizar purificaciones seriadas de VEs para generar el *stock* que luego se utilizó en los experimentos restantes de caracterización funcional. A modo de control también se aislaron VEs a partir de cultivos de CDs sin pulsar, es decir solo en presencia de RPMI y también se obtuvieron VEs de CDs activadas con LPS. Todos los aislamientos se realizaron a partir de sobrenadantes de cultivos de 24 h post-pulsado. Al igual que hicimos con el primer experimento de aislamiento, para confirmar la presencia de VEs en la muestra obtenida realizamos una caracterización fenotípica utilizando marcadores específicos tanto de VEs como de las CDs que les dieron origen. Esta caracterización se realizó de rutina luego de cada aislamiento.

Como puede observarse en la **Figura 25 (A-C)**, las VEs correspondientes a los distintos tratamientos expresaron las proteínas marcadoras de vesículas CD9, CD81 y CD63, siendo la proteína CD9 la más expresada, estando presente en más del 80 % de la población de VEs-VFAi, VEs-RPMI y VEs-LPS. La molécula del CMH-II es una de las proteínas más utilizada para caracterizar a VEs provenientes de CDs ya que su presencia confirma el origen a partir de dichas células. Las poblaciones de VEs obtenidas expresaron en un alto porcentaje esta proteína encontrándose presente en más del 90% de la población. También evaluamos la presencia de la molécula CD86 en las VEs. En concordancia con lo que ocurre en las CDs esta molécula se encontró en mayor porcentaje en las poblaciones de VEs obtenidas a partir de células activadas (VEs-VFAi $p < 0.01^{**}$ y VEs-LPS $p < 0.05^*$ al comparar con VEs-RPMI) (**Figura 25**). Estos resultados son lógicos considerando que esta proteína se induce luego de la activación y maduración. Por otra parte, como la molécula CD11c es muy utilizada para caracterizar a las CDs derivadas de médula ósea y, considerando que la población de CDs utilizadas expresa esta proteína en su mayoría, decidimos incluirla en la caracterización. Para nuestra sorpresa, esta proteína, a pesar de estar presente en abundancia en la célula CDs, no se detectó en ninguna de las poblaciones de VEs obtenidas. Por último, y uno de los puntos de mayor interés para nuestro estudio, fue confirmar la presencia de antígenos virales en las VEs (**Figura 25 A**). En concordancia con los porcentajes obtenidos en el experimento de cinética de secreción obtuvimos una población de VEs en la que más del 85% expresaron antígenos virales ($p < 0.01^{***}$ al comparar VEs-VFAi con VEs-RPMI y VEs-LPS) (**Figura 26**). Se descartó la posibilidad de que estas proteínas virales puedan derivar de restos de virus que se co-purificaron con las VEs en base a un control realizado en el cual se siguió exactamente el protocolo de incubación con VFAi pero sin colocar las CDs, y luego se realizó el protocolo de aislamiento y la citometría de rutina. En este control además de no encontrarse VEs (ausencia total de marcadores como CD9, CD81, CD63 y CMH-II) tampoco se hallaron antígenos virales (datos no mostrados).

Además de los porcentajes de expresión de cada marcador en la población de las VEs, también evaluamos la intensidad media de fluorescencia (MFI del inglés *Mean Fluorescence Intensity*).



En la **Figura 26**, se muestran nuevamente los porcentajes de expresión de cada proteína en las distintas poblaciones de VEs para su comparación. También se muestran los valores de MFI para cada marcador y para cada tipo de VEs. Allí podemos observar que solo las

RESULTADOS

VEs provenientes de CDs pulsadas con VFAi expresaron antígenos virales como se refleja en el porcentaje ($p < 0.001^{***}$ al comparar VEs-VFAi con VEs-RPMI y VEs-LPS) como en el MFI ($p < 0.001^{***}$ y $p < 0.01^{**}$ al comparar VEs-VFAi con VEs-RPMI y VEs-LPS, respectivamente). Es importante remarcar que no se encontraron proteínas virales en las VEs- RPMI. Sorprendentemente, en las VEs-LPS se encontró un 8% de VEs positivas para proteínas de VFA. Sin embargo, la densidad de estas proteínas en las VEs es muy baja (MFI: $6,57 \pm 0,69$) respecto de la expresión en las VEs-VFAi (MFI: 216 ± 82). También se encontraron diferencias significativas para la proteína CD86, registrándose un valor de MFI mayor en las poblaciones de VEs que provienen de CDs maduras y activadas (MFI: $46,4 \pm 17,7$ para VEs-VFAi y MFI: $41,71 \pm 14,11$ para VEs-LPS) respecto a las VEs-RPMI (MFI: $2,41 \pm 0,25$). Esto mismo se observó al analizar el porcentaje de expresión de CD86 ($64.42\% \pm 12.07$ para VEs-VFAi, $67,36\% \pm 4,06$ para VEs-LPS y $3,27\% \pm 0,57$ para VEs-RPMI). Estos resultados sugieren que la expresión del CD86 en la VEs estaría reflejando el estado de activación de la CD de la cual derivan.

Figura 26 en la página siguiente →

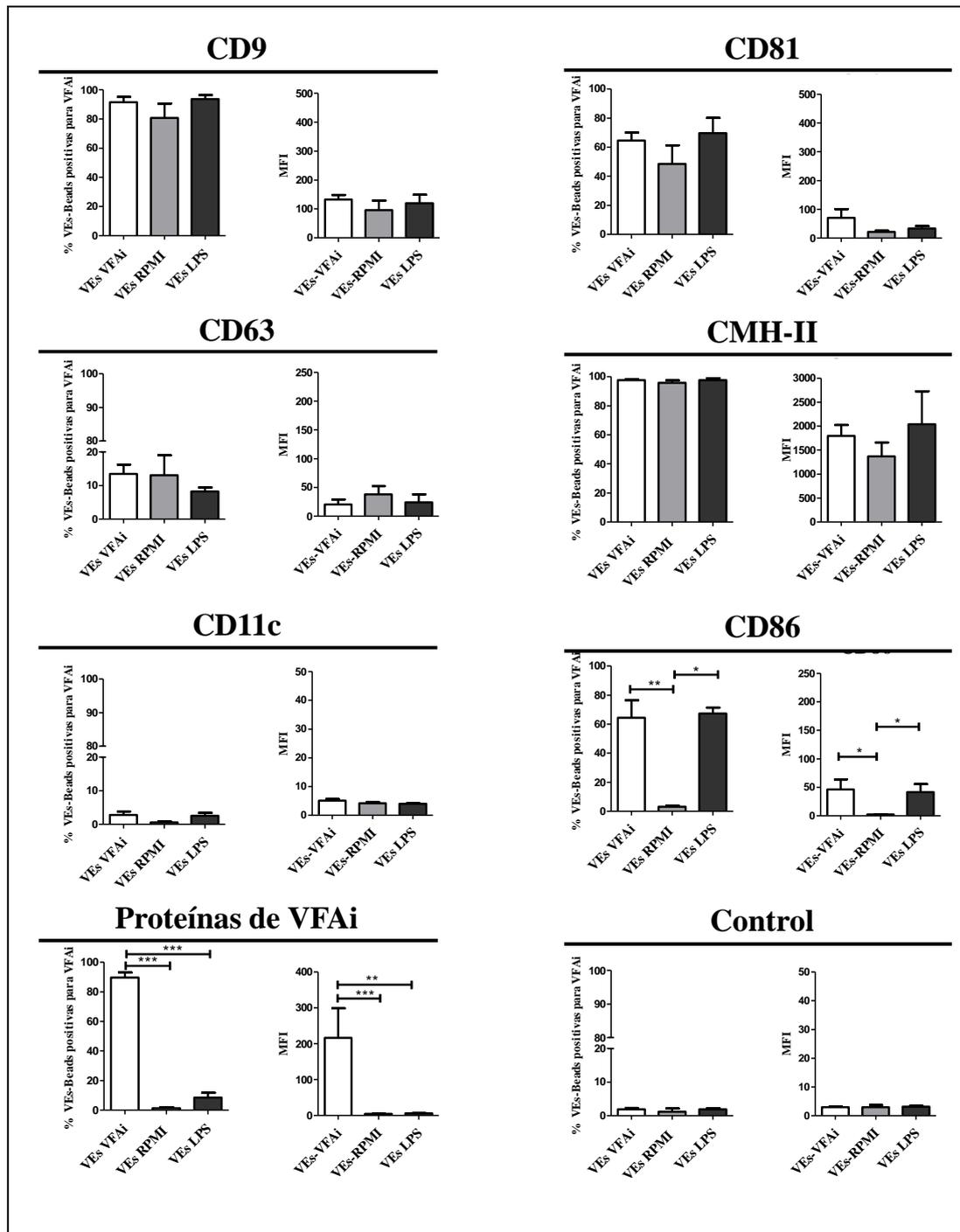
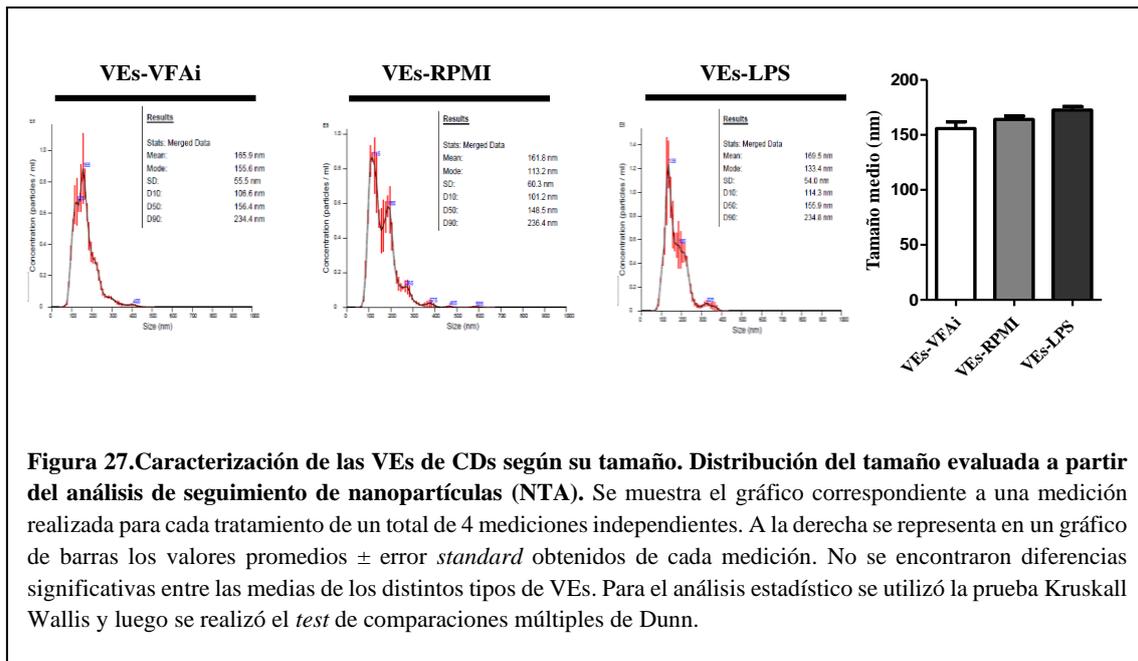


Figura 26. Perfil de proteínas expresadas en las distintas poblaciones de VEs. Comparación de porcentajes de expresión de las distintas proteínas (CD9, CD81, CD63, CMH-II, CD11c, CD86 y proteínas de VFA) para cada población de VEs, a la izquierda. Valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada uno de los marcadores evaluados, a la derecha. Para la detección de proteínas de las moléculas marcadoras se utilizaron anticuerpos monoclonales que se detallan en materiales y métodos. Las proteínas virales en las VEs fueron determinadas con una IgG purificada de un suero bovino inmune marcada con FITC y como control correspondiente la IgG obtenida de un suero bovino normal marcada con FITC (Control). Se muestra la media \pm error estándar. Se utilizó el test de KruskalWallis seguido por el de múltiples comparaciones de Dunn para el análisis de las MFI. y ANOVA de un factor seguido de comparaciones múltiples por Bonferroni para el análisis de los porcentajes. En los gráficos solo se indican las diferencias significativas, que se señalan con asteriscos ($p < 0.05$ *; $p < 0.01$ **; $p < 0.001$ ***).

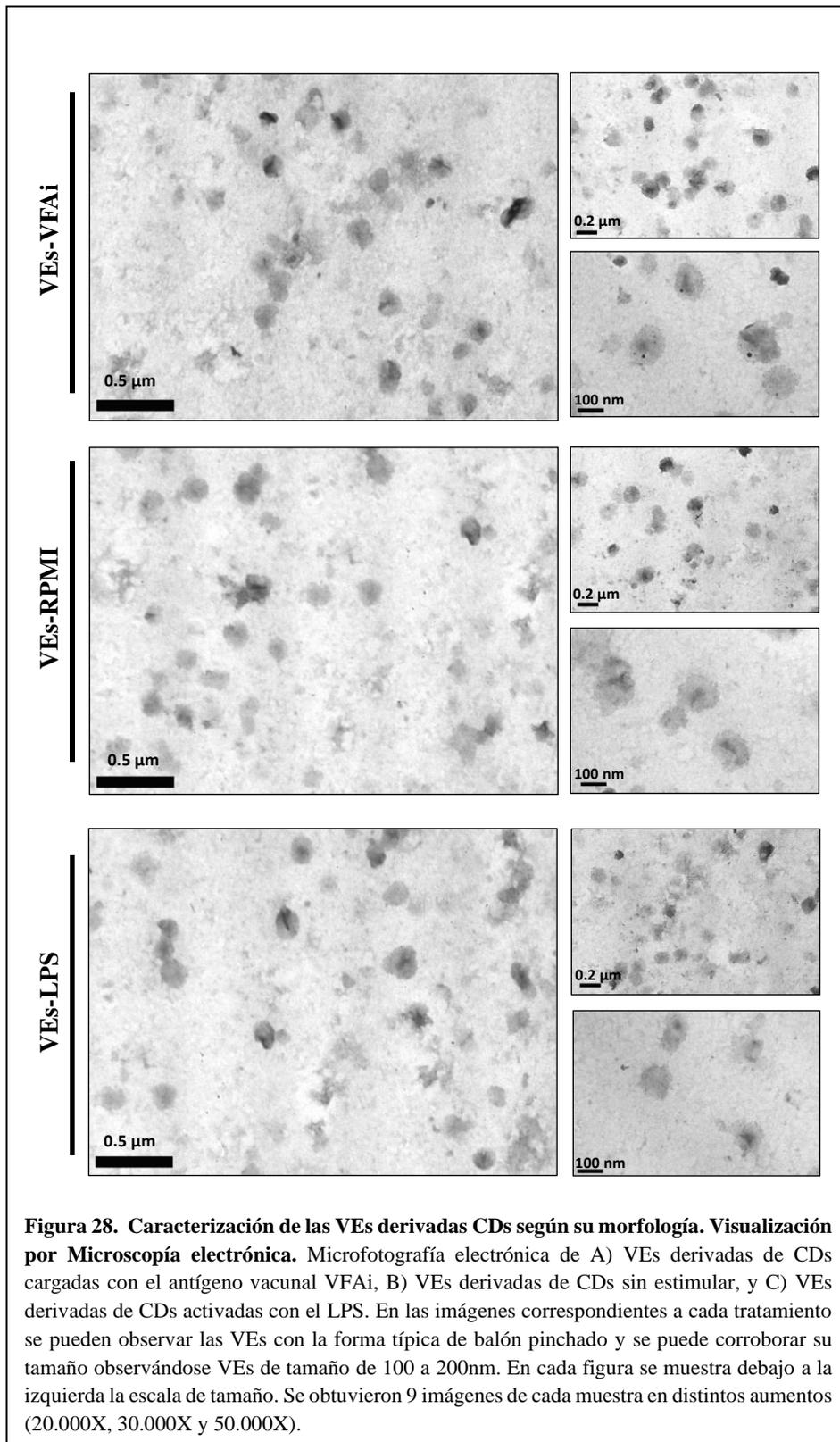
5.2.1.3 Caracterización de las VEs derivadas de CDs según su tamaño y morfología

En el estudio de las VEs es muy importante la caracterización, no solo utilizando marcadores proteicos, sino también en base a otras propiedades como es el tamaño, la morfología, su densidad, entre otras. Gracias a trabajos realizados en colaboración con el Licenciado Federico Coccozza perteneciente al grupo de la Dra Clotilde Théry (*Centre de recherche de l'Institut Curie, Paris, Francia*) se caracterizaron las VEs obtenidas por su tamaño utilizando la tecnología de análisis de seguimiento de nanopartículas (o también conocida como NTA por sus siglas en inglés de *Nanoparticle Tracking Analysis*). Esta tecnología utiliza el movimiento browniano de las nanopartículas para definir la distribución de tamaño de la población y su concentración.

En este trabajo solo se utilizó el NTA para determinar el tamaño de las VEs y poder definir mejor la población obtenida. Como esta tecnología no se encuentra en el país no la utilizamos para determinar la concentración de las muestras ya que no podíamos realizarla de rutina. Por lo que se estableció otro método en el cual se hizo una estandarización según el número de células (ver los detalles en materiales y métodos punto 4.12). Las tres poblaciones de VEs (**Figura 27**) presentaron una distribución de tamaño relativamente homogénea y similar sin encontrarse diferencias entre ellas. Siendo el tamaño promedio para las VEs-VFAi de $155,7 \text{ nm} \pm 6,25$, $164,1 \text{ nm} \pm 3$ para VEs-RPMI y $172,7 \text{ nm} \pm 3,15$ para VEs-LPS (**Figura 27**). Estos tamaños concuerdan con los valores reportados para nanovesículas, también definidas como pequeñas VEs (pVEs) entre las que se encuentran los exosomas. Estos datos, sumados a la caracterización proteica realizada, demostraron que las muestras obtenidas tienen VEs ya que expresan los marcadores característicos y que estas son de tamaño pequeño de 100-200 nm por lo que podrían considerarse VEs similares a exosomas. Un dato no menor para resaltar es que tanto en la expresión de marcadores proteicos (**Figura 26**) como en la distribución de tamaños (**Figura 27**) todas las VEs obtenidas, son similares. El tratamiento al que se expone la célula ya sea para pulsarla con VFAi o LPS, no afecta ni el tamaño ni las características de la población obtenida. Es decir, las únicas diferencias entre las VEs de los distintos grupos son la presencia o la ausencia de proteínas virales que solo están en el grupo VEs-VFAi y la ausencia de CD86 en el grupo VEs-RPMI derivadas de CDs no estimuladas.



Dado su pequeño tamaño, las VEs solo se pueden visualizar utilizando un microscopio electrónico. Si bien ya se tenía una estimación del tamaño, poco sabíamos sobre su morfología. En la microfotografía electrónica (**Figura 28**) se observan las VEs obtenidas de los distintos tratamientos que presentaron la forma de copa o balón pinchado característica de los exosomas. Por esta técnica se pudo confirmar nuevamente su tamaño de alrededor de 150 nm que concuerda con los valores reportados en la bibliografía para exosomas (De Toro et al., 2015) y con los datos obtenidos en la medición por NTA. En línea con los resultados anteriores, la morfología de las VEs tampoco parece afectarse por el tratamiento al que se expone la CDs. Esto confirma que las distintas poblaciones de VEs tienen características similares al menos en los parámetros evaluados y solo difieren en la expresión de antígenos de VFA y de la molécula CD86.



Todos los resultados obtenidos de la caracterización dan indicio de que las VEs aisladas a partir de CDs diferenciadas de médula ósea tienen características similares a exosomas. Sin embargo, debido a la falta de marcadores aprobados por la ISEV que aseguren el

origen endosómico, no podemos definirlos como exosomas y optamos por definirlo según su tamaño. **De aquí en adelante a las VEs obtenidas las definiremos como pequeñas VEs y su abreviación será pVEs.**

Compilando todos los resultados de la caracterización de las VEs podemos decir que las CDs derivadas de médula ósea que internalizaron el VFAi y se activaron, secretan VEs que además de expresar los marcadores CD9, CD81, CD63, CD86 y CMH- II también presentan proteínas virales de VFA. La secreción de estas VEs-VFAi es acotada en el tiempo y ocurre mayormente durante las primeras 24 h post-pulsado de la CDs con el VFAi. Las VEs secretadas tienen la morfología característica de exosomas y un tamaño de 100 a 200 nm que indica que pertenecen al grupo de pequeñas VEs. Por la expresión de los marcadores proteicos, su tamaño y morfología las VEs obtenidas podrían clasificarse como pVEs similares a exosomas.

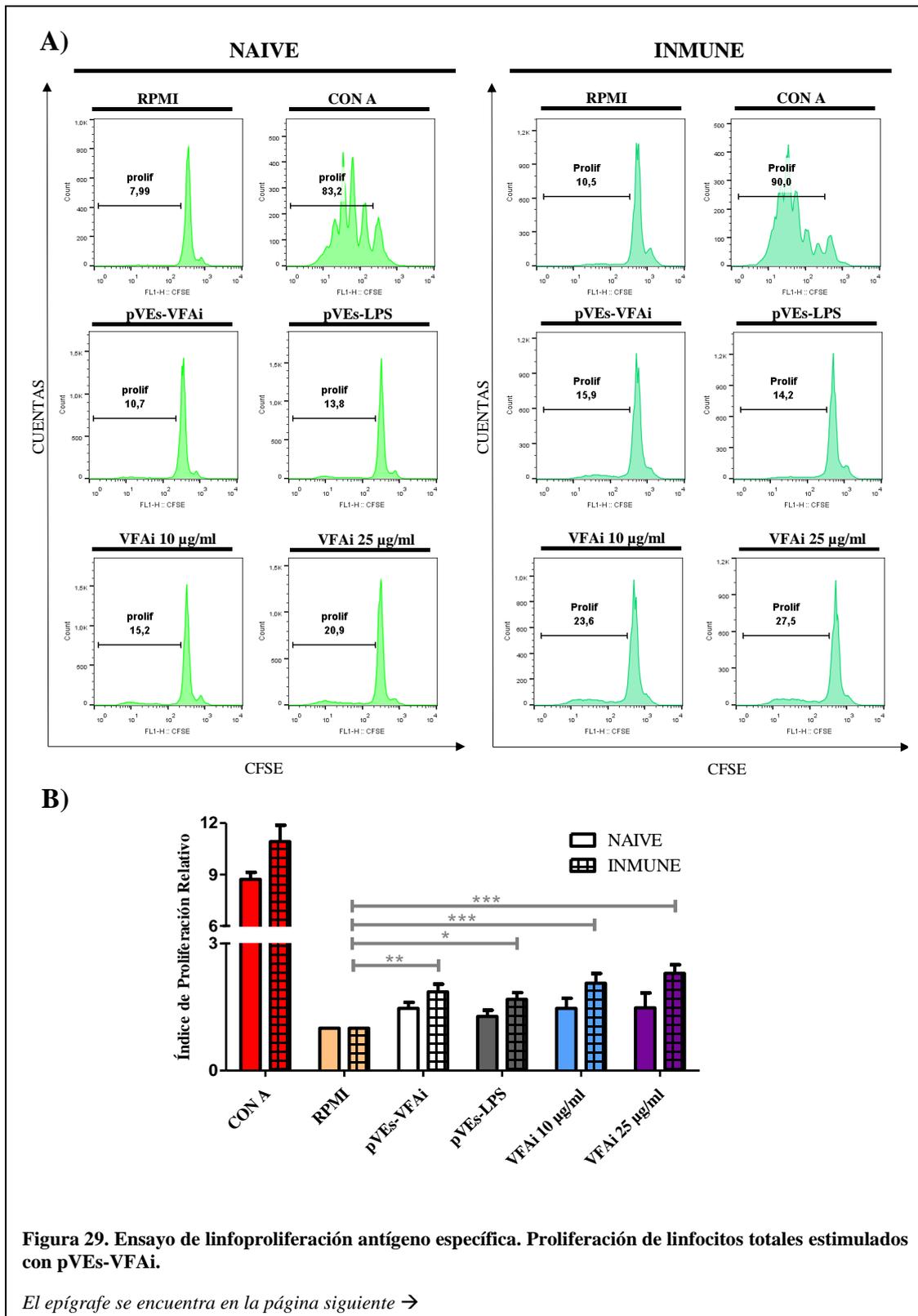
5.3 Las CDs liberan VEs que expresan antígenos del VFA y son capaces de estimular una respuesta inmune celular *in vitro*

5.3.1 Estudio de las propiedades inmunomoduladoras de las VEs derivadas de CDs en la respuesta inmune frente a VFA

5.3.1.1 Linfoproliferación antígeno específica utilizando las VEs derivadas de CDs pulsadas con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos. Análisis sobre la población de células CD3+ y B220+

Una vez caracterizadas las pVEs-VFAi y sabiendo que con el nuevo protocolo de pulsado y secreción más del 85% expresan proteínas virales, se continuó con el siguiente objetivo: evaluar el rol de estas pVEs en la respuesta inmune generada por el VFAi. Una de las preguntas formuladas fue si esas proteínas virales presentes en las pVEs podían participar de la respuesta inmune contra VFA. Para responder este interrogante, se realizó un primer ensayo de linfoproliferación específica utilizando la técnica de dilución del colorante CFSE. En este experimento se evaluó la capacidad de las pVEs-VFAi de inducir la proliferación de linfocitos murinos. Para los ensayos *in vitro* se utilizaron esplenocitos de ratones que previamente fueron sensibilizados *in vivo* con la vacuna comercial

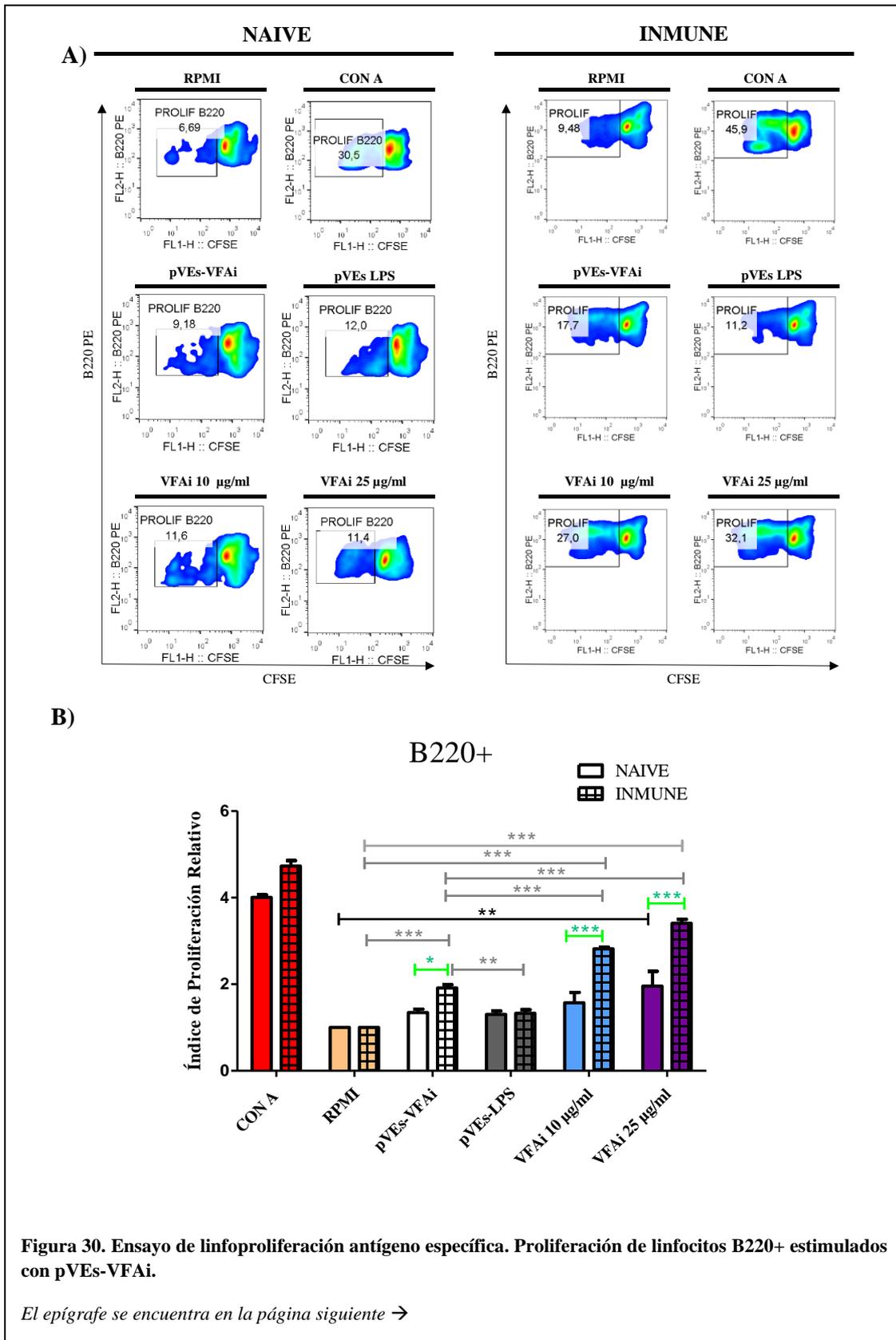
monovalente gentilmente cedida por el laboratorio Biogénesis Bagó. Esta vacuna está formulada con el VFA O1 Campos inactivado con BEI como fuente de antígeno. En paralelo también se realizó el experimento con esplenocitos vírgenes. Con las células de bazo de ratones inmunizados se evaluó la capacidad de las pVEs-VFAi de generar una respuesta secundaria estimulando a los linfocitos que previamente habían tenido contacto con el antígeno. En cambio, con los esplenocitos vírgenes se evaluó la capacidad de las pVEs-VFAi de inducir una respuesta inmune y generar una respuesta primaria. Las condiciones experimentales y el plan de inmunización para obtener los esplenocitos sensibilizados *in vivo* se detallan en **Anexo 4** y en el punto 4.16 de materiales y métodos. Una vez establecido el protocolo de inmunización a seguir (inoculación al día 0 y extracción del bazo al día 14 p.v), se procedió a evaluar la capacidad inmunomoduladora de las pVEs-VFAi. Al día 14 p.v se extrajeron los bazos y se realizó la marcación con CFSE. Como primera aproximación se evaluó la linfoproliferación antígeno específica sobre la población de linfocitos totales. El VFAi se utilizó como control positivo de proliferación específica y la estimulación basal se definió a partir del grupo sin estimular (RPMI). Por otro lado, la Con A se utilizó como control de proliferación inespecífica para evaluar el estado funcional de los esplenocitos y comprobar que no existiera un estado de inmunosupresión de base. Para determinar si los efectos observados eran consecuencia de la presencia de las proteínas virales presentes en las pVEs-VFAi y no de la vesícula *per se*, se utilizaron a las pVEs-LPS como control de VEs derivadas de CDs estimuladas que no expresan proteínas virales. Se seleccionaron para este control las pVEs-LPS y no las pVEs-RPMI debido a que las primeras tienen una distribución de marcadores proteicos similares a las pVEs-VFAi (con excepción de la expresión de proteínas/péptidos virales) (**Figura 29**). Como puede observarse en la **Figura 29**, al evaluar la proliferación linfocitaria se observó una diferencia estadísticamente significativa en todos los grupos respecto al control basal de RPMI para los esplenocitos sensibilizados *in vivo* (INMUNE) ($p < 0,001^{***}$ para VFAi; $p < 0,01^{**}$ para VEs-VFAi y $p < 0,05^*$ para VEs-LPS). Esto indica que los esplenocitos sensibilizados *in vivo* puede reconocer a los antígenos presentes en la membrana de las pVEs-VFAi y proliferar en consecuencia. También pueden responder al antígeno vacunal VFAi (el mismo antígeno utilizado para la sensibilización *in vivo*). Esta inducción de la proliferación no se observó al comparar los grupos experimentales en los esplenocitos sin sensibilizar (NAIVE). Indicando que las pVEs-VFAi no inducirían una respuesta inmune en esplenocitos que no tuvieron contacto previo con los antígenos de VFAi, al menos en el tiempo en el que se las evaluó.



→ **Figura 29. Ensayo de linfoproliferación antígeno específica. Proliferación de linfocitos totales estimulados con pVEs-VFAi.** Los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con la vacuna monovalente VFA O1 Campos (INMUNE), se tiñeron con CFSE y se cultivaron durante 5 días a 37°C con pVEs-VFAi y pVES-LPS provenientes de $2,5 \times 10^6$ CDs, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi. Como control negativo se utilizaron esplenocitos no estimulados teñidos con CFSE (RPMI) y como control positivo de estimulación inespecífica esplenocitos estimulados con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. El mismo protocolo se utilizó para los esplenocitos obtenidos de ratones vírgenes (NAIVE). **A)** Se muestran los gráficos de citometría de flujo correspondientes a un experimento representativo de dos experimentos independientes. Las mediciones se realizaron por triplicado. La proliferación se analizó sobre la región de linfocitos totales que se determinó a partir del gráfico *SSC vs FSC*. **B)** Se muestra en un gráfico de barras las medias \pm error estándar del índice de proliferación relativo (IPR) que se definió como la relación entre el % de proliferación del grupo experimental sobre % de la proliferación basal (RPMI). Se realizó un análisis de Kruskal Wallis, y luego comparaciones de a pares utilizando el *test* de comparaciones múltiples de Dunn. En los gráficos solo se indican las diferencias significativas, que se señalan con asteriscos ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$). En color gris se muestran las diferencias significativas para comparaciones dentro del grupo INMUNE. Las barras sólidas representan los ratones vírgenes y las barras cuadrículadas los ratones inmunizados. N=6.

Frente a estos resultados se decidió profundizar el estudio y se analizaron las poblaciones de LT (CD3+) y la de LB (B220+). El análisis se realizó para esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados o de ratones vírgenes. Al analizar los resultados se pudo observar que para el grupo de esplenocitos sensibilizados (INMUNE) hay una proliferación antígeno específica de células B220+ en presencia de pVEs-VFAi (**Figura 30 A** panel derecho). Esta proliferación presentó diferencias significativas al compararla con el control basal de RPMI y con los esplenocitos incubados con pVEs-LPS ($p < 0,001^{***}$ y $p < 0,01^{**}$, respectivamente) (**Figura 30 B**). Si bien las pVEs -VFAi estimularon la proliferación de los LB, esta proliferación fue aproximadamente un 28% menor (IPR medio: 1,93) en comparación con la estimulada por 10 $\mu\text{g/ml}$ del antígeno vacunal VFAi (IPR medio: 2,8) y un 40% menor en comparación con 25 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi (IPR medio: 3,4). En cambio, al realizar el mismo análisis para linfocitos vírgenes (**Figura 30 A** panel izquierdo) se observó que solo la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi induce una proliferación estadísticamente significativa respecto al control basal ($p < 0,01^{**}$, IPR medio: 1,95(**Figura 30 B**). Este resultado indicaría que aquellos LB que previamente no tuvieron contacto con el VFAi necesitan de una mayor masa de antígeno, en comparación con los linfocitos sensibilizados para poder proliferar, al menos en el tiempo evaluado. Al realizar comparaciones por tratamiento para ambos grupos (NAIVE vs INMUNE) se observó una mayor proliferación en el grupo de esplenocitos sensibilizados. Esta proliferación fue mayor tanto para el tratamiento con pVEs-VFAi (pVEs-VFAi NAIVE vs pVEs-VFAi INMUNE $p < 0,05^*$), como para las dos concentraciones de VFAi evaluadas (10 $\mu\text{g/ml}$ VFAi NAIVE vs 10 $\mu\text{g/ml}$ VFAi INMUNE, $p < 0,001^{***}$; 25 $\mu\text{g/ml}$

VFAi NAIVE vs 25µg/ml VFAi INMUNE, $p < 0,001^{***}$). Sin embargo, para el tratamiento correspondiente a pVEs-LPS no se observó estimulación en los linfocitos NAIVE ni en los INMUNE.



→ **Figura 30. Ensayo de linfoproliferación antígeno específica. Proliferación de linfocitos B220+ estimulados con pVEs-VFAi.** Los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con la vacuna monovalente VFA O1 Campos (INMUNE), se tiñeron con CFSE y se cultivaron durante 5 días a 37°C con pVEs-VFAi y pVES-LPS provenientes de $2,5 \times 10^6$ CDs, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi. Como control negativo se utilizaron esplenocitos no estimulados teñidos con CFSE (RPMI) y como control positivo de estimulación inespecífica esplenocitos estimulados con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. El mismo protocolo se utilizó para los esplenocitos obtenidos de ratones vírgenes (NAIVE). **A)** Se muestran los gráficos de citometría correspondientes a un experimento representativo de tres experimentos independientes, las mediciones se realizaron por triplicado. La región de linfocitos se determinó a partir del gráfico *SSC vs FSC*. La proliferación fue analizada tomando la región correspondiente a linfocitos B220+. **B)** Se muestra en un gráfico de barras la media \pm error estándar del índice de proliferación relativo (IPR) que se definió como la relación entre el % de proliferación del grupo experimental sobre el % de la proliferación basal (RPMI). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de un factor, y luego se realizaron comparaciones de a pares utilizando el *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para las comparaciones entre NAIVE vs INMUNE se utilizó ANOVA de dos factores. En los gráficos solo se indican las diferencias significativas, que se señalan con asteriscos ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$; $p < 0,001^{***}$). En color gris se muestran las diferencias significativas para comparaciones dentro del grupo INMUNE, en color negro las diferencias significativas para comparaciones dentro del grupo NAIVE y en color verde las diferencias significativas para comparaciones entre NAIVE vs INMUNE. Las barras sólidas representan los ratones vírgenes y las barras cuadrículadas los ratones inmunizados. N=6

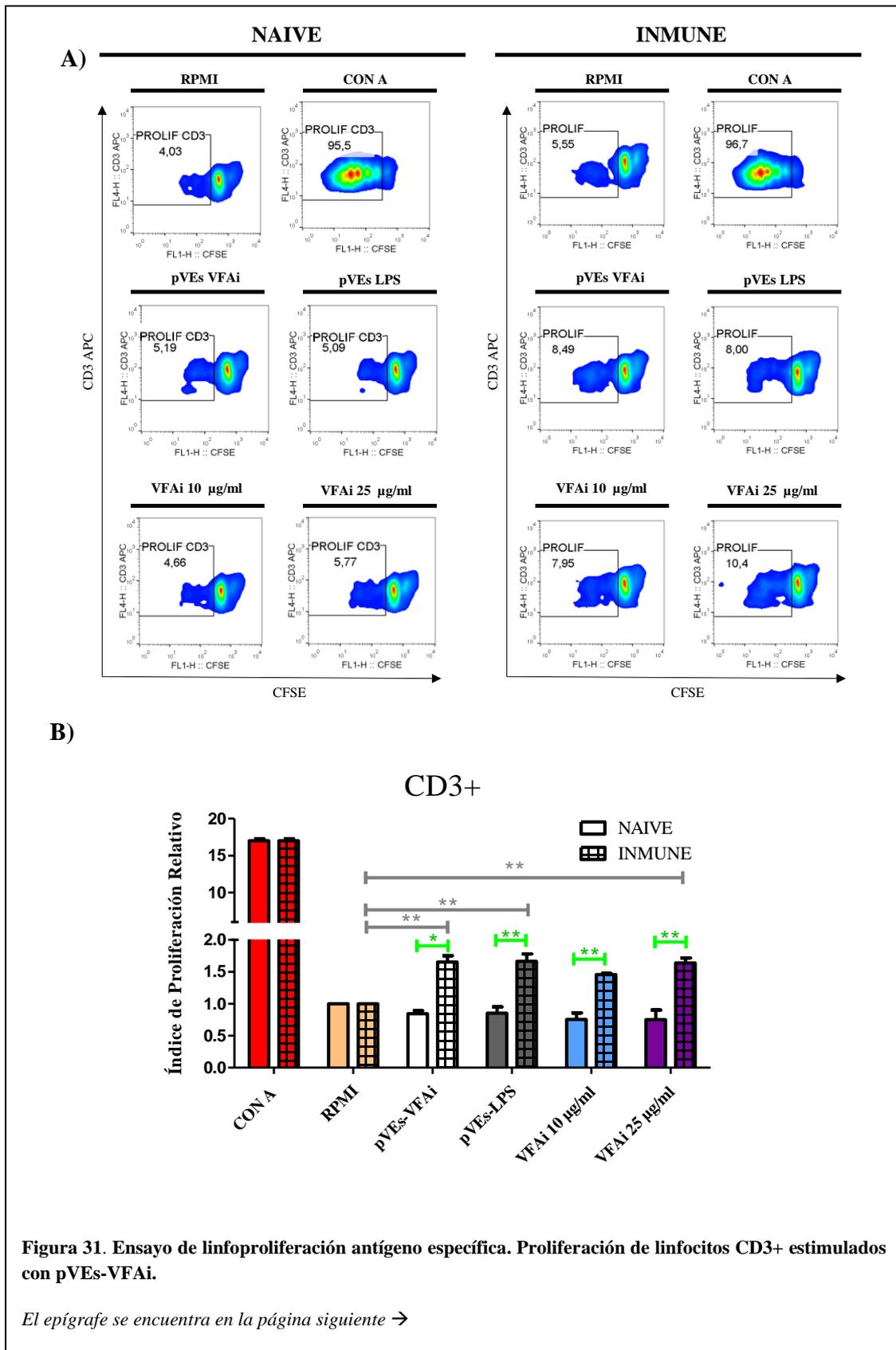
Al analizar la población de LT (**Figura 31**) se observó una estimulación de la proliferación en el grupo de linfocitos sensibilizados e incubados con pVEs-VFAi al compararlo con el basal ($p < 0,01^{**}$; IPR medio:1,65). Sin embargo, una linfoproliferación similar también se observó para las células incubadas con las pVEs-LPS ($p < 0,01^{**}$; IPR medio:1,66). Por lo tanto, no podemos afirmar que la proliferación inducida por las pVEs-VFAi sea antígeno específica. Al comparar el grupo pVEs-VFAi con pVEs-LPS no se encontraron diferencias, y curiosamente, tampoco hubo diferencias al compararlos con el control VFAi. En el grupo de esplenocitos vírgenes (NAIVE) no se observó proliferación en presencia de las pVEs y tampoco en presencia del VFAi, pero si hubo estimulación con Con A ($p < 0,001^{***}$, dato no mostrado) demostrando la capacidad de respuesta de las células. Al realizar comparaciones dentro de un tratamiento para ambos grupos (NAIVE vs INMUNE) se observó, en todos los casos, que tanto las pVEs-VFAi como las pVEs-LPS inducen la proliferación solo de los LT que previamente fueron sensibilizados.

En conclusión, los resultados obtenidos demostraron que las pVEs-VFAi tienen la capacidad de estimular la proliferación específica de los LB (células B220+) sensibilizados *in vivo*. Esta proliferación es de menor magnitud al compararla con el antígeno vacunal VFAi y no ocurre en esplenocitos vírgenes. Las pVEs-VFAi presentan antígenos virales y pueden estimular a los LB de memoria. Esto condice con el hecho de que los anticuerpos anti-VFA presentes en el suero inmune puedan unirse a los antígenos virales y pudieron ser detectados por citometría de flujo. Estos resultados son

RESULTADOS

concordantes con la importancia atribuida a la respuesta inmune humoral y al rol fundamental que cumplen los anticuerpos neutralizantes en la protección contra la FA descrita para el modelo murino. Por otra parte, solo la población de LT que previamente tuvo contacto con el antígeno vacunal se estimuló en presencia de las pVEs-VFAi. Sin embargo, en este caso no pudo demostrarse una activación antígeno específica y no se puede excluir o afirmar que esa activación sea inducida por las moléculas inmunorreguladoras sobre-expresadas en las VEs derivadas de CDs activadas.

Figura 31 en la página siguiente →

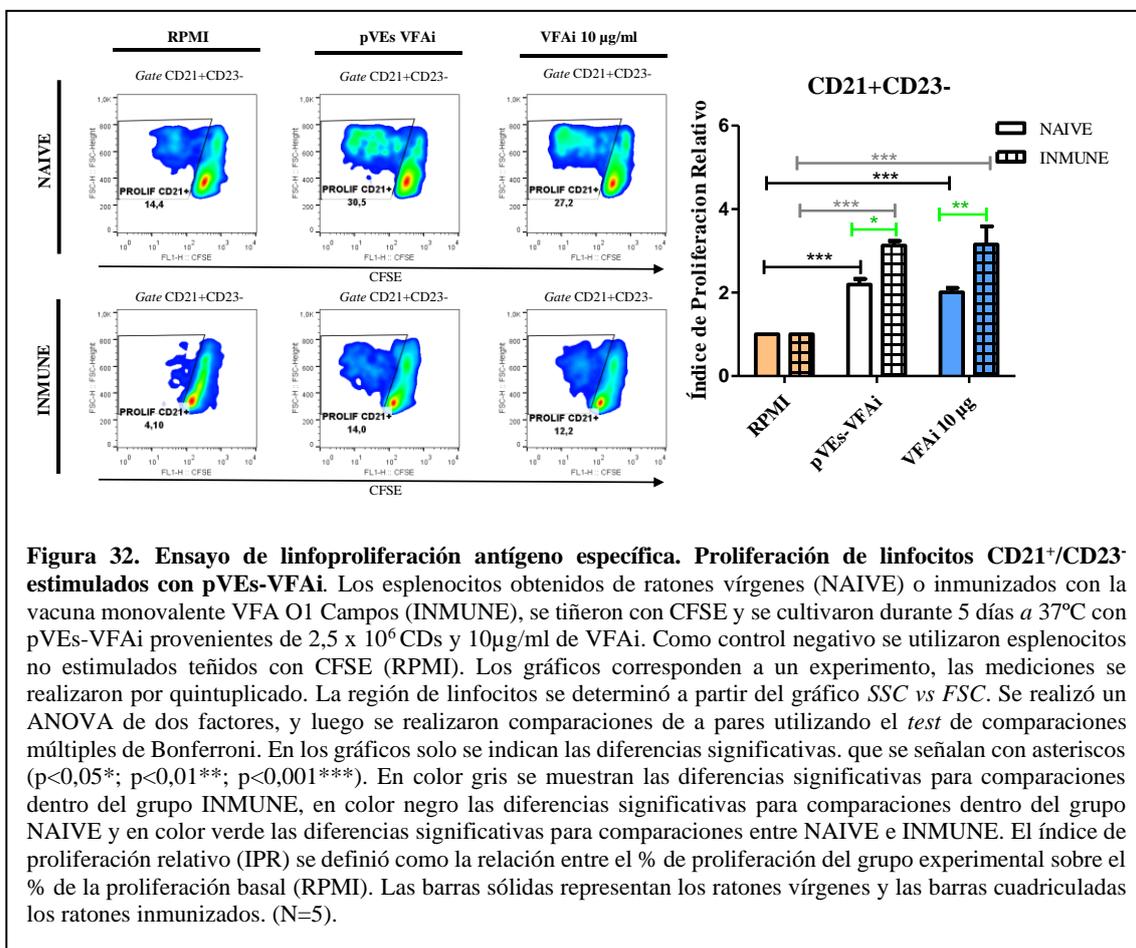


→ **Figura 31. Ensayo de linfoproliferación antígeno específica. Proliferación de linfocitos CD3+ estimulados con pVEs-VFAi.** Los esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados con la vacuna monovalente VFA O1 Campos (INMUNE), se tiñeron con CFSE y se cultivaron durante 5 días a 37°C con pVEs-VFAi y pVES-LPS provenientes de $2,5 \times 10^6$ CDs, 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$ de VFAi. Como control negativo se utilizaron esplenocitos no estimulados teñidos con CFSE (RPMI) y como control positivo de estimulación inespecífica esplenocitos estimulados con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de Con A. El mismo protocolo se utilizó para los esplenocitos obtenidos de ratones vírgenes (NAIVE). A) Se muestran los gráficos de citometría correspondientes a un experimento representativo de tres experimentos independientes, las mediciones se realizaron por triplicado. La región de linfocitos se determinó a partir del gráfico *SSC vs FSC*. La proliferación fue analizada tomando la región correspondiente a linfocitos CD3+. B) Se muestra en un gráfico de barras la media \pm error estándar del índice de proliferación relativo (IPR) que se definió como la relación entre el % de proliferación del grupo experimental sobre el % de la proliferación basal (RPMI). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de un factor, y luego se realizaron comparaciones de a pares utilizando el *test* de comparaciones múltiples de Bonferroni. Para las comparaciones entre NAIVE vs INMUNE se utilizó ANOVA de dos factores. En los gráficos solo se indican las diferencias significativas. que se señalan con asteriscos ($p < 0,05^*$; $p < 0,01^{**}$). En color gris se muestran las diferencias significativas para comparaciones dentro del grupo INMUNE, en color negro las diferencias significativas para comparaciones dentro del grupo NAIVE y en color verde las diferencias significativas para comparaciones entre NAIVE vs INMUNE. Las barras sólidas representan los ratones vírgenes y las barras cuadrículadas los ratones inmunizados. N=6.

5.3.1.2 Linfoproliferación antígeno específica utilizando las VEs derivadas de CDs pulsadas con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos. Análisis sobre las subpoblaciones de células CD21⁺/CD23⁻ y CD21⁺/CD23⁺

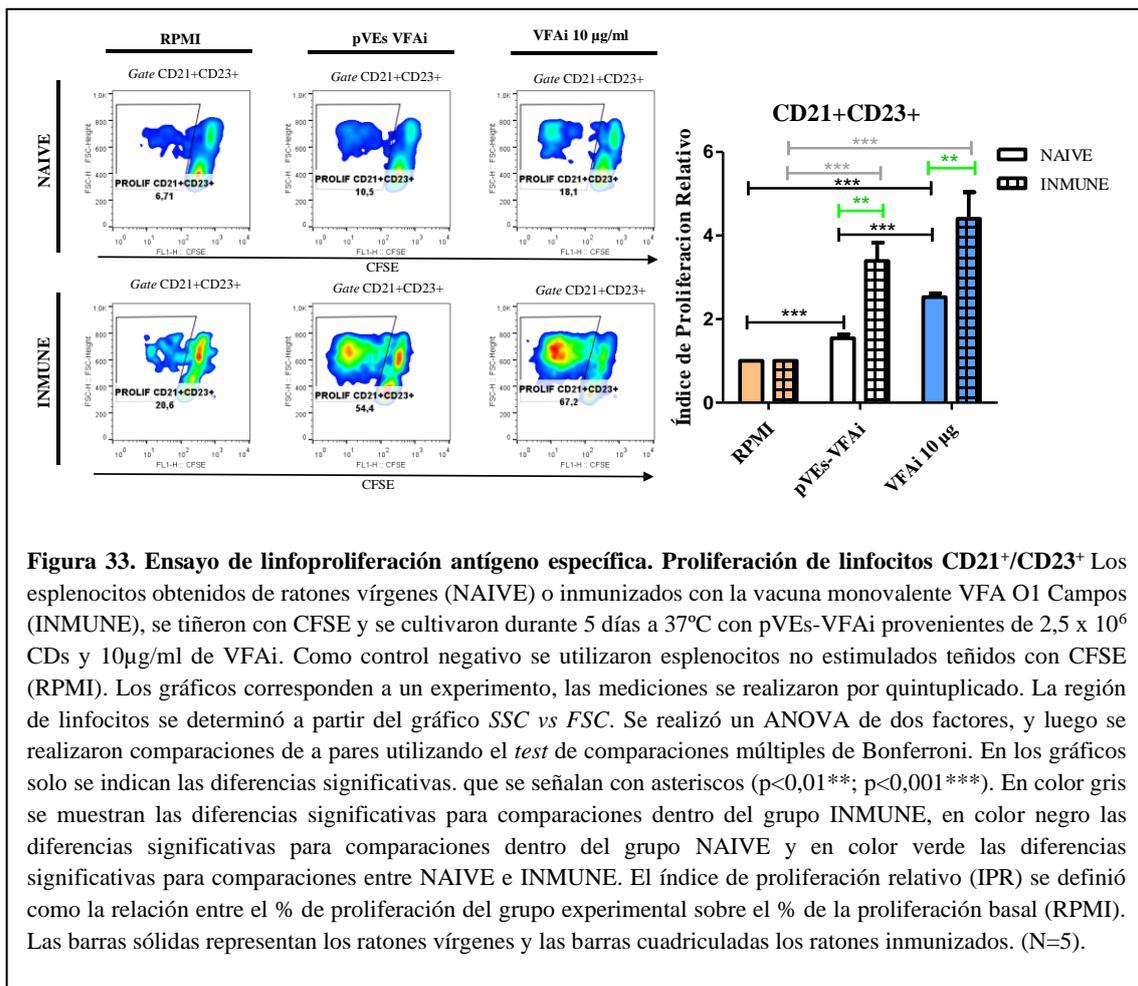
Sabiendo ahora que las pVEs-VFAi pueden inducir la proliferación antígeno específica en los LB y en base a la importancia de la respuesta B en la infección por VFA, resultó interesante enfocar el estudio en la modulación de la respuesta B dada por las pVEs. Continuando con la misma línea de experimentos realizamos otro ensayo de linfoproliferación. En este experimento se efectuó, además, una marcación doble utilizando anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas CD21 y CD23. Estas dos proteínas son utilizadas para diferenciar dos subpoblaciones de LB, los linfocitos BZM o de la zona marginal del bazo que se caracterizan por tener una alta expresión de CD21⁺ y una baja o nula expresión del marcador CD23, y los linfocitos B2 o foliculares (LBf) que expresan tanto CD21 como CD23 (Gorelik et al., 2004). Como estímulo del ensayo se utilizaron las pVEs-VFAi y como control positivo el antígeno vacunal VFAi solo en la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Se decidió realizar los experimentos con esta concentración ya que, en base a los resultados hasta aquí presentados, induce respuestas más similares a las inducidas por las pVEs-VFAi. En la **Figura 32** se detallan los resultados obtenidos de la proliferación antígeno específica de los linfocitos CD21⁺/CD23⁻ utilizando esplenocitos sensibilizados (INMUNE) y esplenocitos vírgenes

(NAIVE). En presencia de pVEs-VFAi y de VFAi se pudo observar un aumento significativo y similar en la proliferación de los linfocitos CD21⁺/CD23⁻, respecto a la proliferación basal ($p < 0,001$ *** tanto para esplenocitos INMUNE como para NAIVE). Al realizar la comparación entre NAIVE e INMUNE (**Figura 32**) también se encontraron diferencias siendo el índice de proliferación siempre mayor en el grupo INMUNE (un 43 % mayor para pVEs-VFAi y 57,5 % mayor para VFAi, respecto al IPR del NAIVE). Esto indicaría que las pVEs-VFAi pueden estimular la proliferación *in vitro* de las células BZM (CD21⁺/CD23⁻) al igual que el VFAi. Esta estimulación es mayor en esplenocitos previamente sensibilizados con el antígeno.



Al analizar la población de células CD21⁺/CD23⁺ dentro del grupo INMUNE se observó también un aumento significativo de la proliferación respecto al basal (pVEs-VFAi $p < 0,001$ *** y VFAi $p < 0,001$ ***). Similar comportamiento se registró al analizar el grupo NAIVE (pVEs-VFAi $p < 0,001$ *** y VFAi $p < 0,001$ ***) (**Figura 33**). Estos resultados demostraron que las pVEs-VFAi tienen un efecto sobre la población de CD21⁺/CD23⁺ en

ambos grupos. Al igual que sucede con la población $CD21^+/CD23^-$ la proliferación es mayor en los linfocitos $CD21^+/CD23^+$ previamente sensibilizados, registrándose aumentos en los IPR del 120% (para pVEs-VFAi) y 74% (para VFAi), respecto a los esplenocitos vírgenes (**Figura 33**). Este mayor aumento en la proliferación de los linfocitos $CD21^+/CD23^+$ respecto de los $CD21^+/CD23^-$ provenientes de los esplenocitos de ratones inmunes se justificaría porque dentro del grupo de los LBF se encuentran los LB de memoria generados *in vivo* por la vacunación.

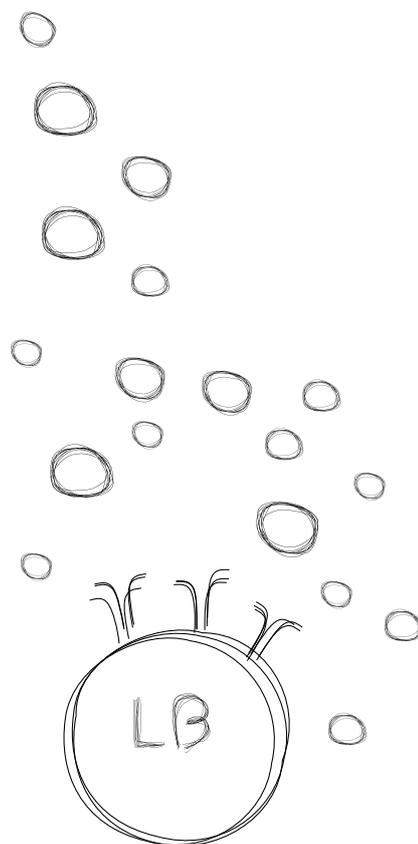


Sorprendentemente, con estos experimentos se demostró que las proteínas/péptidos presentes en las pVEs-VFAi pueden activar tanto a linfocitos $CD21^+/CD23^-$ y $CD21^+/CD23^+$ sensibilizados como a los correspondientes linfocitos vírgenes. Es decir, que las pVEs-VFAi serían la fuente de antígeno para generar una respuesta primaria o para activar una respuesta secundaria antígeno específica. Los análisis más detallados de las poblaciones permitieron encontrar diferencias que no se visualizaron al realizar un

análisis más general. La proliferación específica de las subpoblaciones CD21⁺/CD23⁻ y CD21⁺/CD23⁺ podría explicar la tendencia en aumento observada en la proliferación de los linfocitos totales y en la población de LB en el grupo NAIVE (**Figura 29** y **Figura 30**). Consecuentemente, atribuimos esta tendencia a la proliferación de los LB y no a los LT ya que en estos últimos no se observó ninguna estimulación.

En conclusión, las pVEs derivadas de CDs estimuladas con el antígeno vacunal para la FA tienen un rol activo en la generación de una respuesta específica antiviral en el modelo murino. Las proteínas virales presentes en las pVEs-VFAi son accesibles al receptor BCR y tienen la capacidad de inducir una respuesta inmune primaria y secundaria específica para los LB. Tanto los linfocitos BZM (CD21⁺/CD23⁻) como los LBf (CD21⁺/CD23⁺) participan de esa respuesta específica. En cambio, las pVEs-VFAi solo estimularían a los LT que previamente estuvieron en contacto con el antígeno VFAi. Sin embargo, no podemos afirmar que esa estimulación sea antígeno específico o esté dada por la presencia de moléculas inmunomoduladoras presentes en las pVEs derivadas de CDs activadas. Por otra parte, que las pVEs *per se* tengan un efecto en la activación de los LT sensibilizados, pero no en los LT vírgenes, sugeriría que la exposición previa al antígeno es necesaria para que las pVEs derivadas de CDs activadas puedan estimular a los LT.

Discusión



6 DISCUSIÓN

El sistema inmune es una compleja red de diferentes tipos de células que residen en múltiples órganos, el accionar coordinado de todas las partes es fundamental para un correcto funcionamiento. La comunicación juega un rol protagónico aquí, siendo fundamentales las interacciones célula-célula o los factores solubles. Las VEs se suman a estas vías de comunicación (Veerman, Güçlüler Akpınar, Eldh, & Gabrielsson, 2019), y dependiendo del estado de la célula de origen pueden activar o inhibir una respuesta inmune. Sabíamos que las CDs son las encargadas de orquestar las respuestas inmunes, y que las VEs reflejan el estado de activación y función de la célula de origen. Basándonos en estos conceptos y en estudios previos en los cuales se demostró que el VFA modula de diferente manera a las CDs murinas, dependiendo de si está en su forma infectiva o inactivada (Ostrowski et al., 2007; 2005) fue que decidimos estudiar la participación de las VEs secretadas por estas CPA en la respuesta inmune antiviral. En este trabajo de tesis se hizo hincapié en aquellas VEs que derivan de CDs pulsadas con el VFA inactivado por BEI, que es el antígeno presente en la vacuna comercial. Este estudio se enmarca en el objetivo general que consiste en estudiar cuáles son los mecanismos inmunológicos que determinan que la respuesta inducida luego de la infección con el VFA presente una mayor rapidez, eficiencia y duración que la respuesta generada luego de la vacunación con el virus inactivado.

Para comenzar con nuestro estudio, el primer paso fue la obtención de las CPA profesionales a partir de precursores de médula ósea murina. Esta metodología, si bien es ampliamente utilizada para el estudio *in vitro*, cuenta con un punto débil y es que se obtiene una población que no es 100% de un fenotipo. Por ello fue muy importante la caracterización de las células y la adecuada puesta a punto de la diferenciación. Al cabo de 8 días de diferenciación obtuvimos una población de CPA que expresan el marcador murino característico CD11c, y también las moléculas del CMH-II, CD86, CD11b y F4/8. Estas CPA obtenidas poseen un fenotipo similar al de las CDs convencionales/inflamatorias (Merad, Sathe, Helft, Miller, & Mortha, 2013). Este fenotipo nos resultó óptimo para nuestro objetivo ya que su función principal es la captación, procesamiento y presentación de antígenos. A pesar de que la mayoría de las CPAs coinciden con el fenotipo de CDs convencionales/inflamatorias decidimos referirnos a ellas como CDs en general sabiendo, como se mencionó anteriormente, que con el protocolo utilizado de diferenciación se obtiene una población heterogénea en la

que si bien existe un fenotipo predominante también pueden diferenciarse en simultáneo otros fenotipos de CDs que están en menor proporción.

Para este estudio se utilizó el VFA de la Cepa O1 Campos inactivado, que es uno de los antígenos presentes en la vacuna comercial para FA. Este fue cedido gentilmente por el laboratorio Biogénesis Bagó, quien realizó los controles de integridad del antígeno luego de la inactivación. La presencia de restos de componentes utilizados en la inactivación (por ejemplo: BEI) pueden afectar a los cultivos celulares, por esta razón es conveniente realizar una purificación previa a su utilización en experimentos que incluyan el cultivo celular. En este trabajo de tesis la purificación se realizó mediante un gradiente de sacarosa continuo para separar las partículas degradadas, el ARN libre y también agregados proteicos y restos de BEI que podían existir (Barteling & Meloen, 1974). De esta manera, en todos los ensayos solo se utilizaron partículas 140S intactas e inactivadas, que poseen la misma conformación que el VFA, pero sin la capacidad infectiva. Esta integridad es importante para que el antígeno pueda generar una respuesta inmune lo más similar posible a la que ocurre en la infección.

Una vez purificado el antígeno de interés, el siguiente paso para la obtención de las VEs fue la puesta a punto del cargado de las CDs con el VFAi. Para poder evaluar nuestra hipótesis un paso necesario era que las CDs pudieran interactuar con el antígeno vacunal VFAi. Si bien ya existen trabajos en los que se utiliza el VFA inactivado para pulsar CDs en la modelo murino, la mayoría están realizados con el VFA inactivado por UV y muy pocos antecedentes se encontraron que describan la interacción de la CDs con el VFA inactivado por BEI (C. Langellotti et al., 2012). De hecho, solo se encontró un trabajo que realiza una primera aproximación a la interacción antígeno vacunal y CDs murinas *in vitro*, aunque se centra más en el estudio del VFA infectivo y la CDs (Cecilia Langellotti et al., 2015). En este trabajo de tesis logramos demostrar por microscopia confocal y citometría de flujo que las CDs diferenciadas a partir de precursores de médula ósea pueden interactuar con el antígeno vacunal purificado VFAi y pueden internalizarlo. Siendo este un paso necesario para su posterior procesamiento y presentación. Cómo ocurre la interacción entre el VFA y la CDs murinas no está completamente descrito en la bibliografía. Tampoco la interacción con el VFAi. Sin embargo, basándonos en los antecedentes descritos para el virus infeccioso podríamos inferir algunas de las posibles vías de entrada. Teniendo en cuenta que las CDs se encuentran constantemente censando su entorno, la entrada del VFA a estas células podría

ocurrir por un proceso de captación no selectiva como la macropinocitosis (Han et al., 2016; K. Li et al., 2021). Proceso que es llevado a cabo constantemente por las CPAs profesionales para detectar antígenos solubles en su microambiente. También, el VFAi podría ingresar a las CDs por un proceso más selectivo, como lo hace el virus infeccioso, por ejemplo; podría ingresar a través de integrinas que reconozcan el *loop* RGD de la cápside (Terry Jackson et al., 2000, 2002, 2004). Las CDs murinas expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ por lo que esta vía de ingreso sería factible. En este sentido, también podría respaldarse esta vía de ingreso con algunos resultados preliminares del Dr. Ostrowski en los cuales se demuestra que la pre-incubación de las CDs con un péptido que contiene el motivo RGD de la proteína VP1 inhibe parcialmente la captura del VFA (Ostrowski et al., 2005). Esta hipótesis de ingreso a través de integrinas también está avalada por los descubrimientos del grupo del Dr. Sobrino que demuestran que el VFA inactivado por BEI puede internalizarse eficientemente en cultivos de células BHK de manera dependiente de integrinas, manteniendo las características descritas para la internalización del virus infeccioso (Martín-Acebes et al., 2011). Este trabajo confirma, además, que el tratamiento con BEI produce partículas virales inactivadas que reproducen la adhesión y la internalización del VFA infeccioso. Teniendo en cuenta este último punto, podríamos considerar también como vía de ingreso otras vías descritas (independientes de integrina) en la infección. Entonces, además de su ingreso por integrinas, también podría entrar a través de mecanismos independientes de RGD como el de la adhesión al heparán sulfato (T Jackson et al., 1996) (Sobrino & Domingo, 2004) o por receptores RFc, vía que utiliza el VFA infeccioso para ingresar a CPAs en hospedadores naturales. Si bien en este trabajo no podemos afirmar cuál de estas vías es la de ingreso del VFAi si podemos sostener que la internalización ocurre a pesar de la inactivación de la partícula viral.

Está demostrado que el VFAi es capaz de despertar una respuesta inmune efectiva y proteger de la infección, pero sin establecer una inmunidad sostenida en el tiempo. Esta respuesta inmune es indicio de un reconocimiento específico del VFAi por parte del sistema inmune. En este trabajo se logró demostrar que el VFAi además de ser internalizado por las CDs induce su activación. Esto se ve reflejado en la variación de la expresión de los marcadores de maduración como el CMH-II y la molécula CD86. Si bien el virus inactivado mantiene la conformación intacta, el reconocimiento por parte del sistema inmune puede variar en comparación con el VFA infeccioso, debido a que los

intermediarios de replicación no están presentes en el VFAi. Un trabajo publicado en el año 2020 y realizado en macrófagos, establece al TLR2 como uno de los principales receptores implicados en el reconocimiento del VFAi vacunal. Otros receptores como el TLR1 y TLR6 también participarían potenciando los efectos sobre TLR2 al formar los heterodímeros TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 (Y. Te Lin et al., 2020). Teniendo en cuenta que los macrófagos tienen una expresión de TLR similar a la de las CDs podríamos considerar al TLR2 y a los heterodímeros TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6 como posibles receptores de reconocimiento del VFAi en las CDs. La unión del VFAi a estos receptores desencadenaría la activación y maduración de la CDs. Cabe destacar que, aunque no es el objetivo de este trabajo determinar qué receptores participan en la génesis de la respuesta inmune generada por el VFAi, esta interesante cuestión merece ser evaluada en futuros estudios.

Habiendo determinado que las CDs reconocen el VFAi y se activan, el siguiente paso fue aislar las VEs derivadas de las mismas. Sobre la base de la extensa bibliografía referida al transporte de antígenos y a la regulación del sistema inmune mediada por las pVEs y en especial por los exosomas se enfocó el estudio en esta subpoblación de VEs. Siguiendo el protocolo clásico de centrifugaciones, ultrafiltración y ultracentrifugación para la obtención de pVEs, se obtuvieron las VEs a partir de sobrenadante de cultivo de las CDs pulsadas con el VFAi. El estudio de las VEs conlleva un gran desafío y esto se debe en parte a la gran heterogeneidad que existe en la población aislada. Por esta razón, una caracterización completa es de gran importancia, ya que permite detallar a la población con la cual cada investigador trabaja y que dependerá del sistema biológico que utilice.

Actualmente no existe un consenso sobre marcadores proteicos específicos para cada subpoblación y es por esta razón es difícil clasificar a las VEs basándose solo en la expresión de proteínas. Se deben tener en cuenta también otros aspectos como su tamaño o morfología. Todos los lineamientos para la caracterización de las VEs fueron definidos por la ISEV y se detallaron en una guía de procedimientos mínimos para el estudio de VEs que se publicó en el año 2018 (Théry, Witwer, Aikawa, Alcaraz, Zuba-Surma, et al., 2018). Siguiendo estas recomendaciones, comenzamos la caracterización midiendo uno de los marcadores más comunes de VEs, las tetraspaninas CD9, CD81, y CD63. La expresión de estas proteínas variará según cada sistema y muchas veces las VEs provenientes de un tipo celular pueden estar más enriquecidas en un tipo de tetraspaninas que las VEs provenientes de otro. Las VEs obtenidas del medio condicionado de las CDs

estimuladas con VFAi (pVEs-VFA), activadas con LPS (pVEs-LPS) o del medio condicionado de CDs sin estimular (pVEs-RPMI) se caracterizaron por estar más enriquecidas en la proteína CD9, en menor medida CD81 y una baja proporción expresa CD63. Siguiendo las indicaciones de la ISEV continuamos la caracterización por microscopía electrónica. Pudimos observar que las VEs presentaron la forma típica de copa o balón pinchado. Esta forma fue considerada durante años una manera de corroborar que las nanovesículas observadas eran exosomas. Hoy se conoce que esta apariencia morfológica es un artefacto de la técnica de fijación que provoca el colapso de las estructuras subcelulares por deshidratación (Colombo et al., 2014). Si bien actualmente existen metodologías como la criomicroscopía electrónica que evitan el colapso de las membranas, la microscopía electrónica tradicional sigue siendo una manera válida de caracterizar a las vesículas en primera instancia. Por esta técnica también se pudo observar la distribución de tamaños dentro de las muestras, visualizándose vesículas de variados tamaños todos correspondientes a un rango de 100 a 200 nm. Esto se confirmó realizando las mediciones por la técnica de NTA. Así, se determinó que todos los grupos de VEs obtenidas poseían un tamaño promedio de 160 nm, indicando que las VEs aisladas pertenecían a la población de VEs de menor rango de tamaño. La obtención de VEs de este tamaño concuerda con el método de obtención elegido basado en la ultrafiltración seguido de ultracentrifugación, protocolo diseñado para obtener VEs enriquecidas en exosomas o en pVEs. A pesar de que las vesículas aisladas con nuestro protocolo podrían categorizarse como exosomas según el tamaño, no podemos afirmarlo con certeza ya que actualmente no hay un marcador aprobado por la ISEV que asegure su origen endosómico. Pero, sí podemos clasificarlas utilizando los criterios aprobados por la ISEV y que consta en la clasificación basada en un parámetro. En nuestro caso decidimos realizar la clasificación basándonos en una característica física, el tamaño. Según la ISEV se clasifican en dos grupos: las pVEs que poseen un tamaño <200 nm y las VEs medianas/grandes (m/gVEs) con un tamaño >200 nm (Théry, Witwer, Aikawa, Alcaraz, Zuba-Surma, et al., 2018). Siguiendo este criterio pudimos definir a la población de VEs obtenidas en este trabajo como pVEs con una alta expresión de la tetraspanina CD9, una expresión media de CD81 y una baja expresión CD63.

Se sabe que gran parte de las proteínas que están presentes en las VEs coinciden con las proteínas expresadas en la célula que les dio origen. En el caso de las CDs la proteína de membrana CMH-II o moléculas coestimuladoras suelen ser muy utilizadas para

caracterizar a las VEs que secretan. En este trabajo se pudo determinar por citometría de flujo la presencia de la molécula CMH-II y la proteína coestimuladora CD86 en las VEs, esto permitió confirmar el origen a partir de CDs (Segura et al., 2005; Admyre et al., 2006). Debido a que la molécula CD11c está muy expresada en la población de CDs utilizada se decidió incluirla en la caracterización de las pVEs. Para nuestra sorpresa esta proteína a pesar de estar presente en abundancia en las CDs no se pudo detectar en las poblaciones de pVEs estudiadas. Sin embargo, de la extensa bibliografía consultada referida a las VEs derivadas de CDs, solo escasos trabajos reportan la expresión de CD11c en ellas y su presencia se evidencia cuando se emplean metodologías de aislamiento particulares (Bucio-López et al., 2018).

Es sabido que las CDs durante el proceso de maduración además de variar la expresión de marcadores como el CMH-II y CD86, también incorporan proteínas que provienen de patógenos o microorganismos que luego serán procesadas para ser presentadas. Como las VEs obtenidas derivan de CDs activadas por el VFAi, resultó interesante ver si se hallaban proteínas virales en las VEs. Confirmando nuestra hipótesis, se detectaron proteínas/péptidos de VFA en el grupo de pVEs-VFAi. Estas proteínas/péptidos virales podrían estar o bien unidos al CMH o también asociados por fuera o incluidos en la membrana de las VEs. Si bien no realizamos experimentos que nos permitan ver la ubicación de estas proteínas, podemos inferir que se encuentren presentes en la membrana ya que pueden interactuar con anticuerpos específicos para VFA.

Como se mencionó anteriormente, las CDs secretan en su entorno diferentes tipos de VEs con orígenes intracelulares diferentes y, por lo tanto, con propiedades estructurales y bioquímicas distintas (Kowal, 2019). Las CDs cambian según el microambiente y los estímulos, estos cambios pueden verse reflejados en la cantidad y en la naturaleza de las VEs secretadas (Yáñez-Mó et al., 2015). En este trabajo se estudiaron las pVEs de CDs que recibieron distintos tratamientos: incubación con VFAi, activación con LPS, o cultivadas solo con RPMI. En consecuencia, las VEs podrían diferir en su composición. Sin embargo, a partir de la caracterización pudimos corroborar que tanto las pVEs-VFAi, pVEs-RPMI como las pVEs-LPS son similares en tamaño, forma y en la expresión de los distintos marcadores, siendo la presencia de proteínas/péptidos de VFA en el grupo VEs-VFAi la principal diferencia encontrada entre los grupos. Algo interesante para resaltar es la diferente expresión de la molécula coestimuladora CD86 entre las distintas VEs. Solo se la detectó en las pVEs-VFAi y en las pVEs-LPS, pero no en las pVEs-RPMI. La

presencia de esta molécula en las pVEs parece respetar el mismo perfil que en las CDs de la que derivan. Las CDs sin estimular (RPMI) expresan niveles bajos de CD86 mientras que las CDs incubadas con VFAi o activadas con LPS presentan niveles aumentados. Este mismo perfil se refleja en las VEs que secretan. Los resultados obtenidos fortalecen el concepto de que las VEs reflejan muchas veces el estado de activación de la célula de origen.

Si bien pudimos demostrar que las pVEs obtenidas expresaban proteínas/péptidos virales, uno de los inconvenientes que surgió en el comienzo fue que con el protocolo de obtención de pVEs a partir del sobrenadante de 36 h de cultivo de las CDs (cocultivadas con el VFAi), se obtenía un porcentaje de pVEs que no expresaba proteínas virales. El protocolo utilizado para aislar las pVEs, se diseñó en base a nuestra experiencia previa en la obtención de pVEs de células tumorales (Menay et al., 2017; Cocozza et al., 2019). Con este protocolo, solo un porcentaje cercano al 50% presentaba proteínas/péptidos virales que se detectaban por citometría de flujo. Esta heterogeneidad resultaría en un inconveniente a la hora de querer realizar los ensayos funcionales, ya que una parte importante de las pVE expresarían el antígeno y otra parte no. Esto podría dificultar la interpretación de los resultados. Fue así como surgió la necesidad de idear una estrategia para obtener una población pVEs enriquecidas en aquellas que expresaran antígenos virales (pVEs-VFAi). Para superar este inconveniente se estudió la cinética del proceso de secreción. La liberación de VEs es un proceso dinámico y depende de múltiples factores. Al purificar VEs se debe tener en cuenta que solo se capta el proceso en un momento determinado, es decir las vesículas secretadas por esas células, en esas condiciones y en ese tiempo dado. La composición de la población de VEs purificadas va a depender del equilibrio entre las VEs que secretó la célula y las VEs que se reincorporaron en las células receptoras (Colombo et al., 2014). Además de este equilibrio, también se debe tener en cuenta los cambios a los que se enfrenta la célula de origen, que puedan afectar la cantidad y fenotipo de las VEs secretadas. En este trabajo, al utilizar un cultivo de CDs, las pVEs que se obtienen pueden variar dependiendo del estado de activación de la célula. Teniendo en cuenta esto, se planteó la posibilidad de que el tiempo elegido de obtención de las pVEs no era el apropiado para aislar el total de pVEs-VFAi que expresaban las proteínas virales. Principalmente, si se tiene en cuenta que esos antígenos virales no están presentes en las CDs constitutivamente, sino que la permanencia del antígeno en las CDs tiene un tiempo de vida media que dependerá de la

velocidad de degradación, del reciclaje de proteínas de la célula, la disponibilidad de antígeno en el medio externo, entre otros factores. Al realizar el experimento de cinética de secreción y pulsado pudimos demostrar que efectivamente la CDs no secreta constantemente pVEs-VFAi, sino que esa secreción era acotada en el tiempo. Las CDs secretaron pVEs con proteínas virales las primeras 24 h luego del pulsado y posteriormente continuaron secretando pVEs con las mismas características en cuanto a los marcadores de VEs (CD9 y CD81) y moléculas inmunocompetentes (CMH-II) pero no expresaron proteínas virales. Estas últimas pVEs, podrían ser las responsables de generar un efecto de dilución (no para los marcadores comunes de pVEs, pero si para las proteínas virales) cuando se obtienen VEs en periodos de tiempo posteriores a las 24 h.

La presencia de antígenos de VFA y la co-expresión de las moléculas CMH-II y CD86 en las pVEs-VFAi las coloca como potenciales activadores de una respuesta inmune. Por esta razón, una de las preguntas que surgieron fue si estas pVEs podrían desencadenar o potenciar una respuesta inmune antiviral específica. Por medio de ensayos de linfoproliferación específica se logró demostrar que las pVEs-VFAi tienen un rol activo en la generación de la respuesta contra VFA. Las proteínas virales presentes en las pVEs-VFAi pueden activar la proliferación de los linfocitos *in vitro*. La notable proliferación observada en la población de LB, más específicamente de los linfocitos BZM y LBf, demostró que las proteínas virales asociadas a las pVEs estaban accesibles al BCR. A pesar de su capacidad para activar una respuesta B, las pVEs-VFAi solo pudieron activar a LT que previamente habían tenido un contacto con el antígeno. Todos estos resultados demuestran que las pVEs derivadas de CDs cumplen un rol en la activación de LB y podrían ser muy importantes en la generación de la respuesta humoral.

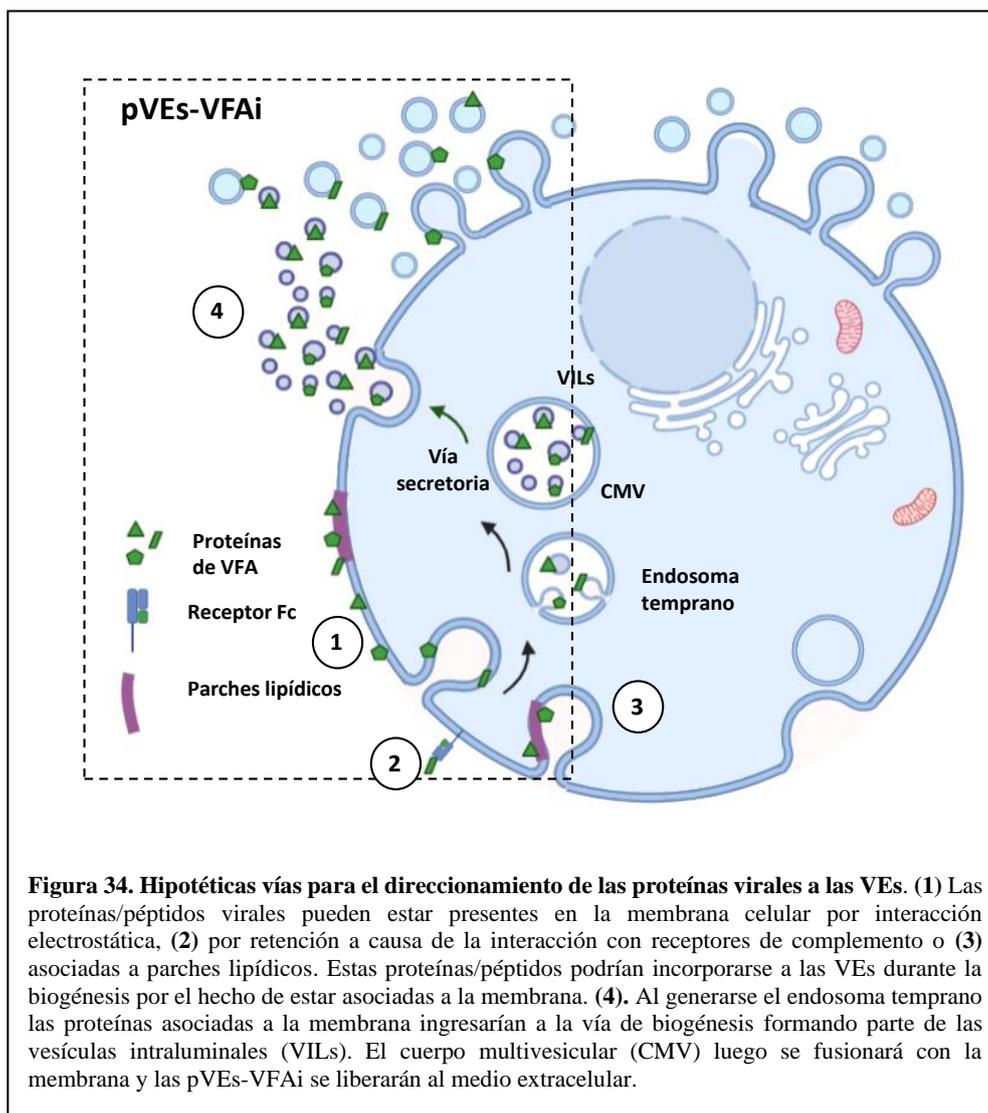
La capacidad de las pVEs-VFAi para estimular la proliferación de LB y el hecho de que los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados con la vacuna comercial para la FA puedan reconocer a las pVEs-VFAi, son evidencias que nos permitieron afirmar la presencia de antígenos de VFA en la membrana de las pVEs. Estos podrían estar no procesados o parcialmente procesados. Este último punto es importante si tenemos en cuenta que los epitopes reconocidos por los LB suelen ser discontinuos (conformacionales) y muchos de los sitios antigénicos de VFA son conformacionales, por ejemplo, uno de los sitios antigénicos conformacionales más importantes es el *loop* G-H de la proteína VP1 (Sobrino & Domingo, 2004). Nuestros resultados se respaldan en el

trabajo de diversos autores que ya reportaron la presencia de proteínas intactas o semiprocadas en la membrana de pVEs derivadas de CDs y su capacidad de activar a los LB (Colino & Snapper, 2006; Qazi et al., 2009; Näslund, Gehrmann, Qazi, et al., 2013). El grupo del Dr. Colino fue el primero en demostrar que CDs pulsadas *in vitro* con la toxina diftérica intacta producían exosomas que podían inducir respuestas humorales primarias y secundarias específicas *in vivo* en ausencia de antígeno libre (Colino & Snapper, 2006). Por otra parte, el grupo de la Dra. Gabrielsson demostró que solo los exosomas derivados de CDs que habían sido pulsadas con la proteína OVA intacta podían estimular a los LB. Por el contrario, que aquellos exosomas que derivaban de CDs pulsadas con pequeños péptidos de OVA dirigidos al CMH no lo hacían (Qazi et al., 2009; Näslund, Gehrmann, Qazi, et al., 2013). Nuestros resultados y estos reportes previos indican que existe un direccionamiento del antígeno intacto hacia la membrana de los exosomas o pVEs en las CDs (Wahlund et al., 2017). Sin embargo, una pregunta que surge es ¿cómo aparecen esas proteínas/péptidos intactos o semiprocados en las VEs?

Si bien las CDs se caracterizan por endocitar y procesar antígenos, no todo lo que se incorpora es degradado. Las CDs pueden adquirir y retener antígenos en su forma intacta durante un tiempo considerable (Wykes et al., 1998). Parte del antígeno puede quedar retenido en compartimentos que no van a degradación y luego reciclarse en la superficie celular (Bergtold et al., 2005). La presencia de proteínas intactas en la membrana de la CD también puede explicarse por interacciones electrostáticas o por la retención a causa de receptores de complemento (Qi et al., 2006). Lo mencionado hasta aquí explica la presencia de antígenos intactos en la membrana de las CDs, pero ¿cómo llegarían esas proteínas a las VEs? Al estar presente en la membrana celular, puede ocurrir que durante la biogénesis de las VEs las proteínas virales se incorporen a las VEs simplemente por el hecho de estar asociadas a la membrana. Al generarse el endosoma temprano por invaginación, estas proteínas ingresan al circuito de biogénesis y de esta manera al formarse el CMV quedarían formando parte de las VILs (**Figura 34**). También puede ser que formen parte del grupo de proteínas acopladas a parches lipídicos y que por esta razón sean direccionados a las VEs (**Figura 34**).

Contemporáneamente, con la demostración de la expresión de proteínas de VFA en las pVEs-VFAi, descrita en esta tesis, el laboratorio estatal de Biología Etiológica Veterinaria del Centro Nacional de referencia para la investigación del VFA de China, demostró, utilizando el VFA infeccioso, que todas las proteínas del VFA (excepto las

proteínas L, 2A y 3B) estaban empaquetadas en exosomas purificados a partir del sobrenadante de células PHK-15 infectadas. Dentro de las vesículas también se encontró el ARN genómico completo del virus. En correspondencia con estos hallazgos se demostró que esos exosomas cumplían un rol activo en la infección ayudando a la propagación del VFA y protegiendo a las partículas virales de los anticuerpos neutralizantes (K. Zhang et al., 2019).



Basándonos en nuestros resultados, sugerimos que, el antígeno vacunal VFAi reproduciría la adhesión e internalización del VFA infeccioso en la CDs y también el direccionamiento de sus proteínas hacia las pVEs. La presencia de proteínas virales en las pVEs también podría explicarse si hacemos foco en los puntos en común que existen entre la biogénesis de las VEs y la liberación de partículas virales luego del ciclo de

replicación. Estas vías se pueden conectar y muchos virus pueden “secuestrar” la maquinaria de biogénesis de VEs y utilizarla para la propagación o ensamblado de partículas (Gould et al., 2003 ; Fleming et al., 2014; Urbanelli et al., 2019). Si bien en nuestro sistema experimental el ciclo de replicación viral no juega un rol debido a la inactivación por BEI, el direccionamiento de las proteínas virales a las VEs podría mantenerse. Las pVEs-VFAi obtenidas serían similares a las secretadas durante la infección que también presentan proteínas virales, pero carecerían del ARN viral infectivo, y por lo tanto no podrían participar en la propagación viral. Por el contrario, nuestros resultados indican que podrían tener un rol activador de la respuesta inmune *in vivo* ya que *in vitro* se demostró que tienen la capacidad de estimular la proliferación específica de LB.

Como se mencionó anteriormente, en los ensayos funcionales se demostró que las pVEs-VFAi tienen un rol como plataforma de antígenos nativos o semiprocados sobre la cual se pueden reconocer proteínas virales. La magnitud con la que las pVEs-VFAi activaron a los LB resultó interesante. Al buscar en la bibliografía se puede encontrar una gran cantidad de publicaciones que detallan la participación de VEs derivadas de CDs en la presentación antigénica a LT. Pero poco se encontró respecto al rol que cumplen en la activación de los LB y en la generación de una respuesta humoral. Considerando que la respuesta de anticuerpos juega un rol esencial en la protección contra la infección por VFA resultó interesante evaluar el efecto de las pVEs-VFAi sobre las subpoblaciones de LB. Principalmente centramos el estudio en los linfocitos BZM (CD21⁺/CD23⁻) y los linfocitos foliculares (CD21⁺/CD23⁺) que están implicados en la respuesta a VFA. Brevemente, los linfocitos BZM son denominados linfocitos B de tipo innato ya que, si bien poseen la especificidad de la inmunidad adaptativa, presentan la cinética y los requerimientos de activación típicos del sistema innato (Grasseau et al., 2020; Kearney, 2005; Romero-Ramírez et al., 2019; Weill & Reynaud, 2020). Además de secretar rápidamente anticuerpos sin colaboración T, los linfocitos BZM cumplen un rol importante en el centro germinal al transportar antígenos desde la sangre hasta la CDF en el bazo. (Cerutti et al., 2013) (Cinamon et al., 2008). Por otra parte, los LBf que constituyen la mayoría de los LB maduros, son responsables de las respuestas contra antígenos proteicos T dependientes. Son los linfocitos que luego van a participar en la producción de anticuerpos de alta afinidad y en la generación de los LB de memoria. Estos dos subtipos de LB cumplen roles fundamentales en la respuesta inmune contra

VFA. Los linfocitos BZM son los encargados de generar los primeros anticuerpos neutralizantes y los LBf son los que originarán los anticuerpos que han sufrido el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad. También generarán las células plasmáticas de larga vida y los LB de memoria que protegerán de reinfecciones (Murphy & Weaver, 2017). El análisis de la activación de las subpoblaciones de LBf y BZM por las pVEs-VFAi, demostró que éstas pueden inducir la proliferación de ambas subpoblaciones. Esta proliferación, fue siempre mayor en aquellas poblaciones que previamente tuvieron un contacto con el antígeno vacunal *in vivo* consecuencia de la inoculación de la vacuna monovalente. Este resultado es lógico si tenemos en cuenta que en el bazo de un animal sensibilizado ya se montó *in vivo* una respuesta B (T dependiente) luego de una primera exposición al antígeno VFAi vacunal. Después de la inoculación del antígeno, los linfocitos vírgenes se diferenciaron en células efectoras. Como consecuencia del reconocimiento específico del antígeno se formó el centro germinal, ocurrió la expansión celular, la hipermutación somática, la selección de linfocitos específicos con mayor afinidad para el antígeno y se diferenciaron linfocitos de memoria. Estos últimos serían los responsables, mayoritariamente, de la proliferación observada en los esplenocitos sensibilizados por la estimulación con las pVEs-VFAi *ex vivo*. Al tratarse de linfocitos de memoria la respuesta al estímulo de las pVes-VFAi es mas rápida y robusta (R. Ahmed & Gray, 1996 ; Tangye et al., 2003; Moens et al., 2016; Cancro & Tomayko, 2021). Esta respuesta contrasta con la de los LB *naïve*, (McHeyzer-Williams et al., 2000) que es más lenta, de menor magnitud y afinidad. A partir de estos hallazgos originales y muy interesantes, consideramos relevante, en un futuro, completar la caracterización fenotípica y funcional de ambas subpoblaciones de LB, para contribuir a dilucidar el rol potencial de las VEs en la respuesta inmune de LB frente a la vacunación para el VFA.

Como se mencionó anteriormente, al derivar de CDs las pVEs-VFAi expresan moléculas del CMH-II y las demás moléculas coestimuladoras. Estas características las colocan como potenciales activadores de los LT. Teniendo en cuenta esto, evaluamos el rol de las pVEs-VFAi en la proliferación de LT. Al analizar nuestros resultados pudimos observar que tanto las pVEs-VFAi como las pVEs-LPS pudieron inducir la proliferación de LT sensibilizados, pero no la de linfocitos vírgenes. Esta proliferación fue de magnitud similar y por esta razón no se pudo atribuir especificidad a la estimulación de las pVEs-VFAi. Estos resultados sugerirían que las pVEs tienen un efecto activador *per se* sobre los LT, independientemente de la presencia de las proteínas virales. La activación por las

pVEs-LPS nos intrigó en principio, pero luego buscando en la bibliografía y sabiendo la potencia del LPS como activador del sistema inmune, formulamos algunas hipótesis que permitan explicar este resultado. La proliferación inducida por las pVEs-LPS podría atribuirse a la gran cantidad de moléculas coestimuladoras presentes en la membrana de estas pVEs, moléculas como CD80/CD86, CD40, moléculas de adhesión y señales pro-inflamatorias como citoquinas (A. Aiello et al., 2020; Barnes & Somerville, 2020; Fitzgerald et al., 2018). Está descrito que las VEs derivadas de CDs activadas tienen una función estimuladora del sistema inmune a diferencia de las derivadas de células inmaduras. Esta diferencia radica en gran parte en el tenor de moléculas coestimuladoras expresadas en estas VEs (Kowal, 2019), que podrían actuar como adyuvante molecular.

Si bien la presencia de la coestimulación es importante, la activación del LT siempre requiere del reconocimiento del antígeno por el TCR (primera señal). También requieren en segunda instancia de las moléculas coestimuladoras y citoquinas que potenciarán la señal del antígeno. Suponiendo que la activación de los LT desencadenada por las pVEs-VFAi es antígeno específica, la señal de activación estaría dada por la presencia de péptidos virales asociados a las moléculas del CMH expresadas en las mismas. Si bien estas proteínas virales no lograron desencadenar una respuesta en linfocitos vírgenes sí pudieron hacerlo en los linfocitos sensibilizados. Al igual que ocurre con los LB, esta estimulación en los LT sensibilizados estaría dada, en su mayoría, por LT de memoria que se generaron en la respuesta *in vivo* y que responden con una cinética y magnitud mayor que los *naïve*. Sin embargo, los linfocitos de memoria específicos para VFA no deberían activarse al estar en contacto con las pVEs-LPS ya que estas no presentan proteínas virales asociadas al CMH que puedan brindarle la señal de activación antígeno específica. Una de las hipótesis que consideramos para explicar esta activación antígeno independiente desencadenada por las pVEs-LPS se basa en trabajos publicados que demuestran que restos de adyuvantes que se utilizan para inducir la maduración de las CDs *in vitro* (como LPS o POLI I:C) puedan unirse a la membrana de las VEs y por lo tanto, puedan estar presente en la incubación con las células inmunes y activar directamente a las CDs como un efecto secundario al unirse a su TLR específico. Esta activación secundaria de la CDs induciría la secreción de citoquinas y en consecuencia activar la proliferación de los linfocitos. (Sobo-Vujanovic et al., 2014).

Sin embargo, el hecho de que las pVEs-LPS no induzcan la proliferación en los LT *naïve* es un indicio que nos permite descartar la hipótesis de un posible efecto mitogénico de

estas pVEs. La capacidad de las pVEs-LPS de activar únicamente a los LT previamente sensibilizados condice más con la hipótesis de una activación *bystander* dada por el alto tenor de moléculas coestimuladoras en las pVEs-LPS. En este caso la señal antígeno específica podría estar dada por la persistencia de pequeñas cantidades de antígeno vacunal dentro del bazo al día 14 p.v. (Wigdorovitz et al., 1997; López et al., 1990). Esta hipótesis se respalda en los datos obtenidos del experimento realizado con los esplenocitos vírgenes, allí a pesar de estar presentes las pVEs-LPS no se observó una proliferación significativa respecto al control, dando indicio de que en ausencia de la primera señal de activación (reconocimiento del antígeno) las moléculas coestimuladoras presentes en las pVEs no pueden inducir una proliferación en ausencia de antígenos. Esta activación mediada por pVEs derivadas de CDs activadas inespecíficamente, ya fue reportada en un trabajo en el cual se estudiaba la participación de las VEs en la respuesta antitumoral. Allí se demostró que las VEs obtenidas de CDs activadas por POLI I:C podían estimular una respuesta tumor específica e inducir la reducción de la neoplasia al ser inoculadas en ratones portadores del tumor.

Siempre suele hacerse referencia al rol que cumplen la CDs y sus pVEs en la activación de los LT y muy poco se sabe de su participación en la activación de los LB. Los trabajos pioneros llevados a cabo por el grupo de la Dra. Gabrielsson demostraron que las pVEs derivadas de CDs son capturadas preferentemente por CDs y por linfocitos BZM. A partir de estos resultados ha propuesto un posible mecanismo de acción en donde las pVEs de CPA profesionales tienen un rol activo en el centro germinal y en la activación de los LB *in vivo* (Nolte' T Hoen et al., 2012; Qazi et al., 2009). Sobre la base de nuestros resultados y adaptando el mecanismo propuesto por la Dra. Gabrielsson proponemos un potencial mecanismo de acción para las pVEs-VFA en la respuesta inmune para el VFAi *in vivo*.

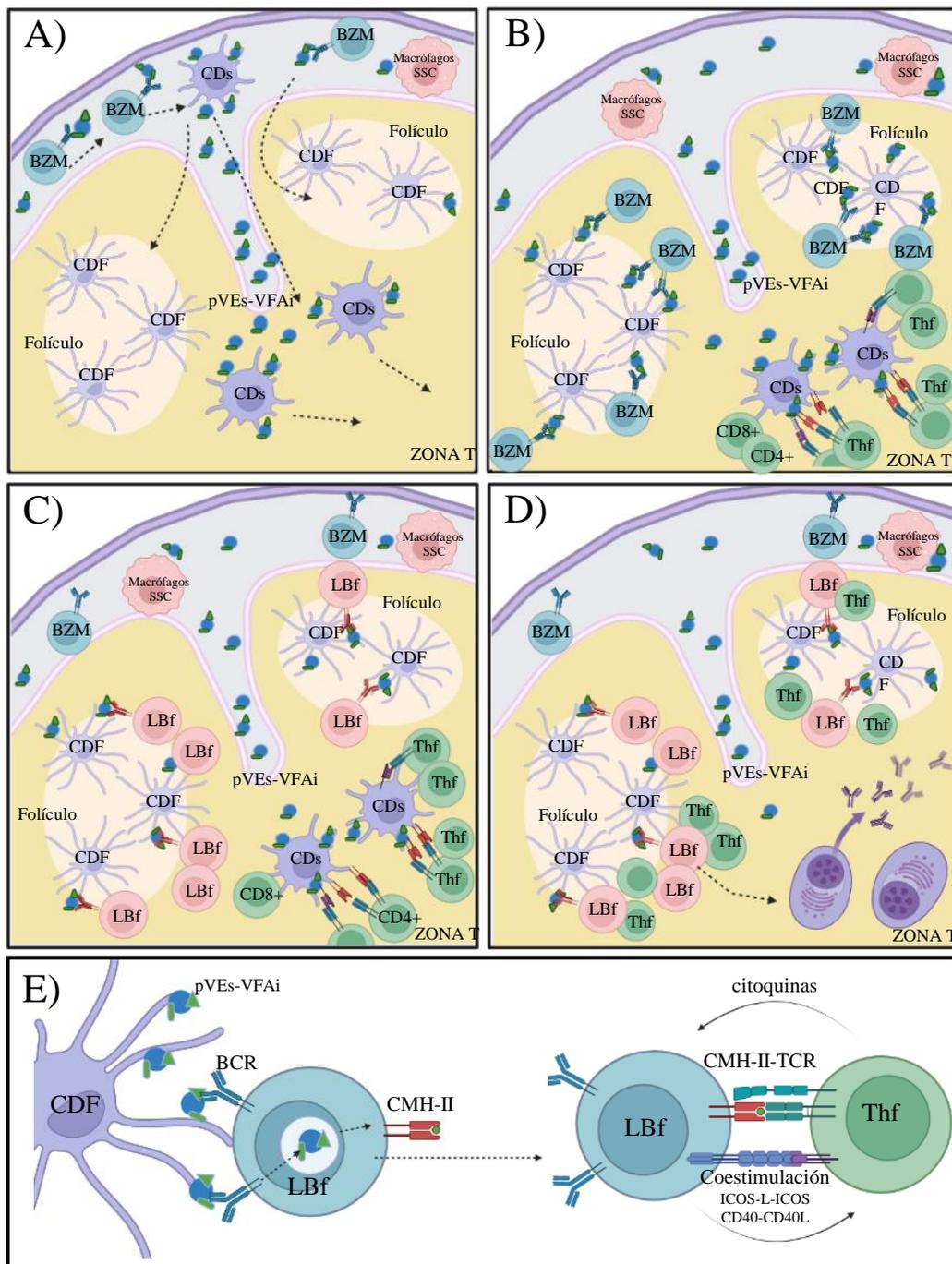


Figura 35. Mecanismo propuesto para la activación de las células inmunes por parte de las pVEs-VFAi. Se muestra el proceso de manera secuencial en los distintos recuadros (A) Las pVEs-VFAi viajarían a través del torrente sanguíneo o bien podrían ser secretadas por las CDs directamente en el OLS y serían captadas por los linfocitos BZM de la zona marginal del bazo y por las CDs, que migrarían a la zona de los LT. (B) Los BZM depositarían el antígeno en las CDs foliculares (CDF) en la zona B/folículo, y las CDs que interactuaron con las pVEs-VFAi se activarían y a su vez estimularían a los LT CD4+ (Thf) y CD8. (C) Los LBf específicos se activarían al interactuar con las CDF que presentan sobre su membrana a las pVEs-VFAi. (D) Los LT CD4+ activados migrarían a la zona T-B en donde colaborarán con los LBf potenciando la activación, favoreciendo así el cambio de isotipo y la producción de anticuerpos específicos de antígeno. (E) **Esquema que plantea la activación del LB por reconocimiento e internalización de las pVEs-VFAi y la posterior colaboración con el LT.** Los LBf reconocen específicamente a las pVEs-VFAi en la membrana de la CDF, esta interacción desencadenaría la endocitosis a las pVEs, procesamiento y presentación de péptidos virales en el contexto del CMH-II al LThf. Esta colaboración T-B ayudaría a mejorar la respuesta de LB y LT a través de citoquinas y moléculas coestimuladoras. Imagen adaptada de Näslund y colaboradores (Näslund, Gehrman, Qazi, et al., 2013).

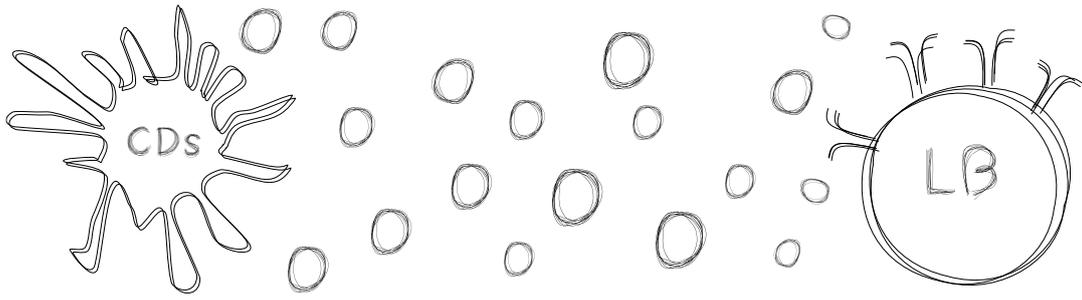
En la **Figura 35** se esquematiza un mecanismo de acción hipotético para las pVEs-VFAi. Las pVEs secretadas por las CDs que captaron al antígeno vacunal (VFAi) en el sitio de inoculación viajarían a través del torrente sanguíneo o bien podrían ser secretadas por las CDs directamente en el OLS (**Figura 35 A**). Posteriormente, las pVEs-VFAi podrían ser captadas por otras CDs, que las llevarían a la zona T. Las CDs que interactuaron con las pVEs-VFAi se activarían y a su vez estimularían a los LT CD4+ y CD8+ (**Figura 35 A, B y C**). Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron una clara interacción entre pVEs-VFAi y los linfocitos BZM. Estos linfocitos reconocerían a las proteínas/péptidos virales presentes en las pVEs-VFAi por medio del BCR y las transportarían hasta la CDs foliculares (CDF) en la zona B (**Figura 35 A y B**). Las pVEs quedarían retenidas sobre la membrana de la CDF y allí contribuirían a la activación de los LBf cumpliendo el rol de fuente de antígeno nativo o semiprocesado (**Figura 35 C, D y E**) (Denzer et al., 2000) (Nolte' T Hoen et al., 2012; Qazi et al., 2009). Por otra parte, nuestros resultados demostraron también que los LBf reconocen específicamente a las proteínas virales presentes en las pVEs-VFAi. Los antígenos virales al estar asociados a la membrana de las pVEs favorecerían el entrecruzamiento de los BCR, que induciría la endocitosis y posterior activación de los LBf (Murphy & Weaver, 2017). El LBf procesaría las proteínas virales adquiridas con las pVEs-VFAi y las presentaría en el contexto del CMH a un LThf en la zona T-B (**Figura 35 D y E**). Esta colaboración T-B ayudaría a mejorar la respuesta de LB a través de citoquinas secretadas por el LThf. y el LBf mejoraría la respuesta a través de moléculas coestimuladoras. El LBf podría diferenciarse posteriormente a célula plasmática secretora de anticuerpo y a LB de memoria. De esta forma las pVEs-VFAi colaborarían en la amplificación y generación de la respuesta inmune inducida por el antígeno vacunal VFAi *in vivo*. A partir de este modelo se desprende que las pVEs-derivadas de CDs serían una plataforma natural sobre la que se presentan proteínas nativas o parcialmente procesadas que pueden permanecer más tiempo en circulación. Al estar unidas a membranas las proteínas del patógeno podrían ser más estables (Ruan et al., 2021) favoreciendo el entrecruzamiento del receptor BCR y facilitando la activación de los LB. Incluso la presencia de moléculas de adhesión en las pVEs podría direccionar y favorecer el contacto con la célula aceptora haciendo que su incorporación sea más eficiente que la del correspondiente antígeno vacunal. No solo funcionaría como *carrier* de antígeno sino, que también tendrían una participación proactiva en la generación y amplificación de la respuesta inmune activando a LB innatos, LBf y a otras CDs que aún no han estado en contacto con el antígeno.

La vacuna inactivada contra la FA ha demostrado ser eficiente en el control de la enfermedad. Sin embargo, la inmunidad generada no es sostenida en el tiempo y se requieren de re-inoculaciones anuales para asegurar la protección. La respuesta inmune humoral es el factor clave en la protección contra el VFA, pero la respuesta celular inducida por la vacunación también es importante para la eliminación del virus y la generación de la memoria B y T. Uno de los desafíos actuales es lograr mejorar la respuesta de memoria inducida por la vacuna inactivada. Por esta razón, es de gran importancia encontrar nuevos adyuvantes o plataformas vacunales que permitan mejorar la respuesta B y que induzcan respuestas Th1/Th2. Ya se han realizado estudios evaluando distintos tipos de adyuvantes que van desde formulaciones con CpG (Terhuja et al., 2015), adyuvante completo de Freund's (Guo et al., 2013), nuevos adyuvantes como ISPA (J. Bidart et al., 2021) y la utilización de adyuvantes basados en liposomas (W. S. Kim et al., 2020). Las VEs tienen puntos en común con los liposomas, también son pequeñas vesículas formadas por una bicapa lipídica solo que su origen es natural. Particularmente, las VEs derivadas de CDs cargadas con patógenos inactivados, son una importante fuente de antígenos y poseen moléculas inmunomoduladoras como las moléculas coestimuladoras CD86, CD40 y la molécula del CMH-I y II (Mehanny et al., 2021). Con toda esta información no es descabellado pensar a las VEs como plataformas vacunales. En comparación con los liposomas, las VEs ofrecen una serie de ventajas potenciales siendo más biocompatibles y proporcionando un entorno de membrana perfecto para las proteínas en términos de dinámica, funcionalidad y estabilidad (Yang et al., 2018; Van der Koog et al., 2021). Actualmente, hay varios ensayos clínicos sobre vacunas y terapias basadas en VEs que fueron aprobados por la FDA para su uso en humanos (disponibles en línea: clinicaltrials.gov/ct2/home). A pesar de estos avances, aún queda un largo camino por recorrer para que las VEs puedan ser utilizadas como vacuna o terapias, considerando el altísimo costo que demanda su producción. Es por ello que solo son consideradas para terapias tumorales cuando los tratamientos tradicionales no brindan una solución.

Si bien las pVEs-VFAi no las planteamos como plataforma vacunal sí consideramos que sería interesante hallar una manera de poder potenciar el rol que cumplen *in vivo*, ya sea por medio de algún adyuvante que aumente la secreción de VEs-VFAi *in vivo* o que pueda potenciar el efecto que tienen las pVEs al interactuar con las células inmunes. Esto sería muy interesante considerando que además de activar a los LB presentan el entorno

propicio para la presentación de antígenos a los LT. Si se logra potenciar la función activadora de las pVEs sobre los LT podría plantearse una potencial solución para mejorarla respuesta Th1/Th2 que actualmente la vacuna inactivada no logra inducir exitosamente y que afecta finalmente a la memoria B. Sería interesante poder evaluar la participación de las pVEs derivadas de CDs en la generación de la respuesta inmune inducida por nuevas plataformas vacunales en estudio, por ejemplo, con vacunas basadas en VLPs.

Los resultados derivados de este trabajo de tesis ponen de manifiesto la importancia de las pVEs de CDs como transporte y soporte de antígeno para la activación de LB. Suman evidencias relevantes para dilucidar el rol poco conocido de las CDs y sus VEs derivadas en la activación de LB. Todos estos conocimientos podrán contribuir significativamente al diseño racional de vacunas.



Conclusiones

7 CONCLUSIONES

- ◆ Las CD8 son las principales células presentadoras de antígenos y son las encargadas de orquestar la respuesta inmune. Si bien forman parte del sistema inmune innato son el principal nexo con el sistema adaptativo y son necesarias para activar a los linfocitos B y T. El reconocimiento de los patógenos por las CD8 es un paso necesario para que luego pueda desarrollarse una respuesta inmune exitosa.

Los resultados derivados de esta tesis indicaron que: **las CD8 derivadas de médula ósea murina con fenotipo similar a las CD8 convencionales/inflamatorias pueden interaccionar con el antígeno vacunal VFAi de la cepa O1 Campos, lo internalizan y se activan en consecuencia. Estos pasos necesarios para la correcta activación de una respuesta anti-VFA.**

- ◆ Todas las células inmunes secretan VEs que cumplen funciones en la comunicación, así como también en la modulación del sistema inmune.

En este trabajo de tesis se demostró que las CD8 activadas por VFAi liberan VEs al medio que poseen características similares a la subpoblación de VEs correspondiente a exosomas o pequeñas VEs (pVEs). Tienen un tamaño promedio de 155 nm y presentan la morfología característica de copa o balón pinchado descripta para los exosomas. Las pVEs tienen una alta expresión de la tetraspanina CD9, una expresión media de CD81 y baja expresión de CD63, además >90% de la población expresan moléculas inmunomoduladoras como el CMH-II y la molécula coestimuladora CD86.

- ◆ Las VEs pueden expresar proteínas provenientes de ciertos patógenos que pueden activar o inhibir al sistema inmune e incluso promover la propagación de la infección.

Los resultados establecieron que las CD8 que internalizan el VFAi y se activan a causa de esa interacción, liberan pVEs que expresan proteínas/péptidos del VFAi (pVEs-VFAi). Estas proteínas o péptidos estarían presentes en la membrana como consecuencia de un direccionamiento de los antígenos hacia las pVEs en las CD8.

- ◆ Cuando una CD8 endocita un patógeno, adquiere proteínas de ese patógeno y esas proteínas pueden aparecer en las VEs. La presencia de esas proteínas en las VEs puede variar ya que no son proteínas constitutivas de las CD8, si no que solo aparecen frente a la infección.

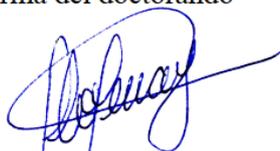
En concordancia con estos datos, se demostró que la secreción de pVEs-VFAi al medio por parte de las CDs es acotada en el tiempo y solo se detectan proteínas virales en las pVEs dentro de las primeras 24 h luego del contacto con el antígeno vacunal VFAi. Posteriormente, las CDs continúa liberando pVEs con menor expresión de proteínas virales hasta negativizarse a las 36 h.

- ◆ Algunas VEs que presentan proteínas de patógenos tienen la capacidad de activar al sistema inmune desencadenando respuestas específicas y actúan como una fuente de antígeno acelular. **Las proteínas/péptidos virales presentes en las pVEs-VFAi inducen la proliferación de linfocitos B de memoria *in vitro*. Los LB de memoria al haber sido activados y seleccionados en el centro germinal previamente poseen un umbral de respuesta menor y por lo tanto responden más rápido y con una magnitud mayor que los LB *naive*. La proliferación B es inducida por la presencia de epitopes B de VFA en la membrana de las pVEs-VFAi.**
- ◆ Las VEs de CDs actúan como *carrier* de antígenos, siendo la plataforma donde se encuentran proteínas intactas o semiprocesadas que facilitan el reconocimiento y entrecruzamiento del BCR. Al tener antígenos asociados también podrían amplificar la respuesta inmune transportando antígenos hacia otras CDs.
- ◆ La respuesta de anticuerpos juega un rol esencial en la protección contra la infección por VFA. Los linfocitos BZM (CD21⁺/CD23⁻) son los encargados de generar los primeros anticuerpos neutralizantes y los linfocitos B2 o foliculares (CD21⁺/CD23⁺) son los que originarán los anticuerpos neutralizantes específicos de alta afinidad y darán lugar a la memoria B. **Las pVEs-VFAi estimulan la proliferación de ambas subpoblaciones celulares, BZM y linfocitos B2 o foliculares, confirmando el rol de las pVEs como fuente de antígeno para LB en el centro germinal. Además, tendrían una participación proactiva en la generación y amplificación de la respuesta inmune activando a LB innatos, LBf y a otras CDs que aún no han estado en contacto con el antígeno.**
- ◆ Las VEs derivadas de CDs activadas expresan muchas proteínas inmunomoduladoras y dentro de estas proteínas se encuentran las moléculas coestimuladoras y el CMH. **Las pVEs-VFAi inducen la proliferación de los LT de memoria, pero no la de los linfocitos vírgenes. No se pudo demostrar una activación antígeno específica y no se puede excluir**

o afirmar que esa activación sea inducida por las moléculas inmunorreguladoras sobre-expresadas en las VEs derivadas de CDs activadas.

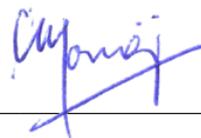
Los resultados derivados de este trabajo de tesis describen por primera vez que las CDs derivadas de médula ósea cocultivadas con el antígeno vacunal para FA secretan pVEs, que poseen proteínas/péptidos virales que son capaces de estimular una respuesta inmune específica para VFA *in vitro*. Estos hallazgos suman evidencias relevantes para dilucidar el rol poco conocido de las pVEs derivadas de CDs en la activación de LB. Esta tesis profundiza el rol de las CDs en la respuesta inmune generada con la vacuna para la FA. Hace énfasis en las pVEs como un nuevo mediador de la comunicación celular entre las CDs y los linfocitos en una respuesta inmune anti-VFA. Comprender mejor los mecanismos inmunes que se desencadenan luego de la vacunación ayudará al diseño racional de las nuevas plataformas experimentales. En este contexto, sería ideal poder aprovechar el rol que las pVEs de CDs tienen *in vivo* para mejorar la respuesta inmune de las vacunas ya existentes o en desarrollo.

Firma del doctorando



Lic. Florencia Menay

Firma del director de tesis



Dra. Claudia Mongini

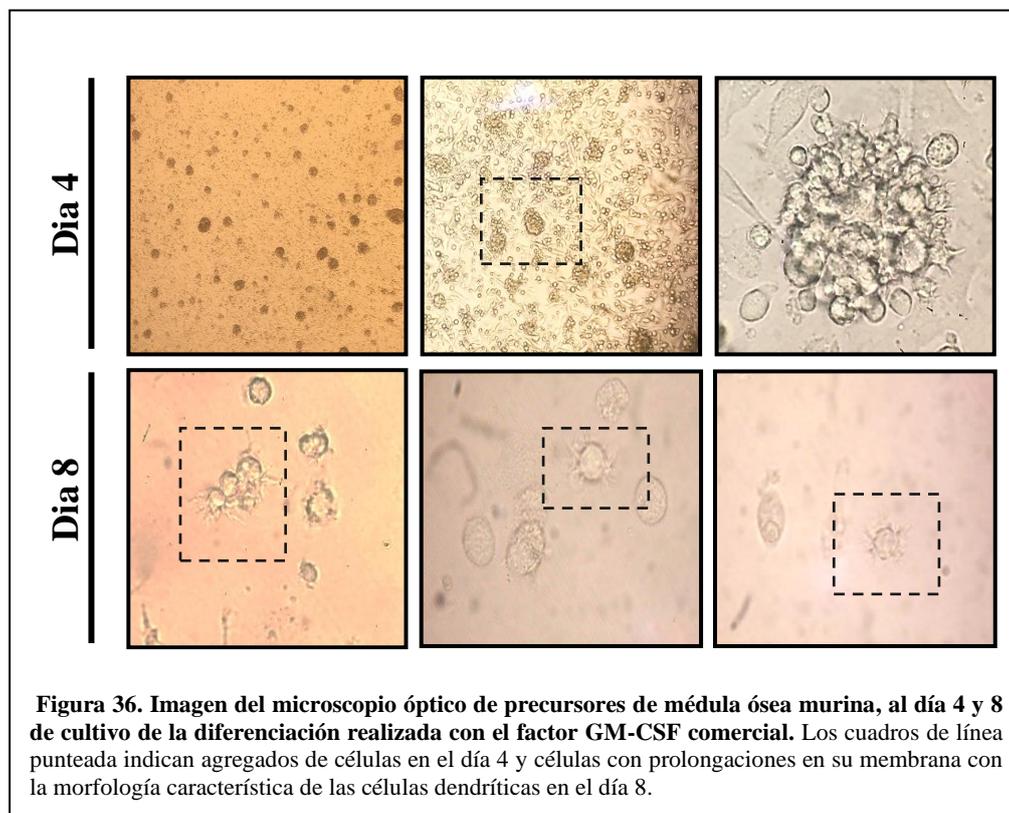
Anexos

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Puesta a punto del protocolo de diferenciación de CDs a partir de precursores de médula ósea

8.1.1 Diferenciación de CDs utilizando el factor GM-CSF

Para cumplir el objetivo de este trabajo y poder enfocarnos en el rol de las VEs que las CDs secretan y cuál es su impacto en la generación de la respuesta frente al VFA, el primer paso fue lograr diferenciar las CDs. Para comenzar con la puesta a punto de la metodología, se recolectó bibliografía en donde se detallaba el protocolo a seguir. Existen una gran cantidad de trabajos que utilizan la estrategia de diferenciación *in vitro* para el estudio funcional de las CDs y en consecuencia existen muchos protocolos para lograr la diferenciación. El trabajo base tomado para comenzar el diseño del protocolo fue el trabajo del Dr. Inaba (Inaba et al., 1992). Su trabajo es el pionero en la diferenciación *in vitro* de CDs a partir de precursores pluripotentes obtenidos de la médula ósea murina. Este trabajo utiliza para la diferenciación el factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF).

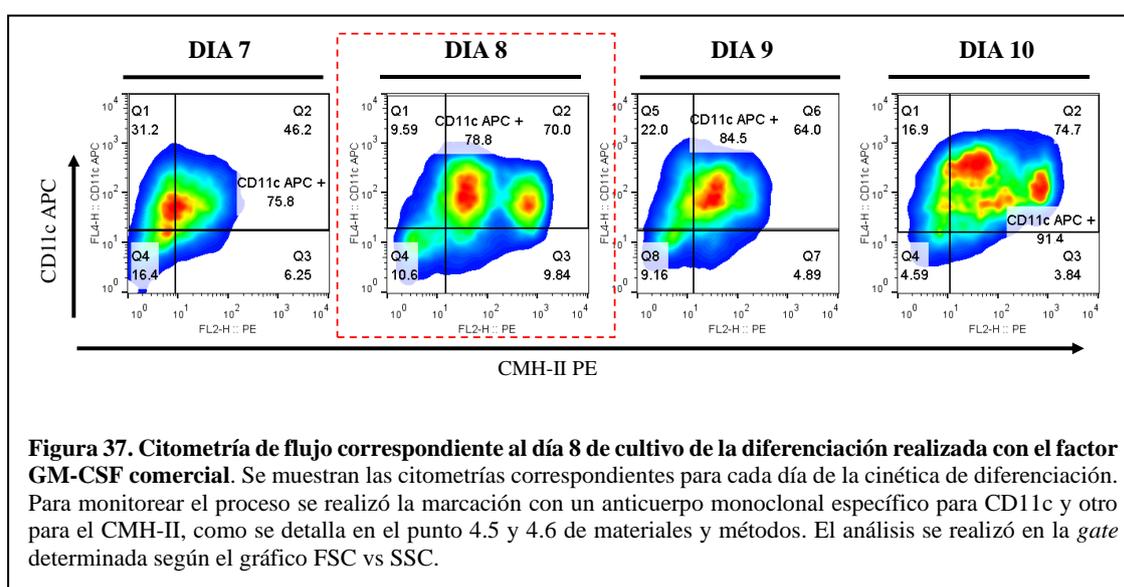


El protocolo del Dr. Inaba sufrió luego modificaciones por otros autores. (Brasel et al., 2014; Madaan et al., 2014; Ndiaye et al., 2016). y pueden encontrarse varios trabajos en donde se utilizan además del factor GM-CSF (Inaba et al., 1992; Brasel et al., 2014; Ndiaye et al., 2016) otros factores como el ligando de Flt3 (Björck, 2001; Karsunky et al., 2003) o combinaciones de factores, como por ejemplo: GM-CSF+IL4 (Son et al., 2002).

En base a estos trabajos y al perfil de CDs que buscábamos obtener (principalmente CDs convencionales o inflamatorias), decidimos comenzar la diferenciación utilizando el factor GM-CSF únicamente (protocolo detallado en el punto 4.5 de materiales y métodos). Todo el protocolo de la diferenciación se monitoreó diariamente por microscopia óptica de forma cualitativa y también, se realizó una cinética de diferenciación que se monitoreó por citometría de flujo. Durante los primeros días del cultivo, se observaron los *clusters* o agregados celulares característicos levemente adheridos al plástico formados por células del tipo estromal y células con una diversidad de tamaño y morfología característica de los precursores (Inaba et al., 1992). Con el pasar de los días, la morfología de las células cambió y a partir del día 4, ya se observó un gran número de células con pequeñas prolongaciones de la membrana (dendritas) que se “desprendían” de los agregados (**Figura 36**). Al día 8, se podían observar una mayor cantidad de células no adherentes con dendritas/prolongaciones (**Figura 36**). La mayoría de los protocolos observados utilizan células diferenciadas al día 7 u 8 e incluso hasta día 10. Por esta razón, se realizó una cinética para determinar qué tiempo de diferenciación era el más adecuado para nuestros experimentos. El monitoreo de la diferenciación se realizó por citometría de flujo desde el día 7 hasta el día 10, también se registró la viabilidad del cultivo (medida por tinción con Azul Tripán) a cada tiempo. Las células que se encontraban levemente o no adheridas se colectaron a cada tiempo y se realizó una marcación con un anticuerpo monoclonal específico para CD11c, proteína marcadora de CDs murinas y un anticuerpos específico para la proteína CMH-II, característica de CPAs profesionales (Inaba et al., 1992) (Dong et al., 2016).

En la **Figura 37** se muestran los análisis de las citometrías de flujo correspondientes a cada día. Allí se puede observar que a partir del día 7 más del 70% de la población expresa la proteína marcadora CD11c. Sin embargo, al día 7 parte de las células aun no presentan expresión del CMH-II (expresión basal en CDs), probablemente indicando una diferenciación aun incompleta. En cambio, al día 8 de diferenciación ya se logra obtener una población que además de ser homogénea en la expresión del marcador CD11c

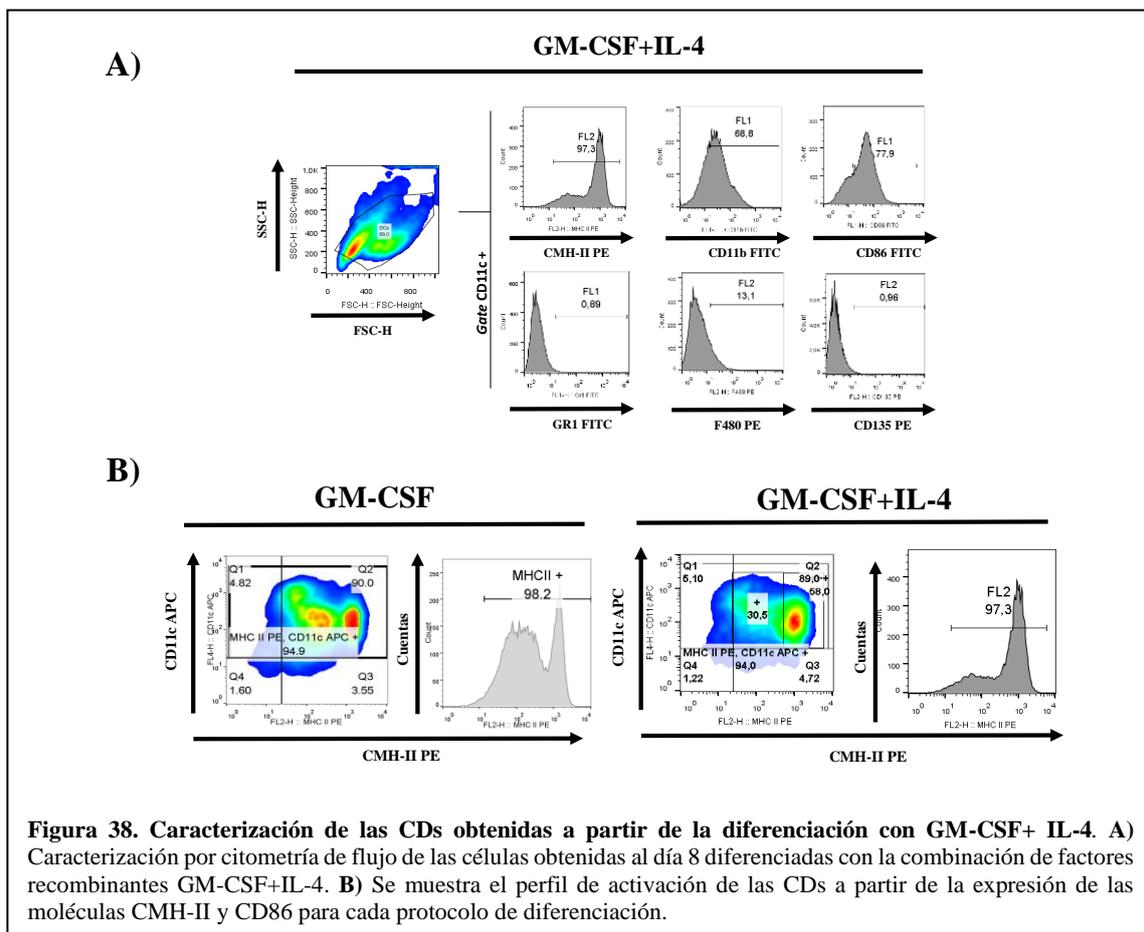
expresan en su mayoría CMH-II. También presentan la expresión bimodal clásica asociada a la molécula CMH-II que es característica de CDs, permitiendo diferenciar entre las células más maduras y células más inmaduras. Decidimos elegir el día 8 como día de cosecha de las células ya que a este día logramos obtener una población diferenciada y con una viabilidad mayor al 80 %. No se eligió el día 9 o 10 para la cosecha ya que a este tiempo comienza a disminuir la viabilidad del cultivo siendo muchas veces menor 80%. El rendimiento promedio de células al día 8 de diferenciación cuantificado por microscopía y tinción con el colorante de exclusión Azul Tripán fue de $7,86 \times 10^6 \pm 2,43$ células por placa partiendo de $10,00 \times 10^6$ precursores totales por placa.



Con la utilización del factor GM-CSF y 8 días de diferenciación logramos obtener una población de CDs homogénea en cuanto la expresión del marcador CD11c (>80%) característico de CDs murinas (**Figura 37**). Estas células CD11c⁺ expresan las proteínas CMH-II (>90%) de expresión bimodal característico de este tipo celular, así como la molécula coestimuladora CD86. Las moléculas CD11b y F4/80 características de CDs convencionales e inflamatorias (Merad et al., 2013) también se expresan en las CPA obtenidas (Ver **Figura 20** de la sección resultados). Hasta aquí podemos decir que con el protocolo utilizado logramos obtener CPAs que poseen las características fenotípicas y morfológicas de las CDs derivadas de médula ósea, que se asemejan a las características de las CDs murinas *in vivo*.

8.1.2 Diferenciación de CDs utilizando el factor GM-CSF+IL-4

Si bien con el protocolo de diferenciación utilizando únicamente GM-CSF logramos obtener la población de CDs de interés, decidimos probar también un protocolo alternativo realizando la diferenciación con GM-CSF+ IL-4, protocolo también muy utilizado para el estudio *in vitro* de las CDs. Según la bibliografía, la IL-4 disminuiría la posible diferenciación de macrófagos en el cultivo (Hiasa et al., 2009). (Grauer et al., 2002). Por esta razón y a modo de prueba, se realizó la diferenciación durante 8 días utilizando 20 ng/ml de GM-CSF y 5 ng/ml de IL-4 recombinante (Ndiaye et al., 2016). La metodología utilizada y los cambios de medio se realizaron siguiendo el mismo esquema que se usó para el GM-CSF. Al cabo de 8 días, realizamos la caracterización de la población obtenida por citometría de flujo.



Como puede observarse en la **Figura 38 A**, la población obtenida expresa el marcador CD11c en un porcentaje mayor al 85% y el perfil de expresión de los marcadores es distinto al de las CDs obtenidas con GM-CSF. Esta población no tiene expresión del

marcador F4/80 asociado a las CDs diferenciadas de monocitos es decir CDs inflamatorias, esto condice con la función asignada a la IL-4 según la bibliografía. Al analizar la expresión del CMH-II se observó que, si bien más del 90% de la población lo expresan, su expresión no es bimodal, y la mayoría de la población presenta una alta expresión de CMH-II indicando un estado basal de alta activación en comparación el estado basal de activación de la población obtenida con el factor GM-CSF únicamente, **Figura 38 B**. Frente a estos resultados y considerando que para nuestro objetivo era conveniente utilizar una población de células con un estado basal de activación menor y que tengan una capacidad fagocítica mayor para poder captar el VFAi, decidimos optar por el protocolo de diferenciación en el que solo se utiliza el factor GM-CSF. Si bien con el protocolo elegido se podría haber obtenido algún porcentaje de células similares a macrófagos, al coleccionar únicamente la fracción de células no adheridas o levemente adheridas disminuimos esa fracción en la población obtenida y ello se refleja en la morfología y en la expresión del marcador CD11c en la población diferenciada (**Figura 38 B**)

8.1.3 Optimización del protocolo de diferenciación, disminución de posibles fuentes de activación de las CDs

Como se expresó anteriormente, las CDs cumplen un rol fundamental en el reconocimiento y presentación de antígenos formando parte del grupo de células catalogadas como presentadoras de antígenos profesionales junto a los macrófagos y los LB. Por medio de sus receptores de reconocimiento de patrones (RPP) pueden identificar antígenos, endocitarlos y procesarlos para luego activar una respuesta adaptativa. (Kuby, 2012) (Murphy & Weaver, 2017). Estas células se encuentran constantemente censando su alrededor y son muy sensibles a los cambios. Por esta razón, el trabajo *in vitro* requirió de una cuidadosa puesta a punto y de un mayor control de las variables ya que la maduración podía ser fácilmente inducible. Es muy importante poder controlar, en lo posible, todos los materiales utilizados en el proceso y tratar de disminuir al máximo cualquier posible activación. Por este motivo, el paso siguiente en la puesta a punto fue minimizar esas posibles fuentes de activación, utilizando material nuevo, pipetas descartables, medios de cultivo validados y agua calidad inyectable para la preparación de antibióticos y otros reactivos. Para disminuir la probabilidad de activación de las CDs por la presencia de trazas de LPS se agregó a los medios de cultivos la Polimixina B. Este antibiótico es ampliamente utilizado por diversos grupos que trabajan con células

dendríticas. La Polimixina B tiene la capacidad de bloquear los efectos biológicos (activación de las CDs) del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas (LPS) a través de la unión al lípido A, el componente tóxico del LPS. De esta manera al agregar al medio este compuesto disminuiríamos el efecto de cualquier traza contaminante de LPS presente. (Tynan et al., 2012).

Para determinar si la polimixina B favorecía la obtención de CDs con una activación basal menor realizamos dos protocolos de diferenciación en forma paralela. Un grupo experimental se diferenció desde el día 0 con medio (+) Polimixina y un segundo grupo (control) se diferenció con medio (-) sin Polimixina. Al día 8 realizamos la citometría de rutina para la caracterización de CDs, utilizando los marcadores CD11c y CMH-II.

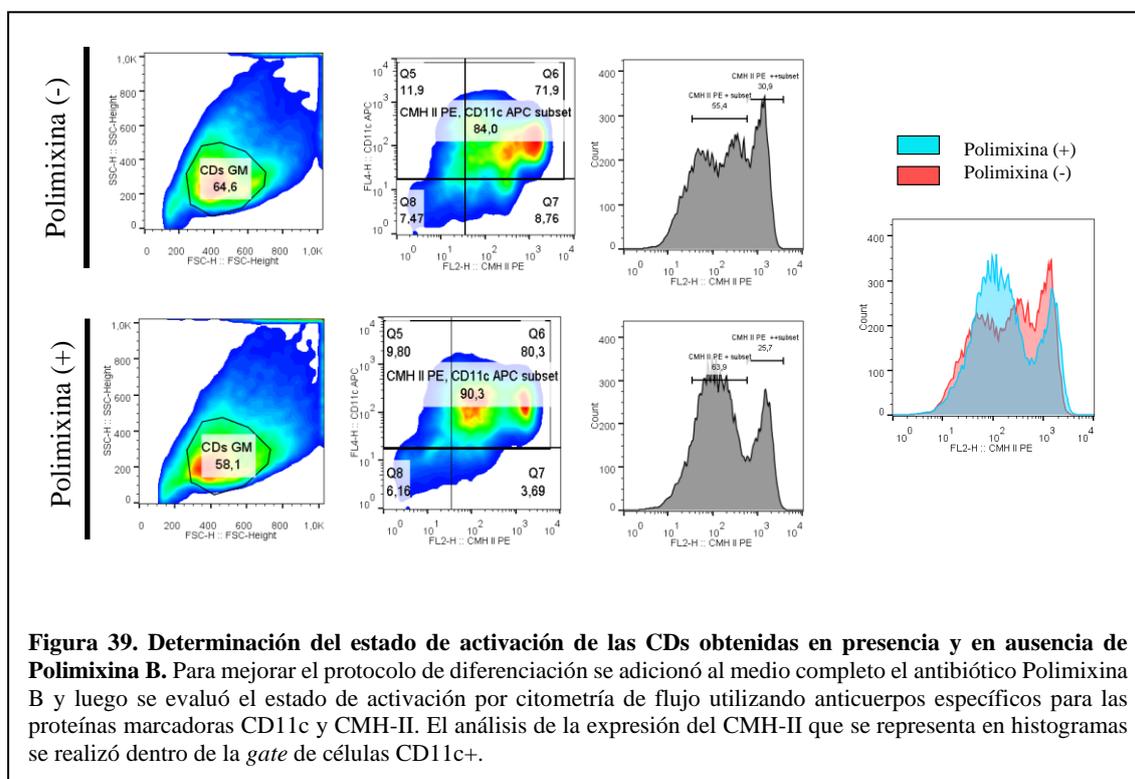


Figura 39. Determinación del estado de activación de las CDs obtenidas en presencia y en ausencia de Polimixina B. Para mejorar el protocolo de diferenciación se adicionó al medio completo el antibiótico Polimixina B y luego se evaluó el estado de activación por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos para las proteínas marcadoras CD11c y CMH-II. El análisis de la expresión del CMH-II que se representa en histogramas se realizó dentro de la *gate* de células CD11c+.

Como puede verse en la **Figura 39** ambos grupos experimentales expresan niveles similares (acorde a las diferenciaciones previas) del marcador CD11c por lo que la adición de la Polimixina B no afectó, en primera instancia, la diferenciación hacia CDs. Sin embargo, al evaluar la expresión de uno de los principales marcadores de activación como es el CMH-II se puede observar que las células que no tenían Polimixina en el medio están más activadas, reflejándose esto en un desplazamiento de la población hacia fluorescencia mayores, aumentando el número de células dentro de la población CMH-II

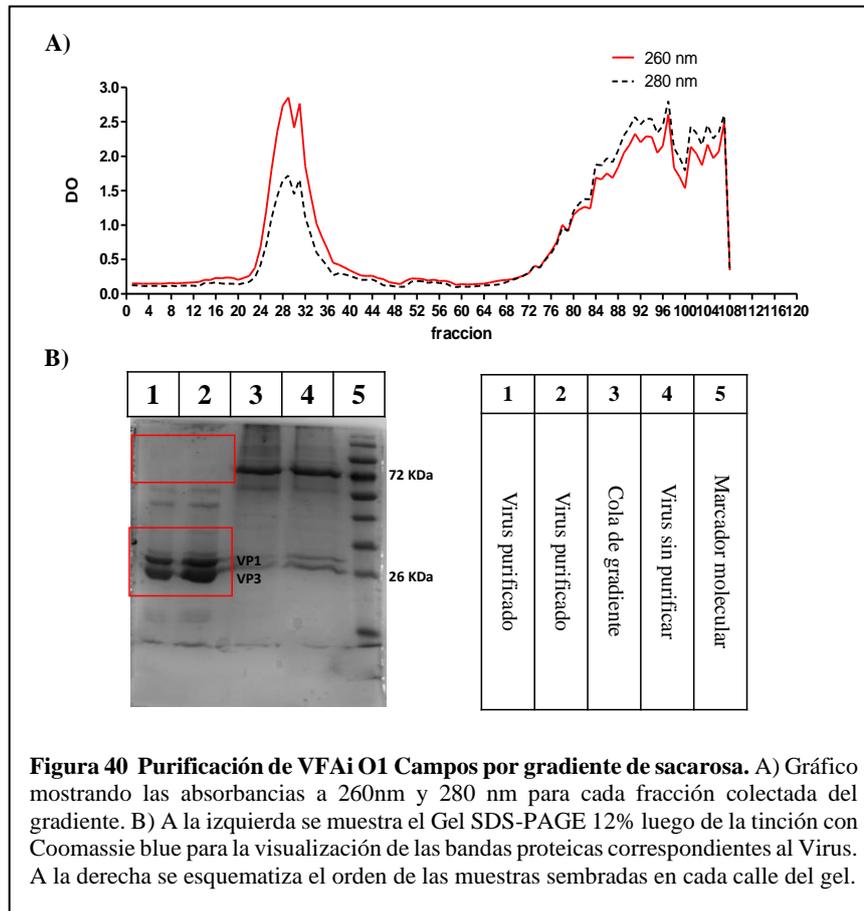
++ (histograma). Al adicionarse al medio la Polimixina, se registra un desplazamiento de la población hacia la izquierda, observándose en el histograma un aumento en la cantidad de eventos de la población correspondiente a CMH-II + (células menos activas). Con estos resultados podemos decir que la adición de Polimixina B en el medio de cultivo favorece la obtención de células más inmaduras (menor expresión de CMH-II). Por esta razón de aquí en adelante, en todas las diferenciaciones y experimentos realizados con CDs se utilizó el medio de cultivo con Polimixina (50 ng/ml).

8.2 Anexo 2: Purificación de VFAi O1 Campos por gradiente de sacarosa (fracción 140 S)

Como se menciona en la sección de resultados de este trabajo de tesis, se realizaron todos los experimentos con el antígeno vacunal VFAi O1 Campos, purificado por gradiente continuo de sacarosa. La construcción del gradiente se realizó utilizando la técnica de capas por congelación. La suspensión stock inactivada de VFAi fue cedida gentilmente por el laboratorio Biogénesis Bagó y almacenada a -70°C hasta la purificación. La purificación por gradiente se realizó en ultracentrífuga a 33.000 xg durante 18h a 4°C , con aceleración mínima y sin freno para evitar disturbios en los gradientes. Luego de transcurrido el tiempo, se colectaron fracciones de 200 μl utilizando una bomba peristáltica. La presencia de partículas virales en las fracciones se determinó a partir de la medición de la absorbancia a 260 nm (correspondiente al material genético) y 280 nm (correspondiente a contenido proteico). En la **Figura 40 A** se puede observar la curva de absorbancia correspondiente a cada fracción colectada del gradiente. Las fracciones elegidas para continuar la purificación fueron las que se encuentran entre las 20 y 40 que corresponden, según la densidad aproximada, a partículas virales completas y además, presentan absorbancia tanto a 260 como 280 nm reflejando la presencia conjunta de proteínas y de material genético. Las fracciones elegidas se volvieron a ultracentrifugar a 100.000 xg rpm por 16 h, para concentrar el VFAi. El *pellet* obtenido se resuspendió en PBS y se filtró por 0,22 μm en esterilidad. La concentración se cuantificó por espectrofotometría de microvolumen empleando el equipo *Nano Drop* (Thermo), para determinar la concentración en $\mu\text{g/ml}$ se realizó el siguiente calculo siendo 131,6 el coeficiente de extinción para el virus de la fiebre aftosa:

$$DO_{260\text{ nm}} \times 131,6 \times F_{dil} = [BEIVFAi] \mu\text{g/ml}$$

Para corroborar el proceso de purificación y concentrado, se realizó un gel de poliacrilamida SDS-PAGE en donde se sembró la muestra purificada y la suspensión original sin purificar. La presencia de proteínas se reveló con *Coomassie Blue*.



En la **Figura 40 B** se puede observar cómo, luego del proceso de purificación, se concentran las proteínas correspondientes a partículas virales que según el marcador de peso molecular corresponden a las proteínas VP1(29 kDa) y VP3 (27 kDa) de la cápside viral del VFAi, la concentración de las proteínas puede evidenciarse al realizar la comparación con la muestra sin purificar.

Al comparar la muestra purificada con la muestra sin purificar o con la muestra correspondiente a las fracciones 72-120 (cola de gradiente) podemos observar que se limpia la muestra y se dejan de observar las bandas de proteínas de peso molecular cercanos a 70 kDa, que corresponderían a agregados proteicos. Este gel evidencia el éxito del protocolo de purificación y concentrado del virus inactivado y nos asegura la presencia partículas 140S intactas (Barteling & Melen, 1974).

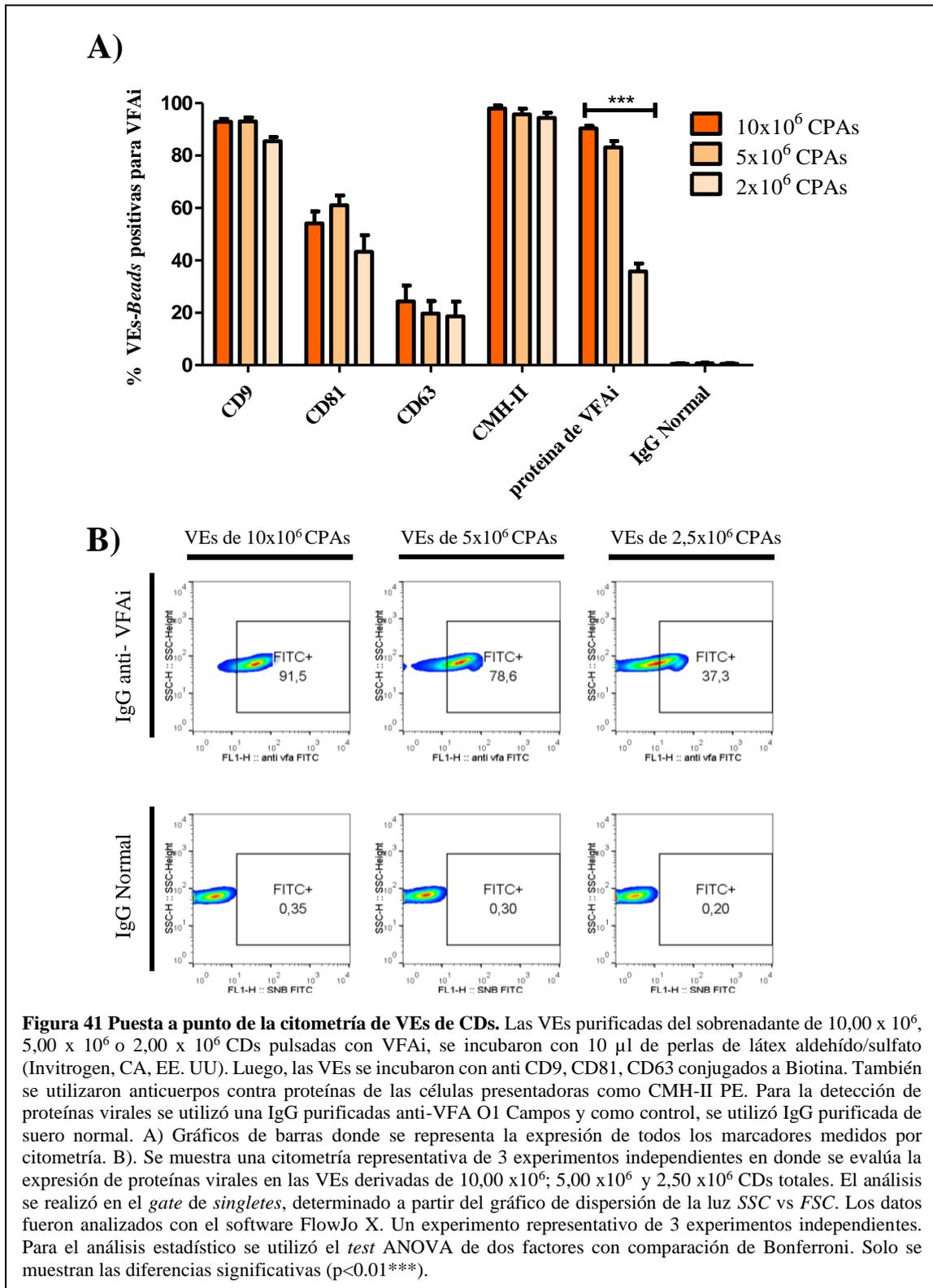
8.3 Anexo 3: Determinación de la concentración óptima de VEs para ser utilizada en la caracterización por citometría de flujo.

Por su pequeño tamaño es necesario adherir las vesículas a perlas de *látex* de 4 μm , para que puedan ser analizadas por el citómetro. En trabajos previos realizados por nuestro laboratorio (Menay et al., 2017; Cocozza et al., 2019), se realizó la detección de las proteínas en las VEs-tumorales por citometría de flujo incubando una cantidad fija de VEs (5 μg de proteínas totales medidas por Bradford) con 10 μl de las perlas de *látex*, así se lograba saturar las perlas con la muestra y determinar las proteínas sin variaciones entre mediciones. Frente a la falta de un equipo en el país que nos permita calcular la concentración de VEs, la estimación de la concentración por proteínas totales sería una opción validada en las publicaciones, pero esta cuantificación demanda una pérdida de muestra que se destina para esa medición. Conociendo que también existe otro método de cuantificación indirecta que se basa en una estandarización en base al número de células originales en el cultivo del que derivan las VEs, esta cuantificación nos pareció más conveniente para las VEs de CDs ya que permite ahorrar muestra y evita una cuantificación sobrevalorada a causa de posibles proteínas contaminantes. Las primeras caracterizaciones de VEs derivadas de CDs por citometría de flujo fueron realizadas incubando 10 μl de las perlas de *látex* con las VEs derivadas de $10,00 \times 10^6$ CDs. Con esta concentración de VEs aseguramos la saturación de las perlas de *latex* y aseguramos la detección de las proteínas presentes en la población de VEs. Con este protocolo se realizaron las primeras caracterizaciones de las VEs, en donde se confirmó la presencia de las proteínas marcadoras CD9, CD81, CD63, CMH-II y proteínas virales. Como la caracterización por citometría se realiza de rutina luego de cada aislamiento de VEs, y ante el gran trabajo que demanda la obtención de estas vesículas y el cultivo de CDs, surgió la necesidad de optimizar el protocolo para la citometría y así destinar menor cantidad de muestra a la caracterización y mayor cantidad a los ensayos funcionales.

De esta manera se probaron nuevos protocolos incubando una cantidad fija de perlas de *latex* con cantidad variable de VEs (derivadas de $10,00 \times 10^6$ CDs, $5,00 \times 10^6$ CDs y 2.50×10^6 CDs). Posteriormente, se realizó la citometría estándar como se detalla en la sección de materiales y métodos en el punto 4.13. Se determinó la presencia de las moléculas CD9, CD81, CD63, CMHII y proteínas virales. Como puede observarse en la **Figura 41**

A la detección de aquellas proteínas marcadoras que están muy representadas en la población pueden detectarse incluso en las muestras de VEs derivadas de 2.5×10^6 CDs. Sin embargo, al evaluar la detección de proteínas virales se puede observar que su detección es menor al disminuir la concentración de VEs iniciales (**Figura 41 A y B**). Con estos resultados decidimos reformular el protocolo de citometría utilizando las VEs derivadas de $5,0 \times 10^6$ CDs. Con esta concentración se puede ahorrar muestra manteniendo el perfil proteico que se obtiene con el protocolo original de $10,00 \times 10^6$ CDs. Estos resultados nos dan el indicio de que las proteínas están expresadas con distintas abundancias en la población siendo las más abundantes aquellas que se pueden detectar a mayores diluciones (Ej: CD9 y CMH-II). Cabe destacar que los datos obtenidos de las citometrías de VEs son datos de la población y no de cada VEs individual.

Figura 41 en la página siguiente →



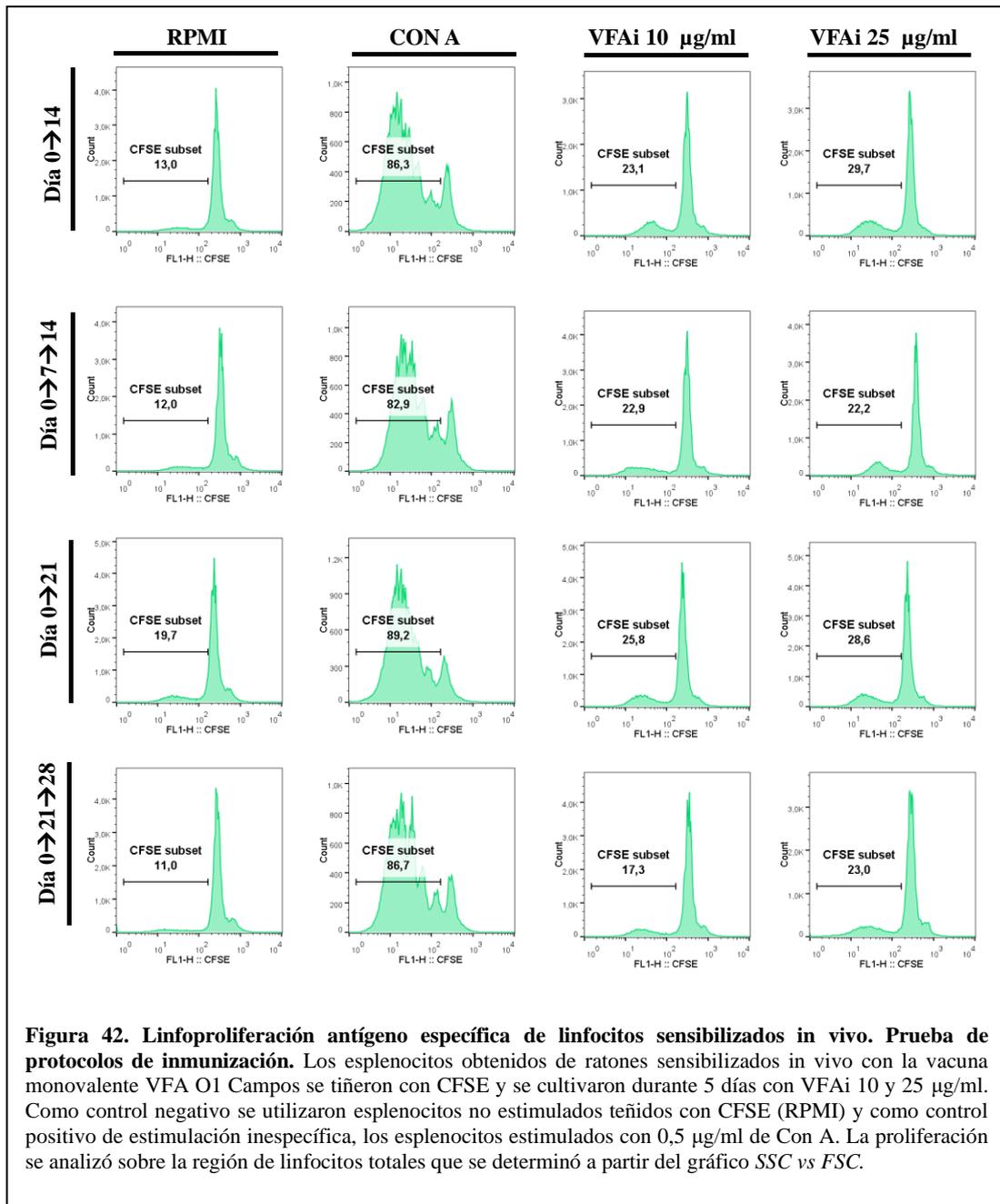
8.4 Anexo 4: Puesta a punto de la inmunización utilizando la vacuna comercial monovalente para la cepa VFA O1 Campos

Para la evaluación funcional de las VEs se decidió emplear un ensayo de linfoproliferación utilizando la técnica de dilución del colorante CFSE. Uno de los interrogantes era ver si las proteínas virales presentes en las VEs derivadas de CDs (que previamente habían estado en contacto con el antígeno vacunal) podían inducir una proliferación de las células inmunes. El diseño experimental planteado incluye el estudio de la proliferación sobre esplenocitos derivados tanto de animales vírgenes (que no estuvieron en contacto con el antígeno antes) como de esplenocitos derivados de animales previamente sensibilizados *in vivo*. Para la sensibilización *in vivo* realizamos un experimento de puesta a punto del plan de inmunización que se utilizó luego para la inmunización de ratones a partir de los cuales se obtuvieron los linfocitos sensibilizados. Basándonos en bibliografía, establecimos diferentes esquemas de dosis entre los días 0 y 21 (Gnazzo et al., 2020), en algunos esquemas de inmunización se añadió una dosis de refuerzo (*boost*) al día 7 o 21. En las inoculaciones se utilizó la vacuna comercial monovalente gentilmente cedida por el laboratorio Biogénesis Bagó, formulada con el VFA O1 Campos inactivado con BEI como fuente de antígeno. Para monitorear la respuesta generada por la vacuna se realizó la sangría de los animales y se midió el título de anticuerpos específicos por la técnica de ELISA. La presencia de anticuerpos específicos en el suero de los animales evidencia la estimulación del sistema inmune mediada por el antígeno vacunal. En la **Tabla 8** se muestran los títulos de anticuerpos obtenidos, a partir del *pool* de sueros correspondiente a cada protocolo de inmunización. Todos los protocolos realizados presentaron altos títulos (mayores a 4) de anticuerpos específicos y la implementación de una dosis de refuerzo a los días 7 o 21 no mejoró considerablemente dicha respuesta. En todos los casos se logró generar una respuesta inmune humoral con la inoculación de la vacuna comercial monovalente por vía i.p.

Tabla 8. Título de anticuerpos de los sueros de los ratones inmunizados con diferentes protocolos de inmunización

Plan de inmunización	Título de Ab
<i>Pool de suero 1: 0→14</i>	4,7
<i>Pool de suero 2: 0→7→14</i>	5,3
<i>Pool de suero 3: 0→21</i>	5,5
<i>Pool de suero 4: 0→21→28</i>	6,1

Luego de determinar que la inmunización generó una respuesta humoral específica, decidimos evaluar la inmunidad celular. Para ello utilizamos un pool de esplenocitos obtenidos de los bazo de los animales de cada protocolo de inmunización. Luego se marcaron las células utilizando el colorante CFSE y se registró la proliferación específica al día 5 de incubación. Como antígeno estimulante se utilizó el VFAi purificado, el mismo virus que está presente en la vacuna utilizada para la estimulación *in vivo*. En la **Figura 42** se puede observar que cerca del 20% de los linfocitos obtenidos a partir de todos los protocolos de inmunización registraron proliferación antígeno específica. El protocolo de inmunización en el cual se realizaba una única inoculación al día 0 y la respuesta se medía al día 14 fue seleccionado como el protocolo a seguir para los experimentos siguientes. Este esquema de inmunización permite desarrollar una buena respuesta tanto humoral como celular comparable al resto de los protocolos, pero con la ventaja de requerir menos tiempo y menor manipulación de los animales.



Bibliografía

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abaracón D, Giacometti H, M. J. (1979). *El uso de la etilenimina binaria (BEI) como inactivante de virus de la fiebre aftosa producido por diferentes técnicas semi-industriales*. Bol Cent Panam Fiebre Aftosa. 1979; 33-34: 1-5. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50110>
- Abrami, L., Brandi, L., Moayeri, M., Brown, M. J., Krantz, B. A., Leppla, S. H., & VanderGoot, F. G. (2013). Hijacking Multivesicular Bodies Enables Long-Term and Exosome-Mediated Long-Distance Action of Anthrax Toxin. *Cell Reports*, 5(4), 986–996. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.019>
- Abubakar, M., & Ahmed, A. (2017). *Interplay of foot and mouth disease virus with cell - mediated and humoral immunity of host*. June 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1002/rmv.1966>
- Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, S. P. (2013). Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (6th Editio, Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Admyre, C., Johansson, S. M., Paulie, S., & Gabrielsson, S. (2006). Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *European Journal of Immunology*, 36(7), 1772–1781. <https://doi.org/10.1002/eji.200535615>
- Ahmed, K. A., Munegowda, M. A., Xie, Y., & Xiang, J. (2008). *Intercellular Trogocytosis Plays an Important Role in Modulation of Immune Responses* (Vol. 5).
- Ahmed, R., & Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), 54–60. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.272.5258.54>
- Aiello, A., Giannessi, F., Percario, Z. A., & Affabris, E. (2020). An emerging interplay between extracellular vesicles and cytokines. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 51, 49–60. <https://doi.org/10.1016/J.CYTOGFR.2019.12.003>
- Aiello, S., Rocchetta, F., Longaretti, L., Faravelli, S., Todeschini, M., Cassis, L., Pezzuto, F., Tomasoni, S., Azzollini, N., Mister, M., Mele, C., Conti, S., Breno, M., Remuzzi, G., Noris, M., & Benigni, A. (2017). Extracellular vesicles derived from T regulatory cells suppress T cell proliferation and prolong allograft survival. *Scientific Reports*, 7(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08617-3>
- Akbar, N., Paget, D., & Choudhury, R. P. (2021). Extracellular Vesicles in Innate Immune Cell Programming. *Biomedicines* 2021, Vol. 9, Page 713, 9(7), 713. <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES9070713>
- Alcalá, P., Feliu, J. X., Arís, A., & Villaverde, A. (2001). Efficient accommodation of recombinant, foot-and-mouth disease virus RGD peptides to cell-surface integrins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 201–206. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5157>
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I., & Garland, A. J. M. (2003). The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of Comparative Pathology*, 129(1), 1–36. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(03)00041-0)
- Allan, R. S., Waithman, J., Bedoui, S., Jones, C. M., Villadangos, J. A., Zhan, Y., Lew, A. M., Shortman, K., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2006). Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity*, 25(1), 153–162. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.017>
- Amadori, M., Archetti, I. L., Verardi, R., & Berneri, C. (1992). Isolation of mononuclear cytotoxic cells from cattle vaccinated against foot-and-mouth disease. *Archives of Virology*, 122(3–4), 293–306. <https://doi.org/10.1007/BF01317191>
- Ambros, V., & Baltimore, D. (1980). Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *Journal of Biological Chemistry*, 255(14), 6739–6744.
- Ambros, Victor, Pettersson, R. F., & Baltimore, D. (1978). An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell*, 15(4), 1439–1446.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90067-3)

- Archetti, I. L., Amadori, M., Donn, A., Salt, J., & Lodetti, E. (1995). Detection of foot-and-mouth disease virus-infected cattle by assessment of antibody response in oropharyngeal fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 79–84. <https://doi.org/10.1128/JCM.33.1.79-84.1995>
- Bachmann, M. F., Kündig, T. M., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1997). Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without “memory T cells”? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(2), 640–645. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.2.640>
- Barnes, B. J., & Somerville, C. C. (2020). Modulating Cytokine Production via Select Packaging and Secretion From Extracellular Vesicles. *Frontiers in Immunology*, 11, 1040. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01040/BIBTEX>
- Barteling, S. J., & Melen, R. H. (1974). A simple method for the quantification of 140S particles of foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Archiv Fur Die Gesamte Virusforschung*, 45(4), 362–364. <https://doi.org/10.1007/BF01242879>
- Bautista, E. M., Ferman, G. S., & Golde, W. T. (2003). Induction of lymphopenia and inhibition of T cell function during acute infection of swine with foot and mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 92(1–2), 61–73. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(03\)00004-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(03)00004-7)
- Bautista, E. M., Ferman, G. S., Gregg, D., Brum, M. C. S., Grubman, M. J., & Golde, W. T. (2005). Constitutive Expression of Alpha Interferon by Skin Dendritic Cells Confers Resistance to Infection by Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*, 79(8), 4838–4847. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.8.4838-4847.2005>
- Bazzan, E., Tinè, M., Casara, A., Biondini, D., Semenzato, U., Cocconcelli, E., Balestro, E., Damin, M., Radu, C. M., Turato, G., Baraldo, S., Simioni, P., Spagnolo, P., Saetta, M., & Cosio, M. G. (2021). Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles’ Knowledge: From 1946 to Today. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/IJMS22126417>
- Belsham, G. J. (2009). Divergent picornavirus IRES elements. *Virus Research*, 139(2), 183–192. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.001>
- Bergtold, A., Desai, D. D., Gavhane, A., & Clynes, R. (2005). Cell surface recycling of internalized antigen permits dendritic cell priming of B cells. *Immunity*, 23(5), 503–514. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.09.013>
- Berinstein, A., Roivainen, M., Hovi, T., Mason, P. W., & Baxt, A. B. (1995). Antibodies to the vitronectin receptor (integrin alpha V beta 3) inhibit binding and infection of foot-and-mouth disease virus to cultured cells. *Journal of Virology*, 69(4), 2664–2666. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.4.2664-2666.1995>
- Beylerli, O., Gareev, I., Sufianov, A., Ilyasova, T., & Guang, Y. (2022). Long noncoding RNAs as promising biomarkers in cancer. *Non-Coding RNA Research*, 7(2), 66–70. <https://doi.org/10.1016/J.NCRNA.2022.02.004>
- Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F. J., & Schorey, J. S. (2007). Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*, 110(9), 3234–3244. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079152>
- Bidart, J., Mignaqui, A., Kornuta, C., Lupi, G., Gammella, M., Soria, I., Galarza, R., Ferella, A., Cardillo, S., Langellotti, C., Quattrocchi, V., Durocher, Y., Wigdorovitz, A., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2021). FMD empty capsids combined with the Immunostant Particle Adjuvant -ISPA or ISA206 induce protective immunity against foot and mouth disease virus. *Virus Research*, 297, 198339. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2021.198339>
- Bidart, Juan, Kornuta, C., Gammella, M., Gnazzo, V., Soria, I., Langellotti, C., Mongini, C., Galarza, R., Calvino, L., Lupi, G., Quattrocchi, V., Marcipar, I., & Zamorano, P. (2020). A New Cage-Like Particle Adjuvant Enhances Protection of Foot-and-Mouth Disease Vaccine. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 396. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00396/BIBTEX>

- Bielska, E., & May, R. C. (2019). Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 52, pp. 90–99). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.007>
- Birge, R. B., Boeltz, S., Kumar, S., Carlson, J., Wanderley, J., Calianese, D., Barcinski, M., Brekken, R. A., Huang, X., Hutchins, J. T., Freimark, B., Empig, C., Mercer, J., Schroit, A. J., Schett, G., & Herrmann, M. (2016). Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 23, Issue 6, pp. 962–978). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.11>
- Björck, P. (2001). Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*, 98(13), 3520–3526. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V98.13.3520>
- Blackwell, J. H. (1980). Internationalism and Survival of Foot-and-Mouth Disease Virus in Cattle and Food Products. *Journal of Dairy Science*, 63(6), 1019–1030. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(80\)83040-2](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(80)83040-2)
- Blanchard, N., Lankar, D., Faure, F., Regnault, A., Dumont, C., Raposo, G., & Hivroz, C. (2002). TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3235–3241. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3235>
- Bobrie, A., & Théry, C. (2013). Exosomes and communication between tumours and the immune system: are all exosomes equal? *Biochemical Society Transactions*, 41(1), 263–267. <https://doi.org/10.1042/BST20120245>
- Boilard, E. (2018). Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. *Journal of Lipid Research*, 59(11), 2037–2046. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084640>
- Bonaccorsi, I., Pezzino, G., Morandi, B., & Ferlazzo, G. (2014). Drag cells in immunity: Plasmacytoid DCs dress up as cancer cells. *OncoImmunology*, 3(3), e27897-1-e27897-2. <https://doi.org/10.4161/onci.28184>
- Booth, A. M., Fang, Y., Fallon, J. K., Yang, J. M., Hildreth, J. E. K., Gould, S. J., Sandefur, S., & Varthakavi, V. (2006). Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, 172(6), 923–935. <https://doi.org/10.1083/jcb.200508014>
- Borca, M. V., Fernández, F. M., Sadir, A. M., Braun, M., & Schudel, A. A. (1986a). Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine experimental model: effective thymus-independent primary and secondary reaction. *Immunology*, 59(2), 261–267.
- Borca, M. V., Garmendia, A. E., Baxt, B., Moore, D. M., Srikumaran, S., & Morgan, D. O. (1993). Cross-reactive idiotopes among anti-foot and mouth disease virus neutralizing antibodies. *Immunology*, 79(3), 368–374.
- Borges, F. T., Melo, S. A., Özdemir, B. C., Kato, N., Revuelta, I., Miller, C. A., Gattone, V. H., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2013). TGF-β1-Containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology*, 24(3), 385–392. <https://doi.org/10.1681/ASN.2012101031>
- Borrego, B., Blanco, E., Rodríguez Pulido, M., Mateos, F., Lorenzo, G., Cardillo, S., Smitsaart, E., Sobrino, F., & Sáiz, M. (2017). Combined administration of synthetic RNA and a conventional vaccine improves immune responses and protection against foot-and-mouth disease virus in swine. *Antiviral Research*, 142, 30–36. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.03.009>
- Boysen, P., & Storset, A. K. (2009). Bovine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 130(3–4), 163–177. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2009.02.017>
- Brasel, K., Smedt, T. De, Smith, J. L., & Maliszewski, C. R. (2014). *bone marrow cultures Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand – supplemented bone marrow cultures*. 96(9), 3029–3039.
- Bucio-López, L., Piñón-Zárate, G., Jarquín-Yáñez, K., Hernández-Téllez, B., & Herrera-Enríquez, M. Á. (2018). Phenotype of Exosomes Derived from Dendritic Cells Treated with Different Stimuli. *J Immunol Clin Res*, 5(1), 1046.
- Buck, A. H., Coakley, G., Simbari, F., McSorley, H. J., Quintana, J. F., Le Bihan, T., Kumar, S., Abreu-

- Goodger, C., Lear, M., Harcus, Y., Ceroni, A., Babayan, S. A., Blaxter, M., Ivens, A., & Maizels, R. M. (2014). Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. *Nature Communications*, 5(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms6488>
- Buschow, S. I., Nolte-’t Hoen, E. N. M., van Niel, G., Pols, M. S., ten Broeke, T., Lauwen, M., Ossendorp, F., Melief, C. J. M., Raposo, G., Wubbolts, R., Wauben, M. H. M., & Stoorvogel, W. (2009). MHC II In dendritic cells is targeted to lysosomes or t cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic*, 10(10), 1528–1542. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00963.x>
- Buzás, E. I., Tóth, E., Sódar, B. W., & Szabó-Taylor, K. (2018). Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Seminars in Immunopathology*, 40(5), 453–464. <https://doi.org/10.1007/S00281-018-0682-0/FIGURES/2>
- Cai, Z., Zhang, W., Yang, F., Yu, L., Yu, Z., Pan, J. H., Wang, L., Cao, X., & Wang, J. (2012). Immunosuppressive exosomes from TGF- β 1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells. In *Cell Research* (Vol. 22, Issue 3, pp. 607–610). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.196>
- Campana, S., De Pasquale, C., Carrega, P., Ferlazzo, G., & Bonaccorsi, I. (2015). Cross-dressing: An alternative mechanism for antigen presentation. In *Immunology Letters* (Vol. 168, Issue 2, pp. 349–354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.11.002>
- Cañas, J. A., Sastre, B., Mazzeo, C., Fernández-Nieto, M., Rodrigo-Muñoz, J. M., González-Guerra, A., Izquierdo, M., Barranco, P., Quirce, S., Sastre, J., & del Pozo, V. (2017). Exosomes from eosinophils autoregulate and promote eosinophil functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5), 1191–1199. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ab0516-233rr>
- Cañas, M.-A., Fábrega, M.-J., Giménez, R., Badía, J., & Baldomà, L. (2018). Outer Membrane Vesicles From Probiotic and Commensal Escherichia coli Activate NOD1-Mediated Immune Responses in Intestinal Epithelial Cells. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR), 498. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00498>
- Cancro, M. P., & Tomayko, M. M. (2021). Memory B cells and plasma cells: The differentiative continuum of humoral immunity. *Immunological Reviews*, 303(1), 72–82. <https://doi.org/10.1111/IMR.13016>
- Cantrell, D. (2015). Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018788>
- Cerutti, A., Cols, M., & Puga, I. (2013). Marginal zone B cells: Virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 13, Issue 2, pp. 118–132). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1038/nri3383>
- Chen, G., Huang, A. C., Zhang, W., Zhang, G., Wu, M., Xu, W., Yu, Z., Yang, J., Wang, B., Sun, H., Xia, H., Man, Q., Zhong, W., Antelo, L. F., Wu, B., Xiong, X., Liu, X., Guan, L., Li, T., ... Guo, W. (2018b). Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*, 560(7718), 382–386. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>
- Cheng, L., Wang, Y., & Huang, L. (2017). Exosomes from M1-Polarized Macrophages Potentiate the Cancer Vaccine by Creating a Pro-inflammatory Microenvironment in the Lymph Node. *Molecular Therapy*, 25(7), 1665–1675. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.02.007>
- Cheng, Y., & Schorey, J. S. (2020). The function and therapeutic use of exosomes in bacterial infections. In *Exosomes* (pp. 123–146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816053-4.00006-7>
- Childerstone, A. J., Cedillo-Baron, L., Foster-Cuevas, M., & Parkhouse, R. M. E. (1999). Demonstration of bovine CD8+ T cell responses to foot-and-mouth disease virus. *Journal of General Virology*, 80(3), 663–669. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-3-663/CITE/REFWORKS>
- Cho, K. S., Kang, S. A., Kim, S. D., Mun, S. J., Yu, H. S., & Roh, H. J. (2019). Dendritic cells and M2 macrophage play an important role in suppression of Th2-mediated inflammation by adipose stem cells-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Research*, 39, 101500. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2019.101500>
- Choi, D. S., Kim, D. K., Kim, Y. K., & Ghoo, Y. S. (2013). Proteomics, transcriptomics and lipidomics of

- exosomes and ectosomes. *PROTEOMICS*, 13(10–11), 1554–1571. <https://doi.org/10.1002/PMIC.201200329>
- Chugh, P. E., Sin, S. H., Ozgur, S., Henry, D. H., Menezes, P., Griffith, J., Eron, J. J., Damania, B., & Dittmer, D. P. (2013). Systemically Circulating Viral and Tumor-Derived MicroRNAs in KSHV-Associated Malignancies. *PLoS Pathogens*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003484>
- Cinamon, G., Zachariah, M. A., Lam, O. M., Foss, F. W., & Cyster, J. G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nature Immunology*, 9(1), 54–62. <https://doi.org/10.1038/ni1542>
- Cocozza, F., Menay, F., Tsacalian, R., Elisei, A., Sampedro, P., Soria, I., Waldner, C., Gravisaco, M. J., & Mongini, C. (2019). Cyclophosphamide enhances the release of tumor exosomes that elicit a specific immune response in vivo in a murine T-cell lymphoma. *Vaccine*, 37(12), 1565–1576. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.004>
- Colino, J., & Snapper, C. M. (2006). Exosomes from Bone Marrow Dendritic Cells Pulsed with Diphtheria Toxoid Preferentially Induce Type 1 Antigen-Specific IgG Responses in Naive Recipients in the Absence of Free Antigen. *The Journal of Immunology*, 177(6), 3757–3762. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3757>
- Collen, T., Pullen, L., & Doel, T. R. (1989). T cell-dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *The Journal of General Virology*, 70 (Pt 2)(2), 395–403. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-2-395>
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L. F., Théry, C., & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 24), 5553–5565. <https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
- Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 30, 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
- Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J. J., Schifflers, R. M., & Vader, P. (2017). Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *Journal of Controlled Release*, 266, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.019>
- Cronemberger-Andrade, A., Aragão-França, L., de Araujo, C. F., Rocha, V. J., Borges-Silva, M. da C., Figueiras, C. P., Oliveira, P. R., de Freitas, L. A. R., Veras, P. S. T., & Pontes-de-Carvalho, L. (2014). Extracellular Vesicles from Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003161>
- Curry, S., Abrams, C. C., Fry, E., Crowther, J. C., Belsham, G. J., Stuart, D. I., & King, A. M. (1995). Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *Journal of Virology*, 69(1), 430–438. <https://doi.org/10.1128/jvi.69.1.430-438.1995>
- Curry, S., Fry, E., Blakemore, W., Abu-Ghazaleh, R., Jackson, T., King, A., Lea, S., Newman, J., & Stuart, D. (1997). Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology*, 71(12), 9743–9752. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.12.9743-9752.1997>
- Dai, S., Wan, T., Wang, B., Zhou, X., Xiu, F., Chen, T., Wu, Y., & Cao, X. (2005). More efficient induction of HLA-A*0201-restricted and carcinoembryonic antigen (CEA) - Specific CTL response by immunization with exosomes prepared from heat-stressed CEA-positive tumor cells. *Clinical Cancer Research*, 11(20), 7554–7563. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0810>
- Dalli, J., Montero-Melendez, T., Norling, L. V., Yin, X., Hinds, C., Haskard, D., Mayr, M., & Perretti, M. (2013). Heterogeneity in neutrophil microparticles reveals distinct proteome and functional properties. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(8), 2205–2219. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.028589>
- De Souza, W., & Barrias, E. S. (2020). Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. In *Parasitology Research*

- (pp. 1–19). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06691-7>
- De Toro, J., Herschlik, L., Waldner, C., & Mongini, C. (2015). Emerging roles of exosomes in normal and pathological conditions: new insights for diagnosis and therapeutic applications. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2015.00203>
- Denzer, K., van Eijk, M., Kleijmeer, M. J., Jakobson, E., de Groot, C., & J. Geuze, H. (2000). Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *The Journal of Immunology*, 165(3), 1259–1265. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1259>
- Deo, P., Chow, S. H., Hay, I. D., Kleinfeld, O., Costin, A., Elgass, K. D., Jiang, J.-H., Ramm, G., Gabriel, K., Dougan, G., Lithgow, T., Heinz, E., & Naderer, T. (2018). Outer membrane vesicles from *Neisseria gonorrhoeae* target PorB to mitochondria and induce apoptosis. *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006945>
- Díaz-San Segundo, F., Weiss, M., Perez-Martín, E., Koster, M. J., Zhu, J., Grubman, M. J., & De los Santos, T. (2011). Antiviral activity of bovine type III interferon against foot-and-mouth disease virus. *Virology*, 413(2), 283–292. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.02.023>
- Dintzis, H. M., Dintzis, R. Z., & Vogelstein, B. (1976). Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(10), 3671–3675. <https://doi.org/10.1073/PNAS.73.10.3671>
- Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genetics*, 15(10), e1008271. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008271>
- Donaldson, A. I., Ferris, N. P., & Wells, G. A. H. (1984). Experimental foot-and-mouth disease in fattening pigs, sows and piglets in relation to outbreaks in the field. *The Veterinary Record*, 115(20), 509–512. <https://doi.org/10.1136/VR.115.20.509>
- Donaldson, A. I., & Kitching, R. P. (1989). Transmission of foot-and-mouth disease by vaccinated cattle following natural challenge. *Research in Veterinary Science*, 46(1), 9–14. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)31109-3](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)31109-3)
- Dong, Y., Arif, A. A., Poon, G. F. T., Hardman, B., Dosanjh, M., & Johnson, P. (2016). Generation and Identification of GM-CSF Derived Alveolar-like Macrophages and Dendritic Cells From Mouse Bone Marrow. *Journal of Visualized Experiments*, 112, 1–7. <https://doi.org/10.3791/54194>
- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Driedonks, T. A. P., van der Grein, S. G., Ariyurek, Y., Buermans, H. P. J., Jekel, H., Chow, F. W. N., Wauben, M. H. M., Buck, A. H., 't Hoen, P. A. C., & Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2018). Immune stimuli shape the small non-coding transcriptome of extracellular vesicles released by dendritic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(20), 3857–3875. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2842-8>
- Drurey, C., & Maizels, R. M. (2021). Helminth extracellular vesicles: Interactions with the host immune system. *Molecular Immunology*, 137, 124–133. <https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2021.06.017>
- Dupont, M., Souriant, S., Lugo-Villarino, G., Maridonneau-Parini, I., & Vérollet, C. (2018). Tunneling nanotubes: Intimate communication between myeloid cells. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue JAN, p. 43). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00043>
- Dus Santos, M. J., Carrillo, C., Ardila, F., Ríos, R. D., Franzone, P., Piccone, M. E., Wigdorovitz, A., & Borca, M. V. (2005). Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine*, 23(15), 1838–1843. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2004.11.014>
- Dutta, D., & Donaldson, J. G. (2015). Rab and Arf G proteins in endosomal trafficking. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 130, pp. 127–138). Academic Press Inc.
- Eblé, P. L., Bouma, A., Weerdmeester, K., Stegeman, J. A., & Dekker, A. (2007). Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine*, 25(6), 1043–1054.

<https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2006.09.066>

- Eguchi, S., Takefuji, M., Sakaguchi, T., Ishihama, S., Mori, Y., Tsuda, T., Takikawa, T., Yoshida, T., Ohashi, K., Shimizu, Y., Hayashida, R., Kondo, K., Bando, Y. K., Ouchi, N., & Murohara, T. (2019). Cardiomyocytes capture stem cell-derived, anti-apoptotic microRNA-214 via clathrin-mediated endocytosis in acute myocardial infarction. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(31), 11665–11674. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007537>
- Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C., & Schifferli, J. A. (2008). Polymorphonuclear Neutrophil-Derived Ectosomes Interfere with the Maturation of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *180*(2), 817–824. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.2.817>
- Eken, C., Sadallah, S., Martin, P. J., Treves, S., & Schifferli, J. A. (2013). Ectosomes of polymorphonuclear neutrophils activate multiple signaling pathways in macrophages. *Immunobiology*, *218*(3), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.05.021>
- EL Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. a. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *12*(5), 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>
- Ellard, F. M., Drew, J., Blakemore, W. E., Stuart, D. I., & King, A. M. Q. (1999). Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *Journal of General Virology*, *80*(8), 1911–1918. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-8-1911>
- Erdogan, M., Caner, A., Namlises, D., Sadiqova, A., Nalbantsoy, A., Oltulu, F., Yigitturk, G., Toz, S., Gunduz, C., Ozbel, Y., & Haydaroglu, A. (2019). Parasites and immunotherapy: Immunostimulatory effect of *Leishmania* spp. in cancer treatment. *European Journal of Cancer*, *110*, S33. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.01.098>
- Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-108>
- Fader, Claudio M., & Colombo, M. I. (2006). Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy*, *2*(2), 122–125. <https://doi.org/10.4161/auto.2.2.2350>
- Fader, Claudio M., Sánchez, D., Furlán, M., & Colombo, M. I. (2008). Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells. *Traffic*, *9*(2), 230–250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00677.x>
- Fader, Claudio Marcelo, Sánchez, D. G., Mestre, M. B., & Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1793*(12), 1901–1916. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.09.011>
- Fais, S. (2013). NK cell-released exosomes. *OncoImmunology*, *2*(1), e22337. <https://doi.org/10.4161/onci.22337>
- Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, *11*(5), 675–687.
- Fernández, F. M., Borca, M. V., Sadir, A. M., Fondevila, N., Mayo, J., & Schudel, A. A. (1986). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response of adult mice. *Veterinary Microbiology*, *12*(1), 15–24.
- Ferris, N. P., & Donaldson, A. I. (1980). The influence of various chemical additives on the survival of vesicular exanthema virus in aerosols. *Journal of General Virology*, *48*(2), 411–415. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-48-2-411/CITE/REFWORKS>
- Fischer, S., & Deindl, E. (2021). Characterization of RNA in Extracellular Vesicles. *Applied Sciences* *2021*, Vol. 11, Page 7520, *11*(16), 7520. <https://doi.org/10.3390/AP11167520>
- Fitzgerald, W., Freeman, M. L., Lederman, M. M., Vasilieva, E., Romero, R., & Margolis, L. (2018). A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles. *8*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27190-x>
- Fitzner, D., Schnaars, M., Van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch,

- U. K., & Simons, M. (2011). Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of Cell Science*, 124(3), 447–458. <https://doi.org/10.1242/jcs.074088>
- Flanegan, J. B., Petterson, R. F., Ambros, V., Hewlett, N. J., & Baltimore, D. (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5' terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), 961–965. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.961>
- Fleming, A., Sampey, G., Chung, M.-C., Bailey, C., van Hoek, M. L., Kashanchi, F., & Hakami, R. M. (2014). The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathogens and Disease*, 71(2), 109–120. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12135>
- Fortier, M., Kent, S., Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., Luheshi, G. N., Kent, S., Ashdown, H., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2004). *The viral mimic , polyinosinic : polycytidylic acid , induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism.* 3.
- Fox, A. S., Duggleby, W. F., Gelbart, W. M., & Yoon, S. B. (1970). DNA-induced transformation in *Drosophila*: evidence for transmission without integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67(4), 1834–1838. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.4.1834>
- Fox, A. S., & Yoon, S. B. (1970). DNA-induced transformation in *Drosophila*: locus-specificity and the establishment of transformed stocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 67(3), 1608–1615. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1608>
- Fox, A. S., Yoon, S. B., & Gelbart, W. M. (1971). DNA-induced transformation in *Drosophila*: genetic analysis of transformed stocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(2), 342–346. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.2.342>
- Gao, K., Jin, J., Huang, C., Li, J., Luo, H., Li, L., Huang, Y., & Jiang, Y. (2019). Exosomes derived from septic mouse serum modulate immune responses via exosome-associated cytokines. *Frontiers in Immunology*, 10(JULY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01560>
- Gao, W., Liu, H., Yuan, J., Wu, C., Huang, D., Ma, Y., Zhu, J., Ma, L., Guo, J., Shi, H., Zou, Y., & Ge, J. (2016). Exosomes derived from mature dendritic cells increase endothelial inflammation and atherosclerosis via membrane TNF- α mediated NF- κ B pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(12), 2318–2327. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12923>
- Gao, X. M., Zou, X. Y., & Yue, L. (2020). Mediated pathways of exosomes uptake by stem cells of apical papilla. *Beijing Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Peking University. Health Sciences*, 52(1), 43–50.
- Gao, Y., Sun, S. Q., & Guo, H. C. (2016). Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology Journal* 2016 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12985-016-0561-Z>
- Gao, Z., Pang, B., Li, J., Gao, N., Fan, T., & Li, Y. (2021). Emerging Role of Exosomes in Liquid Biopsy for Monitoring Prostate Cancer Invasion and Metastasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1016. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.679527/BIBTEX>
- García-Flores, M., Sánchez-López, C. M., Ramírez-Calvo, M., Fernández-Serra, A., Marcilla, A., & López-Guerrero, J. A. (2021). Isolation and characterization of urine microvesicles from prostate cancer patients: different approaches, different visions. *BMC Urology*, 21(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12894-021-00902-8/FIGURES/5>
- Garzetti, L., Menon, R., Finardi, A., Bergami, A., Sica, A., Martino, G., Comi, G., Verderio, C., Farina, C., & Furlan, R. (2014). Activated macrophages release microvesicles containing polarized M1 or M2 mRNAs. *Journal of Leukocyte Biology*, 95(5), 817–825. <https://doi.org/10.1189/jlb.0913485>
- Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J. C., & Schifferli, J. A. (2003). Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental Cell Research*, 285(2), 243–257. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00055-7)
- Gebauer, F., De, J. C., Torre, L. A., Gomes, I., Mateu, M. G., Barahona, H., Tiraboschi, B., Bergmann, I., Auge, P., Mello, D. E., & Domingo, E. (1988). Rapid selection of genetic and antigenic variants

- of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *Journal of Virology*, 62(6), 2041–2049. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.6.2041-2049.1988>
- Gehrmann, U., Hiltbrunner, S., Näslund, T. I., & Gabrielsson, S. (2013). Potentiating antitumor immunity with α GC-loaded exosomes. *Oncology*, 2(10), 8–10. <https://doi.org/10.4161/onci.26261>
- Gerdes, H. H., Rustom, A., & Wang, X. (2013). Tunneling nanotubes, an emerging intercellular communication route in development. In *Mechanisms of Development* (Vol. 130, Issues 6–8, pp. 381–387). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2012.11.006>
- Gezer, U., Özgür, E., Cetinkaya, M., Isin, M., & Dalay, N. (2014). Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biology International*, 38(9), 1076–1079. <https://doi.org/10.1002/cbin.10301>
- Gibson, C. F., & Donaldson, A. I. (1986). Exposure of sheep to natural aerosols of foot-and-mouth disease virus. *Research in Veterinary Science*, 41(1), 45–49. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)30570-8](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)30570-8)
- Giri, P. K., Kruh, N. A., Dobos, K. M., & Schorey, J. S. (2010). Proteomic analysis identifies highly antigenic proteins in exosomes from *M. tuberculosis*-infected and culture filtrate protein-treated macrophages. *PROTEOMICS*, 10(17), 3190–3202. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900840>
- Giri, P. K., & Schorey, J. S. (2008). Exosomes derived from *M. bovis* BCG infected macrophages activate antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, 3(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002461>
- Glassman, F. Y., Dingman, R., Yau, H. C., & Balu-Iyer, S. V. (2020). Biological Function and Immunotherapy Utilizing Phosphatidylserine-based Nanoparticles. In *Immunological Investigations*. Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/08820139.2020.1738456>
- Gnazzo, V., Quattrocchi, V., Soria, I., Pereyra, E., Langellotti, C., Pedemonte, A., Lopez, V., Marangunic, L., & Zamorano, P. (2020). Mouse model as an efficacy test for foot-and-mouth disease vaccines. *Transboundary and Emerging Diseases*, tbed.13591. <https://doi.org/10.1111/tbed.13591>
- Gonda, A., Kabagwira, J., Senthil, G. N., & Wall, N. R. (2019b). Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis. In *Molecular Cancer Research* (Vol. 17, Issue 2, pp. 337–347). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0891>
- Gorelik, L., Cutler, A. H., Thill, G., Miklasz, S. D., Shea, D. E., Ambrose, C., Bixler, S. A., Su, L., Scott, M. L., & Kalled, S. L. (2004). Cutting Edge: BAFF Regulates CD21/35 and CD23 Expression Independent of Its B Cell Survival Function. *The Journal of Immunology*, 172(2), 762–766. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.2.762>
- Gould, S. J., Booth, A. M., & Hildreth, J. E. K. (2003). The Trojan exosome hypothesis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 100, Issue 19, pp. 10592–10597). National Academy of Sciences. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831413100>
- Gould, S. J., & Raposo, G. (2013). As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 3–5. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20389>
- Graner, M. W. (2018). Extracellular Vesicles as Vehicles of B Cell Antigen Presentation : In *Diagnostic and Therapeutic Applications of Exosomes in Cancer*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812774-2.00018-3>
- Grant, C. F. J., Carr, B. V., Singanallur, N. B., Morris, J., Gubbins, S., Hudelet, P., Ilott, M., Charreyre, C., Vosloo, W., & Charleston, B. (2016). The B-cell response to foot-and-mouth-disease virus in cattle following vaccination and live-virus challenge. *Journal of General Virology*, 97(9), 2201–2209. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000517>
- Grasseau, A., Boudigou, M., Le Pottier, L., Chriti, N., Cornec, D., Pers, J. O., Renaudineau, Y., & Hillion, S. (2020). Innate B Cells: the Archetype of Protective Immune Cells. In *Clinical Reviews in Allergy and Immunology* (Vol. 58, Issue 1, pp. 92–106). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08748-7>
- Grauer, O., Wohlleben, G., Seubert, S., Weishaupt, A., Kämpgen, E., & Gold, R. (2002). Analysis of

- maturation states of rat bone marrow-derived dendritic cells using an improved culture technique. *Histochemistry and Cell Biology*, 117(4), 351–362. <https://doi.org/10.1007/S00418-002-0384-4>
- Groot Kormelink, T., Arkesteijn, G. J. A., van de Lest, C. H. A., Geerts, W. J. C., Goerdayal, S. S., Altelaar, M. A. F., Redegeld, F. A., Nolte-'t Hoen, E. N. M., & Wauben, M. H. M. (2016). Mast Cell Degranulation Is Accompanied by the Release of a Selective Subset of Extracellular Vesicles That Contain Mast Cell-Specific Proteases. *The Journal of Immunology*, 197(8), 3382–3392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600614>
- Groot Kormelink, T., Mol, S., de Jong, E. C., & Wauben, M. H. M. (2018). The role of extracellular vesicles when innate meets adaptive. In *Seminars in Immunopathology* (Vol. 40, Issue 5, pp. 439–452). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0681-1>
- Grubman, M. J., & Baxt, B. (2004). Foot-and-Mouth Disease. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 17, Issue 2, pp. 465–493). Clin Microbiol Rev. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.465-493.2004>
- Gudbergsson, J. M., & Johnsen, K. B. (2019). Exosomes and autophagy: rekindling the vesicular waste hypothesis. In *Journal of Cell Communication and Signaling* (Vol. 13, Issue 4, pp. 443–450). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12079-019-00524-8>
- Gulbahar, M. Y., Davis, W. C., Guvenc, T., Yarim, M., Parlak, U., & Kabak, Y. B. (2007). Myocarditis associated with foot-and-mouth disease virus type O in lambs. *Veterinary Pathology*, 44(5), 589–599. <https://doi.org/10.1354/VP.44-5-589>
- Guo, H. C., Sun, S. Q., Jin, Y., Yang, S. L., Wei, Y. Q., Sun, D. H., Yin, S. H., Ma, J. W., Liu, Z. X., Guo, J. H., Luo, J. X., Yin, H., Liu, X. T., & Liu, D. X. (2013). Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in *Escherichia coli* induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle. *Veterinary Research*, 44(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-48/FIGURES/5>
- Guzman, E., Hope, J., Taylor, G., Smith, A. L., Cubillos-Zapata, C., & Charleston, B. (2014). Bovine $\gamma\delta$ T Cells Are a Major Regulatory T Cell Subset. *The Journal of Immunology*, 193(1), 208–222. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303398>
- Guzman, E., Taylor, G., Charleston, B., & Ellis, S. A. (2010). Induction of a Cross-Reactive CD8 + T Cell Response following Foot-and-Mouth Disease Virus Vaccination. *Journal of Virology*, 84(23), 12375–12384. <https://doi.org/10.1128/JVI.01545-10/ASSET/6D4B1697-DOC2-4995-8093-2D503D27E189/ASSETS/GRAPHIC/ZJV9990939400009.JPEG>
- Guzylack-Piriou, L., Bergamin, F., Gerber, M., McCullough, K. C., & Summerfield, A. (2006). Plasmacytoid dendritic cell activation by foot-and-mouth disease virus requires immune complexes. *European Journal of Immunology*, 36(7), 1674–1683. <https://doi.org/10.1002/EJI.200635866>
- Habiela, M., Seago, J., Perez-Martin, E., Waters, R., Windsor, M., Salguero, F. J., Wood, J., Charleston, B., & Juleff, N. (2014). Laboratory animal models to study foot-and-mouth disease: A review with emphasis on natural and vaccine-induced immunity. *Journal of General Virology*, 95(2014), 2329–2345. <https://doi.org/10.1099/vir.0.068270-0>
- Hamblin, C., Kitching, R. P., Donaldson, A. I., Crowther, J. R., & Barnett, I. T. R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus: III. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiology & Infection*, 99(3), 733–744. <https://doi.org/10.1017/S0950268800066590>
- Han, S. C., Guo, H. C., & Sun, S. Q. (2015). Three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus and its biological functions. In *Archives of Virology* (Vol. 160, Issue 1). Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2278-x>
- Han, S. C., Guo, H. C., Sun, S. Q., Jin, Y., Wei, Y. Q., Feng, X., Yao, X. P., Cao, S. Z., Xiang Liu, D., & Liu, X. T. (2016). Productive Entry of Foot-and-Mouth Disease Virus via Macropinocytosis Independent of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.1038/srep19294>
- Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 97(2), 329–339. <https://doi.org/10.1083/jcb.97.2.329>

- Harding, Clifford V., Heuser, J. E., & Stahl, P. D. (2013). Exosomes: Looking back three decades and into the future. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 367–371). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212113>
- Harwood, L. J., Gerber, H., Sobrino, F., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2008b). Dendritic Cell Internalization of Foot-and-Mouth Disease Virus: Influence of Heparan Sulfate Binding on Virus Uptake and Induction of the Immune Response. *Journal of Virology*, *82*(13), 6379–6394. <https://doi.org/10.1128/jvi.00021-08>
- Haydon, D. T., Bastos, A. D., Knowles, N. J., & Samuel, A. R. (2001). Evidence for positive selection in foot-and-mouth disease virus capsid genes from field isolates. *Genetics*, *157*(1), 7–15. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/157.1.7>
- He, X., Feng Guan, ·, & Lei, · Lei. (2022). Structure and function of glycosphingolipids on small extracellular vesicles. *Glycoconjugate Journal* 2022, 1–9. <https://doi.org/10.1007/S10719-022-10052-0>
- Henry, C. M., Sullivan, G. P., Clancy, D. M., Afonina, I. S., Kulms, D., & Martin, S. J. (2016). Neutrophil-Derived Proteases Escalate Inflammation through Activation of IL-36 Family Cytokines. *Cell Reports*, *14*(4), 708–722. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.072>
- Hiasa, M., Abe, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Takeuchi, K., Kagawa, K., Yata, K., Hashimoto, T., Ozaki, S., Asaoka, K., Tanaka, E., Moriyama, K., & Matsumoto, T. (2009). GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood*, *114*(20), 4517–4526. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-04-215020>
- Hindiyeh, M., Li, Q.-H., Basavappa, R., Hogle, J. M., & Chow, M. (1999). Poliovirus Mutants at Histidine 195 of VP2 Do Not Cleave VP0 into VP2 and VP4. *Journal of Virology*, *73*(11), 9072–9079. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.11.9072-9079.1999>
- Horibe, S., Tanahashi, T., Kawauchi, S., Murakami, Y., & Rikitake, Y. (2018). Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*, *18*(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3958-1>
- Hoshina, S., Sekizuka, T., Kataoka, M., Hasegawa, H., Hamada, H., Kuroda, M., & Katano, H. (2016). Profile of exosomal and intracellular microRNA in gamma-herpesvirus-infected lymphoma cell lines. *PLoS ONE*, *11*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162574>
- Hüsser, L., Alves, M. P., Ruggli, N., & Summerfield, A. (2011). Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. *Virus Research*, *159*(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.005>
- Hyenne, V., Labouesse, M., & Goetz, J. G. (2018). The Small GTPase Ral orchestrates MVB biogenesis and exosome secretion. In *Small GTPases* (Vol. 9, Issue 6, pp. 445–451). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1251378>
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., & Steinman, R. M. (1992). Generation of Large Numbers of Dendritic Cells from Mouse Bone Marrow Cultures Supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *Journal of Experimental Medicine*, *176*(December), 1693–1702.
- Inoue, H., Matsuzaki, Y., Tanaka, A., Hosoi, K., Ichimura, K., Arasaki, K., Wakana, Y., Asano, K., Tanaka, M., Okuzaki, D., Yamamoto, A., Tani, K., & Tagaya, M. (2015). γ -SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. *Journal of Cell Science*, *128*(15), 2781–2794. <https://doi.org/10.1242/jcs.158634>
- Isnard, A., Shio, M. T., & Olivier, M. (2012). Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. In *Frontiers in cellular and infection microbiology* (Vol. 2, p. 72). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00072>
- Jackson, T., Ellard, F. M., Ghazaleh, R. A., Brookes, S. M., Blakemore, W. E., Corteyn, A. H., Stuart, D. I., Newman, J. W., & King, A. M. (1996). Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *Journal of Virology*, *70*(8), 5282–5287. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.8.5282-5287.1996>

- Jackson, Terry, Clark, S., Berryman, S., Burman, A., Cambier, S., Mu, D., Nishimura, S., & King, A. M. Q. (2004). Integrin $\alpha\beta 8$ Functions as a Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus: Role of the β -Chain Cytodomain in Integrin-Mediated Infection. *Journal of Virology*, 78(9), 4533–4540. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4533-4540.2004>
- Jackson, Terry, Mould, A. P., Sheppard, D., & King, A. M. Q. (2002). Integrin $\alpha\beta 1$ Is a Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*, 76(3), 935–941. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.3.935-941.2002>
- Jackson, Terry, Sheppard, D., Denyer, M., Blakemore, W., & King, A. M. Q. (2000). The Epithelial Integrin $\alpha\beta 6$ Is a Receptor for Foot-and-Mouth Disease Virus. *Journal of Virology*, 74(11), 4949–4956. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.11.4949-4956.2000>
- Jacobson, M. F., & Baltimore, D. (1968). Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(1), 77–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.1.77>
- Jenni Punt, Sharon Stranford, Patricia Jones, J. A. O. (2018). *KUBY IMMUNOLOGY* (2018 Macmillan Learning (ed.); 8th ed.).
- Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of Exosome Composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>
- Johnstone, R. M., Adam, M., Hammonds, J. R., & Turbide, C. (1987). *Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation*. 262(1), 9412–9420.
- Joly, E., & Hudrisier, D. (2003). What is trogocytosis and what is its purpose? In *Nature Immunology* (Vol. 4, Issue 9, p. 815). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ni0903-815>
- Jong, A. Y., Wu, C. H., Li, J., Sun, J., Fabbri, M., Wayne, A. S., & Seeger, R. C. (2017). Large-scale isolation and cytotoxicity of extracellular vesicles derived from activated human natural killer cells. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1294368>
- Juleff, N., Windsor, M., Lefevre, E. A., Gubbins, S., Hamblin, P., Reid, E., McLaughlin, K., Beverley, P. C. L., Morrison, I. W., & Charleston, B. (2009). Foot-and-Mouth Disease Virus Can Induce a Specific and Rapid CD4+ T-Cell-Independent Neutralizing and Isotype Class-Switched Antibody Response in Naïve Cattle. *Journal of Virology*, 83(8), 3626–3636. <https://doi.org/10.1128/jvi.02613-08>
- Juleff, N., Windsor, M., Reid, E., Seago, J., Zhang, Z., Monaghan, P., Morrison, I. W., & Charleston, B. (2008). Foot-and-mouth disease virus persists in the light zone of germinal centres. *PLoS One*, 3(10), e3434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003434>
- Jung, B. K., Kim, E. Do, Song, H., Chai, J. Y., & Seo, K. Y. (2020). Immunogenicity of exosomes from dendritic cells stimulated with toxoplasma gondii lysates in ocularly immunized mice. *Korean Journal of Parasitology*, 58(2), 185–189. <https://doi.org/10.3347/kjp.2020.58.2.185>
- K Strohmaier, K. H. A. (1976). [Structure of foot-and-mouth disease virus]. *Zentralbl Veterinarmed*, 23(1), 483–506. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(79\)90387-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(79)90387-8)
- Kajimoto, T., Okada, T., Miya, S., Zhang, L., & Nakamura, S. I. (2013). Ongoing activation of sphingosine 1-phosphate receptors mediates maturation of exosomal multivesicular endosomes. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3712>
- Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478). <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>
- Kalra, H., Simpson, R. J., Ji, H., Aikawa, E., Altevogt, P., Askenase, P., Bond, V. C., Borràs, F. E., Breakefield, X., Budnik, V., Buzas, E., Camussi, G., Clayton, A., Cocucci, E., Falcon-Perez, J. M., Gabrielsson, S., Gho, Y. S., Gupta, D., Harsha, H. C., ... Mathivanan, S. (2012). Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biology*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001450>
- Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I. L., & Manz, M. G. (2003). Flt3 ligand regulates

- dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(2), 305–313. <https://doi.org/10.1084/JEM.20030323>
- Kearney, J. F. (2005). Innate-like B cells. In *Springer Seminars in Immunopathology* (Vol. 26, Issue 4, pp. 377–383). Springer Semin Immunopathol. <https://doi.org/10.1007/s00281-004-0184-0>
- Kharmate, G., Hosseini-Beheshti, E., Caradec, J., Chin, M. Y., & Tomlinson Guns, E. S. (2016). Epidermal growth factor receptor in prostate cancer derived exosomes. *PLoS ONE*, 11(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154967>
- Khosravi, M., Mirsamadi, E. S., Mirjalali, H., & Zali, M. R. (2020). Isolation and functions of extracellular vesicles derived from parasites: The promise of a new era in immunotherapy, vaccination, and diagnosis. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 15, pp. 2957–2969). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S250993>
- Kim, H., Kim, A. Y., Choi, J., Park, S. Y., Park, S. H., Kim, J. S., Lee, S. I., Park, J. H., Park, C. K., & Ko, Y. J. (2021b). Foot-and-Mouth Disease Virus Evades Innate Immune Response by 3C-Targeting of MDA5. *Cells*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020271>
- Kim, S.-H., Lechman, E. R., Bianco, N., Menon, R., Keravala, A., Nash, J., Mi, Z., Watkins, S. C., Gambotto, A., & Robbins, P. D. (2005). Exosomes Derived from IL-10-Treated Dendritic Cells Can Suppress Inflammation and Collagen-Induced Arthritis. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6440–6448. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6440>
- Kim, W. S., Zhi, Y., Guo, H., Byun, E. B., Lim, J. H., & Seo, H. S. (2020). Promotion of Cellular and Humoral Immunity against Foot-and-Mouth Disease Virus by Immunization with Virus-Like Particles Encapsulated in Monophosphoryl Lipid A and Liposomes. *Vaccines*, 8(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8040633>
- Kowal, J. (2019). Dendritic cell extracellular vesicles. In *Immunobiology of Dendritic Cells Part B* (1st ed., Vol. 349). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.08.005>
- Kubach, J., Becker, C., Schmitt, E., Steinbrink, K., Huter, E., Tuettenberg, A., & Jonuleit, H. (2005). Dendritic cells: Sentinels of immunity and tolerance. In *International Journal of Hematology* (Vol. 81, Issue 3, pp. 197–203). Springer. <https://doi.org/10.1532/IJH97.04165>
- Kuby. (2012). Immunology. In *Kuby immunology: Vol. XXXIII* (Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Kuipers, M. E., Hokke, C. H., Smits, H. H., & Nolte-'t Hoen, E. N. M. (2018). Pathogen-derived extracellular vesicle-associated molecules that affect the host immune system: An overview. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP), 2182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02182>
- Kumari, S., & Singh, A. (2018). Urinary Exosomal Lipidomics Reveals Markers for Diabetic Nephropathy. *Current Metabolomics*, 6(2), 131–139. <https://doi.org/10.2174/2213235x05666170607135244>
- Kunsmann, L., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Glüder, M., Kemper, B., Fruth, A., Wai, S. N., He, X., Llobes, R., Schmidt, M. A., Dobrindt, U., Mellmann, A., Karch, H., & Bielaszewska, M. (2015). Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by Escherichia coli O104:H4 outbreak strain. *Scientific Reports*, 5(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/srep13252>
- Kushnir, N., Liu, L. M., & MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cells and resting B cells from cluster in vitro and in vivo: T cells independence, partial LFA-1 dependence, and regulation by cross-linking surface molecules. *Journal of Immunology*, 160(4), 1774–1781. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9469436/>
- Land, W. G. (2018). Antigen uptake, processing, and presentation by dendritic cells. In *Damage-Associated Molecular Patterns in Human Diseases* (Vol. 1, pp. 723–748). Taylor and Francis. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78655-1_31
- Langellotti, C., Quattrocchi, V., Alvarez, C., Ostrowski, M., Gnazzo, V., Zamorano, P., & Vermeulen, M. (2012). Foot-and-mouth disease virus causes a decrease in spleen dendritic cells and the early release of IFN- α in the plasma of mice. Differences between infectious and inactivated virus. *Antiviral Research*, 94(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.02.009>

- Langellotti, Cecilia, Cesar, G., Soria, I., Quattrocchi, V., Jancic, C., Zamorano, P., & Vermeulen, M. (2015). Foot-and-mouth disease virus infection of dendritic cells triggers phosphorylation of ERK1/2 inducing class I presentation and apoptosis. *Vaccine*, *33*(38), 4945–4953. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.07.038>
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medicin*, *44*(2–3), 325–337. <https://doi.org/10.1007/BF01959006>
- Lannes, N., Python, S., & Summerfield, A. (2012). Interplay of foot-and-mouth disease virus, antibodies and plasmacytoid dendritic cells: Virus opsonization under non-neutralizing conditions results in enhanced interferon-alpha responses. *Veterinary Research*, *43*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-64/TABLES/1>
- Larios, J., Mercier, V., Roux, A., & Gruenberg, J. (2020). ALIX- And ESCRT-III-dependent sorting of tetraspanins to exosomes. *Journal of Cell Biology*, *219*(3). <https://doi.org/10.1083/jcb.201904113>
- Lässer, C., Shelke, G. V., Yeri, A., Kim, D. K., Crescitelli, R., Raimondo, S., Sjöstrand, M., Ghossein, Y. S., Van Keuren Jensen, K., & Lötvall, J. (2017). Two distinct extracellular RNA signatures released by a single cell type identified by microarray and next-generation sequencing. *RNA Biology*, *14*(1), 58–72. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1249092>
- Lázaro-Ibáñez, E., Lässer, C., Shelke, G. V., Crescitelli, R., Jang, S. C., Cvjetkovic, A., García-Rodríguez, A., & Lötvall, J. (2019). DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *Journal of Extracellular Vesicles*, *8*(1), 1656993. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1656993>
- LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2020). Exosomes as a Multicomponent Biomarker Platform in Cancer. In *Trends in Cancer*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.03.007>
- Lee, Y. F., Nomoto, A., Detjen, B. M., & Wimmer, E. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(1), 59–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.1.59>
- Li, K., Wang, C., Yang, F., Cao, W., Zhu, Z., & Zheng, H. (2021). Virus–Host Interactions in Foot-and-Mouth Disease Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, *12*, 206. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2021.571509/BIBTEX>
- Li, Q., Xu, X., Yu, Y., Li, W., Liang, L., Song, J., Li, B., Li, F.-G., Cai, S., & Liu, T. (2019). Integrin $\beta 5$ in plasma-derived exosomal protein predicting liver-specific metastasis in advanced gastric cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, *37*(15_suppl), e14521–e14521. https://doi.org/10.1200/jco.2019.37.15_suppl.e14521
- Li, S. fang, Gong, M. jiao, Xie, Y. li, Shao, J. jun, Zhao, F. rong, Zhang, Y. guang, & Chang, H. yun. (2019). A novel type I interferon, interferon alphaomega, shows antiviral activity against foot-and-mouth disease virus in vitro. *Microbial Pathogenesis*, *127*, 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.11.040>
- Li, S. fang, Shao, J. jun, Zhao, F. rong, Gong, M. jiao, Xie, Y. li, Chang, H. yun, & Zhang, Y. guang. (2018). Antiviral activity of porcine interferon delta 8 against foot-and-mouth disease virus in vitro. *International Immunopharmacology*, *59*, 47–52. <https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2018.03.022>
- Li, X., Li, J.-J., Yang, J.-Y., Wang, D.-S., Zhao, W., Song, W.-J., Li, W.-M., Wang, J.-F., Han, W., Zhang, Z.-C., Yu, Y., Cao, D.-Y., & Dou, K.-F. (2012). Tolerance Induction by Exosomes from Immature Dendritic Cells and Rapamycin in a Mouse Cardiac Allograft Model. *PLoS ONE*, *7*(8), e44045. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044045>
- Lin, J., Lu, X., Liao, S., Chen, X., Wang, S., Zhao, C., Li, X., Xu, Y.-Z., Liu, H.-F., & Pan, Q. (2019). Cross-regulation between exosomal and autophagic pathways: promising therapy targets in disease. *Discovery Medicine*, *27*(149), 201–210. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31361983>
- Lin, Y. Te, Chen, Y. P., Fang, C. H., Huang, P. Y., & Liang, S. M. (2020). Capsid proteins of foot-and-mouth disease virus interact with TLR2 and CD14 to induce cytokine production. *Immunology Letters*, *223*, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2020.04.008>
- Lindenbergh, M. F. S., & Stoorvogel, W. (2018). *Antigen Presentation by Extracellular Vesicles from*

Professional Antigen- Presenting Cells. April.

- Linton, S. S., Abraham, T., Liao, J., Clawson, G. A., Butler, P. J., Fox, T., Kester, M., & Matters, G. L. (2018). Tumor-promoting effects of pancreatic cancer cell exosomes on THP-1-derived macrophages. *PLoS ONE*, *13*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206759>
- López, O. J., Sadir, A. M., Borca, M. V., Fernández, F. M., Braun, M., & Schudel, A. A. (1990a). Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model. II. Basis of persistent antibody reaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *24*(4), 313–321. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(90\)90002-A](https://doi.org/10.1016/0165-2427(90)90002-A)
- Lőrincz, Á. M., Bartos, B., Szombath, D., Szeifert, V., Timár, C. I., Turiák, L., Drahos, L., Kittel, Á., Veres, D. S., Kolonics, F., Mócsai, A., & Ligeti, E. (2020). Role of Mac-1 integrin in generation of extracellular vesicles with antibacterial capacity from neutrophilic granulocytes. *Journal of Extracellular Vesicles*, *9*(1), 1698889. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1698889>
- Lorincz, A. M., Schutte, M., Timar, C. I., Veres, D. S., Kittel, A., McLeish, K. R., Merchant, M. L., & Ligeti, E. (2015). Functionally and morphologically distinct populations of extracellular vesicles produced by human neutrophilic granulocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(4), 583–589. <https://doi.org/10.1189/jlb.3vma1014-514r>
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). Co-Action Publishing. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>
- Lu, J., Wu, J., Tian, J., & Wang, S. (2018). Role of T cell-derived exosomes in immunoregulation. *Immunologic Research*, *66*(3), 313–322. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9000-0>
- Ludewig, B., Maloy, K. J., López-Macías, C., Odermatt, B., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2000). Induction of optimal anti-viral neutralizing B cell responses by dendritic cells requires transport and release of virus particles in secondary lymphoid organs. *European Journal of Immunology*, *30*(1), 185–196. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200001\)30:1<185::AID-IMMU185>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200001)30:1<185::AID-IMMU185>3.0.CO;2-L)
- Ludwig, S., Floros, T., Theodoraki, M. N., Hong, C. S., Jackson, E. K., Lang, S., & Whiteside, T. L. (2017). Suppression of lymphocyte functions by plasma exosomes correlates with disease activity in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, *23*(16), 4843–4854. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2819>
- Lugini, L., Cecchetti, S., Huber, V., Luciani, F., Macchia, G., Spadaro, F., Paris, L., Abalsamo, L., Colone, M., Molinari, A., Podo, F., Rivoltini, L., Ramoni, C., & Fais, S. (2012). Immune Surveillance Properties of Human NK Cell-Derived Exosomes. *The Journal of Immunology*, *189*(6), 2833–2842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101988>
- Macri, C., Pang, E. S., Patton, T., & O’Keeffe, M. (2018). Dendritic cell subsets. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *84*, 11–21. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.12.009>
- Madaan, A., Verma, R., Singh, A. T., Jain, S. K., & Jaggi, M. (2014). *PROTOCOL 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>
- Mahapatra, M., & Parida, S. (2018). Foot and mouth disease vaccine strain selection: current approaches and future perspectives. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1492378>, *17*(7), 577–591. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1492378>
- Mannie, M. D., Nardella, J. P., White, G. A., Arnold, P. Y., & Davidian, D. K. (1998). Class II MHC/peptide complexes on T cell antigen-presenting cells: Agonistic antigen recognition inhibits subsequent antigen presentation. *Cellular Immunology*, *186*(2), 111–120. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1301>
- Martín-Acebes, M. A., Vázquez-Calvo, Á., González-Magaldi, M., & Sobrino, F. (2011). Foot-and-mouth disease virus particles inactivated with binary ethylenimine are efficiently internalized into cultured cells. *Vaccine*, *29*(52), 9655–9662. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.10.031>

- Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieu, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 9–17. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
- Mathivanan, S., & Simpson, R. J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics*, *9*(21), 4997–5000. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900351>
- Mazzeo, C., Cañas, J. A., Zafra, M. P., Rojas Marco, A., Fernández-Nieto, M., Sanz, V., Mittelbrunn, M., Izquierdo, M., Baixauli, F., Sastre, J., & Del Pozo, V. (2015). Exosome secretion by eosinophils: A possible role in asthma pathogenesis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *135*(6), 1603–1613. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.026>
- McCullough, K. C., De Simone, F., Brocchi, E., Capucci, L., Crowther, J. R., & Kihm, U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *Journal of Virology*, *66*(4).
- McCullough, K. C., Parkinson, D., & Crowther, J. R. (1988). Opsonization-enhanced phagocytosis of foot-and-mouth disease virus. *Immunology*, *65*(2), 187. [/pmc/articles/PMC1384912/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3311111/)
- McHeyzer-Williams, L. J., Cool, M., & McHeyzer-Williams, M. G. (2000). Antigen-Specific B Cell Memory Expression and Replenishment of a Novel B220– Memory B Cell Compartment. *Journal of Experimental Medicine*, *191*(7), 1149–1166. <https://doi.org/10.1084/JEM.191.7.1149>
- McKelvey, K. J., Powell, K. L., Ashton, A. W., Morris, J. M., & McCracken, S. A. (2015). Exosomes: Mechanisms of Uptake. *Journal of Circulating Biomarkers*, *4*. <https://doi.org/10.5772/61186>
- Medina, G. N., Segundo, F. D.-S., Stenfeldt, C., Arzt, J., & de los Santos, T. (2018). The Different Tactics of Foot-and-Mouth Disease Virus to Evade Innate Immunity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02644>
- Mehanny, M., Koch, M., Lehr, C.-M., & Fuhrmann, G. (2020). Streptococcal Extracellular Membrane Vesicles Are Rapidly Internalized by Immune Cells and Alter Their Cytokine Release. *Frontiers in Immunology*, *11*, 80. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00080>
- Mehanny, M., Lehr, C. M., & Fuhrmann, G. (2021). Extracellular vesicles as antigen carriers for novel vaccination avenues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *173*, 164–180. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.03.016>
- Menay, F., Herschlik, L., De Toro, J., Cocozza, F., Tsacalian, R., Gravisaco, M. J., Di Sciuillo, M. P., Vendrell, A., Waldner, C. I., & Mongini, C. (2017). Exosomes Isolated from Ascites of T-Cell Lymphoma-Bearing Mice Expressing Surface CD24 and HSP-90 Induce a Tumor-Specific Immune Response. *Frontiers in Immunology*, *8*(MAR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.00286>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, *31*(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Messenger, S. W., Woo, S. S., Sun, Z., & Martin, T. F. J. (2018). A Ca²⁺-stimulated exosome release pathway in cancer cells is regulated by Munc13-4. *Journal of Cell Biology*, *217*(8), 2877–2890. <https://doi.org/10.1083/jcb.201710132>
- Metcalf, D. (2015). *The Molecular Biology and Functions of the Granulocyte-Macrophage colony stimulating Factors*. *67*(2), 257–267.
- Midgley, R., Moffat, K., Berryman, S., Hawes, P., Simpson, J., Fullen, D., Stephens, D. J., Burman, A., & Jackson, T. (2013). A role for endoplasmic reticulum exit sites in foot-and-mouth disease virus infection. *Journal of General Virology*, *94*(PART 12), 2636–2646. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055442-0>
- Mishra, N. C., & Tatum, E. L. (1973). Non Mendelian inheritance of DNA induced inositol independence in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *70*(12 II), 3875–3879. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3875>
- Miyake, K., Shiozawa, N., Nagao, T., Yoshikawa, S., Yamanishi, Y., & Karasuyama, H. (2017). Trogocytosis of peptide-MHC class II complexes from dendritic cells confers antigen-presenting ability on basophils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

- America*, 114(5), 1111–1116. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615973114>
- Moens, L., Kane, A., & Tangye, S. G. (2016). Naïve and memory B cells exhibit distinct biochemical responses following BCR engagement. *Immunology and Cell Biology*, 94(8), 774–786. <https://doi.org/10.1038/ICB.2016.41>
- Moffat, K., Howell, G., Knox, C., Belsham, G. J., Monaghan, P., Ryan, M. D., & Wileman, T. (2005). Effects of Foot-and-Mouth Disease Virus Nonstructural Proteins on the Structure and Function of the Early Secretory Pathway: 2BC but Not 3A Blocks Endoplasmic Reticulum-to-Golgi Transport. *Journal of Virology*, 79(7), 4382–4395. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.7.4382-4395.2005>
- Montecalvo, A., Shufesky, W. J., Beer Stolz, D., Sullivan, M. G., Wang, Z., Divito, S. J., Papworth, G. D., Watkins, S. C., Robbins, P. D., Larregina, A. T., & Morelli, A. E. (2008). Exosomes As a Short-Range Mechanism to Spread Alloantigen between Dendritic Cells during T Cell Allorecognition. *The Journal of Immunology*, 180(5), 3081–3090. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.3081>
- Morelli, A. E., Larregina, A. T., Shufesky, W. J., Sullivan, M. L. G., Stolz, D. B., Papworth, G. D., Zahorchak, A. F., Logar, A. J., Wang, Z., Watkins, S. C., Falo, L. D., & Thomson, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10), 3257–3266. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0824>
- Morelli, A. E., Zeng, F., Rojas-Canales, D. M., Divito, S., Shufesky, W. J., Larregina, A. T., & Liu, Q. (2017). Cross-dressing of recipient Ag-presenting cells with donor exosomes trigger direct T-cell allosensitization in transplantation. *The Journal of Immunology*, 198(1 Supplement). http://www.jimmunol.org/content/198/1_Supplement/82.34
- Mugoni, V., Ciani, Y., Nardella, C., & Demichelis, F. (2022). Circulating RNAs in prostate cancer patients. *Cancer Letters*, 524, 57–69. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.10.011>
- Mukhamedova, N., Hoang, A., Dragoljevic, D., Dubrovsky, L., Pushkarsky, T., Low, H., Ditiatkovski, M., Fu, Y., Ohkawa, R., Meikle, P. J., Horvath, A., Brichacek, B., Miller, Y. I., Murphy, A., Bukrinsky, M., & Sviridov, D. (2019). Exosomes containing HIV protein Nef reorganize lipid rafts potentiating inflammatory response in bystander cells. *PLOS Pathogens*, 15(7), e1007907. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007907>
- Muntasell, A., Berger, A. C., & Roche, P. A. (2007). T cell-induced secretion of MHC class II-peptide complexes on B cell exosomes. *EMBO Journal*, 26(19), 4263–4272. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601842>
- Münz, C., Steinman, R. M., & Fujii, S. I. (2005). Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: Coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. In *Journal of Experimental Medicine* (Vol. 202, Issue 2, pp. 203–207). The Rockefeller University Press. <https://doi.org/10.1084/jem.20050810>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2017). INMUNOBIOLOGY. In *Janeway's Immunobiology*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Nandakumar, R., Tschismarov, R., Meissner, F., Prabakaran, T., Krissanaprasit, A., Farahani, E., Zhang, B. cun, Assil, S., Martin, A., Bertrams, W., Holm, C. K., Ablasser, A., Klause, T., Thomsen, M. K., Schmeck, B., Howard, K. A., Henry, T., Gothelf, K. V., Decker, T., & Paludan, S. R. (2019). Intracellular bacteria engage a STING–TBK1–MVB12b pathway to enable paracrine cGAS–STING signalling. *Nature Microbiology*, 4(4), 701–713. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0367-z>
- Näslund, T. I., Gehrman, U., & Gabrielsson, S. (2013). *Cancer immunotherapy with exosomes requires B-cell activation*. *June*, 3–4.
- Näslund, T. I., Gehrman, U., Qazi, K. R., Karlsson, C. I., Gabrielsson, S., & Gabrielsson, S. (2013a). *Dendritic Cell – Derived Exosomes Need To Activate Both T and B Cells To Induce Antitumor Immunity*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203082>
- Nawaz, M., & Fatima, F. (2017). Extracellular vesicles, tunneling nanotubes, and cellular interplay: Synergies and missing links. In *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 4, Issue JUL, p. 50). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00050>
- Ndiaye, M., Warnecke, A., Flytzani, S., Abdelmagid, N., Ruhrmann, S., Olsson, T., Jagodic, M., Harris, R. A., & Guerreiro-Cacais, A. O. (2016). Rat bone marrow-derived dendritic cells generated with GM-

- CSF/IL-4 or FLT3L exhibit distinct phenotypical and functional characteristics. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(3), 437–446. <https://doi.org/10.1189/jlb.1AB0914-433RR>
- Ndungu, F. M., Cadman, E. T., Coulcher, J., Nduati, E., Couper, E., MacDonald, D. W., Ng, D., & Langhorne, J. (2009). Functional Memory B Cells and Long-Lived Plasma Cells Are Generated after a Single *Plasmodium chabaudi* Infection in Mice. *PLOS Pathogens*, 5(12), e1000690. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000690>
- Nilsson, J., Skog, J., Nordstrand, A., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., Breakefield, X. O., & Widmark, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *British Journal of Cancer* 2009 100:10, 100(10), 1603–1607. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058>
- Nolte T Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 'T Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 40(18), 9272–9285. <https://doi.org/10.1093/nar/gks658>
- Noy, R., & Pollard, J. W. (2014). Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1, pp. 49–61). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.010>
- O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L. C., & Breakefield, X. O. (2020). RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:10, 21(10), 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>
- O'Donnell, V., Pacheco, J. M., Gregg, D., & Baxt, B. (2009). Analysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Integrin Receptor Expression in Tissues from Naïve and Infected Cattle. *Journal of Comparative Pathology*, 141(2–3), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2008.09.008>
- Ochyl, L. J., & Moon, J. J. (2019). Dendritic Cell Membrane Vesicles for Activation and Maintenance of Antigen-Specific T Cells. *Advanced Healthcare Materials*, 8(4). <https://doi.org/10.1002/adhm.201801091>
- Okoye, I. S., Coomes, S. M., Pelly, V. S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M. C., & Wilson, M. S. (2014). MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity*, 41(1), 89–103. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.019>
- Oliveira, D. L., Freire-de-Lima, C. G., Nosanchuk, J. D., Casadevall, A., Rodrigues, M. L., & Nimrichter, L. (2010). Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions. *Infection and Immunity*, 78(4), 1601–1609. <https://doi.org/10.1128/IAI.01171-09>
- Olmos, Y., & Carlton, J. (2016). The ESCRT machinery: new roles at new holes. *Current Opinion in Cell Biology*, 38, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.12.001>
- Ostrowski, M., Vermeulen, M., Zabal, O., Geffner, J. R., Sadir, a M., & Lopez, O. J. (2005). Impairment of thymus-dependent responses by murine dendritic cells infected with foot-and-mouth disease virus. *J Immunol*, 175(6), 3971–3979. <https://doi.org/10.1172/JCI25000> [pii]
- Ostrowski, Matias, Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacohen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., & Thery, C. (2010). Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1), 19–30; sup pp 1-13. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2000>
- Ostrowski, Matias, Vermeulen, M., Zabal, O., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Geffner, J. R., & Lopez, O. J. (2007). The early protective thymus-independent antibody response to foot-and-mouth disease virus is mediated by splenic CD9+ B lymphocytes. *Journal of Virology*, 81(17), 9357–9367. <https://doi.org/10.1128/JVI.00677-07>
- Pacheco, J. M., Butler, J. E., Jew, J., Ferman, G. S., Zhu, J., & Golde, W. T. (2010). IgA antibody response of swine to foot-and-mouth disease virus infection and vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(4), 550–558. https://doi.org/10.1128/CVI.00429-09/SUPPL_FILE/PACHECO_SUPP_FIGURE_OCT09.TIF
- Palm, W. (2019). Metabolic functions of macropinocytosis. *Philosophical Transactions of the Royal*

- Society B: Biological Sciences*, 374(1765), 20180285. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0285>
- Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(July), 967–978. <https://doi.org/10.1139/o84-159>
- Parida, S., Oh, Y., Reid, S. M., Cox, S. J., Statham, R. J., Mahapatra, M., Anderson, J., Barnett, P. V., Charleston, B., & Paton, D. J. (2006). Interferon-gamma production in vitro from whole blood of foot-and-mouth disease virus (FMDV) vaccinated and infected cattle after incubation with inactivated FMDV. *Vaccine*, 24(7), 964–969. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2005.08.108>
- Patch, J. R., Pedersen, L. E., Toka, F. N., Moraes, M., Grubman, M. J., Nielsen, M., Jungersen, G., Buus, S., & Golde, W. T. (2011). Induction of foot-and-mouth disease virus-specific cytotoxic T cell killing by vaccination. *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*, 18(2), 280–288. <https://doi.org/10.1128/CVI.00417-10>
- Peak, T. C., Panigrahi, G. K., Praharaj, P. P., Su, Y., Shi, L., Chyr, J., Rivera-Chávez, J., Flores-Bocanegra, L., Singh, R., Vander Griend, D. J., Oberlies, N. H., Kerr, B. A., Hemal, A., Bitting, R. L., & Deep, G. (2020). Syntaxin 6-mediated exosome secretion regulates enzalutamide resistance in prostate cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 59(1), 62–72. <https://doi.org/10.1002/mc.23129>
- Pegtel, D. M., & Gould, S. J. (2019). Exosomes. *Annual Review of Biochemistry*, 88(1), 487–514. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111902>
- Pettmann, J., Santos, A. M., Dushek, O., & Davis, S. J. (2018). Membrane Ultrastructure and T Cell Activation. *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), 2152. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02152>
- Pfeffer, S. R. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 4, pp. 414–419).
- Pfrieger, F. W., & Vitale, N. (2018). Thematic review series: Exosomes and microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 59, Issue 12, pp. 2255–2261). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084210>
- Piatti, P. G., Berinstein, A., Lopez, O. J., Borca, M. V, Fernandez, F., Schudel, A. A., & Sadir, A. M. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *The Journal of General Virology*, 72 (Pt 7), 1691–1694.
- Pintarič, M., Gerner, W., & Saalmüller, A. (2008). Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-gamma production of porcine natural killer cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 121(1–2), 68–82. <https://doi.org/10.1016/J.VETIMM.2007.08.009>
- Polatnick, J., & Wool, S. H. (1983). Correlation of Surface and Internal Ultrastructural Changes in Cells Infected with Foot-and-Mouth Disease Virus. In *Canadian Journal of Comparative Medicine* (Vol. 47, Issue 4). Canadian Veterinary Medical Association. /pmc/articles/PMC1235972/?report=abstract
- PY, A., & MD, M. (1999). Vesicles Bearing MHC Class II Molecules Mediate Transfer of Antigen From Antigen-Presenting Cells to CD4+ T Cells. *European Journal of Immunology*, 29(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199904\)29:04<1363::AID-IMMU1363>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1363::AID-IMMU1363>3.0.CO;2-0)
- Qazi, K. R., Gehrman, U., Jordö, E. D., Karlsson, M. C. I., & Gabrielsson, S. (2009). Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B cell dependent mechanism. *Blood*, 113(12), 2673–2683. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-153536>
- Qi, H., Egen, J. G., Huang, A. Y. C., & Germain, R. N. (2006). Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science*, 312(5780), 1672–1676. <https://doi.org/10.1126/science.1125703>
- Quattrocchi, V., Langellotti, C., Pappalardo, J. S., Olivera, V., Di Giacomo, S., van Rooijen, N., Mongini, C., Waldner, C., & Zamorano, P. I. (2011). Role of macrophages in early protective immune responses induced by two vaccines against foot and mouth disease. *Antiviral Research*, 92(2), 262–270. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.08.007>

- Racaniello, V. (2001). Picornaviridae, The virus and their replication. *Fields Virology*, 795–838. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10029419365>
- Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J., & Geuze, H. J. (1996). B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(March), 1161–1172. <https://doi.org/10.1084/jem.183.3.1161>
- Raposo, G., & Nijman, H. (1996). B Lymphocytes Secrete Antigen presenting Vesicles. *J. Exp. Med.*, 183(March), 1161–1172. <http://jem.rupress.org/content/183/3/1161.abstract>
- Raposo, Graça, & Stahl, P. D. (2019). Extracellular vesicles: a new communication paradigm? In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 9, pp. 509–510). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0158-7>
- Raposo, Graça, & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 200, Issue 4, pp. 373–383). <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Raposo, Graça, Tenza, D., Mecheri, S., Peronet, R., Bonnerot, C., & Desaynard, C. (1997). Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation. *Molecular Biology of the Cell*, 8(12), 2631–2645. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.12.2631>
- Record, M., Carayon, K., Poirot, M., & Silvente-Poirot, S. (2014). Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell-cell communication and various pathophysiologicals. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1841, Issue 1, pp. 108–120). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.10.004>
- Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Wakelam, M. J. O. (2018). Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1316–1324. <https://doi.org/10.1194/JLR.E086173>
- Reid, E., Juleff, N., Gubbins, S., Prentice, H., Seago, J., & Charleston, B. (2011). Bovine plasmacytoid dendritic cells are the major source of type I interferon in response to foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology*, 85(9), 4297–4308. <https://doi.org/10.1128/JVI.02495-10>
- Ren, Y., Yang, J., Xie, R., Gao, L., Yang, Y., Fan, H., & Qian, K. (2011). Exosomal-like vesicles with immune-modulatory features are present in human plasma and can induce CD4+ T-cell apoptosis in vitro. *Transfusion*, 51(5), 1002–1011. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02909.x>
- Rigden, R. C., Carrasco, C. P., Summerfield, A., & McCullough, K. C. (2002). Macrophage phagocytosis of foot-and-mouth disease virus may create infectious carriers. *Immunology*, 106(4), 537–548. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2567.2002.01460.X>
- Robbins, P. D., Dorransoro, A., & Booker, C. N. (2016). Regulation of chronic inflammatory and immune processes by extracellular vesicles. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1173–1180. <https://doi.org/10.1172/JCI81131>
- Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 195–208. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3622>
- Roberts, A. W. (2005). G-CSF: A key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 23(1), 33–41. <https://doi.org/10.1080/08977190500055836>
- Robinson, L., Windsor, M., McLaughlin, K., Hope, J., Jackson, T., & Charleston, B. (2011). Foot-and-Mouth Disease Virus Exhibits an Altered Tropism in the Presence of Specific Immunoglobulins, Enabling Productive Infection and Killing of Dendritic Cells. *Journal of Virology*, 85(5), 2212–2223. <https://doi.org/10.1128/jvi.02180-10>
- Rodrigues, M. L., Nakayasu, E. S., Oliveira, D. L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J. D., Almeida, I. C., & Casadevall, A. (2008). Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 58–67. <https://doi.org/10.1128/EC.00370-07>
- Rodríguez-Habibe, I., Celis-Giraldo, C., Patarroyo, M. E., Avendaño, C., & Patarroyo, M. A. (2020). A Comprehensive Review of the Immunological Response against Foot-and-Mouth Disease Virus

- Infection and Its Evasion Mechanisms. *Vaccines*, 8(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/VACCINES8040764>
- Rodríguez Pulido, M., del Amo, L., Sobrino, F., & Sáiz, M. (2018). Synthetic RNA derived from the foot-and-mouth disease virus genome elicits antiviral responses in bovine and porcine cells through IRF3 activation. *Veterinary Microbiology*, 221, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.05.015>
- Romero-Ramírez, S., Navarro-Hernandez, I. C., Cervantes-Díaz, R., Sosa-Hernández, V. A., Acevedo-Ochoa, E., Kleinberg-Bild, A., Valle-Rios, R., Meza-Sánchez, D. E., Hernández-Hernández, J. M., & Maravillas-Montero, J. L. (2019). Innate-like B cell subsets during immune responses: Beyond antibody production. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(5), 843–856. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0618-227R>
- Ruan, S., Greenberg, Z., Pan, X., Zhuang, P., Erwin, N., & He, M. (2021). Extracellular Vesicles as an Advanced Delivery Biomaterial for Precision Cancer Immunotherapy. *Advanced Healthcare Materials*, 2100650. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202100650>
- Ruiz-Sáenz, J., Goez, Y., Tabares, W., & López-Herrera, A. (2009). Cellular receptors for foot and mouth disease virus. *Intervirology*, 52(4), 201–212. <https://doi.org/10.1159/000226121>
- Sáiz, M., Núñez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E., & Sobrino, F. (2002). Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control. *Microbes and Infection*, 4(11), 1183–1192. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01644-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01644-1)
- Salguero, F. J., Sánchez-Martín, M. A., Díaz-San Segundo, F., De Avila, A., & Sevilla, N. (2005). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) causes an acute disease that can be lethal for adult laboratory mice. *Virology*, 332(1), 384–396. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.11.005>
- Sangaphunchai, P., Todd, I., & Fairclough, L. C. (2020). Extracellular vesicles and asthma: A review of the literature. *Clinical & Experimental Allergy*, 50(3), 291–307. <https://doi.org/10.1111/cea.13562>
- Santos, J. C., Dick, M. S., Lagrange, B., Degrandi, D., Pfeffer, K., Yamamoto, M., Meunier, E., Pelczar, P., Henry, T., & Broz, P. (2018). LPS targets host guanylate-binding proteins to the bacterial outer membrane for non-canonical inflammasome activation. *The EMBO Journal*, 37(6). <https://doi.org/10.15252/embj.201798089>
- Sanz-Ramos, M., Díaz-San Segundo, F., Escarmís, C., Domingo, E., & Sevilla, N. (2008). Hidden virulence determinants in a viral quasispecies in vivo. *Journal of Virology*, 82(21), 10465–10476. <https://doi.org/10.1128/JVI.00825-08>
- Saunderson, S. C., Dunn, A. C., Crocker, P. R., & McLellan, A. D. (2014). CD169 mediates the capture of exosomes in spleen and lymph node. *Blood*, 123(2), 208–216. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-489732>
- Schöneberg, J., Lee, I. H., Iwasa, J. H., & Hurley, J. H. (2016). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 18, Issue 1, pp. 5–17). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.121>
- Schorey, J. S., Cheng, Y., Singh, P. P., & Smith, V. L. (2015). Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*, 16(1), 24–43. <https://doi.org/10.15252/embr.201439363>
- Sebastian, R., Sravanthi, M., Umapathi, V., Krishnaswamy, N., Priyanka, M., Dechamma, H. J., Ganesh, K., Basagoudanavar, S. H., Sanyal, A., & Reddy, G. R. (2020). Foot and mouth disease virus undergoes non-progressive replication in mice peritoneal macrophages and induces M1 polarization. *Virus Research*, 281. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.197906>
- Segundo, F. D.-S., Weiss, M., Pérez-Martín, E., Dias, C. C., Grubman, M. J., & Santos, T. de los. (2012). Inoculation of Swine with Foot-and-Mouth Disease SAP-Mutant Virus Induces Early Protection against Disease. *Journal of Virology*, 86(3), 1316. <https://doi.org/10.1128/JVI.05941-11>
- Segura, E., Amigorena, S., & Thery, C. (2005). Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 35(2), 89–93.

- Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Amigorena, S., & Théry, C. (2007). CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(3), 1489–1496. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17641014>
- Sei, J. J., Waters, R. A., Kenney, M., Barlow, J. W., & Golde, W. T. (2016). Effect of Foot-and-Mouth Disease Virus Infection on the Frequency, Phenotype and Function of Circulating Dendritic Cells in Cattle. *PLOS ONE*, *11*(3), e0152192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152192>
- Sellers, R. F., & Parker, J. (1969). Airborne excretion of foot-and-mouth disease virus. *The Journal of Hygiene*, *67*(4), 671. <https://doi.org/10.1017/S0022172400042121>
- Shah, N. K., Gupta, S. K., Wang, Z., & Meenach, S. A. (2019). Enhancement of macrophage uptake via phosphatidylserine-coated acetalated dextran nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *50*, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.013>
- Shamri, R., Xenakis, J. J., & Spencer, L. A. (2011). Eosinophils in innate immunity: An evolving story. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 343, Issue 1, pp. 57–83). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1049-6>
- Sharma, A. K., Bhatt, M., Sankar, M., Mohapatra, J. K., Dash, B. B., Gowane, G. R., Subramaniam, S., Ranjan, R., & Pattnaik, B. (2018). Kinetics of Interferon gamma and Interleukin-21 response following foot and mouth disease virus infection. *Microbial Pathogenesis*, *125*, 20–25. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2018.08.049>
- Shimaoka, M., Kawamoto, E., Gaowa, A., Okamoto, T., & Park, E. (2019). Connexins and Integrins in Exosomes. *Cancers*, *11*(1), 106. <https://doi.org/10.3390/cancers11010106>
- Shinohara, H., Kuranaga, Y., Kumazaki, M., Sugito, N., Yoshikawa, Y., Takai, T., Taniguchi, K., Ito, Y., & Akao, Y. (2017). Regulated Polarization of Tumor-Associated Macrophages by miR-145 via Colorectal Cancer-Derived Extracellular Vesicles. *The Journal of Immunology*, *199*(4), 1505–1515. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700167>
- Shopova, I. A., Belyaev, I., Dasari, P., Jahreis, S., Stroe, M. C., Cseresnyés, Z., Zimmermann, A. K., Medyukhina, A., Svensson, C. M., Krüger, T., Szeifert, V., Nietzsche, S., Conrad, T., Blango, M. G., Knemeyer, O., von Lilienfeld-Toal, M., Zipfel, P. F., Ligeti, E., Figge, M. T., & Brakhage, A. A. (2020). Human Neutrophils Produce Antifungal Extracellular Vesicles against *Aspergillus fumigatus*. *MBio*, *11*(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00596-20>
- Silverman, J. M., Clos, J., Horakova, E., Wang, A. Y., Wiesgigl, M., Kelly, I., Lynn, M. A., McMaster, W. R., Foster, L. J., Levings, M. K., & Reiner, N. E. (2010). Leishmania Exosomes Modulate Innate and Adaptive Immune Responses through Effects on Monocytes and Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, *185*(9), 5011–5022. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000541>
- Singh-jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M., Bessis, N., Rammensee, H., & Decker, P. (2013). Immunobiology 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>
- Skokos, D., Botros, H. G., Demeure, C., Morin, J., Peronet, R., Birkenmeier, G., Boudaly, S., & Mécheri, S. (2003). Mast Cell-Derived Exosomes Induce Phenotypic and Functional Maturation of Dendritic Cells and Elicit Specific Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*, *170*(6), 3037–3045. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3037>
- Skotland, T., Ekroos, K., Kauhanen, D., Simolin, H., Seierstad, T., Berge, V., Sandvig, K., & Llorente, A. (2017). Molecular lipid species in urinary exosomes as potential prostate cancer biomarkers. *European Journal of Cancer*, *70*, 122–132. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.011>
- Skotland, T., Hessvik, N. P., Sandvig, K., & Llorente, A. (2019). Exosomal lipid composition and the role of ether lipids and phosphoinositides in exosome biology. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 60, Issue 1, pp. 9–18). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1194/jlr.R084343>
- Slater, T. W., Finkielstein, A., Mascarenhas, L. A., Mehl, L. C., Butin-Israeli, V., & Sumagin, R. (2017). Neutrophil Microparticles Deliver Active Myeloperoxidase to Injured Mucosa To Inhibit Epithelial Wound Healing. *The Journal of Immunology*, *198*(7), 2886–2897.

- <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601810>
- Smith, V. L., Cheng, Y., Bryant, B. R., & Schorey, J. S. (2017). Exosomes function in antigen presentation during an in vivo Mycobacterium tuberculosis infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep43578>
- Sobo-Vujanovic, A., Munich, S., & Vujanovic, N. L. (2014). Dendritic-cell exosomes cross-present Toll-like receptor-ligands and activate bystander dendritic cells. *Cellular Immunology*, 289(1–2), 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.03.016>
- Sobrinho, F., & Domingo, E. (2004). *Foot and Mouth Disease Foot and Mouth Disease Current Perspectives Edited by*.
- Son, Y. I., Egawa, S. I., Tatsumi, T., Redlinger, R. E., Kalinski, P., & Kanto, T. (2002). A novel bulk-culture method for generating mature dendritic cells from mouse bone marrow cells. *Journal of Immunological Methods*, 262(1–2), 145–157. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(02\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(02)00013-3)
- Soung, Y. H., Ford, S., Yan, C., & Chung, J. (2019). Roles of integrins in regulating metastatic potentials of cancer cell derived exosomes. In *Molecular and Cellular Toxicology* (Vol. 15, Issue 3, pp. 233–237). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13273-019-0026-8>
- Spencer, N., & Yeruva, L. (2021). Role of bacterial infections in extracellular vesicles release and impact on immune response. *Biomedical Journal*, 44(2), 157–164. <https://doi.org/10.1016/J.BJ.2020.05.006>
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, 9(1), 271–296. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IY.09.040191.001415>
- Steinman, R. M., & Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), 1142–1162. <https://doi.org/10.1084/jem.137.5.1142>
- Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(8), 513–525. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19603039>
- Steward, M. W., Stanley, C. M., Dimarchi, R., Mulcahy, G., & Doelt, T. R. (1991). High-affinity antibody induced by immunization with a synthetic peptide is associated with protection of cattle against foot-and-mouth disease. *Immunology*, 72(1), 99. /pmc/articles/PMC1384343/?report=abstract
- Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *Journal of Lipid Research*, 51(8), 2105–2120. <https://doi.org/10.1194/jlr.M003657>
- Summerfield, A., Guzylack-Piriou, L., Harwood, L., & McCullough, K. C. (2009). Innate immune responses against foot-and-mouth disease virus: Current understanding and future directions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.296>
- Sun, P., Zhang, S., Qin, X., Chang, X., Cui, X., Li, H., Zhang, S., Gao, H., Wang, P., Zhang, Z., Luo, J., & Li, Z. (2018). Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and induces autophagy via HSPB1. *Autophagy*, 14(2), 336–346. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1405187>
- Tamaki, K., Stingl, G., & Katz, S. I. (1980). The origin of Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 74(5), 309–311. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12543533>
- Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K., & Hodgkin, P. D. (2003). Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(2), 686–694. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.170.2.686>
- Terhuja, M., Saravanan, P., & Tamilselvan, R. P. (2015). Comparative efficacy of virus like particle (VLP) vaccine of foot-and-mouth-disease virus (FMDV) type O adjuvanted with poly I:C or CpG in guinea pigs. *Biologicals*, 43(6), 437–443. <https://doi.org/10.1016/J.BIOLOGICALS.2015.09.004>
- Théry, C. (2011). Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*,

- 3(July), 15. <https://doi.org/10.3410/B3-15>
- Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology, Chapter 3*(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.CB0322S30>
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Væron, P., Lantz, O., & Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology, 3*(12), 1156–1162. <https://doi.org/10.1038/ni854>
- Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews. Immunology, 9*(8), 581–593. <https://doi.org/10.1038/nri2567>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., ... Lowry, M. C. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles, 8*(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews. Immunology, 2*(8), 569–579. <https://doi.org/10.1038/nri855>
- Tian, T., Zhu, Y. L., Zhou, Y. Y., Liang, G. F., Wang, Y. Y., Hu, F. H., & Xiao, Z. D. (2014). Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *Journal of Biological Chemistry, 289*(32), 22258–22267. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588046>
- Timár, C. I., Lorincz, Á. M., Csépanyi-Kömi, R., Vályi-Nagy, A., Nagy, G., Buzás, E. I., Iványi, Z., Kittel, Á., Powell, D. W., McLeish, K. R., & Ligeti, E. (2013). Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood, 121*(3), 510–518. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431114>
- Toka, F. N., & Golde, W. T. (2013). Cell mediated innate responses of cattle and swine are diverse during foot-and-mouth disease virus (FMDV) infection: a unique landscape of innate immunity. *Immunology Letters, 152*(2), 135–143. <https://doi.org/10.1016/J.IMLET.2013.05.007>
- Toka, F. N., Nfon, C., Dawson, H., & Golde, W. T. (2009). Natural killer cell dysfunction during acute infection with foot-and-mouth disease virus. *Clinical and Vaccine Immunology, 16*(12), 1738–1749. <https://doi.org/10.1128/CVI.00280-09>
- Torralba, D., Baixauli, F., Villarroya-Beltri, C., Fernández-Delgado, I., Latorre-Pellicer, A., Acín-Pérez, R., Martín-Cófreces, N. B., Jaso-Tamame, Á. L., Iborra, S., Jorge, I., González-Aseguinolaza, G., Garaude, J., Vicente-Manzanares, M., Enríquez, J. A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2018). Priming of dendritic cells by DNA-containing extracellular vesicles from activated T cells through antigen-driven contacts. *Nature Communications, 9*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05077-9>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 13–24). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.), 319*(April), 1244–1247. <https://doi.org/10.1126/science.1153124>
- Tschuschke, M., Kocherova, I., Bryja, A., Mozdziak, P., Angelova Volponi, A., Janowicz, K., Sibiak, R., Piotrowska-Kempisty, H., Iżycki, D., Bukowska, D., Antosik, P., Shibli, J. A., Dyszkiewicz-Konwińska, M., & Kempisty, B. (2020). Inclusion Biogenesis, Methods of Isolation and Clinical Application of Human Cellular Exosomes. *Journal of Clinical Medicine, 9*(2), 436. <https://doi.org/10.3390/jcm9020436>
- Tung, S. L., Boardman, D. A., Sen, M., Letizia, M., Peng, Q., Cianci, N., Dioni, L., Carlin, L. M., Lechler, R., Bollati, V., Lombardi, G., & Smyth, L. A. (2018). Regulatory T cell-derived extracellular vesicles modify dendritic cell function. *Scientific Reports, 8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24531-8>

- Turchinovich, A., Drapkina, O., & Tonevitsky, A. (2019). Transcriptome of Extracellular Vesicles: State-of-the-Art. *Frontiers in Immunology*, *10*(FEB), 202. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00202>
- Tynan, G. A., McNaughton, A., Jarnicki, A., Tsuji, T., & Lavelle, E. C. (2012). Polymyxin B inadequately quenches the effects of contaminating lipopolysaccharide on murine dendritic cells. *PloS One*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0037261>
- Urbanelli, L., Buratta, S., Tancini, B., Sagini, K., Delo, F., Porcellati, S., & Emiliani, C. (2019). The role of extracellular vesicles in viral infection and transmission. In *Vaccines* (Vol. 7, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/vaccines7030102>
- Usharani, J., Park, S. Y., Cho, E. J., Kim, C., Ko, Y. J., Tark, D., Kim, S. M., Park, J. H., Lee, K. N., Lee, M. H., & Lee, H. S. (2017). Antiviral activity of ovine interferon tau 4 against foot-and-mouth disease virus. *Antiviral Research*, *143*, 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2017.01.018>
- Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M., & Minami, M. (2003). MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunology Letters*, *89*(2–3), 125–131.
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Van der Koog, L., Gandek, T. B., & Nagelkerke, A. (2021). Liposomes and Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems: A Comparison of Composition, Pharmacokinetics, and Functionalization. *Advanced Healthcare Materials*, 2100639. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202100639>
- Van Maanen, C., & Terpstra, C. (1989). Comparison of a liquid-phase blocking sandwich ELISA and a serum neutralization test to evaluate immunity in potency tests of foot-and-mouth disease vaccines. *Journal of Immunological Methods*, *124*(1), 111–119. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(89\)90192-0](https://doi.org/10.1016/0022-1759(89)90192-0)
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*, *121*(2), 337–349. <https://doi.org/S001650850128055X> [pii]
- Van Niel, Guillaume, D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- Van Niel, Guillaume, Phanie Charrin, S., Simoes, S., Romao, M., Rochin, L., Saftig, P., Marks, M. S., Rubinstein, E., & Raposo, G. A. (2011). The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell*, *21*, 708–721. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
- Van Vlijmen, H. W., Curry, S., Schaefer, M., & Karplus, M. (1998). Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *Journal of Molecular Biology*, *275*(2), 295–308. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1418>
- Vázquez-Calvo, Á., Caridi, F., Rodriguez-Pulido, M., Borrego, B., Sáiz, M., Sobrino, F., & Martín-Acebes, M. A. (2012). Modulation of foot-and-mouth disease virus pH threshold for uncoating correlates with differential sensitivity to inhibition of cellular Rab GTPases and decreases infectivity in vivo. *Journal of General Virology*, *93*(PART 11), 2382–2386. <https://doi.org/10.1099/vir.0.045419-0>
- Veerman, R. E., Güçlüler Akpınar, G., Eldh, M., & Gabrielsson, S. (2019). Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles – Functions and Therapeutic Applications. *Trends in Molecular Medicine*, *25*(5), 382–394. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.02.003>
- Verweij, F. J., Bebelman, M. P., Jimenez, C. R., Garcia-Vallejo, J. J., Janssen, H., Neeffjes, J., Knol, J. C., de Goeij-de Haas, R., Piersma, S. R., Baglio, S. R., Verhage, M., Middeldorp, J. M., Zomer, A., van Rheenen, J., Coppolino, M. G., Hurbain, I., Raposo, G., Smit, M. J., Toonen, R. F. G., ... Pegtel, D. M. (2018). Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *Journal of Cell Biology*, *217*(3), 1129–1142. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703206>
- Viaud, S., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., André, F., Novault, S., Escudier, B., Robert, C., Caillat-

- Zucman, S., Tursz, T., Zitvogel, L., & Chaput, N. (2009). Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: A role for NKG2D ligands and IL-15R α . *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004942>
- Vincent-Schneider, H., Stumptner-Cuvelette, P., Lankar, D., Pain, S., Raposo, G., Benaroch, P., & Bonnerot, C. (2002). Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. *International Immunology*, 14(7), 713–722.
- Visser, L. J., Aloise, C., Swatek, K. N., Medina, G. N., Olek, K. M., Rabouw, H. H., De Groot, R. J., Langereis, M. A., De Los Santos, T., Komander, D., Skern, T., & Van Kuppeveld, F. J. M. (2020). Dissecting distinct proteolytic activities of FMDV Lproimplicates cleavage and degradation of RLR signaling proteins, not its deISGylase/DUB activity, in type I interferon suppression. *PLoS Pathogens*, 16(7), e1008702. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008702>
- Vulpis, E., Soriani, A., Cerboni, C., Santoni, A., & Zingoni, A. (2019). Cancer Exosomes as Conveyors of Stress-Induced Molecules: New Players in the Modulation of NK Cell Response. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 611. <https://doi.org/10.3390/ijms20030611>
- Wahlund, C. J. E., Güclüler, G., Hiltbrunner, S., Veerman, R. E., Näslund, T. I., & Gabrielsson, S. (2017). Exosomes from antigen-pulsed dendritic cells induce stronger antigen-specific immune responses than microvesicles in vivo. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16609-6>
- Wang, C., Huang, X., Wu, Y., Wang, J., Li, F., & Guo, G. (2020). Tumor cell-associated exosomes robustly elicit anti-tumor immune responses through modulating dendritic cell vaccines in lung tumor. *International Journal of Biological Sciences*, 16(4), 633–643. <https://doi.org/10.7150/ijbs.38414>
- Wang, D., Fang, L., Luo, R., Ye, R., Fang, Y., Xie, L., Chen, H., & Xiao, S. (2010). Foot-and-mouth disease virus leader proteinase inhibits dsRNA-induced type I interferon transcription by decreasing interferon regulatory factor 3/7 in protein levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(1), 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.044>
- Wang, G., Nola, S., Bovio, S., Bun, P., Coppey-Moisan, M., Lafont, F., & Galli, T. (2018). Biomechanical Control of Lysosomal Secretion Via the VAMP7 Hub: A Tug-of-War between VARP and LRRK1. *IScience*, 4, 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.05.016>
- Wang, L., Sun, Z., & Wang, H. (2021). Extracellular vesicles and the regulation of tumor immunity: Current progress and future directions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(7), 760–769. <https://doi.org/10.1002/JCB.29904>
- Weill, J. C., & Reynaud, C. A. (2020). IgM memory B cells: specific effectors of innate-like and adaptive responses. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 63, pp. 1–6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.09.003>
- Weisheit, C. K., Engel, D. R., & Kurts, C. (2015). Dendritic cells and macrophages: Sentinels in the kidney. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10(10), 1841–1851. <https://doi.org/10.2215/CJN.07100714>
- Wen, C., Seeger, R. C., Fabbri, M., Wang, L., Wayne, A. S., & Jong, A. Y. (2017). Biological roles and potential applications of immune cell-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1400370>
- Wigdorovitz, A., Zamorano, P., Fernández, F. M., López, O., Prato-Murphy, M., Carrillo, C., Sadir, A. M., & Borca, M. V. (1997). Duration of the foot-and-mouth disease virus antibody response in mice is closely related to the presence of antigen-specific presenting cells. *The Journal of General Virology*, 78 (Pt 5)(5), 1025–1032. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1025>
- Windsor, M. A., Carr, B. V., Bankowski, B., Gibson, D., Reid, E., Hamblin, P., Gubbins, S., Juleff, N., & Charleston, B. (2011). Cattle remain immunocompetent during the acute phase of foot-and-mouth disease virus infection. *Veterinary Research*, 42(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-108/FIGURES/7>
- Witwer, K. W., Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lässer, C., Lötvall, J., Nolte-'t Hoen, E. N., Piper, M. G., Sivaraman, S., Skog, J., Théry, C., Wauben, M. H., & Hochberg, F. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of*

- Extracellular Vesicles*, 2(1), 8–10. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.20360>
- Wolfers, J., Lozier, a, Raposo, G., Regnault, a, Théry, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., & Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature Medicine*, 7(3), 297–303.
- Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C., & MacPherson, G. G. (1998). Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(3), 1313–1319. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9686593>
- Xiao, L., Erb, U., Zhao, K., Hackert, T., & Zöller, M. (2017). Efficacy of vaccination with tumor-exosome loaded dendritic cells combined with cytotoxic drug treatment in pancreatic cancer. *OncImmunity*, 6(6), e1319044. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1319044>
- Xie, Y., Zhang, H., Li, W., Deng, Y., Munegowda, M. A., Chibbar, R., Qureshi, M., & Xiang, J. (2010). Dendritic Cells Recruit T Cell Exosomes via Exosomal LFA-1 Leading to Inhibition of CD8 + CTL Responses through Downregulation of Peptide/MHC Class I and Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity . *The Journal of Immunology*, 185(9), 5268–5278. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000386>
- Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giesel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., ... De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 4, Issue 2015, pp. 1–60). Co-Action Publishing. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
- Yang Y, Hong Y, Cho E, Kim GB, Kim IS. Extracellular vesicles as a platform for membrane-associated therapeutic protein delivery. *J Extracell Vesicles*. 2018 Mar 1;7(1):1440131. doi: 10.1080/20013078.2018.1440131. PMID: 29535849; PMCID: PMC5844050 Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., Li, C., Cong, Y., Kimberly, R., Grizzle, W. E., Falkson, C., & Zhang, H.-G. (2007). Tumor Exosomes Inhibit Differentiation of Bone Marrow Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 178(11), 6867–6875. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.11.6867>
- Zhang, H.-G., Liu, C., Su, K., Yu, S., Zhang, L., Zhang, S., Wang, J., Cao, X., Grizzle, W., & Kimberly, R. P. (2006). A Membrane Form of TNF- α Presented by Exosomes Delays T Cell Activation-Induced Cell Death. *The Journal of Immunology*, 176(12), 7385–7393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7385>
- Zhang, K., Xu, S., Shi, X., Xu, G., Shen, C., Liu, X., & Zheng, H. (2019). Exosomes-mediated transmission of foot-and-mouth disease virus in vivo and in vitro. *Veterinary Microbiology*, 233, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.04.030>
- Zhang, Yuan, Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. In *Cell and Bioscience* (Vol. 9, Issue 1, pp. 1–18). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhang, Yuehui, Liu, F., Yuan, Y., Jin, C., Chang, C., Zhu, Y., Zhang, X., Tian, C., He, F., & Wang, J. (2017). Inflammasome-Derived Exosomes Activate NF- κ B Signaling in Macrophages. *Journal of Proteome Research*, 16(1), 170–178. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00599>
- Zhang, Z., Bashiruddin, J. B., Doel, C., Horsington, J., Durand, S., & Alexandersen, S. (2006). Cytokine and Toll-like receptor mRNAs in the nasal-associated lymphoid tissues of cattle during foot-and-mouth disease virus infection. *Journal of Comparative Pathology*, 134(1), 56–62. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2005.06.011>
- Zhang, Z., Ahmed, R., Paton, D., & Bashiruddin, J. B. (2009). Cytokine mRNA responses in bovine epithelia during foot-and-mouth disease virus infection. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 179(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2007.08.012>
- Zheng, J., Tan, J., Miao, Y. Y., & Zhang, Q. (2019). Extracellular vesicles degradation pathway based autophagy lysosome pathway. *American Journal of Translational Research*, 11(3), 1170–1183.
- Zheng, P., Luo, Q., Wang, W., Li, J., Wang, T., Wang, P., Chen, L., Zhang, P., Chen, H., Liu, Y., Dong, P., Xie, G., Ma, Y., Jiang, L., Yuan, X., & Shen, L. (2018). Tumor-associated macrophages-derived exosomes promote the migration of gastric cancer cells by transfer of functional Apolipoprotein e.

Cell Death and Disease, 9(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0465-5>

Zitvogel, L., Regnault, a, Lozier, a, Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nature Medicine*, 4(5), 594–600.