



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

2018 - TESIS DOCTORAL
Programa Doctoral en Cirugía y Ciencias Morfológicas

Tesis presentada por:
ÀNGELA M BELLMUNT FONTANET

**PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA COMUNICACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS
TUMORALES Y LOS MACRÓFAGOS EN EL CARCINOMA LARÍNGEO**

Para optar al título de Doctora por la
Universitat Autònoma De Barcelona

Tutor: **Dr. Juan Lorente Guerrero**

Directores:

Dr. Juan Lorente Guerrero

Dr. Daniel Closa Autet

© **Àngela M Bellmunt Fontanet**

Foto cubierta: Captación de exosomas (rojo) por parte de células tumorales laríngeas (verde) BICR18

Diseño: Usartdisseny

Barcelona (2018)

**Apunta a la lluna.
Si falles, podries encertar una estrella.**

“W. Clement Stone”

El poder de la Ment ens fa infinits.

“John Muir”

Sempre amunt,

AGRAÏMENTS

No em crec que hagi arribat el moment d'escriure els "agraïments". Em sento TAN feliç! Tot i que... haig de confessar que alhora em sento melancòlica. Una Tesis sempre comporta una història darrere... La meua va començar quan el Dr Juan Lorente em va proposar formar part de l'equip de la Vall d'Hebron i endinsar-me al món del Doctorat. ¡Muchas Gracias por presentarme este mundo!

No us podeu imaginar la il·lusió que em va fer trepitjar per primer cop la sala de cultius, l'emoció amb què cada cop que m'he vestit amb la bata verda, he esterilitzat la campana de cultius i he agafat la placa per observar les cèl·lules sota el microscopi... consti que també m'he emocionat fent l'estimat *Western*!

Al Laboratori 710 hi he après des de pipetejar i descongelar congeladors amb un súper gruix de gel, fins a tècniques súper *Hi-Tech* com la immunofluorescència. Laia, vas ser el meu primer exemple com doctoranda al Lab (quina raó que tenies... -és dur, però compensa!). Laura, ha sido un gusto trabajar contigo, ¡tienes un espíritu docente que me encanta! Gracias por tus horas i tu paciencia! Anna, Gràcies per estar-hi sempre, pel teu somriure energètic i poder compartir el teu despatx-menjador amb la força del *tupper*! És clar, el ritme d'en Nacho que no falti mai! ¿De dónde sacas este súper-buen humor? Ha sigut un luxe treballar amb tots vosaltres i que m'hagueu ajudat a descobrir la meua part més científica! Gràcies!

Vull agrair a les persones que sempre hi són, com la meua gent de Madrid: Maria José González Gimeno, gracias infinites por ser mi mentora y sobretodo mi amiga, siempre te tengo cerca sea cuál sea la hora... Gracias!

Gon! Mi compi de cordada... ¿cuál es la próxima pared? y mi Emma: ¡conocerme fue revelador para mí en Madrid! A mis súper Cirujanas y a su Telemedicina: Camilla, Marta, Isa, Pati... Madrid y el Clínico no hubiera sido los mismo sin vosotras!

Manoli (vaaale, ya sé que prefieres que te llame Manuela), por haber sido la mejor compañera de piso y haberme mostrado como es la vida de doctoranda. Y por tu complicidad, nuestras charlas y guardias compartidas... A coger aire y a bailar!

Marina V., ets l'exemple més clar d'amistat incondicional. Per tots els goffres i Barraques de l'Empordà, partides de ping pong i de bàsquet. Recordes que ja de petites parlàvem d'investigació i medicina?... així seguim, ara de Doctora a Doctora (què fort!), i sempre davant un bon sushi! Ets el meu exemple dins del món de la investigació.

Gràcies als meus Vallesans, heu sigut una gran troballa i heu fet que el meu retorn a Sabadell estigui ple d'emocions i aventures, tant dintre com fora de la UES. Al Gabriel pels seus improvisats sopars. Al veí Oriol, pels seus rescats i les escapades al trote per Togores i Mordor! Gràcies al Juli per ajudar conèixer-me a mi mateixa. Ets el millor company de Swing i de pales! Gràcies per suposat a la família CEG i GIE, heu sigut la meva altre família al tornar de Madrid: Tina i Montse, amb vosaltres a la fi del món! Nat, Marina, Pad... m'encanta que formeu part del meu món!

Gràcies també a la Marina Ciria (Marinola!) per les seves visions professionals i sobretot de bona amiga, però sobretot gràcies per ser-hi sempre. A la Laia, pel seu esperit dinamitzador, i a la Laura Gutiérrez, com agraeixo haver caminat juntes des del món de la Pia fins ara.

Per suposat, vull agrair el suport de la meva família, en especial a la meva Mare, que m'ha vist literalment en toooots els colors... T'estimo Mare! Aquesta tesi no hagués sigut possible sense la teva incondicional presència! També en especial vull agrair al meu Pare: la teva orientació m'és imprescindible.... gràcies per les teves xerrades fins les tantes! Gràcies al meu germà Jordi i les seves converses i escalades! Ens en queden moltes! Gràcies també a les meves Tietes i a la meva família Bostoniana, a l'Anna i al meu germà Xavi! (algun dia escalarem tots tres!) També vull agrair a les meves Àvies, perquè sempre em tenen un plat improvisat a taula i són les dones amb més fortalesa que he conegut mai! Avi, sempre hi haurà una "piloteta" dins meu...

Aquesta història meva i aquesta tesi té en concret un pilar essencial i no estaria llegint aquesta memòria sense el Dr Closa. Dani... sense dubtes has sigut la persona que més m'ha "aguantat" durant aquest temps... M'has transformat en una dona amb visió investigadora i m'has ajudat a entendre que "si no tens una bona pregunta no saps què buscar!". No saps com he crescut al teu costat (i sota la teva super - VISIÓ!) tan a nivell professional (m'has obert un món fascinant) com personal (gràcies per confiar en mi). També m'has ajudat a transportar-me segles enrere amb les teves novel·les... que per cert en necessitaré més! Ens esperen més projectes i experiments anotats a un tovalló...

Per la Mare Natura, l'Amor i la Terra.

Pel Miguel Ángel,

Pel Mure

INFORME DE LOS DIRECTORES DE TESIS

Dr Juan Lorente Guerrero, Profesor Titular de Otorrinolaringología de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, y Dr Daniel Closa Autet, Científico Titular de *l'Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona*, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIBB-CSIC)

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral: PAPEL DE LOS EXOSOMAS EN LA COMUNICACIÓN ENTRE LAS CÉLULAS TUMORALES Y LOS MACRÓFAGOS EN EL CARCINOMA LARÍNGEO, presentada por Àngela M Bellmunt Fontanet para optar al título de Doctora por la *Universitat Autònoma de Barcelona* se ha realizado bajo nuestra dirección y cumple los requisitos específicos para ser defendida frente al Tribunal de evaluación correspondiente.

Dr. Juan Lorente Guerrero

Dr Daniel Closa Autet

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS _____	Pág. 18
ÍNDICE DE FIGURAS _____	Pág. 20
ÍNDICE DE TABLAS _____	Pág. 21
INTRODUCCIÓN _____	Pág. 23
1. La laringe _____	Pág. 24
1.1. Embriología	
1.2. Anatomía	
1.3. Fisiología	
1.4. Histología	
2. El carcinoma de Laringe _____	Pág. 26
2.1. Etiología	
2.2. Epidemiología	
2.3. Clínica	
2.4. Tratamiento	
2.5. Supervivencia y mortalidad	
2.6. Fisiopatología de la Carcinogénesis	
3. Exosomas _____	Pág. 34
3.1. Caracterización	
3.2. Biogénesis	
3.3. Secreción	
3.4. Adhesión e internalización	
3.5. Funciones de los exosomas	
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____	Pág. 43
MATERIAL Y MÉTODOS _____	Pág. 47
1. Cultivos celulares _____	Pág. 48
1.1. Líneas celulares	
1.2. Condiciones de cultivo	
1.3. Cocultivo	
1.4. Ensayo de migración celular	
1.5. Esferoides	
1.6. Captación e internalización de exosomas	

ÍNDICE

2. Diseño experimental	Pág. 49
Experimento A: Caracterización de los exosomas generados por las células BICR-18 y THP1.	
Experimento B: Determinación del papel de los exosomas en el diálogo celular entre macrófagos y células tumorales.	
Experimento C: Papel de los exosomas en la modulación del eje inmunosupresor PD-1/ PD-L1.	
Experimento D: Distribución de los tipos celulares en cultivos tridimensionales y estudio del perfil de activación de los macrófagos	
3. Métodos	Pág. 53
3.1. Preparación del medio Exo-free	
3.2. Aislamiento de exosomas	
3.3. Microscopía electrónica de transmisión	
3.4. Nanosight	
3.5. Western blot	
3.6. qPCR	
3.7. Marcaje mediante fluorescencia	
3.8. Inmunofluorescencia	
3.9. Esferoides	
4. Análisis estadístico	Pág. 59
RESULTADOS	Pág. 61
<i>Experimento A: Caracterización de los exosomas generados por las células BICR-18 y THP1.</i>	
<i>Experimento B: Determinación del papel de los exosomas en el diálogo celular entre macrófagos y células tumorales.</i>	
Efecto de los exosomas de THP1 sobre la migración celular de BICR-18	
Efecto de los exosomas de BICR-18 sobre el fenotipo de los macrófagos	
<i>Experimento C: Papel de los exosomas en la modulación del eje inmunosupresor PD-1/PD-L1.</i>	
<i>Experimento D: Distribución de los tipos celulares en cultivos tridimensionales y estudio del perfil de activación de los macrófagos</i>	
DISCUSIÓN	Pág. 71
CONCLUSIONES	Pág. 79
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 83

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Alix: *Programmed cell death 6 interacting protein*
APC: *Antigen Presenting Cell*
CAF: *Cancer Associated Fibroblasts*
CCL2: C-C motif ligand 2
CCL3: C-C motif ligand 3
CCL18: C-C motif ligand 18
CCND1: *Cyclin D1 gene*
CSC: *Cancer Stem Cells*
CSF-1: *Colony-Stimulating Factor-1*
CTLA4: *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*
dsDNA: *double-strand DNA*
EGF: *Epidermal Growth Factor*
EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*
Erp57: *Endoplasmic Reticulum protein 57*
ESCRT: *Endosomal Sorting Complex Required For Transport*
EV: *Extracellular Vesicles*
FBS: *Fetal Bovine Serum*
FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor*
GM-CSF: *Granulocyte - Monocyte Colony Stimulating Factor*
gp130: *glycoprotein 130*
HNSCC: *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*
HSP70: *Heat Shock Protein 70*
HSP90: *Heat Shock Protein 90*
IFN: *Interferon*
I κ B: *κ B Inhibitor*
IL: *Interleukin*
JAK: *Janus Kinase*
LAMP1: *Lysosomal Associated Membrane Protein 1*
LCK Kinasa: *Lymphocytes-Specific Tyrosine Kinasa*
LPS: *Lipopolysaccharides*
MCHII: *Major Histocompatibility Factor-II*
miRNA: *microRNA*
MMP: *Matrix Metaloproteasas*
mRNA: *messenger RNA*
MSC: *Mesenchimal Stem Cells*
mtDNA: *mitochondrial DNA*
MVBs: *Multivesicular Bodies*
NF- κ B: *Nuclear Factor-kappa B*

PD-1: *Programmed Death-1*
PD-L1: *Programmed Death Ligand -1*
PD-L2: *Programmed Death Ligand-2*
PI3K: *Phosphoinositide-3-kinase*
PMA: *Phorbol 12-Miristate-13-Acetate*
RMC1: *Mannose Receptor*
SHP-2: *Tyrosine Phosphatase SH-2*
SNARE: *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*
STAT3: *Signal Transducers and Activators of Transcription-3*
TAM: *Tumor Associated Macrophages*
TCR: *T-Cell antigen Receptor*
TEM: *Transmission Electron Microscopy*
TEX: *Tumor Exosomes*
TGF- β : *Transforming Growth Factor β*
Th1: *Linfocitos T-helper 1*
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α*
TSG101: *Tumor Susceptibility Gene 101 Protein*
VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la laringe.	Pág. 24
Figura 2. Esqueleto laríngeo.	Pág. 25
Figura 3. Diferenciación del monocito precursor a macrófago.	Pág. 29
Figura 4. Representación del perfil de activación de los macrófagos	Pág. 29
Figura 5. Captación y activación de macrófagos.	Pág. 30
Figura 6. Esquema del funcionamiento de un factor de transcripción.	Pág. 31
Figura 7. Dibujo esquemático de la vía de señalización NFkB.	Pág. 32
Figura 8. Esquema de funcionamiento de la vía de señalización STAT3.	Pág. 33
Figura 9. Modelo molecular de la inhibición del linfocito T mediada por PD-1/PD-L1.	Pág. 34
Figura 10. Microfotografía electrónica exosomas.	Pág. 35
Figura 11. Composición de los exosomas.	Pág. 36
Figura 12. Representación esquemática de la biogénesis y secreción de exosomas y vesículas extracelulares.	Pág. 38
Figura 13. Captación de los exosomas.	Pág. 39
Figura 14. Interacciones mediadas por los TEX en el microambiente tumoral I.	Pág. 40
Figura 15. Interacciones mediadas por los TEX en el microambiente tumoral II.	Pág. 41
Figura 16. Representación esquemática del Scratch Assay.	Pág. 50
Figura 17. Representación esquemática para la caracterización fenotípica de los macrófagos.	Pág. 51
Figura 18: Representación esquemática para determinar la expresión de PD-1 y de PD-L1 a las 24 h.	Pág. 52
Figura 19: Esquema para el aislamiento de los exosomas.	Pág. 54
Figura 20. Imagen representativa de exosomas por microscopía electrónica con tinción negativa.	Pág. 62
Figura 21. Rastreo de muestras BICR-18 y THP1 mediante <i>Nanosight</i> .	Pág. 62
Figura 22. Análisis por <i>Western Blot</i> de los exosomas.	Pág. 63
Figura 23. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia para estudiar la captación celular de exosomas.	Pág. 63
Figura 24. <i>Scratch Assay</i> de BICR-18.	Pág. 64
Figura 25. Expresión de citoquinas por los macrófagos, tras 24 h.	Pág. 65
Figura 26. Cinética de cultivo de los macrófagos.	Pág. 65
Figura 27. Expresión relativa de PD-1 y PD-L1 por ambas poblaciones celulares mediante qPCR.	Pág. 66
Figura 28. Tinción por inmunofluorescencia STAT3 i NFkB en BICR-18.	Pág. 67
Figura 29. Tinción por inmunofluorescencia de STAT3 en BICR-18 con 5,15-DPP.	Pág. 67
Figura 30. qPCR de PD-L1 tras el tratamiento con inhibidor de STAT3.	Pág. 68
Figura 31. Microfotografías de los distintos esferoides tras 1 y 7 días de cultivo.	Pág. 69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Principales características y diferencias entre Microvesículas, Exosomas y Cuerpos apoptóticos.	Pág. 38
Tabla II. Tinciones utilizadas para el estudio de captación de los exosomas mediante fluorescencia.	Pág. 50
Tabla III. Composición de los reactivos usados para el Western Blot.	Pág. 55
Tabla IV. Anticuerpos primarios y secundarios usados para el Western Blot de Alix y TSG101.	Pág. 56
Tabla V. Condiciones específicas para la PCR	Pág. 57
Tabla VI. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR.	Pág. 58

1. La laringe

La laringe es un órgano situado en la línea media del cuello, a la altura de los cuerpos vertebrales C3 a C6 y comunica la parte inferior de la faringe con la tráquea. Se encarga de funciones vitales como la respiración, la deglución y es el órgano responsable de la emisión de la voz.

1.1. Embriología

La laringe se origina durante la cuarta y la quinta semana de gestación (**Figura 1**). El revestimiento interno de la laringe es de origen endodérmico, mientras que los cartílagos y los músculos provienen del mesénquima de los arcos faríngeos cuarto y sexto. El mesénquima que rodea al orificio laríngeo se acaba diferenciando en los cartílagos tiroideos, cricoides y aritenoides, que forman el soporte esquelético de la laringe. La luz de la laringe se ve ocluida por el epitelio de forma temporal hasta la novena semana de gestación, cuando se produce la recanalización de la estructura.

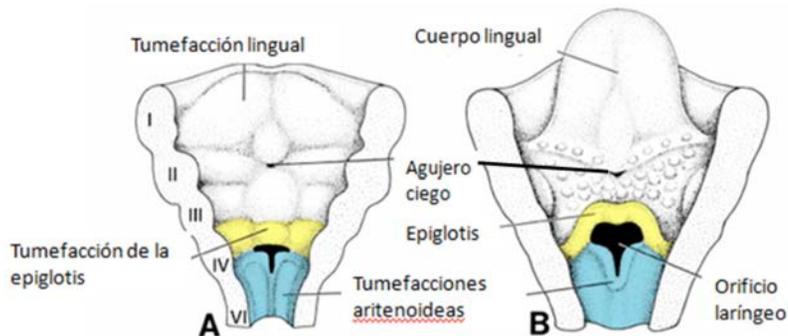


Figura 1. Desarrollo de la laringe. Imágenes representativas del orificio laríngeo y las correspondientes tumefacciones que lo rodean. **A:** a las 6 semanas de gestación **B:** a las 12 semanas de gestación. Imagen adaptada de [156].

Simultáneamente, las cuerdas vocales y los ventrículos laríngeos se desarrollan a partir de un par de pliegues laterales y fondos de saco.

La musculatura laríngea deriva del cuarto y sexto arco faríngeo y su mesénquima, y es inervada por ramas del nervio vago (X par craneal).

1.2. Anatomía

El esqueleto laríngeo se compone de nueve cartílagos, unidos por ligamentos y membranas. Tres de los cartílagos son únicos –tiroideos, cricoides y cartílago epiglótico–, y los otros tres, pares –aritenoides, corniculados de Santorini y cuneiformes de Wrisberg – (**Figura 2**).

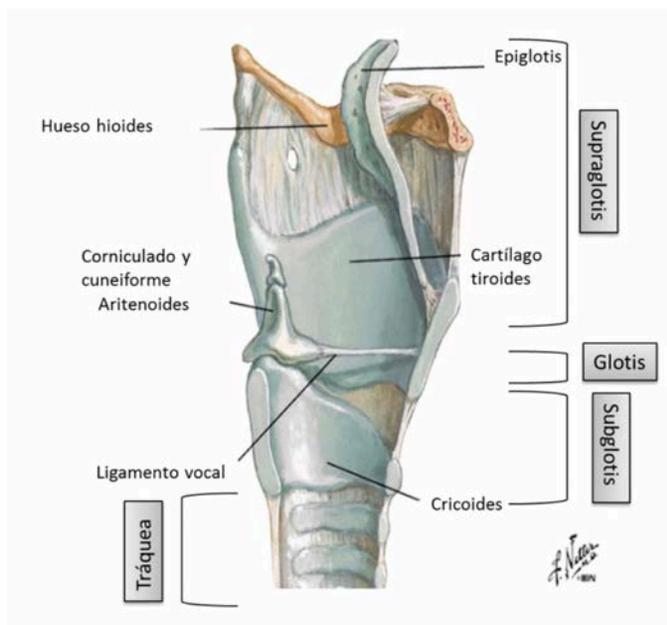


Figura 2. Esqueleto laríngeo. Visión lateral derecha de la estructura laríngea cartilaginosa. Los cartílagos laríngeos están unidos entre sí por ligamentos y tejido blando que permiten, mediante la musculatura laríngea intrínseca, modificar el tamaño y la morfología de la estructura laríngea para llevar a cabo sus funciones. Imagen adaptada de [157].

La cavidad laríngea se extiende desde la apertura superior, por donde se comunica con la faringe, hasta el plano del borde inferior del cartílago cricoides, dando inicio a la tráquea. Las cuerdas vocales se sitúan en la glotis y son las estructuras responsables de la emisión del sonido. El área situada por encima de las cuerdas vocales corresponde a la supraglotis, mientras que el área por debajo de ellas y colindante con la tráquea pertenece a la subglotis.

La musculatura intrínseca de la laringe está inervada bilateralmente por el nervio laríngeo recurrente, a excepción del músculo cricotiroideo, que se encuentra inervado por el nervio laríngeo superior.

La vascularización de la laringe viene dada por la arteria tiroidea superior, rama de la arteria carótida externa, y la arteria tiroidea inferior, rama del tronco tirobircervicoescapular. El sistema venoso acompaña al sistema arterial.

El sistema linfático de la laringe drena en los ganglios cervicales profundos superiores y los ganglios pre- y paratraqueales.

1.3. Fisiología

Las tres funciones primordiales de la laringe son la respiración a través de la rima glotis, la fonatoria mediante la vibración, y la protección de la vía aérea durante la deglución.

La estructura anatómica de la laringe permite el paso de aire durante la respiración, la cual se inhibe de forma refleja durante la deglución evitando así la aspiración de bolo alimentario. Inmediatamente las cuerdas vocales y las bandas se aproximan entre sí y contactan con la base de la epiglotis constituyendo el esfínter glótico. Además, la laringe se eleva y la epiglotis acaba de cerrar la glotis, facilitando el paso del bolo alimentario al tracto digestivo.

Para la fonación, la laringe actúa como transductor de la energía aerodinámica generada en los pulmones y abdomen en energía acústica, mediante el efecto Bernoulli.

1.4. Histología

La laringe está revestida mayoritariamente de epitelio respiratorio típico cilíndrico pseudoestratificado. Cabe destacar que las cuerdas vocales están revestidas de su propio epitelio estratificado, que le ofrece más resistencia a la vibración generada durante la emisión de la voz.

2. El carcinoma de Laringe

2.1. Etiología

El factor de riesgo más implicado clásicamente en el cáncer de laringe es el consumo de tabaco y alcohol, que actúan a demás sinérgicamente [1], [2]. Por otra parte, algunos factores ambientales y profesionales como el asbesto, los hidrocarburos policíclicos aromáticos, los polvos de madera y metal, e incluso las lacas, también se han detectado como posibles potenciadores del cáncer de laringe [1], [3]. El papel de la alimentación es menos claro, pero se ha propuesto que una alimentación rica en fruta y verdura tendría un efecto protector contra el cáncer de laringe [4], [5]. También es controvertido el papel del reflujo gastroesofágico y faringolaríngeo, ya que existen estudios contradictorios al respecto [6], [7]. El HPV (*Human Papillomavirus*), altamente estudiado estos últimos años, juega un papel minoritario en el carcinoma laríngeo a diferencia de su homólogo en la orofaringe, detectándose en el primero entre un 5-20%, según las series [8], [9].

2.2. Epidemiología

Mundialmente, el carcinoma de cabeza y cuello (HNSCC) se encuentra el sexto en frecuencia, con 600.000 casos nuevos anuales [10], [11]. Un 2% van a localizarse en la laringe y en más del 90% de los casos su histología va a ser epidermoide [12]. Centrándonos en Europa, se estima que alrededor de 28.000 nuevos casos de carcinoma laríngeo ocurren anualmente [13]. La incidencia anual ha sido históricamente mayor en hombres que en mujeres (5,8 casos por 100,000 *versus* 1,2 por 100,000, respectivamente) y ha presentado una tendencia estable al aumento hasta la última década, en la que el menor consumo de tabaco y alcohol ha llevado a una reducción global de las cifras, en ambos sexos. [14]–[17].

2.3. Clínica

El lugar de asiento del cáncer de laringe determina los síntomas y su estadio al diagnóstico. Dos tercios de los carcinomas laríngeos van a asentar en el plano glótico presentando disfonía de forma temprana y facilitando su diagnóstico precoz. El cáncer supraglótico ocurre en segundo lugar y tiende a crecer relativamente silencioso hasta que presenta sintomatología disneica y disfónica. El cáncer subglótico representa menos del 2% de los casos e igual que el supraglótico suele diagnosticarse en estadios avanzados, con obstrucción aérea [18], [19].

2.4. Tratamiento

El manejo del cáncer de laringe en estadio temprano se basa en protocolos de preservación de órgano mediante cirugía endoscópica transoral, cirugía abierta o radioterapia, procurando mantener intactas las funciones de la laringe [12], [18].

La laringectomía total era el pilar para el tratamiento del cáncer de laringe en estadio avanzado hasta los 90s [20], década en la se evaluaron protocolos de quimioterapia y radioterapia secuencial o concurrente los cuales han relevado a la cirugía radical [19], [21]. La laringectomía total sigue siendo el tratamiento de rescate de elección ante las recaídas locales y progresiones tumorales [12], [22].

El manejo de los ganglios linfáticos cervicales va a depender de su afectación tumoral y de la localización y el tamaño del tumor primario, pudiendo ofrecer, de nuevo, tratamiento quirúrgico o quimiorradioterápico [12].

La terapia con anticuerpos monoclonales contra el EGFR (cetuximab) ha sido el paradigma reciente en el tratamiento médico para el cáncer de cabeza y cuello en pacientes afectos de HNSCC avanzados o recidivantes. Sin embargo, la reducción global de la mortalidad ha sido menor a la esperada. A día de hoy, las nuevas terapias inmunes están abriendo una nueva expectativa, al usar el propio sistema inmunológico del paciente, que puede ser suprimido por las células cancerosas, para combatir el tumor [23], [24].

2.5. Supervivencia y mortalidad

La mortalidad por los diferentes tipos de cáncer incrementó a lo largo del siglo XX, principalmente debido a la epidemia del tabaco y el cáncer de pulmón, disminuyendo un 1,5% anual a partir de los años 90s. La menor mortalidad global por cáncer durante las dos últimas décadas es debida a una menor incidencia anual, así como a los métodos de detección y tratamiento precoz.

Lamentablemente, el cáncer de laringe es una excepción a esos datos, ya que su tasa de supervivencia ha disminuido en los últimos años [25]. El grupo de Hoffman observó que la reducción de la supervivencia coincidía con una mayor tendencia al manejo quimiorradioterápico y menos quirúrgico durante los últimos años [26].

2.6. Fisiopatología de la Carcinogénesis

El proceso de la carcinogénesis es altamente complejo y no del todo comprendido a día de hoy. Rudolf Virchow (1821-1902) sugirió en 1863 la relación entre la inflamación y el cáncer a raíz de detectar una elevada proporción de linfocitos en muestras tumorales [27].

Actualmente se considera que tan solo un 5-10% de todos los cánceres son causados por herencia genética, mientras que el 90-95% restante se asocian a estilos de vida y factores medioambientales: inflamación crónica, obesidad, tabaco, alcohol, radiación.... Todos estos factores de riesgo llevan al cáncer a través de un denominador común: la irritación crónica y la inflamación [28].

Originalmente las células inflamatorias presentes en el tumor se asumieron como parte de la respuesta antitumoral del sistema inmune, pero posteriormente se vieron también involucradas en la iniciación y progresión tumoral [29]. A día de hoy, la implicación de la respuesta inflamatoria en el tumor se considera equivalente a una inflamación no resuelta que, de manera similar a un proceso de curación de una herida, promueve la proliferación celular, la inmunosupresión y la angiogénesis: factores que favorecen la cicatrización pero que en el contexto del cáncer, promueven su desarrollo y crecimiento [30].

En el escenario del HNSCC se han señalado alteraciones genéticas en forma de pérdidas o ganancias cromosómicas, amplificaciones de loci o metilaciones. La lista de oncogenes aumenta cada día; algunos ejemplos son el gen TP53, que codifica para la proteína p53 y el gen CCND1, que conlleva la sobreexpresión de la proteína Ciclina D [31]. Algunas vías de señalización conocidas en el HNSCC son la PI3K (*Phosphoinositide-3-kinase*), FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*), EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) y STAT3 (*Signal Transducers and Activators Of Transcription-3*) [31].

A través del conocimiento de los ejes genéticos alterados y de la capacidad de modular el sistema inmune, se ha podido avanzar en el campo de la inmunoterapia, que busca promover una respuesta antitumoral bloqueando algún punto de la vía de señalización y evitar la replicación del gen responsable del cáncer [23].

2.6.1. Microambiente tumoral

El desarrollo del cáncer tiene lugar en un escenario llamado “microambiente tumoral”, donde encontramos las células tumorales (*CSC, cancer stem cells*) y las no tumorales: células endoteliales, fibroblastos, células mesenquimales (*MSC, mesenchymal stem cells*) y células del sistema inmune [32], [33].

La comunicación bidireccional entre las células tumorales y las de microambiente celular es ampliamente reconocida como clave para la iniciación y el crecimiento tumoral mediante citoquinas y factores de crecimiento inmunosupresores como Interleucina 6, Interleucina 10, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), TGF- β (*Transforming growth factor β*) y GM-CSF (*Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor*) [33]–[35].

2.6.2. TAM: tumor associated macrophages.

Los macrófagos son el componente principal de las células inflamatorias y los que infiltran el microambiente tumoral reciben el nombre de macrófagos asociados al cáncer (TAM, *tumor associated macrophages*) [36], [37]. Juntamente con los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *cáncer associated fibroblasts*), son las células no-tumorales predominantes en el tejido tumoral [38].

La plasticidad es una característica distintiva de los macrófagos y globalmente se han definido dos estados de activación (polarización) donde los macrófagos muestran una heterogeneidad funcional e incluso funciones opuestas. Por analogía a las respuestas inmunes TH1 y TH2, los dos fenotipos de activación de macrófagos se denominaron inicialmente “M1” (clásica) y “M2” (alternativa) [39], [40] (**Figura 3**). En respuesta a una agresión, citoquinas inflamatorias tipo I como el IFN γ (*Interferon γ*) y el TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), o de fragmentos de microorganismos como LPS (lipopolisacáridos), median la polarización de los monocitos a macrófagos M1. Los macrófagos que adquieren este fenotipo segregan más citoquinas pro-inflamatorias (IL1 β , IL-6, IL-12, TNF α , CCL3, CXL9 y CXL10), radicales libres y óxido nítrico, aumentan la expresión de MCHII (*Major Histocompatibility Factor-II*) estimulan la presentación del antígeno, coactúan con linfocitos Th1 (*T-helper 1*) y desencadenan una respuesta proinflamatoria para hacer frente a la agresión [37]. Contrariamente a la polarización clásica, los macrófagos pueden polarizarse a un fenotipo M2 en presencia de citoquinas Th2, como la IL-4 y la IL-13 o complejos inmunitarios. Este proceso da lugar a un fenotipo cicatrizante mediante la liberación de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, CCL2) y factores de crecimiento que conllevan a una síntesis de colágeno y matriz extracelular para la reparación tisular (TGF- β , VEGF, EGF) [41].

Las tres poblaciones se caracterizan por las diferentes interleucinas segregadas, de forma que mientras la elevada presencia de IL-10 y TGF β definiría a la población M2-like reguladora [42], una mayor expresión del receptor de la manosa (RMC1) y CCL2 (*C-C motif ligand-2*) correspondería a la población M2-like reparador [43].

Ante la presencia de un tumor, los monocitos sanguíneos son captados, diferenciados a macrófagos y activados a fenotipo M2-like mediante citoquinas y factores de crecimiento producidos tanto por células tumorales como estromales del microambiente tumoral (**Figura 5**). Algunos de los factores son CSF-1 (*Colony-stimulating factor-1*), CCL2 y CCL18 (*C-C motif ligand-2 y 18*) y VEGF [37], [41], [44]–[47].

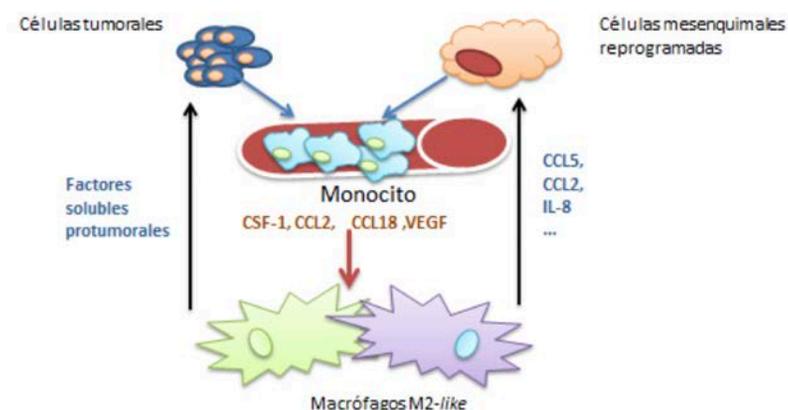


Figura 5. Captación y activación de macrófagos. Monocitos circulantes son captados al lecho tumoral mediante señales quimotácticas liberadas por células tumorales y MSC. Recíprocamente, factores solubles liberados por los propios macrófagos M2-like promueven el crecimiento celular y la motilidad de las células estromales [36], [159].

Los TAM facilitan un microambiente apto para el crecimiento tumoral y promueven la inmortalidad celular [45], [48]. También inducen la angiogénesis [46] y, mediante proteasas y citoquinas anti-inflamatorias, [37], [41] suscitan la invasión local y la metástasis a distancia [49].

La importancia de este proceso reside en que se ha descrito que una mayor infiltración de macrófagos pro-tumorales empeora el pronóstico tumoral en el HNSCC, al estar en relación con tumores histológicamente más agresivos y con una peor respuesta a la quimioterapia [50], [51].

2.6.3. Factores de transcripción

Un factor de transcripción es una proteína que se une a una secuencia específica de DNA y regula el paso a RNA para la producción de proteínas. Cualquier cambio en el medio extracelular induce unas modificaciones intracelulares en forma de vías de transcripción que inducen una respuesta celular ya sea en forma de cambio fenotípico en los macrófagos, cambios en el ritmo de proliferación en la célula tumoral o cualquier otra respuesta celular (**Figura 6**).

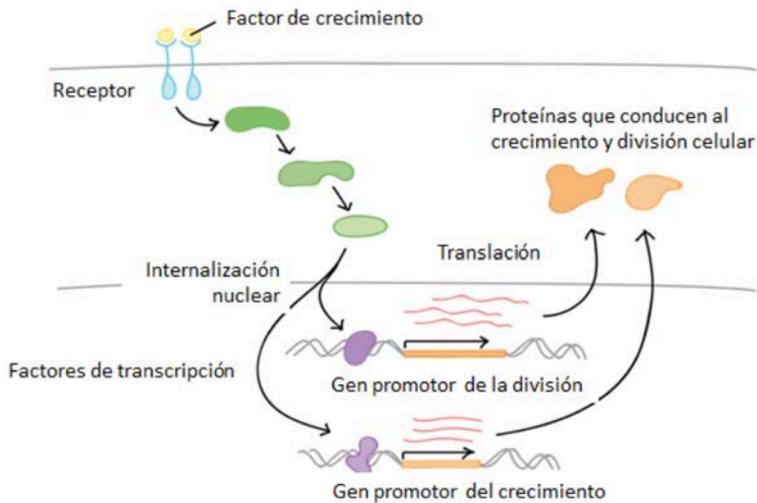


Figura 6. Dibujo esquemático del funcionamiento de un factor de transcripción a través de su vía de señalización, tras recibir el estímulo externo en forma de factor de crecimiento. Imagen adaptada de KhanAcademy (<https://es.khanacademy.org/>)

En este trabajo estudiamos más detenidamente las vías de señalización NF- κ B y STAT3, y su papel potencial en la señalización mediada por exosomas en el carcinoma de laringe.

NF- κ B

NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) es una familia de factores de transcripción que regula procesos fisiológicos como la supervivencia celular, la inflamación y la respuesta inmune.

En mamíferos existen 5 miembros de la familia NF- κ B de los que los más relevantes son las subunidades P65 y P50 que actúan de forma dimerica. En condiciones basales los componentes P65 y P50 se encuentran en forma de dímero inactivo en el citoplasma debido a su unión con la proteína inhibidora I κ B (Inhibidores de κ B), que previene su translocación al interior del núcleo. En respuesta a estímulos como citoquinas inflamatorias, se activa una proteína quinasa de I κ B (I κ -Kinasa) que fosforila a la molécula I κ B. Esta fosforilación actúa como señal para separar I κ B del dímero P65-P50, unirlo a proteínas ubiquitininas (Ub) y conduce la proteína I κ B a un proceso de degradación por parte del proteosoma (**Figura 7**). Una vez libre, el dímero p65-P50 es transportado al interior del núcleo celular mediante las proteínas Importinas. En el núcleo, NF- κ B se une a los promotores de genes específicos que tienen sitios de unión para NF- κ B, induciendo la expresión de genes implicados en la proliferación (MYC, Ciclina D1), supervivencia (BCL-2), inflamación (COX-2 TNF α , IL-6, IL-8) y metástasis (MMP, *Matrix Metaloproteasas*), entre otros procesos [52].

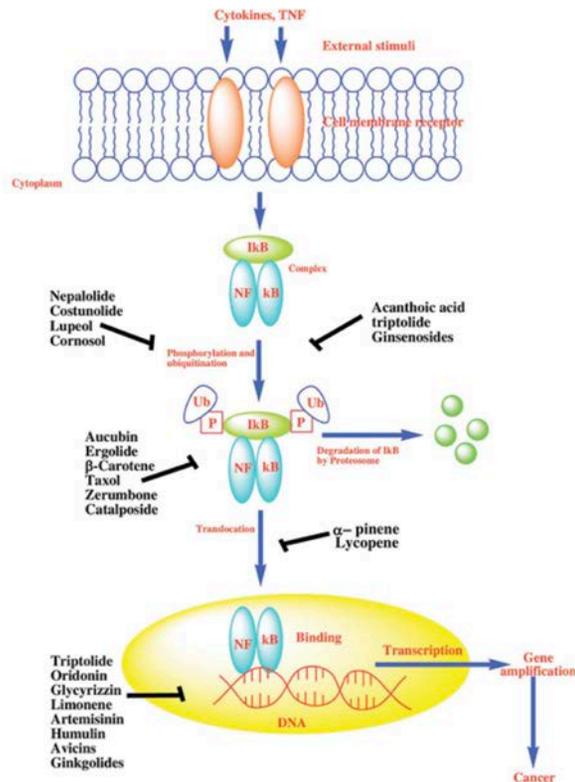


Figura 7. Dibujo esquemático de la vía de señalización NFκB. Se muestran algunas sustancias anti-tumorales, que actúan en distintos pasos de la vía de señalización. Imagen obtenida de [160].

STAT3

STAT3 es un factor de transcripción perteneciente a la familia JAK/STAT. De los siete miembros de la familia STAT, STAT3 juega un papel crucial para la progresión y supervivencia tumoral [53], [54]. La vía de transcripción de STAT3 fue inicialmente descubierta en el contexto de IFN α (*interferon- α*), IFN γ e IL-6 (*Interleucina-6*) en la década de los 90 [55]. En situación basal, STAT3 permanece latente en el citosol en forma de monómero formando complejos con proteínas de la familia de las chaperonas HSP90 (*Heat shock protein 90*) y ERp57 (*endoplasmic reticulum protein 57*). En respuesta a diferentes citoquinas y factores de crecimiento se activa la quinasa JAK (*Janus kinase*) que fosforila a dos moléculas de STAT3, induciendo su dimerización, yuxtaposición y translocación nuclear (**Figura 8**). Esto ocurre de forma transitoria en la célula sana, pero en la célula transformada la activación persiste y promueve cambios favorecedores para la iniciación y progresión tumoral. Tras su translocación al núcleo, STAT3 induce la proliferación celular al aumentar la expresión de Ciclina D1/D2, c-Myc, S-jun, c-fos. También contribuye a que las células tumorales adquieran inmortalidad mediante la transcripción de genes anti-apoptóticos como MCL, BCL-XL y BCL-2, y mediante la menor expresión del gen supresor tumoral p-53 [56]. STAT3 promueve el escape inmune, la activación de Macrófagos M2-like [57], la progresión tumoral mediante MMP2 y MMP9 (Metaloproteinasas 2 y 9) [54] y facilita el asentamiento de metástasis [57]–[59]. Se ha descrito que STAT3 se encuentra constitutivamente activado en el cáncer colorectal, de mama, pulmón, próstata, hígado y páncreas [59], [60], así como también en laringe [61], [62].

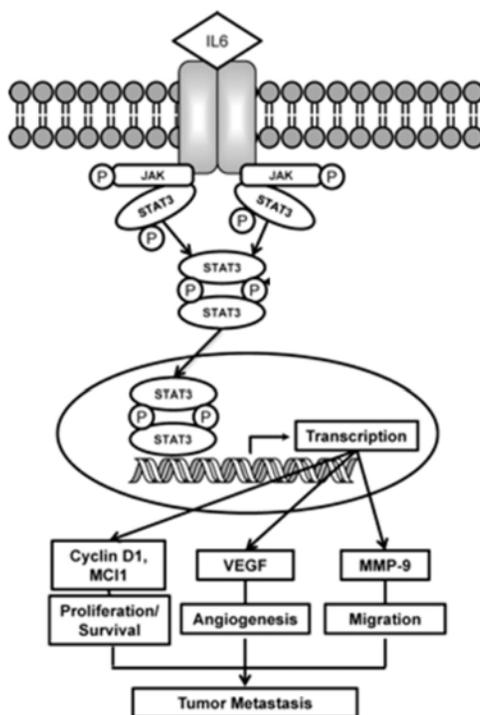


Figura 8. Esquema de funcionamiento de la vía de señalización STAT3. Al igual que NFkB, la activación mantenida de STAT3 contribuye a crear un microambiente protumoral. Imagen obtenida de [161].

2.6.4. PD-1 y PD-L1

PD-1 (*Programmed Death-1*, *CD279*) es un receptor monomérico expresado fisiológicamente en las células inmunes que, mediante la unión con sus ligandos PD-L1 y PD-L2 (*Programmed Death Ligand-1 y 2*), actúa como punto de control en la respuesta inmunitaria. Por un lado, facilita la auto-tolerancia de las células y evita mecanismos autoinmunes [63]; por otro lado, actúa en la sinapsis inmune y modula el grado de activación, evitando un exceso de respuesta inmunitaria que ocasionaría un daño tisular [64].

Esta proteína fue descrita inicialmente por el grupo Ishida [65] como una molécula inductora de la apoptosis celular, recibiendo esta denominación. Posteriormente se le adjudicaron otras funciones en la modulación de la respuesta inmune.

En condiciones normales, una célula dañada o transformada expresa mutaciones que son reconocidas por el MHC de la APC (*Antigen Presenting Cell*) y presentadas al Linfocito T, concretamente en el TCR (*T-cell antigen receptor*). El reconocimiento MHC-TCR es una primera señal que, por sí sola, no puede activar la cascada de respuesta inmune todavía. Precisa de una segunda señal por parte de CTLA4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*) y su ligando CD-80/86, que actúan como co-señal. Tras las dos señales, el complejo MHC-TCR es activado mediante LCK kinasa (*Lymphocytes-specific tyrosine Kinasa*) y se inicia la cascada de activación en el Linfocito T [64] (**Figura 9**).

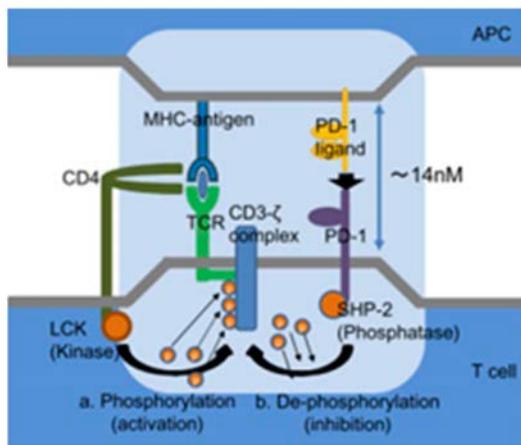


Figura 9. Modelo molecular de la inhibición del linfocito T mediada por PD-1/PD-L1. a. El reconocimiento MHC – TCR activa la quinasa, que fosforila al complejo CD3-TCR, iniciándose la cascada inmune. b. Simultáneamente en la misma sinapsis celular, tiene lugar la unión de PD-1 del Linfocito con su ligando PD-L1 (Programmed Death Ligand-1) de la APC. Dicha interacción promueve defosforilaciones del complejo MHC-TCR por parte de SHP-2 (Tyrosine Phosphatasa SH-2), modulando la respuesta inmune y frenando la activación del Linfocito T. Imagen obtenida de [64].

En el caso del cáncer, la célula tumoral adquiere, genuinamente, la capacidad de expresar en la membrana plasmática el ligando para el receptor PD-1 (PD-L1), evitando la activación del Linfocito T y adquiriendo la llamada resistencia inmune adaptativa [66], [67]. La expresión de PD-L1 se ha relacionado con la activación de diferentes factores de transcripción, incluyendo STAT y NFκB [64], [68] que ejercerían cambios moleculares en el microambiente tumoral, incluida la transcripción de PD-L1.

Dentro de sistemas inmunosupresores que actúan en el HNSCC, la vía PD-1/PD-L1 se ha detectado elevada entre el 18-80% de los casos y ha despertado especial interés al verse como diana terapéutica [69], [70]. La inmunoterapia contra PD-1/PD-L1 fue aprobada en EEUU en el 2016 y en Europa al año siguiente [67], [71] como segunda línea de tratamiento en HNSCC recurrentes y metastásicos. A día de hoy se están llevando a cabo ensayos clínicos de anticuerpos anti-PD-L1 para HNSCC avanzados, en terapia combinada en primera línea y como primera línea en HNSCC recurrentes y metastásicos [72].

3. Exosomas

La comunicación intercelular es esencial para el correcto desarrollo celular y tisular. Los modelos clásicos de comunicación entre células se basan en uniones de contacto directo, factores de adhesión o factores solubles, que pueden actuar en las células vecinas o a distancia. Además de estos mecanismos, recientemente se ha puesto de relieve la importancia de las vesículas extracelulares (EV, *extracellular vesicles*) [73]. Estas vesículas se segregan desde la membrana citoplasmática y se han denominado “microvesículas”, “exosomas”, “partículas retrovirales-like” o “cuerpos apoptóticos”, según su tamaño y origen. Este sistema de comunicación parece haberse conservado a lo largo de la evolución tanto en células eucariotas como en procariotas [74]. Otros nombres que reciben las EV en la literatura hacen referencia a su tamaño (micropartículas, nanopartículas, microvesículas o nanovesículas) o a su presencia fuera de la célula (ectosomas, exosomas, exovesículas) [75]. La terminología todavía está en proceso de unificación.

El término **exosoma** se usó por primera vez en 1981 por el grupo de Trams [76] para catalogar pequeñas vesículas segregadas desde la membrana plasmática mediante una “exfoliación”. Dos años después el grupo de Johnstone descubrió que los exosomas derivaban de los llamados cuerpos multivesiculares (MVBs, *Multivesicular Bodies*), en el interior de la célula [77]. Hasta entonces se habían considerado simples productos de desecho celular, hasta que se les atribuyó por primera vez funciones de transporte y comunicación: en 1996 el grupo de Raposo demostró la presencia de proteínas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC clase I y II) en la membrana de los exosomas, lo que les permitía actuar como presentadores de antígeno y facilitar la respuesta inmune [78]. Dos años más tarde el grupo de Zitvogel demostró la capacidad de los exosomas de células dendríticas de suprimir el crecimiento tumoral [79]. Finalmente, los exosomas recibieron la importancia merecida, y el interés en estudiar sus funciones ha crecido exponencialmente en los últimos 10 años [80].

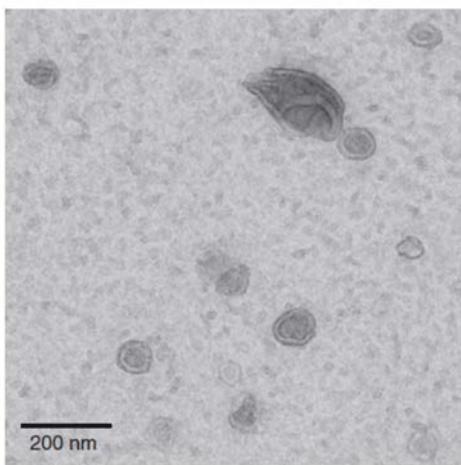


Figura 10. Microfotografía electrónica exosomas. Se puede apreciar la morfología característica en forma de copa. Escala 1:200 nm [81])

Los exosomas son vesículas esféricas nanométricas de entre **30 y 150 nm** de diámetro. Bajo microscopía electrónica de transmisión tienden a adoptar una forma cóncava, (**Figura 10**) lo que resulta un inconveniente durante los métodos de fijación. Para mantener su morfología esférica nativa es preciso el uso de la criomicroscopía electrónica [81].

3.1.2. Composición

Los exosomas transportan gran variedad de moléculas bioactivas como péptidos, lípidos, proteínas y diverso material genético, según la población celular de la cual provengan. Su conocimiento es dinámico, y cada día se identifican nuevos componentes (**Figura 11**) [73], [78].

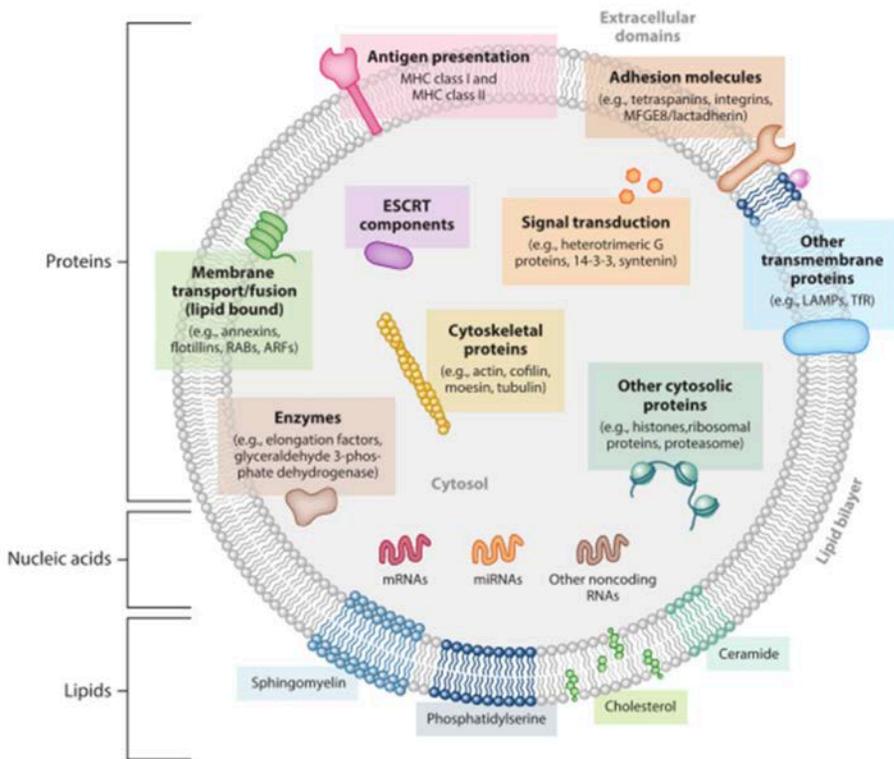


Figura 11. Composición de los exosomas. Representación de los componentes de los exosomas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y su localización y orientación en la membrana [75].

Proteínas

Las proteínas contenidas en los exosomas se han identificado mediante métodos como el Western Blot o el análisis proteómico. Se recogen todas ellas en una base de datos llamada Exocarta, incluida a la vez dentro de otra base de datos llamada Vesiclepedia [82], [83].

A grandes rasgos se describen dos tipos de proteínas: unas van a estar presentes según su célula de origen, mientras que otras van a presentarse de forma constitutiva. Por su origen endosomal, todos los exosomas contienen proteínas de transporte y de fusión (Annexinas, Flotilinas, GTPases), de adhesión (tetraspaninas CD9, CD63, CD81, CD82, LAMP1), así como proteínas involucradas en la biogénesis de MVBs como Alix, (*programmed cell death 6 interacting protein*) y TSG101 (*tumor susceptibility gene 101 protein*). También se ha descrito que contienen proteínas de estrés (*Heat-shock proteins HSP70 y HSP90*), proteínas presentadoras de antígeno y proteínas del citoesqueleto [75], [84], [85]. Los exosomas expresan en la membrana proteínas glicosiladas responsables de definir el contenido del exosoma y dirigir su reconocimiento e internalización por la célula diana. Cabe destacar que muchas de las proteínas se expresan también en otras EV, no siendo específicas de los exosomas. Se ha propuesto que para definir a un exosoma, éste debe expresar tetraspaninas, Alix, Flotilinas, TSG101 y Rab5b [84], [86]

Ácidos nucleicos

La presencia de RNA en los exosomas se describió por primera vez en microvesículas producidas por células madre de origen murino [87]. Al año siguiente se detectó RNA mensajero (mRNA) y RNA de pequeño tamaño, microRNA (miRNA) en exosomas de mastocitos [88]. A día de hoy se conoce que los exosomas pueden contener mRNA intacto, así como fragmentos de RNA, miRNA, y RNA no codificante [85]. El material nucleico está protegido de la digestión por enzimas líticas y se encuentra marcado por unas secuencias específicas de péptidos, que determinarán su retención o secreción extracelular [89].

Los exosomas también contienen DNA, y aunque menos descrito, se sabe que existe DNA mitocondrial (mtDNA), DNA de cadena simple y doble (dsDNA)[90]

Lípidos

Los exosomas son ricos en lípidos y de nuevo su composición varía según su célula origen [85]. Los lípidos aportan al exosoma la estabilidad y resistencia necesaria para su viaje. También participan en su reconocimiento e internalización por parte de la célula diana.

Los principales son el colesterol, diglicéridos, esfingolípidos (esfingomiélin y ceramidas), fosfolípidos, glicerofosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol) y poliglicerofosfolípidos [75]. Los exosomas también contienen lípidos bioactivos, como prostaglandinas y leucotrienos, que forman parte de la información transferida y participan en vías de señalización [75], [81], [84], [91].

3.1.3. Métodos de aislamiento

Aunque a día de hoy falta un consenso para estandarizar los métodos de aislamiento de exosomas, la *International Society Extracellular Vesicles* (ISEV) propuso que las características para definir a un exosoma fueran su tamaño (30-100nm de diámetro), su morfología de copa y la presencia de ciertas tetraspaninas (Tabla I) [75].

La técnica más clásica es el método por centrifugación seriada y la ultracentrifugación. Mediante este método se consigue separar la fracción microvesicular correspondiente a los exosomas de restos celulares y otras vesículas de mayor tamaño [92].

Otro método de aislamiento es el sistema por inmunocaptura, capaz de detectar ciertos marcadores de membrana de los exosomas, como las tetraspaninas. El inconveniente es que éstas no son exclusivas de los exosomas y están presentes en otras EV [85], [93]. La detección de algunos lípidos [91], [93] y el elevado grado de glicosilación [94] de la membrana exosomal también se han aprovechado como método de aislamiento.

CARACTERÍSTICAS	EXOSOMAS	MICROVESÍCULAS	CUERPOS APOPTÓTICOS
Tamaño	30-150nm	150-1,000nm	≥1,000nm
Origen	Exocitosis desde MVB	Germinación MP	Germinación MP de célula apoptótica
Marcadores	Tetraspaninas, Tsg 101, Alix, Annexinas, ↓PS	Complejos lipídicos, ↑PS	Fosfatidilserina
Contenido	Proteínas, lípidos, mRNA, miRNA, DNA	Proteínas, lípidos, mRNA,	Fragmentos celulares y organelas celulares
MVB, Multivesicular Bodies; MP, membrana plasmática; PS, Fosfatidilserina; TSG101, tumor susceptibility gene 101; Alix, programmed cell death-interacting protein X			

Tabla I. Principales características y diferencias entre Microvesículas, Exosomas y Cuerpos apoptóticos

3.2. Biogénesis

La formación de un exosoma se inicia con la invaginación de la membrana plasmática, generando un endosoma temprano, que mientras madura en el interior celular incorpora de forma predeterminada su carga. A continuación, varios endosomas se fusionan originando los llamados endosomas multivesiculares o cuerpos multivesiculares (MVB) (Figura 12) [95]. Este proceso viene dirigido por complejos proteicos llamados ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*), entre los que se conocen el sistema Alix y el TSG101. También se han descrito mecanismos independientes del complejo ESCRT [96], [97]. Estos MVB van a ser conducidos por proteínas de transporte de la familia RAB hacia el lisosoma, para su reciclaje o hacia la membrana plasmática, para ser secretados al exterior celular [73], [75].

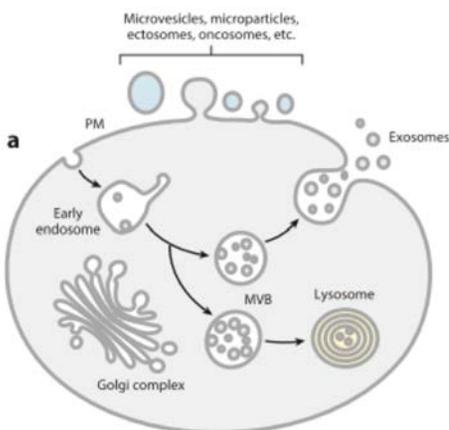


Figura 12. Representación esquemática de la biogénesis y secreción de exosomas y vesículas extracelulares desde la membrana plasmática celular. Mientras la EV emergen directamente desde la membrana plasmática, los exosomas son liberados desde unas vesículas intraluminales de mayor tamaño, los MVB [75].

3.3. Secreción

En la mayoría de las células, los MVB liberan los exosomas de forma espontánea, y aumentan su secreción frente a ciertos estímulos tanto del medio extracelular (por ejemplo señales de linfocitos T), como del medio intracelular (por ejemplo la presencia de DNA dañado) [75].

Las proteínas del citoesqueleto son las encargadas de movilizar los MVB, haciendo posible la coaptación de la membrana exosomal con la celular. Nuevamente participan proteínas de la familia RAB, el factor p-53 y el complejo proteico SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) [98]. La fusión de ambas membranas se realiza por mecanismos dependientes del flujo intracelular de calcio dando paso a la liberación de la carga exosomal. [99], [100].

3.4. Adhesión e internalización

El destino final de los exosomas está altamente determinado por moléculas de superficie: tetraspaninas, integrinas, proteoglicanos, glucolípidos, lectinas, e incluso inmunoglobulinas [101]. Una vez capturados por la célula receptora, los exosomas se internalizan mayoritariamente mediante mecanismos de digestión celular: endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis [102]. En esta fase del proceso son esenciales receptores proteicos como la clatrina o receptores lipídicos como la caveolina (**Figura 13**) [103].

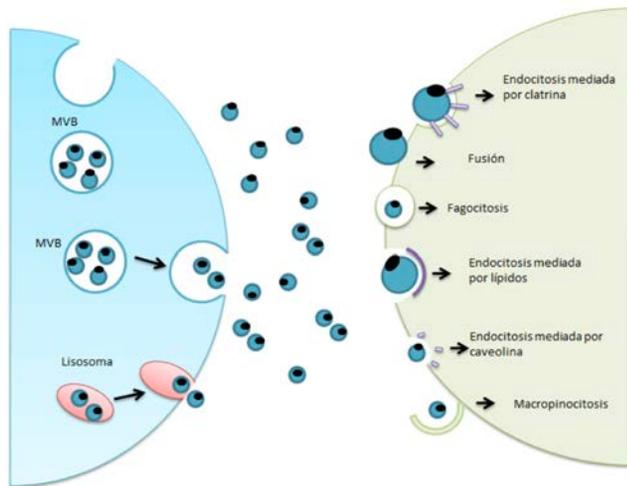


Figura 13. Captación de los exosomas.

Tras su liberación al espacio extracelular, los exosomas interaccionan con la célula receptora mediante señales yuxtacinas, endocitosis o fusión celular. Imagen adaptada de [162]

En menor proporción también se han definido mecanismos de internalización mediante fusión directa de la membrana del exosoma a la membrana plasmática de la célula diana [101], o a través receptores celulares y moléculas de adhesión [104], [105].

3.5. Funciones de los exosomas

Funciones fisiológicas

Los exosomas actúan de vehículo para retirar el material de desecho y para la señalización intercelular tanto entre células vecinas como a larga distancia [75], [85], [88].

Numerosos tipos celulares liberan exosomas, como células sanguíneas, células dendríticas, endoteliales, epiteliales, células nerviosas, intestinales y embriogénicas, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas [77], [106], [107]. Tienen un papel clave en la respuesta inmunológica y en la

comunicación intercelular de procesos metabólicos, neurodegenerativos, cardiovasculares, de diferenciación celular y tumoral [101], [108]–[112].

A día de hoy, la participación de los exosomas en la respuesta inmune y en el cáncer son los ámbitos que más interés han suscitado.

Los exosomas favorecen la presentación de antígenos a través de los MHC I y II a linfocitos T, macrófagos y células dendríticas [78], [113]–[115]. Sin embargo, los exosomas también pueden mediar un estado inmunodepresor interfiriendo en la activación de células del sistema inmune [116] e incluso son capaces de distribuir material de células infectadas (por virus, bacterias...) entre células sanas [117].

Los exosomas se han identificado en sangre, orina, líquido amniótico, leche materna, bilis, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo, saliva, flujo vaginal y semen [75], [84], [118], [119]. La presencia de exosomas circulantes en fluidos corporales hace posible su utilidad como diagnóstico no invasivo, reconociéndolos como biomarcadores de situaciones fisiológicas y patológicas como la diabetes, enfermedades cardiovasculares, el asma, la pancreatitis aguda, la rinitis alérgica, el alzhéimer o el cáncer [106], [111], [112], [120]–[123].

Funciones en el cáncer

En el contexto del cáncer, los exosomas derivados del tumor (TEX, *tumor exosomes*) sirven como vehículos de información, enviando señales desde las células tumorales a células inmunes, endoteliales, fibroblastos, a células no transformadas, así como a las MSC (**Figura 14**).

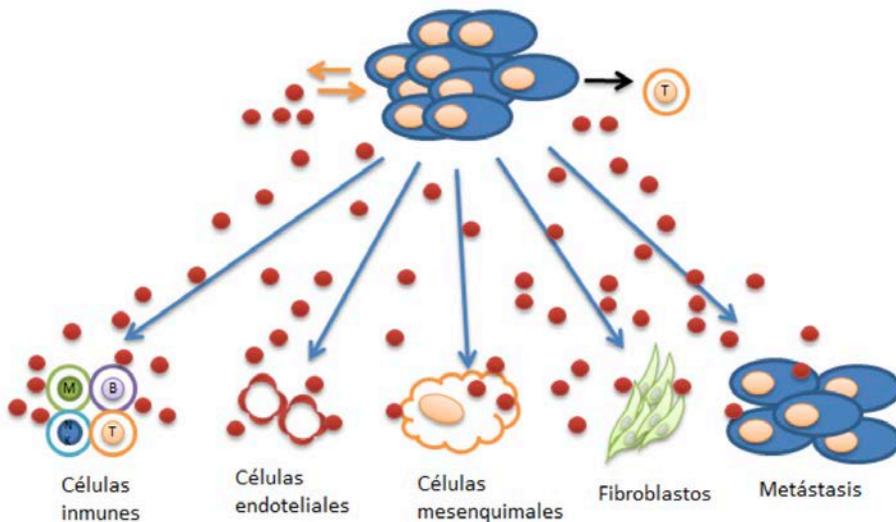


Figura 14. Interacciones mediadas por los TEX en el microambiente tumoral I. Los TEX son los mediadores de la reprogramación del microambiente tumoral actuando de forma autocrina sobre las propias células tumorales (fechas naranjas), yuxtacrina sobre los linfocitos T infiltrantes (fecha negra) y de forma paracrina sobre los demás tipos celulares: células inmunes, endoteliales, MSC y fibroblastos (fechas azules). Imagen adaptada de [124].

Las MSC parecen jugar un papel particularmente importante en el acondicionamiento del lecho tumoral mediante la señalización a través de factores solubles (citoquinas y factores de crecimiento). Tras descubrir los exosomas como vehículos de información intercelular, las propias MSC se describieron también como productoras, y no sólo receptoras, de una gran cantidad de exosomas que ejercían cambios importantes para el TME y facilitaban la diseminación tumoral. [124]–[126].

(Figura 15)

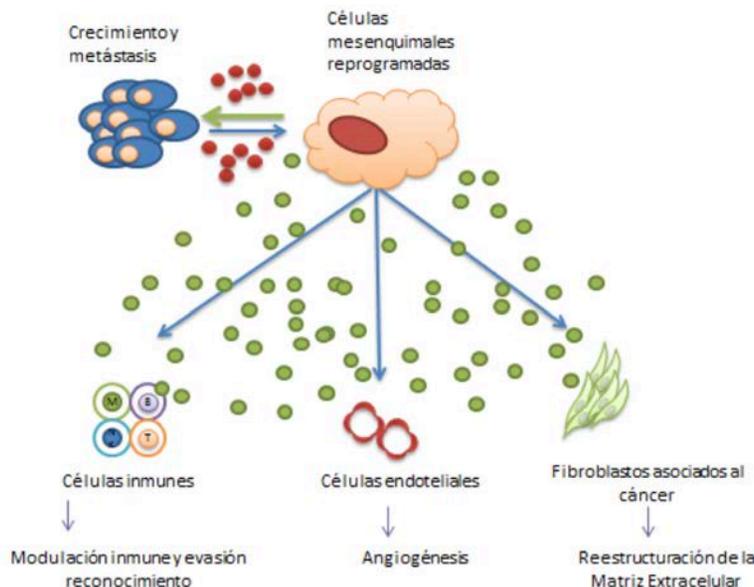


Figura 15. Interacciones mediadas por los TEX en el microambiente tumoral II. Tras la internalización de los TEX por parte de la célula mesenquimal estromal, las MSC transformadas se vuelven ávidas productoras de factores solubles y exosomas. Las señales moleculares son dirigidas a las células tumorales para promover su crecimiento y diseminación [34], [163]. La perpetuación de la célula tumoral es facilitada también por exosomas de MSC mediante el escape inmune [67], [114], [115], [124]. Los exosomas de las MSC actúan también sobre los fibroblastos y células endoteliales para la progresión tumoral [82], [108]. Imagen adaptada de [124].

Es de destacar que las células tumorales secretan 10 veces más exosomas que las células sanas, y se han identificado patrones específicos de miRNA correspondientes a tumores concretos. Algunos ejemplos descritos en la literatura son el melanoma [127], cáncer de pulmón [128], gastrointestinal [129], de mama [122], de próstata [130] y de esófago [131]. La participación de los exosomas en el carcinoma de cabeza y cuello ha sido descrita recientemente por el grupo de Theodoraki [67], al describir exosomas que expresan la proteína PD-L1 en su superficie, pudiendo actuar como un sistema más de actividad inmunosupresora tumoral. El mismo grupo describió, también, que los exosomas ejercerían cambios a las células inmunes circulantes, mediante mecanismos directos e indirectos [116].

Además de su utilidad diagnóstica en el cáncer [93], los exosomas pueden actuar como factores pronóstico e incluso parece que pueden estar implicados en algunas resistencias a quimioterápicos [132], [133]. En este sentido, se cree que sería posible obtener información de los TEX a fin de ofrecer una terapia personalizada, o incluso bloquear su liberación para conseguir el control tumoral y la erradicación de la enfermedad. Por otra parte, aprovechando sus funciones de transporte, se están diseñando estrategias encaminadas a modular la carga de los exosomas para conseguir una distribución selectiva de biofármacos e incluso de material genético [38], [120].

El cáncer de laringe es todavía a día de hoy una enfermedad que conlleva una elevada tasa de morbimortalidad, a pesar del intento continuo de adoptar nuevas estrategias para su diagnóstico precoz y tratamiento.

No obstante, el descubrimiento de los exosomas como mediadores de la comunicación intercelular en el cáncer de laringe abre un nuevo campo de investigación.

La hipótesis de este trabajo es que los exosomas están implicados en la fisiopatología del cáncer de laringe modulando la comunicación entre macrófagos y células tumorales.

Objetivo general:

Investigar el papel de los exosomas en la comunicación entre las células tumorales laríngeas y los macrófagos.

Objetivos concretos:

1. Caracterizar los efectos de los macrófagos en las células tumorales y determinar la participación de los exosomas **(Experimento A y B)**
2. Caracterizar los efectos de las células tumorales en los macrófagos y determinar la participación de los exosomas **(Experimento A y B)**
3. Definir la vía de señalización a través de la cual median los efectos **(Experimento C)**
4. Determinar la participación de los exosomas en la activación de dicha vía de señalización **(Experimento C)**
5. Caracterizar los efectos de los macrófagos y las células tumores en cocultivo tridimensional (esferoides) **(Experimento D)**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

1.1. Líneas celulares

THP-1

Línea celular humana (*Sigma-Aldrich*) de la estirpe monocito-macrófago derivada de un paciente con leucemia monocítica aguda. Se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*), 2 mM de L-glutamina estable, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml).

Las THP-1 se diferenciaron a macrófagos humanos mediante tratamiento con forbol 12-miristato-13-acetato (PMA). Las células se trataron con PMA 50 nM durante 24 h, tras las cuales se sustituyó por medio RPMI 1640 sin PMA durante 24 h más antes de realizar los experimentos.

En algunos experimentos se indujo la polarización de los macrófagos a fenotipo M1 tratándolos con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 24 horas, o a fenotipo M2 tratándolos con IL4 (20 ng/ml) e IL13 (20 ng/ml) durante 24h.

BICR-18

Línea celular humana (*Sigma-Aldrich*) adherente de queratinocitos obtenida a partir de un nódulo linfático metastásico de un carcinoma escamoso de laringe (*SCC, squamous cell carcinoma*). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de FBS (*Fetal Bovine Serum*), 2 mM de L-glutamina estable, penicilina (100 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml).

1.2. Condiciones de cultivo

Todos los cultivos se mantuvieron en incubadoras bajo una atmósfera controlada de aire/CO₂ (95:5), al 95% de humedad y a una temperatura de 37 °C.

1.3. Cocultivo

Los experimentos de cocultivo se realizaron por medio de sistema *transwell* (utilizando *inserts* para cultivo celular con poro de 0,4 µm, *Corning, VWR InterntionsLtd, UK*) que permite cultivar las células separadas físicamente pero manteniendo el intercambio molecular de señales. Por un lado se sembraron 250,000 células BICR/pocillo en una placa de 12 pocillos y se mantuvieron durante 48h (hasta confluencia) a 37 °C en medio DMEM. Por otro lado, se sembraron 200,000 células TPH1/insert y se mantuvieron durante 24 h en medio RPMI + PMA (para diferenciarlos a macrófagos), y 24 h más en medio RPMI.

Tras estas 48 h se colocaron los inserts de macrófagos sobre los pocillos con BICR-18.

A diferentes tiempos de incubación se realizó el ensayo de migración celular en las BICR-18 o, alternativamente, se obtuvo el mRNA de los dos tipos celulares para el análisis de la expresión génica o se sometieron a estudio por inmunofluorescencia, según el experimento.

1.4. Ensayo de migración celular

La evaluación de la migración celular se realizó mediante el método de Scratch Assay (*wound healing assay*). Las células BICR-18 se dejaron crecer a confluencia y se trataron con Mitomicina C 2 µM 2 horas antes de realizar el experimento, con la finalidad de parar el ciclo duplicativo de

las células y que la migración observada fuera debida al desplazamiento y no a la proliferación celular. A continuación, con una punta de pipeta, se realizó el rascado (*Scratch*) y se obtuvieron microfotografías que se repitieron 24 h después. El área cubierta por las células durante estas 24 h se cuantificó usando el *software* Image J.

1.5. Esferoides

Para evaluar de forma más fiable la naturaleza de las interacciones entre varios tipos celulares se crearon conglomerados tridimensionales heterogéneos de BICR-18 con THP1 diferenciados a macrófagos en reposo (M0), o polarizados a M1 o M2. Previamente a la formación de los esferoides, cada línea celular se sometió a tinción fluorescente. Tras 24 h de incubación se obtuvieron microfotografías que permitieron estudiar la distribución de los dos tipos celulares. También se evaluó la expresión de marcadores M1 y M2 mediante qPCR.

1.6. Captación e internalización de exosomas

Para estudiar el papel de los exosomas en la comunicación entre macrófagos y células tumorales, primero investigamos si había captación e internalización de los exosomas por parte de la célula diana. Para ello, el primer paso fue aislar exosomas de células tumorales (Exos- BICR) y exosomas de macrófagos (Exos- THP1) producidos durante 24 h. Sembramos células BICR en una placa y TPH1 en otra teñidas ambas líneas con colorante fluorescente PKH-67 (verde), y añadimos exosomas de la otra línea celular, teñidos con el colorante PKH-26 (rojo) quedando así:

- BICR-18 con Exos THP1
- THP1 con Exos BICR-18

Tras incubarlos durante 60 min a 37 °C, estudiamos la internalización de los exosomas por los macrófagos y las células tumorales mediante microscopía de fluorescencia.

2. Diseño experimental

Experimento A: Caracterización de los exosomas generados por las células BICR-18 y THP1.

Para caracterizar las poblaciones de exosomas generados por BICR-18 y THP1 los dos tipos celulares se cultivaron a confluencia en frascos de 20 ml usando medio *Exo-free* durante 48 h. Pasado este tiempo se recuperó el medio y se procedió a la purificación de los exosomas por medio del protocolo de ultracentrifugación.

La distribución del tamaño de las vesículas aisladas se verificó mediante un análisis de rastreo de nanopartículas con un *Nanosight* LM10.

El tamaño y la morfología de los exosomas se evaluaron por tinción negativa de las muestras y observación mediante microscopía electrónica de transmisión (*TEM*).

Mediante *Western-blot* se determinó la presencia de marcadores característicos de los exosomas (Alix y TSG101).

Experimento B: Determinación del papel de los exosomas en el diálogo celular entre macrófagos y células tumorales.

En un primer experimento se determinó la capacidad de captación de los exosomas de BICR-18 por parte de THP1 y viceversa. Previamente se llevaron a cabo tinciones celulares con PKH67 y

Tinción	Casa comercial®	Marcador	Color
PKH67	Sigma Aldrich	Membrana citoplasmática de BICR-18 y THP1	Verde
PKH26	Sigma Aldrich	Exosomas	Rojo
DAPI	Sigma Aldrich	Nuclear	Azul

Tabla II. Tinciones utilizadas para el estudio de captación de los exosomas mediante fluorescencia.

La incorporación de los exosomas al citoplasma se evaluó mediante microscopía de fluorescencia.

Efecto de los exosomas de THP1 sobre la migración celular de BICR-18:

Una vez verificada la captación de los exosomas en células BICR-18, se evaluó el efecto que tenían sobre la migración celular. Para ello se realizaron los siguientes grupos:

- Células BICR-18 control (n=6)
- Células BICR-18 cocultivadas con THP1 (n=6)
- Células BICR-18 incubadas con 10 µg/ml de exosomas de THP1 (n=6)

El grado de migración celular durante 24 h se evaluó mediante el *Scratch Assay* (Figura 16).

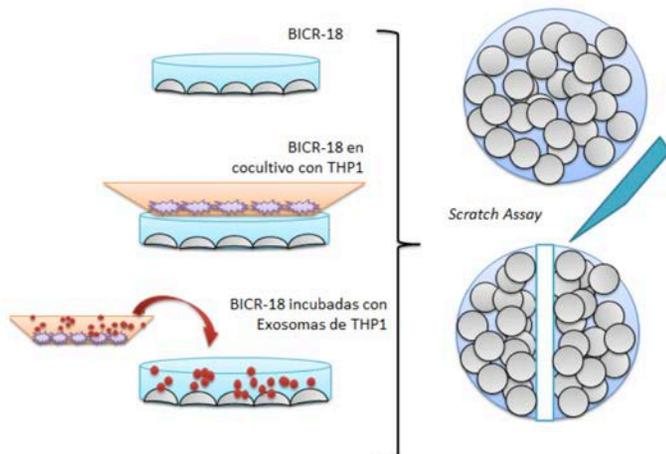


Figura 16. Representación esquemática del *Scratch Assay*. Se realizó en ensayo en las tres situaciones: Cultivo de BICR solas, en cocultivo con THP1, y BICR-18 cultivadas en medio rico de exosomas procedentes de THP1.

Efecto de los exosomas de BICR-18 sobre el fenotipo de los macrófagos:

Para determinar el papel de los exosomas de BICR-18 sobre los macrófagos se realizaron los siguientes grupos:

- Células THP1 control (n=6)
- Células THP1 cocultivadas con BICR-18 (n=6)
- Células THP1 incubadas con 10 µg/ml de exosomas de BICR-18 (n=6)

Tras 24 h de cultivo se obtuvo el mRNA celular y se determinó el fenotipo de los macrófagos evaluando por qPCR los niveles de IL1 β , MRC1, CCL2, IL-10 y TGF β (**Figura 17**).

Adicionalmente se realizó un estudio de la cinética del fenotipo de los macrófagos en cocultivo determinando los niveles de IL1 β y MRC1 tras 1, 5 y 7 días de cocultivo.

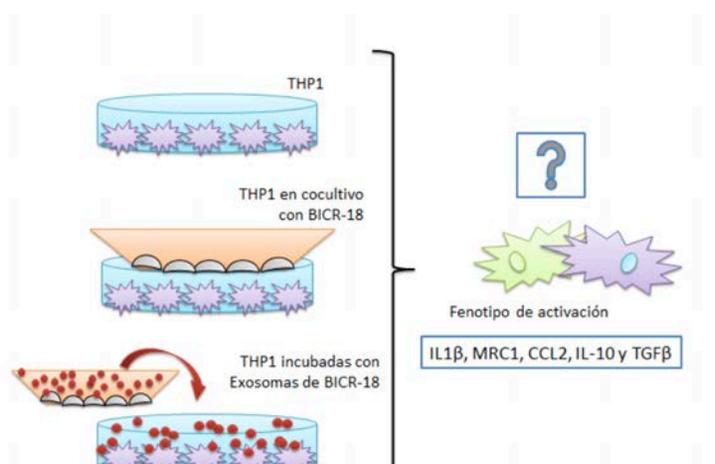


Figura 17. Representación esquemática para la caracterización fenotípica de los macrófagos. El experimento para estudiar el perfil de activación de los macrófagos se llevó a cabo en las tres situaciones: THP1 solas, en cocultivo con BICR-18 y THP1 incubadas con exosomas procedentes de BICR-18.

Experimento C: Papel de los exosomas en la modulación del eje inmunosupresor PD-1/PD-L1.

Para determinar si la señalización por exosomas modulaba la expresión de PD-1/PD-L1 se realizaron los siguientes grupos:

- Células BICR-18 control (n=3)
- Células BICR-18 cocultivadas con THP1 (n=3)
- Células BICR-18 incubadas con 10 µg/ml de exosomas de THP1 (n=3)

Tras 24 h de incubación se obtuvo el mRNA y se determinó por qPCR la expresión de PD-1 y PD-L1 en los dos tipos celulares (**Figura 18**).

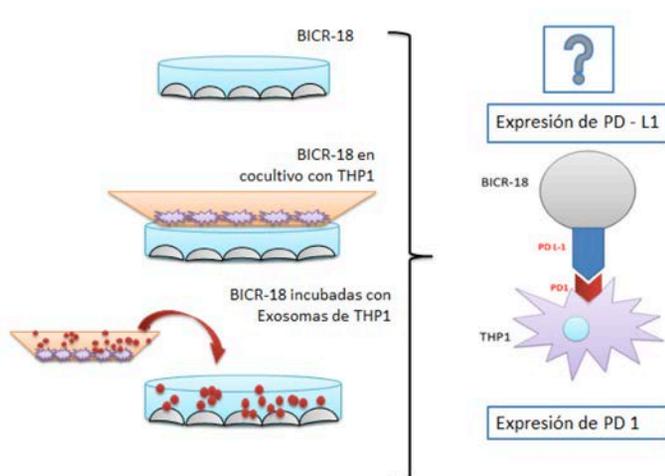


Figura 18: Representación esquemática para determinar la expresión de PD-1 y de PD-L1 a las 24 h. El experimento para estudiar la expresión de PD-1 y PD-L1 se llevó a cabo para BICR-18 en monocultivo, en cocultivo con THP1 y en BICR-18 incubadas con exosomas procedentes de THP1.

La inducción detectada nos llevó a analizar el papel de los factores de transcripción STAT 3 y NFκB en las BICR-18. Para ello se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en células tratadas con exosomas de THP1 durante 1 h.

Puesto que Los resultados sugirieron un papel para STAT3 (pero no para NFκB,) se realizó un ensayo de inhibición tratando las células con el inhibidor específico de STAT3 5,15-Dephenil-21H,23H,porfina (5,15 DPP).

Los grupos realizados fueron:

- Células BICR-18 control (n=3)
- Células BICR-18 incubadas con 10 µg/ml de exosomas de THP1 (n=3)
- Células BICR-18 incubadas con 10 µg/ml de exosomas de THP1 y 50 µM de 5,15 DPP (n=3)

Tras 6 h de incubación se obtuvo el mRNA y se determinó por qPCR la expresión de PD-1 y PD-L1.

Experimento D: Distribución de los tipos celulares en cultivos tridimensionales y estudio del perfil de activación de los macrófagos

Para aproximar los resultados a las condiciones de tridimensionalidad de los tumores *in vivo*, se realizó un estudio con esferoides generados combinando los dos tipos celulares. En este caso se consideró el efecto de la polarización de los macrófagos. En un primer grupo, las células THP1 se polarizaron al fenotipo M1 mediante la adición de IFN γ y LPS. En un segundo grupo se diferenciaron a fenotipo M2 mediante la adición de IL-4 y IL-13. Finalmente, en un tercer grupo, no se indujo polarización y se mantuvieron como M0. Las diferentes poblaciones celulares se sometieron a tinción, usando colorante PKH67 (verde) para BICR-18 y PKH26 (rojo) para los macrófagos.

Se realizaron 3 grupos:

- Células BICR-18 incubadas con M0 (n=2)
- Células BICR-18 incubadas con M1 (n=2)
- Células BICR-18 incubadas con M2 (n=2)

Se prepararon seis suspensiones conteniendo cada una 150,000 BICR-18 y 50,000 macrófagos, que se sometieron a centrifugación para facilitar las adhesiones celulares y la formación del esferoide y, tras 24 horas de incubación, se tomaron microfotografías con el microscopio de fluorescencia. Posteriormente, se tomaron nuevas microfotografías a lo largo de diferentes días.

3. Métodos

3.1. Preparación del medio *Exo-free*

El medio de cultivo habitual está suplementado con un 10% de suero fetal bovino. El suero fetal bovino posee de forma natural exosomas que podrían interferir en los análisis. Por ello, para preparar el medio de cultivo en el cual se van a realizar experimentos enfocados a los exosomas, el primer paso fue conseguir medio libre de exosomas. Para ello, medio suplementado con suero fetal bovino al 20% se sometió a una ultracentrifugación a 100.000 xg , durante 16 h, consiguiendo la sedimentación de los exosomas. A continuación, se recogió el sobrenadante (porción no sedimentada), que se pasó por un filtro de 0,2 μm y se guardó a 4 °C. Para su utilización se preparó una dilución 1:2 de este medio con medio no suplementado, consiguiendo un medio al 10% de suero fetal bovino libre de exosomas que denominamos medio *Exo-free*.

3.2. Aislamiento de exosomas

Para la obtención de exosomas, las células se cultivaron durante, como mínimo, 24h en medio *Exo-free*. A continuación se recogió el medio de cultivo para proceder a la extracción de exosomas según el protocolo estándar de ultracentrifugación (**Figura 19**). Este protocolo se basa en centrifugaciones repetidas a 4 °C a una velocidad cada vez mayor, que consigue separar restos celulares y vesículas de tamaño mayor que la de los exosomas.

La primera centrifugación fue a 2,000 xg durante 10 min para eliminar las células muertas. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 10,000 xg durante 30 min para descartar fracciones subcelulares y vesículas de tamaño grande. El sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de 0,2 μm para eliminar vesículas de tamaño superior a 200 nm. A continuación, el medio filtrado se centrifugó a 100,000 xg durante 70 min con la ultracentrífuga *Optima L-90K* con el rotor SW-28y tubos de policarbonato resistentes a la deformación y a la temperatura (*Beckman Coulter, Brea, CA*). Esta ultracentrifugación permitió sedimentar los exosomas, que se resuspendieron en tampón de fosfato salino (PBS, *phosphate buffer saline*) y se sometieron a un último filtrado utilizando unidades de filtración centrifugal de tamaño de poro de 300 kDa para eliminar proteínas contaminantes.

Finalmente, el precipitado de exosomas se resuspendió en PBS o PB (0,1M) (para su uso experimental), en una solución de paraformaldehído al 4 % (para microscopía electrónica) o en tampón de lisis RIPA (*Radio-Immunoprecipitation Assay*) (para su análisis mediante *Western Blot*).

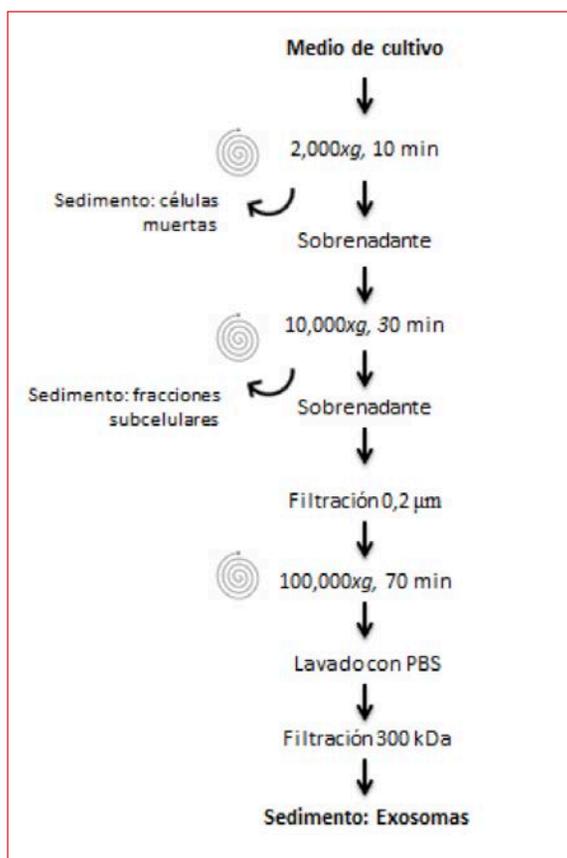


Figura 19: Esquema para el aislamiento de los exosomas

3.3. Microscopía electrónica de transmisión

La preparación de las muestras y su posterior observación tuvo lugar en régimen de autoservicio en la Unidad de Criomicroscopía electrónica en el Parque Científico de Barcelona, que pertenece a los Centros Científicos y Tecnológicos de la *Universitat de Barcelona* (CCiTUB).

Para estudiar los exosomas aislados bajo microscopía electrónica se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4 % en PBS. Se colocaron en rejillas de cobre (400 *mesh*) recubiertas por una película de carbono de 14 nm y tratadas con *glow discharge* para hacerlos más hidrofílicos. Tras 20 min, se lavaron con agua Milli-Q (purificada y desionizada) y se suspendieron en acetato de uranilo al 2% durante 5 min. Las rejillas se estudiaron con el microscopio de transmisión JEOL-1010 a 80 kV.

3.4. Nanosight

La distribución de tamaño de las partículas se evaluó mediante un análisis de rastreo de nanopartículas con un Nanosight LM10 (Servicios Científico-técnico del *Institut de Ciència de Materials de Barcelona*-CSIC). Este sistema utiliza las propiedades de dispersión de la luz y del movimiento Browniano para obtener la distribución del tamaño de las partículas en una suspensión líquida. Para cada muestra se grabaron tres vídeos de 1 min de duración y para el blanco se utilizó PBS filtrado, que no dio señal.

3.5. Western blot

El *Western* – Blot es una técnica que permite cuantificar las proteínas presentes en una muestra. Primeramente se obtiene el extracto proteico en conjunto para determinar la concentración de proteínas de la muestra. Seguidamente el extracto proteico se somete a una electroforesis para separar las distintas proteínas en un gel, y se transfiere posteriormente a una membrana de PVDF para detectar la proteína deseada por Inmunofluorescencia. La composición de los distintos reactivos usados se muestra en la siguiente tabla (**Tabla III**) y los anticuerpos usados en la **Tabla IV**.

El primer paso de extracción de las proteínas se realizó resuspendiendo los exosomas en tampón RIPA con inhibidores de proteasas. Tras 15 min en hielo, las proteínas se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro *Nanodrop* (programa 280). En este punto es posible congelar los extractos a -40 °C hasta su utilización.

Antes de someter el extracto a la electroforesis, se diluyó con tampón de carga *Laemmli* que contiene el agente reductor TCEP (tris-2-carboxietilfosina). Antes de cargar la muestra al gel de electroforesis, se escalfó a 85 °C durante 5 min y se dejó enfriar.

Tampón	Composición
Tampón de lisis RIPA	Tris-Cl 10 mM (pH 8), NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1 %, Tritón X-100 1 %
Inhibidores de proteasas y fosfatasas	Inhibidor de la tripsina 0.3 µM, aprotinina 0.3 µM, PMSF 0.1 mM, EDTA 1 mM, NaF 6.25 mM, ortovanadato de sodio 1.25 Mm
Gel de empaquetamiento	Tampón Tris 62.5 mM (pH 6.8), bis-acrilamida (37.5:1) 5%, APS 0.1 %, SDS 0.1 %, TEMED 0.1 %
Gel separador	Tampón Tris 375 mM (pH 8.8), bis-acrilamida (37.5:1) 10-15%, APS 0.1 %, SDS 0.1 %, TEMED 0.1 %
Tampón de electroforesis	Tampón Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 192 mM, SDS 0.1%
Tampón de transferencia	Tampón Tris 25 mM (pH 8.3), Glicina 192 mM, SDS 0.1%, Metanol 20 %
Tampón TBS	Tampón Tris 25 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM
Tampón TBS-T	Tampón TBS con Tween-20 0.05%

Tabla III. Composición de los reactivos usados para el Western Blot.

Anticuerpos	Casa comercial	Referencia	Dilución	kDa
Alix	Protein Tech	12422-1-AP	1:1000	96
TSG101	Protein Tech	14497-1-AP	1:1000	46
Dylight 800 anti-rabbit	Thermo Fisher	SA5-10036	1:10.000	

Tabla IV. Anticuerpos primarios y secundarios usados para el Western Blot de Alix y TSG101.

El gel de electroforesis (*Sodiumdodecylsulphate-poliacrilamide gel electroforesis*) tiene una parte superior compuesta de gel empaquetador (*sticking gel*) al 5% de acrilamida, el cual alinea y compacta las muestras antes de separarse, y un gel separador (*running gel*) al 12% de acrilamida, a través del cual avanza la muestra. Se cargaron 35 µg de extracto a cada pocillo de gel empaquetador, en paralelo, que tras compactarse, progresaron a través del gel separador frenándose según el peso molecular de cada proteína. Poseemos un extracto proteico de control, del cual conocemos su composición proteica exacta y su resultado electroforético (*Prism Ultra Protein Ladder, Abcam, Cambridge, UK*). La electroforesis se realizó con el aparato Mini-PROTEAN (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*) a voltaje constante primero a 60V durante 30min, después a 120 V, en frío.

Una vez separadas en el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (*PVDF, Immobilon-P, Merck Millipore, Billerica, MA*) apta para Inmunofluorescencia. La transferencia se realizó en cubetas húmedas con adaptadores del *Mini-PROTEAN*, durante 120 min a una intensidad de 400 mA. Para comprobar que las proteínas se transfirieron correctamente, se tiñó la membrana con tinción reversible Ponceau S (*Ponceau S* al 0.2 %, ácido acético glacial al 5 %) que permitió visualizar el conjunto de proteínas separadas en la membrana.

El siguiente paso consistió en bloquear la membrana: para ello se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 5 % en tampón Tris, TBS). Dicha solución de bloqueo contiene la cantidad suficiente de albúmina que ocupa los espacios sobrantes de la membrana.

A continuación se procedió a incubar las membranas a 4 °C durante toda la noche con el anticuerpo primario, el cual detecta a la proteína deseada. El anticuerpo primario se encuentra tamponado con solución TBS-*tween* (TBS-T) a fin de aumentar la especificidad anticuerpo-antígeno. Al día siguiente, tras realizar tres lavados con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se procedió a añadir una solución con el anticuerpo secundario marcado con la molécula fluorescente Dylight 800 (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*), dejándose actuar durante 1 h a temperatura ambiente. De nuevo se realizaron tres lavados con TBS-T para eliminar el anticuerpo secundario excedente. El anticuerpo secundario permitió detectar al primario mediante el aparato de inmunofluorescencia *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)*.

3.6. qPCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*) la usamos para estudiar niveles de expresión de determinados genes de interés en la muestra. Primeramente necesitábamos extraer todos los RNA presentes en la muestra, y pasarlos a cDNA mediante transcripción inversa. A continuación las secuencias seleccionadas se amplificaron mediante PCR a tiempo real (qPCR).

La extracción de RNA total se realizó usando TRIzol® (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*), que lisó las células manteniendo íntegro el RNA. Tras incubarlo 5 min a temperatura ambiente, se añadió cloroformo y se centrifugó a 12,000 gx durante 15 min, a 4 °C, obteniéndose dos fases: la fase blanca inferior con el DNA y las proteínas, y la acuosa superior con el RNA. Se recogió la fase acuosa y tras hacerla precipitar con isopropanol se centrifugó a 12,000 gx durante 10 min, a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 12,000 gx, durante 10 min, a 4 °C. El precipitado de RNA final se resuspendió con agua dietilpirocarbonada (DEPC) para determinar después la concentración por densidad óptica a 260 y 280 nm mediante el espectrofotómetro *NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)*.

Posteriormente se realizó la conversión de 1 µg de RNA a cDNA con el kit iScriptcDNA de Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*), y se procedió al proceso de transcripción inversa con el termociclador *Eppendorf® Mastercycler (Hamburg, Alemania)*. Este proceso consta de 3 ciclos: incubación a 25 °C durante 5 min, después a 42 °C durante 30 min y por último a 85 °C durante 5 min. El cDNA resultante se ajustó a una concentración final de 10 ng/µl.

En último lugar se procedió a la cuantificación de la expresión de los genes deseados por qPCR. Para ello se utilizaron secuencias de oligonucleótidos específicas diseñadas para cada gen de interés, juntamente con la molécula fluorófora iTaqTMSYBR® Green (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*), que desprende una señal fluorescente proporcional a la cantidad de cadenas de cDNA de la muestra. Se usó el aparato *DNA Engine® PeltierThermalCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)*.

El protocolo de amplificación consiste en un primer paso de 1,5 min a 95 °C que activa a la polimerasa, seguido de 40 ciclos de amplificación. Cada uno de los ciclos precisa de un primer paso de desnaturalización para separar las cadenas de cDNA (15 s a 95 °C), seguido de la hibridación del cDNA con los oligonucleótidos conocidos (30 s a 60 °C) y su elongación (20 s a 72 °C). Finalmente, las muestras se sometieron a una curva de temperaturas (melting) de 55 °C a 95 °C para descartar amplificaciones inespecíficas (**Tabla V**).

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Activación de polimerasa	1	95 °C	90 s
Desnaturalización	40	95 °C	15 s
Hibridación		60 °C	30 s
Elongación		72 °C	20 s
<i>Melting</i>	1	55 °C a 95 °C	-
Almacenaje	1	4 °C	∞

Tabla V. Condiciones específicas para la PCR.

Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes correspondientes fueron las siguientes (**Tabla VI**).

Gen	Secuencia
Gapdh	F: 5'-CTG TGT CTT TCC GCT GTT TTC-3' R: 5'-TGT GCT GTG CTT ATG GTC TCA-3'
Il1β	F: 5'-AAA AAT GCC TCG TGC TGT CT-3' R: 5'-TCG TTG CTT GTC TCT CCT TG-3'
Il 10	5'-GTT CTT TGG GGA GCC AAC AG -3' 5'-GCT CCC TGG TTT CTC TTC CT-3'
TGFβ	5'-GTG GAA ACC CAC AAC GAA AT-3' 5'-CAC GTG CTG TCT CAC TTT TA-3'
MRC1	F: 5'-GCA GGT GGT TTA TGG GAT GT-3' R: 5'-GGG TTC AGG AGT TGT TGT GG-3'
PD-1	5'- GTG TCA CAC AAC TGC CCA AC- 3' 5'- GCA GGC TCT CTT TGA TCT GC- 3'
PD-L1	5'-TATGGT GGT GCC GAC TAC AA-3' 5'- TGACTG GAT CCA CAA CCA AA-3'

Tabla VI. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la PCR.

Los resultados se evaluaron con el programa *Opticon Monitor 3* (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron según el método ΔCt (diferencia de ciclos hasta alcanzar el *threshold*), utilizando la *Gapdh* como gen control.

3.7. Marcaje mediante fluorescencia

Para estudiar la captación de exosomas por parte de las células, se utilizaron tintes fluorescentes inespecíficos de membrana PKH26 (rojo) y PKH67 (verde) (*Sigma Aldrich*). Los exosomas se tiñeron con PKH26 a concentración 0,8 μM durante 5 min y las células se tiñeron con PKH67 a concentración 4 μM también durante 5 min. En ambos casos, la reacción se paró con BSA al 3%. Para eliminar la fracción de colorante no unido los exosomas se lavaron tres veces con PBS, usando los concentradores Nanosep 300K (*Pall Corporation, NYC*).

3.8. Inmunofluorescencia

Para determinar la activación de los factores de transcripción STAT3 y NF κ B las células se incubaron en portaobjetos y se trataron con 30 $\mu\text{g/ml}$ de exosomas. Como control positivo se utilizó LPS (100 ng/ml) + IFN γ (20ng/ml). A continuación se fijaron con formaldehído al 3,5% durante 5 min, se permeabilizaron, y se incubaron con anticuerpos *rabbit* anti-p65 NF κ B (sc-372, *Santa Cruz biotechnology*) o anti-STAT3 (sc-483, *Santa Cruz biotechnology*). Acto seguido se incubaron con anticuerpos primarios *anti-rabbit* (*goat anti-rabbit A11008, Alexa Life Technologies*) conjugados con Alexa fluor-488 (*Molecular Probes, Eugene, Oregon*). La localización nuclear de los factores de transcripción se examinó mediante microscopía de fluorescencia.

3.9. Esferoides

El primer paso fue realizar el recuento celular con la cámara de conteo Thoma. El número de células por cada línea celular para formar cada tipo de esferoide fue, en nuestro caso, de 150,000 BICR-18 y 50,000 macrófagos M0, M1 o M2. A continuación cada línea celular se sometió a tinción con un marcador inespecífico de membrana: PKH67 (fluorescente verde) para BICR-18 y PKH26 (fluorescente rojo) para los macrófagos. Una vez teñidas se mezclaron resuspendiendo ambas líneas celulares en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se sometieron a centrifugación a 500 xg durante 5 min. Tras descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 500 μ l de medio de cultivo sin FBS (ya que el FBS favorece que las células se separen y extiendan por la superficie), se centrifugó de nuevo a 500 xg durante 5 min.

El esferoide formado sobre la pared (pellet resultante) se mantuvo a 37 °C durante 12 h con la tapa abierta, permitiendo el intercambio gaseoso favoreciendo de esta manera la creación de uniones intercelulares y la estabilidad del esferoide.

Al día siguiente hicimos saltar el esferoide con un pequeño golpe al tubo eppendorf y lo transferimos cuidadosamente con la pipeta a un pocillo de una placa de 96w de baja adhesión. Se incubó a 37 °C y se fueron haciendo pequeños cambios de medio para ir introduciendo medio suplementado con FBS.

Todos los esferoides se mantuvieron durante una semana y se fueron observando bajo microscopía de fluorescencia para ir tomando microfotografías. Al séptimo día, los esferoides fueron sometidos a qPCR para cuantificar la expresión de IL1 β y RMC1.

4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *GraphPad Prism v.6.0* (*GraphPad software Inc, San Diego, CA*). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm el error estándar de la media (*SEM, standard error mean*). Para comparar dos grupos se utilizó el test t-Student, mientras que la comparación entre tres o más grupos se realizó mediante el análisis de la varianza (ANOVA, *one-way analysis of variance*). Una vez se determinó por ANOVA que existían diferencias significativas entre los grupos, se realizó el test *post-hoc de Tukey*. Las diferencias significativas se aceptaron con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Experimento A: Caracterización de los exosomas generados por las células BICR-18 y THP1.

La caracterización de los exosomas aislados de ambos cultivos celulares se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 20**), Nanosight, y mediante Western Blot.

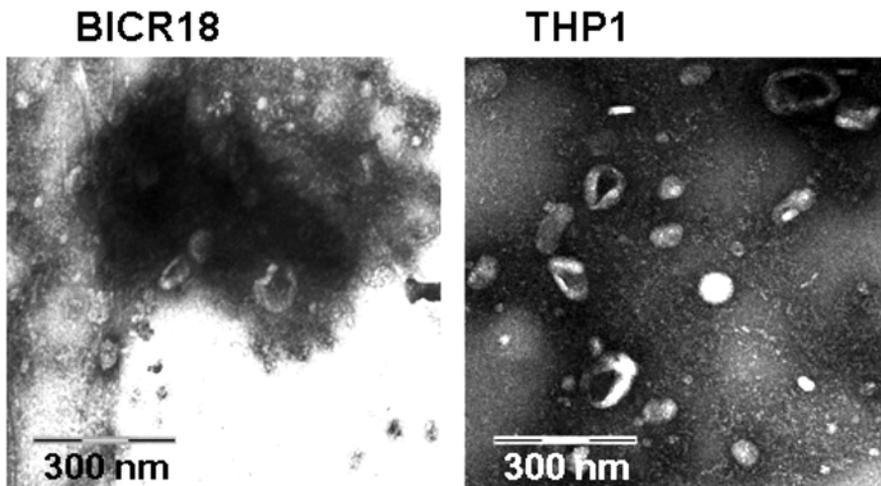


Figura 20. Imagen representativa de exosomas por microscopía electrónica con tinción negativa. Obsérvese la característica morfología de copa. Escala: 1:100.

Las muestras se sometieron al análisis por rastreo de las muestras líquidas y se obtuvo la distribución de las partículas según el tamaño, de esta forma (**Figura 21**).

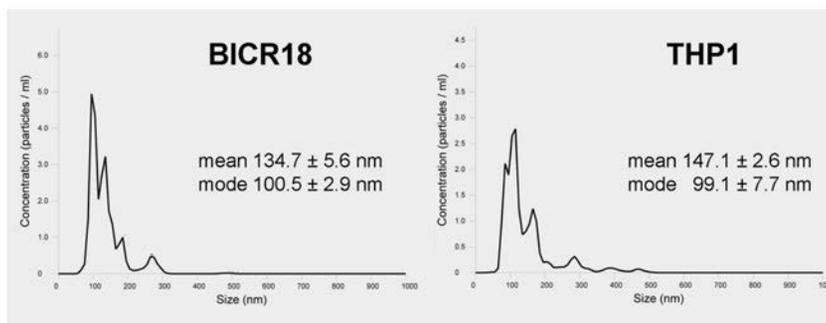


Figura 21. Rastreo de muestras BICR-18 y THP1 mediante Nanosight. Distribución según el tamaño de vesículas presentes en medio líquido de cultivo de BICR-18 y THP1 respectivamente, mediante Nanosight. Los datos se expresan mediante tamaño (nm) y concentración (partículas / ml).

Se puede observar que la gran mayoría de microvesículas presentes corresponden a un peso acorde con las características de los exosomas con una moda de $100,5 \pm 2,9$ nm (media de $134,7$ nm $\pm 5,6$ nm) para las microvesículas pertenecientes a la población de BICR-18, y con una moda de $99,1$ nm $\pm 7,7$ nm (media de $147,1$ nm $\pm 7,7$ nm) para las pertenecientes a la población de THP1.

Además, para confirmar el enriquecimiento en exosomas de la población de vesículas extracelulares presentes en cada muestra, se evaluaron mediante Western Blot, los marcadores Alix y TSG101 (Figura 22).

La co-expresión de los marcadores Alix y TSG101 permitió definir la población de vesículas como “exosomas” para ambas poblaciones celulares.

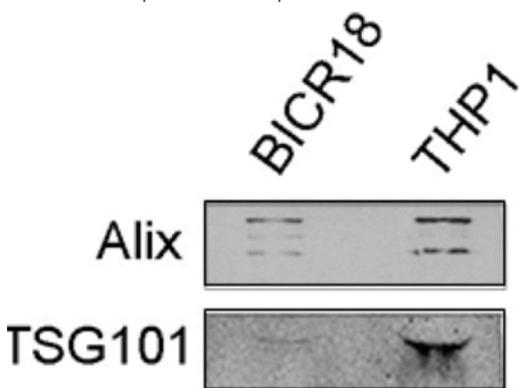


Figura 22. Análisis por Western Blot de los exosomas. Se demuestra la presencia de Alix y TSG101 en ambas poblaciones celulares BICR-18 y THP1, respectivamente.

Experimento B: Determinación del papel de los exosomas en el diálogo celular entre macrófagos y células tumorales.

Tras incubar durante 60 minutos las células previamente teñidas de verde con los exosomas teñidos de rojo, se pudo comprobar, mediante microscopía de fluorescencia, la captación de exosomas de células BICR-18 por parte los THP1, así como la captación de exosomas de THP1 por parte de células BICR-18 (Figura 23).

Tras confirmar la captación bidireccional de exosomas, se evaluó el efecto de los exosomas de THP1 sobre la migración celular de BICR-18.

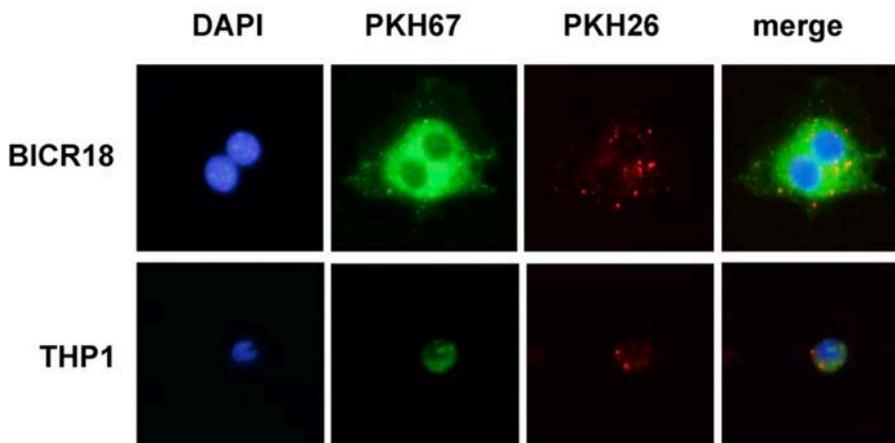


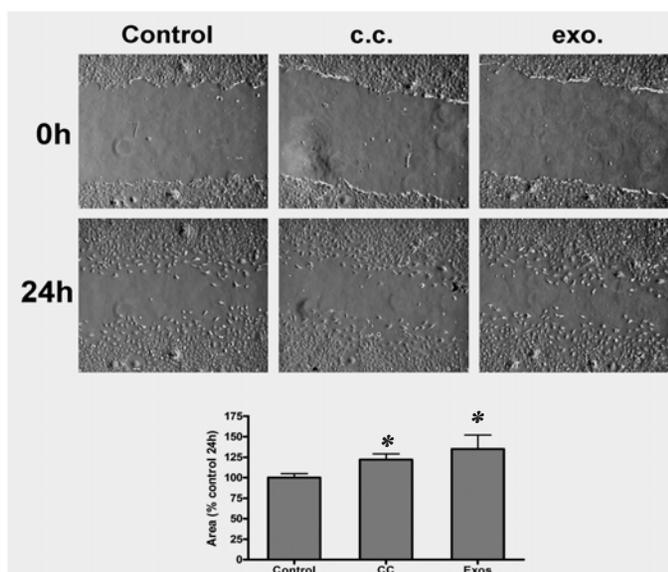
Figura 23. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia para estudiar la captación celular de exosomas. Tinción DAPI (nuclear) en azul, tinción PKH67 (citoplasmática) en verde, tinción PKH26 (exosomas) en rojo. Tras la fusión de las microfotografías (*merge*) se confirma la presencia de exosomas en el citoplasma de ambas líneas celulares.

Efecto de los exosomas de THP1 sobre la migración celular de BICR-18:

Como control se utilizaron células BICR-18 en su medio DMEM y se evaluó el patrón de migración mediante un estudio de Scratch Assay, del que se calculó el área ocupada a las 24 h. Asimismo, se estudió la migración de BICR-18 en cocultivo con THP1, del que se dedujo que la presencia de células THP1 aumentaba la migración celular.

Finalmente, para determinar si el aumento observado en la migración de BICR-18 en cocultivo era debido al efecto de los exosomas de THP1, se realizó un tercer Scratch Assay de células BICR-18 cultivadas en medio Exo-free al que se añadieron exosomas aislados de THP1.

El área de cierre en las tres situaciones se calculó mediante la sustracción del área inicial (0 h) y la final (24 h) y se muestran en la (Figura 24).



Los resultados indicaron que el área cubierta por BICR-18 tras 24 horas era significativamente mayor en situación de cocultivo respecto al control. Asimismo, este aumento fue similar al observado en BICR-18 cultivados con exosomas de THP1. Esto sugiere que el efecto sobre la migración de la célula tumoral BICR-18 vendría dado (al menos parcialmente) por efecto de los exosomas de los macrófagos.

Efecto de los exosomas de BICR-18 sobre el fenotipo de los macrófagos:

Para estudiar las modificaciones fenotípicas que ejercía la presencia de BICR-18 y sus exosomas sobre los macrófagos, se determinó, mediante qPCR, el perfil de expresión de los marcadores M1 (IL-1 β), M2 reparadores (MRC1 y CCL2) y M2 reguladores (IL-10 y TGF- β) en tres situaciones: células THP1 control, THP1 cocultivadas con células BICR-18 durante 24 h o cultivadas en medio rico en exosomas de BICR-18, también durante 24 h.

Los macrófagos, tras 24 horas, expresaron las citoquinas de la siguiente forma: **(Figura 25)**.

Los macrófagos en cocultivo con BICR-18 tendieron a mostrar un perfil a medio camino entre el fenotipo M1, (con inducción de la IL1 β) y el M2-regulador, (con inducción de IL-10 aunque sin cambios significativos en la expresión de TGF- β). Por otra parte, se observó una inhibición de los marcadores M2-reparadores (MRC1 y CCL2). Cabe destacar que no se observaron alteraciones significativas en la expresión de citoquinas cuando los macrófagos se cultivaron con exosomas de BICR-18, a excepción de IL-10, que mostró una inducción equivalente a la obtenida en cocultivo. De este primer experimento se deduce que los macrófagos en contacto con células tumorales laríngeas muestran un perfil solapado antitumoral y M2-like regulador. Por otra parte, se puede deducir que la modificación del fenotipo de los macrófagos no vendría dada por los exosomas derivados de las células tumorales.

Sin embargo, entendiendo que el perfil de activación de los macrófagos es un estado dinámico, se quiso evaluar las modificaciones en el perfil fenotípico M1/M2 a lo largo del tiempo. Se realizó para este fin una cinética de cultivo, **(Figura 26)** comparándose la expresión de los diferentes marcadores tras 1, 5 y 7 días de cultivo.

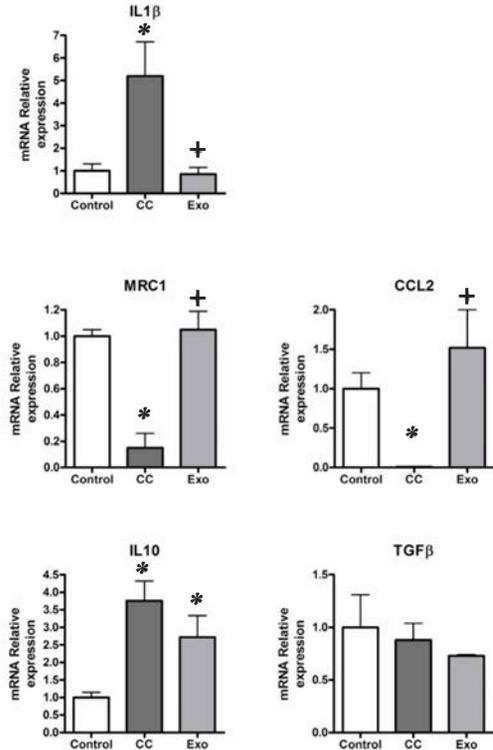
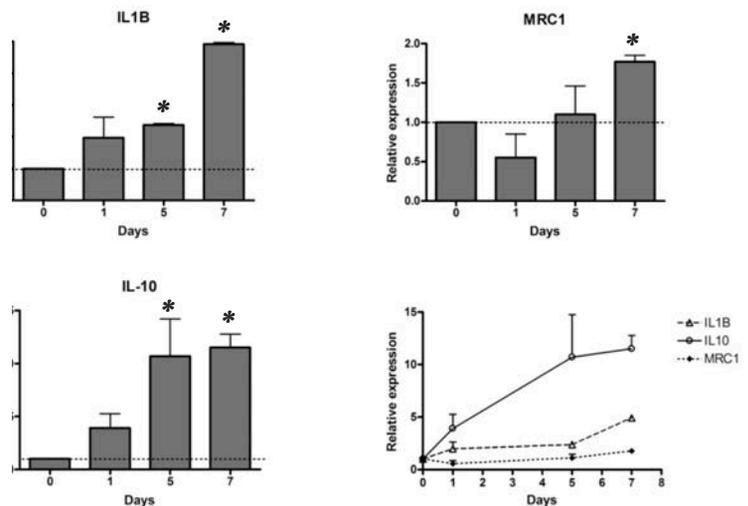


Figura 25. Expresión de citoquinas por los macrófagos, tras 24 h. Resultados relativos respecto al control de las citoquinas expresadas por los macrófagos, en las tres situaciones: THP1 solas, en cocultivo con BICR e incubadas con exosomas procedentes de BICR-18. * = $p < 0,05$ respecto al control. + = $< 0,05$ respecto al cocultivo.

Figura 26. Cinética de cultivo de los macrófagos. Gráfico de barras: expresión relativa de marcadores descriptivos de los fenotipos de activación de macrófagos en situación de cocultivo, a lo largo de los días.

Gráfica de líneas: al séptimo día, IL1 β aumentó 2,5 veces su expresión respecto al primer día, MRC1 lo hizo el triple y IL-10 se expresó doce veces su valor inicial. Las THP1 solas sirvieron de control, y su expresión no varió a lo largo del tiempo (no se representa en la gráfica).

* = $p < 0,05$ respecto al control.



Estos cambios indicaron que, aunque el fenotipo a las primeras 24 h se situaba a medio camino entre un perfil M1 y un perfil M2-reparador, se pudo observar, a lo largo del tiempo, una tendencia hacia un perfil M2, y por lo tanto protumoral. Cabe remarcar el mayor aumento de la Interleucina -10 respecto a las demás citoquinas, mostrándose un fenotipo más M2 regulador.

Experimento C: Papel de los exosomas en la modulación del eje inmunosupresor PD-1/PD-L1.

Para estudiar si la modulación de PD-L1 en la célula tumoral laríngea está mediada por la presencia de macrófagos asociados al cáncer y por sus exosomas, se estudió la expresión genética de PD-L1 mediante qPCR en distintas situaciones: células BICR-18 en monocultivo, en cocultivo con THP1 y BICR-18 con exosomas de THP1.

Los resultados se muestran en la **Figura 27**:

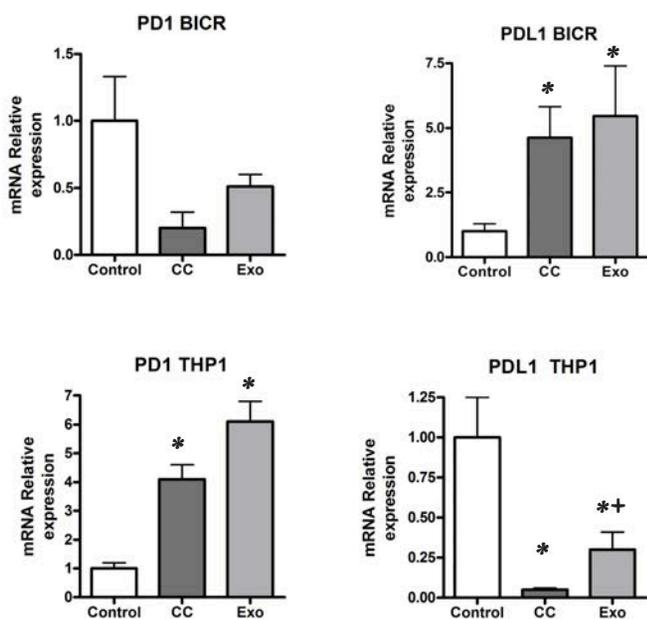


Figura 27: Expresión relativa de PD-1 y PD-L1 por ambas poblaciones celulares mediante qPCR. La células tumorales BICR-18, dotadas de PD-L1, aumentaron la expresión relativa del ligando 5 veces tras permanecer 24 h en cocultivo con THP1. Dicho efecto se reprodujo al incubarlas con exosomas procedentes de macrófagos. La población de THP1, dotada del receptor PD-1, cuadruplicó su expresión relativa tras estar en cocultivo con BICR-18, y lo hizo en más medida cuando fueron incubados con exosomas procedentes de BICR-18. * = p < 0,05 respecto al control. + = < 0,05 respecto al cocultivo.

La expresión de PD-L1 por parte de las células tumorales y de su receptor PD-1 por parte de los macrófagos se vio aumentada significativamente en situación de cocultivo, respecto al control. La expresión de ambos ligando y receptor se vio también incrementada tras la incubación con exosomas. De forma complementaria, la expresión de PD1 se vio reducida en las BICR-18, así como lo hizo PD-L1 en las THP1, cuando fueron sometidas a cocultivo.

Para evaluar si los factores de transcripción STAT3 i NFkB eran responsables de la expresión de PD-L1 en las BICR-18 mediada por exosomas, se realizó un estudio de inmunofluorescencia analizando el efecto de los exosomas sobre la translocación de ambos factores de transcripción (**Figura 28**). El control positivo se realizó con una combinación de LPS y IFN y.

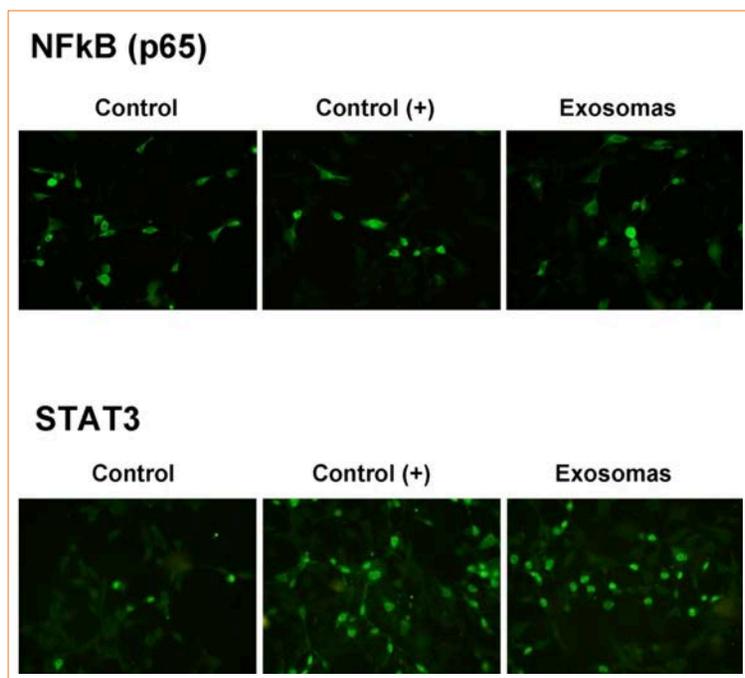


Figura 28. Tinción por inmunofluorescencia STAT3 i NFkB en BICR-18. Microfotografías tras inmunofluorescencia de los factores de transcripción NFkB y STAT3, en BICR-18, BICR-18 estimuladas, y BICR-18 cultivadas con exosomas de THP1.

En el caso de NFkB no se observaron cambios relevantes tras tratarlas con exosomas. Puesto que el control positivo tampoco mostró cambios significativos, podemos especular con que NFkB ya se encuentra constitutivamente activado en la célula tumoral, en condiciones basales. En cambio, en el caso de STAT3 se pudo detectar un claro aumento de la presencia de este factor de transcripción tras el tratamiento con exosomas. En este caso, la activación detectada fue similar a la observada en el control positivo.

Para confirmar la participación de los exosomas en la activación de STAT3, se usó un inhibidor específico de STAT3. La eficacia del tratamiento se verificó determinando la inhibición de la translocación de STAT3. **(Figura 29).**

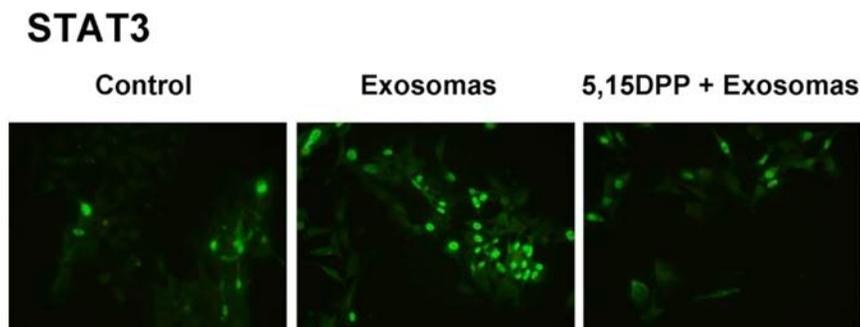


Figura 29. Tinción por inmunofluorescencia de STAT3 en BICR-18 con 5,15-DPP. Microfotografías por inmunofluorescencia de STAT3 en BICR-18 en reposo, BICR-18 estimuladas con exosomas y tras añadir el inhibidor de STAT3 (5,15-DPP).

Mientras que en situación de exosomas vemos captación de la tinción y por lo tanto funcionalidad de la vía STAT3, dicha captación desaparece prácticamente en presencia del inhibidor.

A continuación se evaluó el efecto de este tratamiento sobre la expresión de PD-L1 inducida por exosomas, mediante qPCR. Los resultados se muestran en la **Figura 30**.

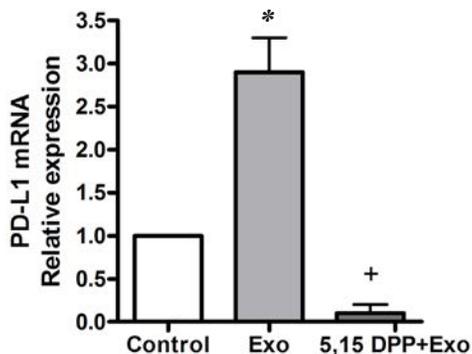


Figura 30. qPCR de PD-L1 tras el tratamiento con inhibidor de STAT3. La expresión de PD-L1 se reduce

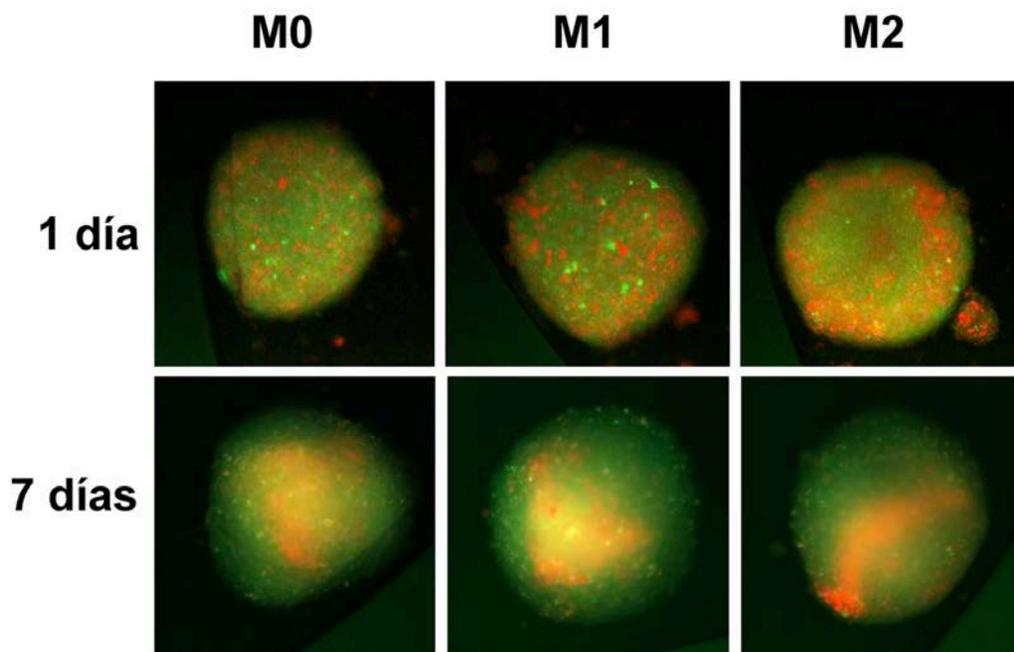
tras aplicar el inhibidor 5,15 DPP

*= $p < 0,05$ respecto al control.

+ = $< 0,05$ respecto al cultivo con exosomas.

Experimento D: Distribución de los tipos celulares en cultivos tridimensionales y estudio del perfil de activación de los macrófagos

A fin de reproducir una interacción tridimensional se generaron esferoides con 150,000 BICR-18 y 50,000 macrófagos (M0, M1 y M2) por cada esferoide, previamente teñidos. A continuación se muestra la distribución que tomó cada población celular al primer y séptimo día (**Figura 31**)



Parece ser que el perfil de activación de los macrófagos a las primeras horas condicionaría una localización específica respecto a las células tumorales. Los resultados también indican que, a lo largo de los días, los macrófagos adquirirían una situación espacial distinta a la inicial y más similar a la adquirida por los macrófagos M2-like.

La palabra “inflamación” deriva del latín “*Inflamatio*”, y evoca la “iniciación en el fuego”. Fue caracterizada por primera vez en el siglo I dc por el médico Cornelius Celsus, que describió la inflamación como un estado marcado por calor, rubor, dolor y tumor (aumento de tamaño). No fue hasta el siglo XIX que el patólogo alemán Rudolph Virchow (1821-1902) remarcó: “la irritación crónica que se manifiesta por una inflamación crónica es la clave promotora del cáncer”.

Actualmente se asume que entender el cáncer implica conocer, además, las características del microambiente tumoral donde se desarrolla, ya que esta región participa activamente en conferirle capacidad para el crecimiento, invasión y metástasis [35]. Tras evidencias recientes que los TAM presentes en el microambiente tumoral promueven el crecimiento tumoral y la evasión del sistema inmune [49], surge la hipótesis principal de este trabajo: que el mecanismo es mediado a través de exosomas.

En el **experimento A** se quiso verificar que efectivamente se estaba trabajando con la subpoblación de vesículas extracelulares correspondiente a “exosomas”. Para ello, la fracción purificada supuestamente correspondiente a exosomas de células tumorales y macrófagos se estudió bajo microscopía electrónica con tinción negativa, obteniéndose las características imágenes en forma de copa típicas de los exosomas. El conocimiento de la escala microscópica que usamos nos permitió extrapolar que las vesículas contenidas en el medio estudiado cumplían con el requisito que los exosomas miden menos de 200 nm (entre 30 – 150 nm). De todos modos, el análisis del tamaño vesicular de ambas poblaciones de exosomas se estudió de forma sistematizada mediante el rastreo de muestras por Nanosight. El tamaño vesicular más representativo (definido por la moda, el valor más repetido) fue de 100,5 nm para la población vesicular de BICR18 y de 99,1 nm para la población vesicular de THP1, ciñéndose al tamaño propuesto como estándar para definir al exosoma. Además de cumplir ambos aspectos morfológicos, se analizó la presencia de los marcadores de superficie Alix y TSG101 mediante análisis por Western Blot. La presencia de las proteínas involucradas en la biogénesis de MVB (Alix y TSG101) nos confirmó que estábamos trabajando con exosomas [84], [86].

En el **experimento B**, previo al estudio de los efectos moleculares ejercidos por los exosomas, se determinó si los exosomas eran capturados por la célula receptora. Para ello, se tiñeron ambas poblaciones de células, sus membranas plasmáticas, sus núcleos y sus correspondientes exosomas, y tras incubar las células con los correspondientes exosomas se estudió la localización bajo microscopía de fluorescencia. La presencia de exosomas teñidos en el interior de la célula receptora confirmó que efectivamente podía tener lugar, entre células tumorales laríngeas y macrófagos, un diálogo mediado por exosomas. Además, se concluyó que esta comunicación podía actuar de forma bidireccional.

Centrando la atención en los procesos biológicos tumorales que involucran al carcinoma escamoso de laringe, y partiendo del hecho que los TAM promueven la progresión de células malignas [45], [48], se quiso investigar la capacidad pro-tumoral de las THP1 sobre las BICR-18, mediante exosomas. Para este objetivo se comparó en primer lugar la capacidad migratoria de BICR-18 ante la presencia de THP1, mediante *Scratch Assay*. Pudimos observar que, efectivamente, la presencia de macrófagos en el cocultivo aumentaba la migración celular de BICR-18. Este mismo resultado se obtuvo en ausencia de macrófagos, y simplemente tratando las células tumorales con los exosomas derivados de los macrófagos. Este resultado indica que la estimulación inducida por los

macrófagos está mediada por la generación de exosomas con capacidad para promover la migración de las células tumorales. El mecanismo molecular a través del cual los exosomas estimularían una mayor migración de las células tumorales todavía está por dilucidar. Nuestros resultados van en la línea sugerida por diferentes grupos de investigación que están trabajando en la posibilidad de actuar sobre los exosomas liberados por los TAM para inhibir la progresión celular en diferentes tipos de cáncer. Nuestros resultados sugieren que también sería de aplicación en el carcinoma laríngeo. Así como se han llevado a cabo ensayos clínicos con vacunas de exosomas autólogos para el melanoma [134], no se ha probado todavía en pacientes afectados de carcinoma de laringe, siendo éste un posible campo a explorar.

Por otra parte, la polarización de los macrófagos es un elemento importante para la progresión tumoral [43]. Un fenotipo M2 – like se ha definido como predominante en el tejido tumoral [38]. El perfil M2-*like* se encuentra también involucrado en el proceso fisiológico de curación de una herida, pudiendo entender el cáncer como un proceso de cicatrización perpetuado y autodirigido tanto por las propias células tumorales como por las no-tumorales [41]. En el mismo **experimento B** se caracterizó el fenotipo de los macrófagos, midiendo la expresión de marcadores característicos para los fenotipos M1 y M2. A las 24 h se observó un fenotipo más próximo a M1 (aumento de IL1 β y reducción de MRC1) aunque también se observó un aumento de la IL-10 (característica de un perfil M2).

Este hecho, que al principio parece contradecir a la premisa que los TAM adquieren un perfil pro-tumoral, sigue la línea de investigaciones previas realizadas por el grupo de Vidyarthi, el cual describió que inicialmente los TAM muestran un fenotipo anti-tumoral (M1), desplazándose posteriormente hacia un perfil M2-*like*, y por lo tanto pro-tumoral [135]. En nuestro caso, para verificar el dinamismo en el que se mueven los macrófagos ante un proceso tumoral, se llevó a cabo a continuación una cinética de cultivo. Se analizaron los cambios en la expresión de los distintos marcadores de activación de los macrófagos al primer, quinto y séptimo día de cocultivo. Efectivamente, los macrófagos inicialmente mostraron un perfil más próximo a un estado M1-*like*, mientras que posteriormente expresaron un fenotipo más cercano a M2. Este resultado reafirmó el dinamismo en el que se mueven los macrófagos.

A día de hoy se han llevado a cabo estudios dónde el fenotipo de activación de los macrófagos se desplazó hacia un estado M1-*like* tras el tratamiento y regresión de cáncer de pulmón [136]. En este punto surge la oportunidad de poder incidir sobre la polarización de los macrófagos y reeducar los TAM en el cáncer de laringe hacia un perfil anti-tumoral (M1). De hecho, esta hipótesis se llevó a cabo recientemente *in vivo* por el equipo de Jarosz-Biej, que mediante una terapia combinada (agente antiangiogénico con IL-12) consiguió inhibir el crecimiento de melanoma en ratones incidiendo en el perfil de los TAM [137].

Respecto al mecanismo de comunicación intercelular entre TAM y célula tumoral, el equipo de Huang describió las microvesículas tumorales como vehículo promotor de la polarización a macrófagos M2-*like* en líneas celulares de hepatocarcinoma, melanoma y cáncer colorectal [138]. En el **experimento B** de nuestros estudios para determinar el papel de los exosomas en la polarización de macrófagos, los cambios fenotípicos inducidos sobre los TAM en presencia de células tumorales no se reprodujeron al tratar las células con exosomas, a excepción de la inducción de la IL-10. Esto sugiere que el mecanismo de polarización de los TAM inducido por células tumorales no es-

taría regulado por un único factor, sino por una combinación de diferentes mediadores, incluyendo factores solubles, exosomas y microvesículas.

Este resultado está en la línea de los trabajos de Komohara y Hashimoto, según los cuales la comunicación entre TAM i célula tumoral laríngea se daría a través de factores solubles [33], [139]. No obstante, no se puede descartar, tal como sugiere *Huang*, la participación de microvesículas de mayor tamaño que los exosomas en el cambio de fenotipo de los macrófagos.

Una limitación de este estudio a la hora de atribuir la mayor migración de BICR-18 a los exosomas es que se trata de un estudio *in vitro*, tan solo con dos líneas celulares, y por tanto sin poder valorar el efecto que tendrían los demás componentes del microambiente tumoral como los fibroblastos, leucocitos, células endoteliales y factores solubles que podrían mediar la comunicación intercelular [35].

En coherencia con otras investigaciones, se constata la liberación por parte de células tumorales laríngeas de exosomas [140]. Dichos exosomas podrían incluso ser utilizados como diagnóstico no invasivo (y tal vez precoz) de carcinoma epidermoide de laringe [141]. Aunque el grupo de Whiteside ha demostrado correlación entre concentración de exosomas en sangre periférica y pronóstico tumoral en pacientes afectos de cáncer de laringe, los inconvenientes a la hora de postular los exosomas como diagnóstico precoz del cáncer son varios. El primero es que la ratio TEX/exosomas liberados por células normales varía ampliamente de un tumor a otro, y a día de hoy no hay estudios en humanos para estandarizar los datos. En segundo lugar, algunos tumores segregarían una cantidad de TEX en sangre cuando el tumor estuviera avanzado, dejando de ser útiles como diagnóstico precoz. El tercer inconveniente a tener en cuenta es que los exosomas también se han descrito como vehículos presentadores de antígeno tumoral al sistema inmune, por lo que su detección en sangre podría corresponder al proceso fisiológico del sistema inmune para la eliminación del proceso tumoral, resultando ser un falso positivo [142], [143].

Cabe destacar también del **experimento B** que el único cambio fenotípico que podemos atribuir directamente a los exosomas en nuestro trabajo sería la inducción de la IL-10, una citoquina pleiotrópica clásicamente reconocida como anti-inflamatoria e inmuno-reguladora, confeccionando un microambiente propicio para el cáncer. Este resultado sugiere una nueva línea de investigación, y es que cabría estudiar, además de citoquinas y factores de crecimiento algunos ya descritos, [37], [41], [44]–[47], el papel de los exosomas generados por lo macrófago M2-like sobre los cambios fenotípicos en macrófagos de la vecindad.

Otro de los mecanismos mediante el cual el TME confiere al cáncer una evasión del sistema inmune es la activación del eje PD-1/PD-L1 [64]. Para estudiar la participación de este eje inmunomodulador en el cáncer de laringe llevamos a cabo el **experimento C** cuantificando, mediante qPCR, la expresión de ambos ligando y receptor por parte de las células tumorales y los macrófagos tras 24 h en cocultivo. Nuestros resultados indicaron que efectivamente existe un sistema de comunicación bidireccional entre la célula tumoral y el macrófago para evitar el reconocimiento inmune, que vendría dado por cambios en la expresión PD-1 y PD-L1 en THP1 y BICR-18, respectivamente. Asimismo, se pudo deducir que la mayor expresión de PD-1/PD-L1 estaría mediada por exosomas, al reproducirse dicho incremento de expresión tras la incubación en medio con exosomas. De nuestro trabajo se desprende que los exosomas presentes en el TME ejercerían un efecto inmunosupresor

estimulando la expresión de PD-L1 en las células tumorales laríngeas, así como del receptor PD-1 en los macrófagos. Es interesante destacar que se observó un patrón opuesto de expresión de PD-1/PD-L1 en macrófagos y células tumorales. Mientras que en cocultivo se indujo la expresión de PD-L1 y la inhibición de PD-1 en células tumorales, PD-L1 se inhibió y PD-1 aumentó su expresión en los macrófagos. Por otra parte, todos estos cambios se reprodujeron cuando se incubaron las células con los correspondientes exosomas.

El efecto inmunodepresor que ejercen los TAM se ha descrito mediado por exosomas en animales afectados de adenocarcinoma de mama [125]. El grupo de Chen ha descrito recientemente que los exosomas liberados por el melanoma metastásico bloquean la respuesta inmunitaria mediante el eje PD-1/PD-L1 y permiten predecir la respuesta al tratamiento inmunoterápico [144]. En la misma línea, el grupo de Theodoraki aisló exosomas en sangre periférica de pacientes afectados de HNSCC que expresaban en la membrana exosomal el ligando PD-L1, ejerciendo *in vitro* un efecto inmunosupresor directo a las células inmunes de la circulación. Una mayor concentración de dichos exosomas circulantes se ha relacionado con un peor pronóstico tumoral [67]. Además de estos efectos directos descritos, nuestros resultados aportan un nuevo mecanismo de acción inmunosupresora, y es que del **experimento C** se constata que los exosomas también actuarían de forma indirecta alterando la expresión del eje PD-1/PD-L1. De particular importancia es la inducción de PD-L1 en células tumorales, ya que este ligando será el responsable de la inhibición de los linfocitos T que infiltran el tumor y del consecuente escape inmune. De nuevo, un inconveniente de este trabajo es que se realiza en modelo *in vitro* y con dos poblaciones celulares, sin poder evaluar los efectos que ejercerían otras poblaciones presentes *in vivo* como fibroblastos y células endoteliales.

La identificación del eje PD-1/PD-L1 como modulador de la oncogénesis y la notable respuesta que ha tenido la inmunoterapia dirigida a PD-1 en distintos tipos de cáncer, llevó a pensar en que su presencia podría ser determinante en la oncología [145]. Sin embargo, su expresión no permite predecir de forma fiable la respuesta tumoral a la inmunoterapia, al haberse encontrado que HNSCC aún con baja concentración de PD-1 responden a la inmunoterapia [70].

Del **experimento C** de nuestro trabajo también se desprende que el mecanismo molecular por el que las células tumorales laríngeas expresarían una mayor concentración de PD-L1 sería a través de la vía de transcripción STAT3. Este factor de transcripción es un punto de convergencia clave en la mayoría de procesos tumorales y ejerce cambios tanto en las células inmunes como en las neoplásicas [57], [146]. Por esa razón, STAT3 también ha sido objeto de estudio como diana terapéutica a lo largo de estos últimos 20 años [147], [148], a pesar de que no se ha podido hallar un tratamiento efectivo y con baja toxicidad [59]. Los experimentos llevados a cabo constatan que la evasión del reconocimiento inmune en el cáncer de laringe estaría regulada por la expresión del eje PD-1/PD-L1, mediante la activación del factor de transcripción STAT3. También se puede afirmar que de nuevo serían los exosomas derivados de los macrófagos los responsables de dicha transcripción.

El mecanismo molecular por el cual exosomas derivados de TAM activarían la vía de transcripción STAT3 en el cáncer de laringe queda todavía por dilucidar. En el caso del cáncer de mama se ha descrito recientemente que la activación de STAT3 estaría inducida por exosomas a través de la gp130. Esta glicoproteína de membrana actúa como co-receptor para la familia de IL-6 y está asociada a las tirosina quinasas JAK, la cual tiene capacidad para activar STAT3 [149]. Un mecanismo

similar podría estar implicado en la activación observada en nuestros experimentos, suponiendo un campo a profundizar en estudios posteriores.

Desde nuestro conocimiento, estos experimentos constatan, por primera vez, que una comunicación mediada por exosomas participaría en la activación de factores de transcripción nuclear responsables de promover la inmunosupresión en el cáncer de laringe.

NF- κ B i STAT se han descrito como cruciales en el HNSCC y con un alta grado de interconexión [150]. Las dos vías están persistentemente activadas en el cáncer, median las señales extracelulares y actúan como factores de transcripción nuclear para regular genes involucrados en la proliferación, supervivencia, angiogénesis e invasión tumoral [61]. No obstante, en nuestro trabajo no pudimos detectar activación de la vía NF κ B tras el tratamiento con exosomas. El análisis de inmunofluorescencia reveló un notable grado de activación en las células control sin tratar, probablemente relacionada con el hecho que se tratan de células tumorales y la vía de NF κ B esté constitutivamente activada. En estas condiciones, el tratamiento con exosomas no pareció promover una mayor activación de la vía NF κ B en las BICR-18.

Un último detalle a tener en cuenta es la disposición física que tienen las distintas poblaciones celulares dentro del tumor, ya que condicionaría las interacciones inmunes que tienen lugar en el TME. En el **experimento D** de nuestro trabajo estudiamos la disposición de las distintas poblaciones celulares en un cultivo tridimensional, que nos acerca a una estructura más similar a la de un tumor in vivo. Para ello generamos esferoides combinando macrófagos M0, M1 y M2 con células tumorales y pudimos comprobar que la disposición espacial de los macrófagos depende del fenotipo de activación que presenten. Los M2 mostraron una tendencia a agruparse y depositarse preferentemente en la periferia del esferoide ya a las 24 h de cocultivo. En los otros casos (fenotipos M0 y M1) no adquirieron esta disposición hasta el séptimo día. Cabe destacar que este tiempo coincide con los siete días necesarios para que los macrófagos en presencia de células tumorales se polaricen hacia un perfil M2 en la cinética de cultivo del **experimento B**.

Nuestros resultados *in vitro* están en la línea de los observados *in vivo* por otros grupos internacionales. Se ha descrito que hay más población de macrófagos M2 en la periferia del cáncer [138] [151], que metafóricamente dirigirían el frente invasor tumoral y que estarían involucrados en la remodelación, invasión local y progresión tisular mediante enzimas líticas (MMP) [35], [152]. En base a los conocimientos sobre el fenotipo del macrófago y su disposición espacial en el microambiente tumoral, cabría esperar que los macrófagos del **experimento D** mostraran un fenotipo M2-like, el cual no se pudo determinar mediante qPCR al estar conformando un esferoide junto con células tumorales. Este punto ofrece una nueva línea de investigación para estudiar el mecanismo a través del cual los macrófagos M1 de nuestros esferoides modificarían, supuestamente, su perfil de activación hacia M2-like. Éste mecanismo podría estar de nuevo dirigido por exosomas segregados por las propias células tumorales y macrófagos, que podrían ejercer efectos mediante mecanismos yuxtacrinos.

La inmunoterapia ofrece un beneficio indisputable respecto a los fármacos citotóxicos: dirigir el tratamiento oncológico según el fenotipo tumoral y el paciente en cuestión para proporcionar una terapia personalizada. Inicialmente, los tratamientos en el campo de la inmunoterapia se focalizaron en la propia célula tumoral. El problema principal que surgía era que las células tumorales son

típicamente aberrantes e inestables, dificultando la caracterización y eliminación de las mismas. En contraste, las células presentes en el TME se mantienen más estables y por esa razón se reconocieron posteriormente como más atractivas para ser estudiadas como dianas terapéuticas [153]. El objetivo principal dejó de ser la eliminación directa de la célula tumoral *per se*, sino que se focalizaron los esfuerzos para poder reeducar el estroma tumoral, dirigiendo el sistema inmune hacia la eliminación de las células tumorales. Se han llevado a cabo estudio pre-clínicos que han observado cambios en la progresión tumoral tras modificar el fenotipo de los TAM [137], [154]. Sin embargo, alterar específicamente el TME es una tarea desafiante, ya que en el TME tiene lugar un número ingente de interacciones celulares, de manera que cualquier cambio podría tener consecuencias no deseadas desde el punto de vista terapéutico.

Otro dilema que surge habitualmente en el cáncer es que distintos procesos moleculares convergen en un mismo resultado, por lo que un tratamiento en monoterapia no sería efectivo. Además, el cáncer es altamente heterogéneo y versátil, siendo capaz de desarrollar resistencias a la monoterapia. Se precisan más estudios para ofrecer un terapia anti-tumoral combinada dirigida a bloquear la remodelación del microambiente tumoral, la angiogénesis, la evasión inmune, promover la presentación de antígenos tumorales, inducir la respuesta inmune efectiva y sustentar la supervivencia de las células inmunes.

Nuestros resultados indican que los TEX juegan un papel relevante en el acondicionamiento de un ambiente protumoral en el cáncer de laringe y en la evasión del sistema inmune vía IL-10 en macrófagos, vía PD-1/PD-L1 en células tumorales. Todo ello señala a los exosomas como una interesante diana terapéutica en el cáncer de laringe, al estar involucrados en varios niveles dentro del proceso oncogénico [155].

- 1.** Los macrófagos inducen un aumento en la migración de las células tumorales laríngeas. Este aumento está mediado por el intercambio de exosomas.

- 2.** La célula tumoral induce un fenotipo *M2-like* en los macrófagos, caracterizado por un aumento de la IL1 β y la IL-10. De estos cambios, tan solo el aumento de IL-10 es debido a los exosomas de la célula tumoral.

- 3.** La interacción entre macrófagos y células tumorales modifica considerablemente el eje PD-1/PD-L1. En células tumorales tiene lugar un aumento de la expresión de PD-L1 y una inhibición de PD-1. En macrófagos tiene lugar un efecto opuesto (inducción de PD-1 e inhibición de PD-L1). Todos estos cambios son debidos a señalización mediada por exosomas.

- 4.** La inducción de PD-L1 en células tumorales está mediada por la activación de la vía de señalización STAT3, que a su vez está inducida por exosomas.

- 5.** El fenotipo de los macrófagos condiciona su distribución espacial respecto a las células tumorales laríngeas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. Szyfter, "Molecular and cellular alterations in tobacco smoke-associated larynx cancer," *Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 445, pp. 259–274, 1999.
- [2] H. Kuper, P. Boffetta, and H. Adami, "Tobacco use and cancer causation : association by tumour type," *J. Intern. Med.*, no. 252, pp. 206–224, 2002.
- [3] S. Paget-bailly, "Occupational Exposures and Cancer of the Larynx — Systematic," *JOEM*, vol. 54, no. 1, pp. 71–84, 2012.
- [4] A. Perloy, D. H. E. Maasland, P. A. Van Den Brandt, and B. Kremer, "Intake of meat and fish and risk of head – neck cancer subtypes in the Netherlands Cohort Study," *Cancer Causes Control*, vol. 28, no. 6, pp. 647–656, 2017.
- [5] D. H. E. Maasland, P. A. Van Den Brandt, B. Kremer, R. A. Goldbohm, and L. J. Schouten, "Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head – neck cancer in the Netherlands Cohort Study," *Int. J. Cancer*, 2015.
- [6] J. E. Freije, T. W. Beatty, B. H. Campbell, B. T. Woodson, C. J. Schultz, and R. J. Toohill, "Carcinoma of the Larynx in Patients With Gastroesophageal Reflux," *Am. J. Otolaryngol.*, vol. 17, no. 6, pp. 386–390, 1996.
- [7] M. Nilsson, W. Chow, M. Lindblad, and W. Ye, "No Association between Gastroesophageal Reflux and Cancers of the Larynx and Pharynx," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 14, no. May, pp. 1194–1198, 2005.
- [8] M. Loyo and S. I. Pai, "The Molecular Genetics of Laryngeal Cancer," *Otola*, vol. 41, pp. 657–672, 2008.
- [9] R. R. Gama, A. L. Carvalho, A. L. Filho, A. P. Scorsato, R. V. M. López, J. Rautava, S. Syrjänen, and K. Syrjänen, "Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: Systematic review and meta-analysis," *Laryngoscope*, vol. 126, no. 4, pp. 885–893, 2016.
- [10] A. Jemal, F. Bray, and J. Ferlay, "Global Cancer Statistics: 2011," *CA Cancer J Clin*, vol. 49, no. 2, p. 1,33-64, 1999.
- [11] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, D. M. Parkin, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359–E386, 2015.
- [12] C. E. Steuer, M. El-Deiry, J. R. Parks, K. A. Higgins, and N. F. Saba, "An update on larynx cancer," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 67, no. 1, pp. 31–50, 2017.
- [13] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray, "CanceFerlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer*, 49(6), 1374–1403," *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 6, pp. 1374–1403, 2013.
- [14] L. Chatenoud, W. Garavello, E. Pagan, P. Bertuccio, S. Gallus, C. La Vecchia, E. Negri, and C. Bosetti, "Laryngeal cancer mortality trends in European countries," *Int. J. Cancer*, 2016.

- [15] M. Mourad, T. Jetmore, A. A. Jategaonkar, S. Moubayed, E. Moshier, and M. L. Urken, "Epidemiological Trends of Head and Neck Cancer in the United States: A SEER Population Study," *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 75, no. 12, pp. 2562–2572, 2017.
- [16] B. You, X. Cao, X. Shao, H. Ni, S. Shi, Y. Shan, Z. Gu, and Y. You, "Clinical and biological significance of HAX-1 overexpression in nasopharyngeal carcinoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 11, pp. 12505–12524, 2016.
- [17] J. M. Tamarit Conejeros, M. C. Llatas, E. E. Ferriol, S. F. Martínez, N. B. Granell, and J. D. Galofre, "Carcinomas supraglóticos y glóticos. Estudio de la incidencia en los últimos 31 años," *Acta Otorrinolaringol. Esp.*, vol. 58, no. 10, pp. 449–453, 2007.
- [18] C. Salvador-Coloma and E. Cohen, "Multidisciplinary Care of Laryngeal Cancer," *J. Oncol. Pract.*, vol. 12, no. 8, pp. 717–724, 2016.
- [19] A. a Forastiere, Q. Zhang, R. S. Weber, M. H. Maor, H. Goepfert, T. F. Pajak, W. Morrison, B. Glisson, A. Trotti, J. a Ridge, W. Thorstad, H. Wagner, J. F. Ensley, and J. S. Cooper, "Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 7, pp. 845–52, Mar. 2013.
- [20] Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group, "Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 324, no. 24, pp. 1685–90, 1991.
- [21] J. L. Lefebvre, Y. Pointreau, F. Rolland, M. Alfonsi, A. Baudoux, C. Sire, D. de Raucourt, O. Malard, M. Degardin, C. Tuchais, E. Blot, M. Rives, E. Reyt, J. M. Tourani, L. Geoffrois, F. Peyrade, F. Guichard, D. Chevalier, E. Babin, P. Lang, F. Janot, G. Calais, P. Garaud, and E. Bardet, "Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPLIN randomized phase II study.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 7, pp. 853–9, Mar. 2013.
- [22] J.-L. Lefebvre, "Candidates for larynx preservation: the next step?," *Oncologist*, vol. 15 Suppl 3, pp. 30–2, Jan. 2010.
- [23] J. Moskovitz, J. Moy, and R. L. Ferris, "Immunotherapy for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma," *Curr. Oncol. Rep.*, vol. 20, no. 2, p. 22, 2018.
- [24] V. Dogan, "Current studies of immunotherapy in head and neck cancer," *Clin. Otolaryngol.*, no. April 2017, pp. 13–21, 2018.
- [25] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer Statistics , 2018," *CA CANCER J CLIN*, vol. 68, no. 1, pp. 7–30, 2018.
- [26] H. T. Hoffman, "Laryngeal cancer in the United States: Changes in demographics, patterns of care, and survival," *Laryngoscope*, vol. 116, no. 9 SUPPL. 2, pp. 1–13, 2006.
- [27] F. Balkwill and A. Mantovani, "Inflammation and cancer : back to Virchow ?," *Lancet*, vol. 357, pp. 539–545, 2001.
- [28] B. B. Aggarwal, R. V Vijayalekshmi, and B. Sung, "Targeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of Cancer : Short-Term Friend , Long-Term Foe argeting Inflammatory Pathways for Prevention and Therapy of," *Clin. Cancer Res.*, pp. 425–430, 2009.
- [29] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, "Immunity, inflammation, and cancer," *Cell*, vol. 140, no. 6, pp. 883–899, 2011.

- [30] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer : The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011.
- [31] B. Solomon, R. J. Young, and D. Rischin, "Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments," *Semin. Cancer Biol.*, no. October 2017, pp. 0–1, 2018.
- [32] E. Lengyel, L. Makowski, J. Digiovanni, and M. G. Kolonin, "Cancer as a Matter of Fat : The Crosstalk between Adipose Tissue and Tumors," *TRENDS in CANCER*, vol. xx, pp. 1–11, 2018.
- [33] Y. Komohara and M. Takeya, "CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment," *J. Pathol.*, vol. 241, no. 3, pp. 313–315, 2017.
- [34] A. Ramteke, H. Ting, C. Agarwal, S. Mateen, A. Hussain, M. Graner, B. Frederick, and R. Agarwal, "Exosomes Secreted under Hypoxia Enhance Invasiveness and Stemness of Prostate Cancer Cells by Targeting Adherens Junction Molecules," *Mol Carcinog*, vol. 54, no. 7, pp. 554–565, 2016.
- [35] D. Quail, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis," *Nat Med.*, vol. 19, no. 11, pp. 1423–1437, 2013.
- [36] L. Yang and Y. Zhang, "Tumor-associated macrophages : from basic research to clinical application," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 10, no. 58, pp. 1–12, 2017.
- [37] W. L. Ruth A. Franklin, "The Cellular and Molecular Origin of Tumor-associated Macrophages," *Sci. . 2014*, vol. 344, no. 6186, pp. 921–925, 2014.
- [38] D. Mukhopadhyay and N. Javeed, "Exosomes and their role in the micro-/macro-environment: a comprehensive review," *J. Biomed. Res.*, vol. 30, no. 0, pp. 1–9, 2016.
- [39] M. Stein, "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation," *J. Exp. Med.*, vol. 176, no. 1, pp. 287–292, 1992.
- [40] C. D. Mills, K. Kincaid, J. M. Alt, M. J. Heilman, and A. M. Hill, "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm," *J. Immunol.*, vol. 164, no. 12, pp. 6166–6173, 2000.
- [41] S. Zhang, X. Yang, L. Wang, and C. Zhang, "Interplay between inflammatory tumor microenvironment and cancer stem cells.," *Oncol. Lett.*, vol. 16, no. 1, pp. 679–686, 2018.
- [42] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophages activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, 2009.
- [43] A. J. Petty and Y. Yang, "Tumor-associated macrophages : implications in cancer immunotherapy," *Immunotherapy*, vol. 9, pp. 289–302, 2017.
- [44] B. Nandi, M. Shapiro, M. K. Samur, C. Pai, N. Y. Frank, C. Yoon, R. H. Prabhala, N. C. Munshi, and J. S. Gold, "Stromal CCR6 drives tumor growth in a murine transplantable colon cancer through recruitment of tumor-promoting macrophages," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 8, pp. 1–11, 2016.
- [45] H. Wang, Q. Shao, J. Sun, C. Ma, W. Gao, Q. Wang, L. Zhao, and X. Qu, "Interactions between colon cancer cells and tumor-infiltrated macrophages depending on cancer cell-derived colony stimulating factor 1," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 4, pp. 1–12, 2016.

- [46] N. Linde, W. Lederle, S. Depner, N. van Rooijen, C. M. Gutschalk, and M. M. Mueller, "Vascular Endothelial Growth Factor Induced Skin Carcinogenesis depends on Recruitment and Alternative Activation of Macrophages.," *J. Pathol.*, vol. 1, pp. 17–28, 2012.
- [47] J. M. Mota, C. A. Leite, L. E. Souza, P. H. Melo, D. C. Nascimento, V. M. de-Deus-Wagatsuma, J. Temporal, F. Figueiredo, H. Noushmehr, J. C. Alves-Filho, F. Q. Cunha, and E. M. Rego, "Post-Sepsis State Induces Tumor-Associated Macrophage Accumulation through CXCR4/CXCL12 and Favors Tumor Progression in Mice," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 4, no. 4, pp. 312–322, 2016.
- [48] A. Sica, C. Porta, A. Amadori, and A. Pastò, "Tumor - associated myeloid cells as guiding forces of cancer cell stemness," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 66, no. 8, pp. 1025–1036, 2017.
- [49] R. Pollard and J. W., "Tumor-associated macrophages : from mechanisms to therapy," *Immunity.*, vol. 41, no. 1, pp. 49–61, 2015.
- [50] M. Gregory T. Wolf and M. Douglas B. Chepeha, "Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Prognosis in Oral Cavity Squamous Carcinoma: A Preliminary Study Gregory," *Oral Oncol.*, vol. 51, no. 1, pp. 90–95, 2015.
- [51] G. Karpathiou, F. Casteillo, J. Giroult, F. Forest, P. Fournel, A. Monaya, M. Froudarakis, J. M. Dumollard, J. M. Prades, and M. Peoc, "Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma : Immune cell subtypes , immunosuppressive pathways and clinicopathologic characteristics," *Oncotarget*, vol. 8, no. 12, pp. 19310–19322, 2017.
- [52] B. R. B. Pires, "NF-kappaB : Two Sides of the Same Coin," *Genes (Basel).*, vol. 9, no. 24, pp. 1–23, 2018.
- [53] H. Yu, D. Pardoll, R. Jove, and K. Comprehensive, "STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3," *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 11, pp. 798–809, 2009.
- [54] E. B. Haura, J. Turkson, and R. Jove, "Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer," *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 2, no. 6, pp. 315–324, 2005.
- [55] J. E. Darnell, M. Kerr, and G. R. Stark, "Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins," *Science (80-.)*, vol. 264, no. June, pp. 1415–1422, 1994.
- [56] E. Bournazou and J. Bromberg, "Targeting the tumor microenvironment JAK-STAT3 signaling," *Oncotarget*, no. June, pp. 1–8, 2014.
- [57] Y. Su, S. Banerjee, S. V. White, M. Kortylewski, M. Mac, and M. Mac, "STAT3 in Tumor-Associated Myeloid Cells: Multitasking to Disrupt Immunity," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 3, no. 19, p. 1803, 2018.
- [58] S. B. Mali, "Review of STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) in head and neck cancer," *Oral Oncol.*, vol. 51, no. 6, pp. 565–569, 2015.
- [59] J. Beebe, J.-Y. Liu, and J.-T. Zhang, "Two decades of research in discovery of anticancer drugs targeting STAT3, how close are we?," *Pharmacol. Ther.*, 2018.
- [60] H. Yu, H. Lee, A. Herrmann, R. Buettner, and R. Jove, "Revisiting STAT3 signalling in cancer : new and unexpected biological functions," *Nat. Publ. Gr.*, vol. 14, no. 11, pp. 736–746, 2014.

- [61] J. I. Song and J. R. Grandis, "STAT signaling in head and neck cancer," *Onco*, no. 19, pp. 2489–2495, 2000.
- [62] M. H. Choe, J. W. Min, H. B. Jeon, D. Cho, and J. S. Oh, "ERp57 modulates STAT3 activity in radioresistant laryngeal cancer cells and serves as a prognostic marker for laryngeal cancer," *Oncotarget*, vol. 6, no. 5, pp. 2654–2666, 2014.
- [63] B. G. J. Freeman, A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo, "Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation," *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 7, pp. 1027–1034, 2000.
- [64] S. Chikuma, "Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity," *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 21, no. 3, pp. 448–455, 2016.
- [65] Y. Ishida, Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo, "Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death," *EMBO J.*, vol. 11, no. 1, pp. 3887–3895, 1992.
- [66] S. E. Strome, H. Dong, H. Tamura, S. G. Voss, D. B. Flies, K. Tamada, D. Salomao, J. Cheville, F. Hirano, W. Lin, J. L. Kasperbauer, K. V. Ballman, and L. Chen, "B7-H1 Blockade Augments Adoptive T-Cell Immunotherapy for Squamous," *[CANCER Res.]*, no. 63, pp. 6501–6505, 2003.
- [67] M.-N. Theodoraki, S. Yerneni, T. K. Hoffmann, W. E. Gooding, and T. L. Whiteside, "Clinical significance of PD-L1+ exosomes in plasma of Head and Neck Cancer patients," *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 4, p. clincanres.2664.2017, 2017.
- [68] H. M. Romberg, Neil., "Gain-of-function STAT1 mutations are associated with PD-L1 overexpression and a defect in B-cell survival," *J Allergy Clin Immunol.*, vol. 131, no. 6, pp. 1691–1693, 2013.
- [69] P. C. Tumeh, C. L. Harview, J. H. Yearley, I. P. Shintaku, J. Emma, M. Taylor, L. Robert, B. Chmielowski, M. Spasic, G. Henry, A. N. West, M. Carmona, C. Kivork, E. Seja, A. Gutierrez, T. R. Grogan, C. Mateus, G. Tomasic, J. A. Glaspy, R. O. Emerson, H. Robins, R. H. Pierce, A. David, C. Robert, and A. Ribas, "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance," *Nature*, vol. 515, no. 7528, pp. 568–571, 2015.
- [70] J. D. Schoenfeld, E. Gjini, S. J. Rodig, R. B. Tishler, B. Rawal, P. J. Catalano, R. Uppaluri, R. I. Haddad, G. J. Hanna, N. G. Chau, G. Rabinowits, J. Lorch, V. Y. Jo, J. F. Krane, L. A. Goguen, D. J. Annino, S. Abdelrahman, M. Lipschitz, and D. N. Margalit, "Evaluating the PD-1 Axis and Immune Effector Cell Infiltration in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma," *Radiat. Oncol. Biol.*, no. 617, pp. 1–9, 2018.
- [71] R. L. Ferris, G. Blumenschein, J. Fayette, J. Guigay, A. D. Colevas, L. Licitra, K. J. Harrington, S. Kasper, E. E. Vokes, C. Even, F. Worden, N. F. Saba, L. C. I. Docampo, R. Haddad, T. Rordorf, N. Kiyota, M. Tahara, M. Lynch, V. Jayaprakash, L. Li, and M. L. Gillison, "Nivolumab vs investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 2-year long-term survival update of CheckMate 141 with analyses by tumor PD-L1 expression," *Oral Oncol.*, vol. 81, no. April, pp. 45–51, 2018.
- [72] P. Specenier, "Nivolumab in squamous cell carcinoma of the head and neck," *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. accepted m, 2018.
- [73] C. Tetta, E. Ghigo, L. Silengo, M. C. Deregibus, and G. Camussi, "Extracellular vesicles as

- an emerging mechanism of cell-to-cell communication," *Endocrine*, vol. 44, no. 1, pp. 11–19, 2013.
- [74] B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, and E. I. Buzás, "Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 16, pp. 2667–2688, 2011.
- [75] M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, "Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 255–289, 2014.
- [76] L. et al Trams, "Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 645, pp. 63–70, 1981.
- [77] R. M. Johnstone, M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide, "Vesicle Formation during Reticulocyte Maturation," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 1, pp. 9412–9420, 1987.
- [78] G. Raposo, "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles," *J. Exp. Med.*, vol. 183, no. 3, pp. 1161–1172, 1996.
- [79] Zitvogel, "Eradication of established murine tumors using a novel cell free vaccine," *Group*, vol. 4, pp. 623–6, 1998.
- [80] Y. Li, Q. Cheng, G. Hu, T. Deng, Q. Wang, J. Zhou, and X. Su, "Extracellular vesicles in mesenchymal stromal cells: A novel therapeutic strategy for stroke (review)," *Exp. Ther. Med.*, vol. 15, no. 5, pp. 4067–4079, 2018.
- [81] A. V. Vlassov, S. Magdaleno, R. Setterquist, and R. Conrad, "Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1820, no. 7, pp. 940–948, 2012.
- [82] J. D. Anderson, H. J. Johansson, C. S. Graham, M. Vesterlund, M. T. Pham, C. S. Bramlett, E. N. Montgomery, M. S. Mellema, R. L. Bardini, Z. Contreras, M. Hoon, G. Bauer, K. D. Fink, B. Fury, K. J. Hendrix, F. Chedin, S. El-Andaloussi, B. Hwang, M. S. Mulligan, J. Lehtiö, and J. A. Nolte, "Comprehensive proteomic analysis of mesenchymal stem cell exosomes reveals modulation of angiogenesis via nuclear factor-kappaB signaling," *Stem Cells*, vol. 34, no. 3, pp. 601–613, 2016.
- [83] S. Keerthikumar, D. Chisanga, D. Ariyaratne, H. Al Saffar, S. Anand, K. Zhao, M. Samuel, M. Pathan, M. Jois, and N. Chilamkurti, "ExoCarta : A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 4, pp. 688–692, 2016.
- [84] G. Raposo and W. Stoorvogel, "Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends," *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, 2013.
- [85] M. Yáñez-Mó, P. R. M. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borràs, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A. Cordeiro-Da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giebel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E. M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Line, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. M. Nolte-’t Hoen, T. A. Nyman, L. O’Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H. A. Del Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M. S. Ostendorf, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van Der Grein, M. Helena Vasconcelos, M. H. M. Wauben, and O. De Wever,

- “Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 2015, pp. 1–60, 2015.
- [86] J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, and C. Théry, “Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, no. 8, pp. E968–E977, 2016.
- [87] Ratajczak, “REVIEW Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication,” *Leukemia*, pp. 1487–1495, 2006.
- [88] H. Valadi, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Lipid Insights*, vol. 2 1, no. 6, pp. 27–40, 2008.
- [89] M. L. Squadrito, C. Baer, F. Burdet, C. Maderna, G. D. Gilfillan, R. Lyle, M. Ibberson, and M. De Palma, “Endogenous RNAs Modulate MicroRNA Sorting to Exosomes and Transfer to Acceptor Cells,” *Cell Rep.*, vol. 8, no. 5, pp. 1432–1446, 2014.
- [90] B. K. Thakur, H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J. M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado, and D. Lyden, “Double-stranded DNA in exosomes: A novel biomarker in cancer detection,” *Cell Res.*, vol. 24, no. 6, pp. 766–769, 2014.
- [91] T. Skotland, K. Sandvig, and A. Llorente, “Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward,” *Prog. Lipid Res.*, vol. 66, pp. 30–41, 2017.
- [92] G. D. W. Xu R., Simpson R. J., *A protocol for isolation and proteomic characterization of distinct extracellular vesicle subtypes by sequential centrifugal ultrafiltration. Methods in Molecular Biolog.* .
- [93] E. M. Mora, S. Álvarez-Cubela, and E. Oltra, “Biobanking of exosomes in the era of precision medicine: Are we there yet?,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [94] C. Williams, F. Royo, and O. Aizpurua-olaizola, “Glycosylation of extracellular vesicles : current knowledge , tools and clinical perspectives,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 7, no. 1, 2018.
- [95] S. N. Tamkovich, O. S. Tutanov, and P. P. Laktionov, “Exosomes: Generation, structure, transport, biological activity, and diagnostic application,” *Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, vol. 10, no. 3, pp. 163–173, 2016.
- [96] S. Koussevitzky, A. Nott, T. C. Mockler, F. Hong, G. Sachetto-Martins, M. Surpin, J. Lim, R. Mittler, and J. Chory, “SI_Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes Katarina,” *Science (80-.)*, vol. 316, no. 5825, pp. 715–719, 2007.
- [97] R. Ghossoub, F. Lembo, A. Rubio, C. B. Gaillard, J. Bouchet, N. Vitale, J. Slavík, M. Machala, and P. Zimmermann, “Syntenin-ALIX exosome biogenesis and budding into multivesicular bodies are controlled by ARF6 and PLD2,” *Nat. Commun.*, vol. 5, 2014.
- [98] L. A. Yu X1, Harris SL, “The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein.” p. *Cancer Res.* May 1;66(9):4795-801, 2006.
- [99] G. Van Niel, I. Porto-Carreiro, S. Simoes, and G. Raposo, “Exosomes: A common pathway for a specialized function,” *J. Biochem.*, vol. 140, no. 1, pp. 13–21, 2006.
- [100] T. J. Melia, “Putting the clamps on membrane fusion: How complexin sets the stage for calcium-mediated exocytosis,” *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 11, pp. 2131–2139, 2007.

- [101] C. Cossetti, N. Iraci, T. R. Mercer, T. Leonardi, E. Alpi, D. Drago, C. Alfaro-Cervello, H. K. Saini, M. P. Davis, J. Schaeffer, B. Vega, M. Stefanini, C. J. Zhao, W. Muller, J. M. Garcia-Verdugo, S. Mathivanan, A. Bachi, A. J. Enright, J. S. Mattick, and S. Pluchino, "Extracellular vesicles from neural stem cells transfer IFN- γ via *lfng1* to activate Stat1 signaling in target cells," *Mol. Cell*, vol. 56, no. 2, pp. 193–204, 2014.
- [102] H. Costa Verdera, J. J. Gitz-Francois, R. M. Schiffelers, and P. Vader, "Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis," *J. Control. Release*, vol. 266, no. September, pp. 100–108, 2017.
- [103] K. J. Svensson, H. C. Christianson, A. Wittrup, E. Bourseau-Guilmain, E. Lindqvist, L. M. Svensson, M. Mörgelin, and M. Belting, "Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 24, pp. 17713–17724, 2013.
- [104] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, D. Raul, and F. Carter, "Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake," *J. Extracell. Vesicles*, vol. 1, no. 3, pp. 1–14, 2014.
- [105] K. C. French, M. A. Antonyak, and R. A. Cerione, "Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 67, pp. 48–55, 2017.
- [106] L. Rajendran, J. Bali, M. M. Barr, F. A. Court, E.-M. Kramer-Albers, F. Picou, G. Raposo, K. E. van der Vos, G. van Niel, J. Wang, and X. O. Breakefield, "Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System," *J. Neurosci.*, vol. 34, no. 46, pp. 15482–15489, 2014.
- [107] J. S. Schorey and S. Bhatnagar, "Exosome function: From tumor immunology to pathogen biology," *Traffic*, vol. 9, no. 6, pp. 871–881, 2008.
- [108] M. Gong, B. Yu, J. Wang, Y. Wang, M. Liu, C. Paul, R. W. Millard, D.-S. Xiao, M. Ashraf, and M. Xu, "Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis," *Oncotarget*, vol. 8, no. 28, pp. 45200–45212, 2017.
- [109] A. L. and E. Rodriguez-Boulan, "Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity," *Trends Cell Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 199–209, 2008.
- [110] J. K. Heath and M. Heyman, "Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice," *Gut*, no. 53, pp. 1690–1697, 2003.
- [111] A. Ahmad, N. N. Desai, M. Zahid, D. Rubert, N. Librelotto, M. Luisa, A. Bishayee, S. Mohammad, V. Curti, and M. Daglia, "Exosome biogenesis, bioactivities and functions as new delivery systems of natural compounds," *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 1, pp. 328–334, 2018.
- [112] L. Bonjoch, V. Casas, and D. Closa, "Involvement of exosomes in lung inflammation associated with experimental acute pancreatitis," *J. p*, no. 240, pp. 235–245, 2016.
- [113] D. Sun, X. Zhuang, S. Zhang, Z. Bin Deng, W. Grizzle, D. Miller, and H. G. Zhang, "Exosomes are endogenous nanoparticles that can deliver biological information between cells," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 3, pp. 342–347, 2013.
- [114] M. Szajnik, M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil, and T. L. Whiteside, "Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg)," *PLoS One*, vol. 5, no. 7, 2010.
- [115] R. Valenti, V. Huber, M. Iero, P. Filipazzi, G. Parmiani, and L. Rivoltini, "Tumor-released

- microvesicles as vehicles of immunosuppression," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 7, pp. 2912–2915, 2007.
- [116] T. L. Whiteside, "Exosomes carrying immunoinhibitory proteins and their role in cancer," *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 189, no. 3, pp. 259–267, 2017.
- [117] D. M. Pegtel, M. D. B. van de Garde, and J. M. Middeldorp, "Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, vol. 1809, no. 11–12, pp. 715–721, 2011.
- [118] H. Izumi, M. Tsuda, Y. Sato, N. Kosaka, T. Ochiya, and H. Iwamoto, "Bovine milk exosomes contain microRNA and mRNA and are taken up by human macrophages," *J. Dairy Sci.*, vol. 98, no. 5, pp. 2920–2933, 2015.
- [119] N. Kumeda, Y. Ogawa, Y. Akimoto, H. Kawakami, M. Tsujimoto, and R. Yanoshita, "Characterization of Membrane Integrity and Morphological Stability of Human Salivary Exosomes," *Pharm. Soc. Japan*, vol. 40, no. 8, pp. 1183–1191, 2017.
- [120] L. Barile and G. Vassalli, "Pharmacology & Therapeutics Exosomes : Therapy delivery tools and biomarkers of diseases," *Pharmacol. Ther.*, vol. 174, pp. 63–78, 2017.
- [121] S. K. Mueller, A. L. Nocera, and B. S. Bleier, "Exosome function in aerodigestive mucosa," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 14, no. 2, pp. 269–277, 2018.
- [122] S. Halvaei, S. Daryani, Z. Eslami-s, T. Samadi, N. Jafarbeik-iravani, T. O. Bakhshayesh, K. Majidzadeh-a, and R. Esmaeili, "Exosomes in Cancer Liquid Biopsy : A Focus on Breast Cancer," *Mol. Ther. Nucleic Acid*, vol. 10, no. March, pp. 131–141, 2018.
- [123] A. Panagiotara, A. Markou, E. S. Lianidou, G. P. Patrinos, and T. Katsila, "Exosomes: A Cancer Theranostics Road Map," *Public Health Genomics*, vol. 20, no. 2, pp. 116–125, 2017.
- [124] T. L. Whiteside, "Exosome and mesenchymal stem cell cross-talk in the tumor microenvironment," *Semin. Immunol.*, vol. 35, no. September 2017, pp. 69–79, 2018.
- [125] X. Xiang, A. Poliakov, C. Liu, Y. Liu, Z. Deng, Z. Cheng, S. V Shah, G. Wang, L. Zhang, E. William, J. Mobley, and H. Zhang, "Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes," *Int J Cancer* ., vol. 124, no. 11, pp. 2621–2633, 2010.
- [126] S. Danilin, A. R. Merkel, J. R. Johnson, R. W. Johnson, J. R. Edwards, and J. A. Sterling, "Myeloid-derived suppressor cells expand during breast cancer progression and promote tumor-induced bone destruction," *Oncoimmunology*, vol. 1, no. 9, pp. 1484–1494, 2012.
- [127] M. Logozzi, A. De Milito, L. Lugini, M. Borghi, L. Calabro, M. Perdicchio, M. L. Marino, C. Federici, E. Iessi, D. Brambilla, G. Venturi, F. Lozupone, M. Santinami, V. Huber, M. Maio, and S. Fais, "High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin- 1 in Plasma of Melanoma Patients," *PLoS*, vol. 4, no. 4, 2009.
- [128] P. Reclusa, S. Taverna, M. Pucci, E. Durendez, S. Calabuig, P. Manca, M. J. Serrano, L. Sober, P. Pauwels, A. Russo, and C. Rolfo, "Exosomes as diagnostic and predictive biomarkers in lung cancer," *J. Thorac. Disease*, vol. 9, no. 3, pp. 1373–1382, 2017.
- [129] A. Lopez, K. Harada, D. M. Kaya, X. Dong, J. A. Ajani, A. Lopez, K. Harada, D. Mizrak, X. Dong, S. Song, and J. A. Ajani, "Expert Review of Anticancer Therapy Liquid biopsies in gastrointestinal malignancies : when is the big day ?," *Expert Rev. Anticancer Ther.*, vol. 00, no. 00, pp. 1–20, 2018.

- [130] M. Rodríguez, C. Bajo-santos, N. P. Hessvik, S. Lorenz, B. Fromm, V. Berge, K. Sandvig, A. Lin, and A. Llorente, "Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes," *Mol. Cancer*, vol. 16, no. 156, pp. 4–9, 2017.
- [131] N. Takeshita, I. Hoshino, M. Mori, Y. Akutsu, N. Hanari, Y. Yoneyama, N. Ikeda, Y. Isozaki, and T. Maruyama, "Serum microRNA expression profile : miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 3, pp. 644–652, 2013.
- [132] M. H. Rashed, E. Bayraktar, G. K. Helal, M. F. Abd-Ellah, P. Amero, A. Chavez-Reyes, and C. Rodriguez-Aguayo, "Exosomes: From garbage bins to promising therapeutic targets," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 3, 2017.
- [133] S. Bortoluzzi, F. Lovisa, E. Gaffo, and L. Mussolin, "Small RNAs in Circulating Exosomes of Cancer Patients: A Minireview," *High-Throughput*, vol. 6, no. 4, p. 13, 2017.
- [134] B. Escudier, T. Dorval, N. Chaput, F. André, M. P. Caby, S. Novault, C. Flament, C. Leboulleire, C. Borg, S. Amigorena, C. Boccaccio, C. Bonnerot, O. Dhellin, M. Movassagh, S. Piperno, C. Robert, V. Serra, N. Valente, J. B. Le Pecq, A. Spatz, O. Lantz, T. Tursz, E. Angevin, and L. Zitvogel, "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: Results of the first phase 1 clinical trial," *J. Transl. Med.*, vol. 3, pp. 1–13, 2005.
- [135] et al Vidyarthi A, "TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha\beta$ Signaling and Restricts Tumor Progression," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. July, pp. 1–14, 2018.
- [136] E. F. Redente, L. D. Dwyer-Nield, D. T. Merrick, K. Raina, R. Agarwal, W. Pao, P. L. Rice, K. R. Shroyer, and A. M. Malkinson, "Tumor progression stage and anatomical site regulate tumor-associated macrophage and bone marrow-derived monocyte polarization," *Am. J. Pathol.*, vol. 176, no. 6, pp. 2972–2985, 2010.
- [137] M. Jarosz-Biej, N. Kamińska, S. Matuszczak, T. Cichoń, J. Pamuła-Piłat, J. Czapla, R. Smolarczyk, D. Skwarzyńska, K. Kulik, and S. Szala, "M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma," *PLoS One*, vol. 13, no. 1, pp. 1–26, 2018.
- [138] B. Huang, R. Ma, T. Ji, D. Chen, W. Dong, H. Zhang, X. Yin, J. Ma, X. Liang, Y. Zhang, G. Shen, and X. Qin, "Tumor cell-derived microparticles polarize M2 tumor-associated macrophages for tumor progression," *Oncoimmunology*, vol. 5, no. 4, pp. 1–12, 2016.
- [139] O. Hashimoto, M. Yoshida, Y. ichiro Koma, T. Yanai, D. Hasegawa, Y. Kosaka, N. Nishimura, and H. Yokozaki, "Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development," *J. Pathol.*, vol. 240, no. 2, pp. 211–223, 2016.
- [140] S. Ludwig, T. Floros, M. Theodoraki, C. Hong, E. K. Jackson, S. Lang, and T. L. Whiteside, "Suppression of Lymphocyte Functions by Plasma Exosomes Correlates with Disease Activity in Patients with Head and Neck Cancer," *Clinical cancer Res.*, vol. 23, no. 16, pp. 4843–4855, 2017.
- [141] T. L. Whiteside, "The emerging role of plasma exosomes in diagnosis , prognosis and therapies of patients with cancer," *Contemp Oncol (Pozn. Mar.)*, vol. 22, no. 1A, pp. 38–40, 2018.
- [142] N. M. Mahaweni, M. E. Kaijen-Lambers, J. Dekkers, J. G. Aerts, and J. P. Hegmans, "Tumour-

- derived exosomes as antigen delivery carriers in dendritic cell-based immunotherapy for malignant mesothelioma,” *J Extracell Vesicles*, vol. 2, p. 22492, 2013.
- [143] S. Gabrielsson and A. Scheynius, “Exosomes in immunity and cancer-Friends or foes?,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–2, 2014.
- [144] G. Chen, A. C. Huang, W. Zhang, G. Zhang, M. Wu, W. Xu, Z. Yu, J. Yang, B. Wang, H. Sun, H. Xia, Q. Man, W. Zhong, L. F. Antelo, B. Wu, X. Xiong, X. Liu, L. Guan, T. Li, S. Liu, R. Yang, Y. Lu, L. Dong, S. Mcgettigan, R. Somasundaram, R. Radhakrishnan, G. Mills, Y. Lu, J. Kim, Y. H. Chen, H. Dong, Y. Zhao, G. C. Karakousis, T. C. Mitchell, L. M. Schuchter, M. Herlyn, E. J. Wherry, X. Xu, and W. Guo, “Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response,” *Nature*, 2018.
- [145] A. Ribas and P. C. Tumeh, “The future of cancer therapy: Selecting patients who respond to PD-1/L1 blockade,” *Clin Cancer Res*, vol. 20, no. 19, pp. 4982–4984, 2015.
- [146] M. Kortylewski, H. Xin, M. Kujawski, H. Lee, Y. Liu, C. Drake, D. Pardoll, and H. Yu, “Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment,” *Cancer Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 114–123, 2009.
- [147] A. Kaptein and M. Saunders, “Dominant Negative Stat3 Mutant Jak-STAT Signal Transduction *,” *Biochemistry*, pp. 5961–5964, 1996.
- [148] G. Niu, R. Heller, R. Catlett-falcone, B. Melanoma, D. Coppola, M. Jaroszeski, W. Dalton, R. Jove, and H. Yu, “Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 Suppresses Growth of the Murine Melanoma B16 Tumor in Vivo Advances in Brief Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 Suppresses Growth of the Murine,” *Cancer Res.*, vol. 59, no. 20, pp. 5059–5063, 1999.
- [149] W. S. Ham S, Lima LG, Chai EPZ, Muller A, Lobb RJ, Krumeich S and W. A. and M. A, “Breast Cancer-Derived Exosomes Alter Macrophage Polarization via,” *Front. Immunol.*, vol. 9, no. 871, pp. 1–10, 2018.
- [150] Y. Fan, R. Mao, and J. Yang, “NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer,” *Protein Cell*, vol. 4, no. 3, pp. 176–185, 2013.
- [151] J. Schupp, F. K. Krebs, N. Zimmer, E. Trzeciak, D. Schuppan, and A. Tuettenberg, “Targeting myeloid cells in the tumor sustaining microenvironment,” *Cell. Immunol.*, no. October, pp. 0–1, 2017.
- [152] K. Kessenbrock, V. Plaks, and Z. Werb, “Review Matrix Metalloproteinases : Regulators of the Tumor Microenvironment,” *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 52–67, 2010.
- [153] M. J. Smyth, S. F. Ngiow, A. Ribas, and M. W. L. Teng, “Combination cancer immunotherapies,” *Nat. Publ. Gr.*, pp. 1–16, 2015.
- [154] C. Belgiovine, E. Bello, M. Liguori, I. Craparotta, L. Mannarino, L. Paracchini, L. Beltrame, S. Marchini, C. M. Galmarini, A. Mantovani, R. Frapolli, P. Allavena, and M. D’Incalci, “Lurbinectedin reduces tumour-associated macrophages and the inflammatory tumour microenvironment in preclinical models,” *Br. J. Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 628–638, 2017.
- [155] A. S. Azmi, B. Bao, F. H. Sarkar, and F. H. S. Asfar S. Azmi1, Bin Bao, “Exosomes in Cancer Development, Metastasis and Drug Resistance: A Comprehensive Review,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 32, no. 0, pp. 1–33, 2014.

- [156] T. W. Sadler, "Embriología médica de Langman (9ª ed), Editorial Panamericana 2004
Carlson, Bruce A. Embriología humana y biología del desarrollo (5a. ed.), Elsevier Health Sciences Spain - T, 2014. ProQuest Ebook Central," Apr. 2004.
- [157] F. H. Netter, "Atlas De Anatomia Humana." p. Quinta Edición, Elsevier Edpaña S. L, 2011.
- [158] M. Hesketh, K. B. Sahin, Z. E. West, and R. Z. Murray, "Macrophage phenotypes regulate scar formation and chronic wound healing," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 7, pp. 1–10, 2017.
- [159] K. Anton, D. Banerjee, and J. Glod, "Macrophage-Associated Mesenchymal Stem Cells Assume an Activated , Migratory , Pro-Inflammatory Phenotype with Increased IL-6 and CXCL10 Secretion," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, pp. 1–10, 2012.
- [160] H. Jain, N. Dhingra, T. Narsinghani, R. Sharma, T. Campus, and T. Campus, "Insights into the mechanism of natural terpenoids as NF- κ B inhibitors : an overview on their anticancer potential," *Expert Oncol*, vol. 38, no. 3, pp. 158–168, 2016.
- [161] R. Kannappan, V. R. Yadav, and B. B. Aggarwal, "Tocotrienol but Not Tocopherol Blocks STAT3 Cell Signaling Pathway through Induction of Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 and Sensitizes Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents *," vol. 285, no. 43, pp. 33520–33528, 2010.
- [162] A. M. Janas, K. Sapo, T. Janas, M. H. B. Stowell, and T. Janas, "Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1858, pp. 1139–1151, 2016.
- [163] H. Peinado, "Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells," *Nat. Med.*, vol. 18, no. 6, pp. 883–891, 2013.

