



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Evaluación del efecto adyuvante de la  
Lipopéptido-fosfoglicana de *Entamoeba histolytica* en la inducción de  
inmunidad protectora en un modelo de melanoma**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Biól. Benjamín Cocom Chan**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Armando Isibasi Araujo**

Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, IMSS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dra. María Antonieta Chávez González**

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, IMSS

**Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

MÉXICO, D. F. enero de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## HOJA DE DATOS

**ALUMNO:**

Biól. Benjamín Cocom Chan

**NÚMERO DE CUENTA:**

407011357

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dr. Armando Isibasi Araujo

**COMITÉ TUTORAL:**

Dr. María Antonieta Chávez González  
Dr. Julio Cesar Carrero Sánchez

**Dedicado a mi familia y a mi pueblo.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, su amable personal y todos mis profesores. Tuve la oportunidad de formarme de diversas formas en esta etapa tan importante de mi carrera.

A la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Centro Médico Nacional Siglo XXI por ofrecerme un espacio de aprendizaje sin igual. En especial al Dr. Armando Isibasi Araujo y la Dra. Laura Bonifaz Alfonzo por guiarme y apoyarme a lo largo de este trabajo. Me llevaré sus enseñanzas el resto de mi vida.

A los investigadores que se involucraron y me ayudaron en momentos importantes como el Dr. Constantino III López Macías y el Dr. Rodolfo Pastelín Palacios.

A mis compañeros y amigos de la UIMIQ, con quienes aprendí, de quienes aprendí y con los que crecí estos años.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo como becario durante la realización de este posgrado.

Al personal del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM-Hospital General de México. Sin su aportación y su esfuerzo este trabajo no sería posible.



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud



"2013, Año de la Lealtad Institucional y Centenario del Ejército Mexicano"

**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3601  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI,  
D.F. SUR

FECHA **05/07/2013**

**DR. ARMANDO ISIBASI ARAUJO**

**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**Efecto adyuvante de la Lipopéptidofosfoglicana de Entamoeba histolytica en la inducción de inmunidad protectora en un modelo de melanoma**

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2013-3601-179

ATENTAMENTE

**DR. CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA**

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3601

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

## ÍNDICE

<b>Parte</b>	<b>Tema</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	RESUMEN	7
<b>2</b>	LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS	8
<b>3</b>	INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	10
<b>3.1</b>	EL CÁNCER	10
<b>3.1.1</b>	<i>Relevancia actual del cáncer</i>	12
<b>3.2</b>	EL DESARROLLO DEL CÁNCER Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE	12
<b>3.2.1</b>	<i>El sistema inmune como blanco terapéutico contra el cáncer</i>	13
<b>3.2.2</b>	<i>El uso de inmunoterapias para el tratamiento del melanoma</i>	14
<b>3.3</b>	LA MADURACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS COMO PASO IMPORTANTE PARA LA INDUCCIÓN DE UNA INMUNIDAD ANTITUMORAL	15
<b>3.3.1</b>	<i>Uso de antígenos microbianos para la inducción de una respuesta inmune antitumoral</i>	19
<b>3.3.2</b>	<i>Estimulación de Células T Natural Killer como inductor de maduración de Células Presentadoras de Antígenos</i>	19
<b>3.4</b>	LA LIPOPÉPTIDO-FOSFOGLICANA DE <i>Entamoeba histolytica</i> COMO MOLÉCULA INMUNOESTIMULADORA	24
<b>4</b>	JUSTIFICACIÓN	28
<b>5</b>	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
<b>6</b>	HIPÓTESIS	29
<b>7</b>	OBJETIVO	30
<b>8</b>	MATERIALES Y MÉTODOS	31
<b>9</b>	DISEÑO EXPERIMENTAL	34
<b>10</b>	RESULTADOS	37
<b>10.1</b>	Obtención y caracterización de la Lipopéptido-fosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>	37
<b>10.2</b>	Las células B16-MO4 son capaces de inducir un tumor sólido en los ratones hospederos	38
<b>10.3</b>	El uso de los la LPPG como adyuvante en un modelo de vacuna profiláctica no provocó algún efecto en el crecimiento de los tumores	39
<b>10.4</b>	El tratamiento intratumoral con LPPG no produjo algún efecto en el crecimiento de los tumores	47
<b>10.5</b>	El uso como adyuvante de la LPPG en un modelo de vacuna terapéutica para un antígeno tumor-específico produjo un menor crecimiento tumoral	51
<b>11</b>	DISCUSIÓN	52
<b>12</b>	CONCLUSIONES	53
<b>13</b>	PERSPECTIVAS	54
<b>14</b>	BIBLIOGRAFÍA	55

## 1. RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial caracterizada por la proliferación celular descontrolada que puede desencadenar la invasión de diversos tejidos y falla orgánica. Una de las características más importantes para el desarrollo del cáncer es la evasión del sistema inmune, el cual resulta incapaz de reconocer y eliminar las células malignas. Por tal razón, uno de los objetivos fundamentales de la terapia inmunológica contra el cáncer es la caracterización de moléculas con propiedades inmunogénicas que ayuden en la activación de células del sistema inmune; y también que eviten o reviertan la tolerancia inmunológica hacia las células transformadas. Una estrategia implementada en la formulación de vacunas profilácticas y terapéuticas involucra usar antígenos derivados de microorganismos con capacidad para estimular Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), o la vía de presentación de glicolípidos por CD1d. Recientemente, su uso en la formulación de tratamientos clínicos y experimentales contra el cáncer han mostrado ser una estrategia importante a considerar. Estudios previos reportaron que la molécula de membrana Lipopéptido-fosfoglicana de *Entamoeba histolytica* (EhLPPG) puede estimular tanto Receptores Tipo Toll (TLRs) como la presentación antigénica por la vía CD1d, sugiriendo su uso potencial como adyuvante. En este trabajo se evaluó la capacidad adyuvante de la EhLPPG hacia un antígeno tumor-específico en un modelo de melanoma murino. En un modelo de vacunación profiláctica, el uso de la EhLPPG como adyuvante no proporcionó protección contra el crecimiento tumoral cuando se comparó con adyuvantes modelo. Sin embargo, su uso como adyuvante en un modelo de vacunación terapéutica ayudó a retardar el crecimiento de los tumores, sugiriendo una activación inmunológica de tipo aguda en vez de una protección de memoria. Queda por resolver en estudios futuros cuáles son los mecanismos específicos de actividad adyuvante de la EhLPPG en este modelo de melanoma murino.

## ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease characterized by uncontrolled cell proliferation that can trigger tissue invasion and organic failure. A hallmark of cancer disease progression is the evasion of the immune system, which results incapable of recognizing and eliminating the malignant cells. Therefore, one of the primary goals of immunological therapies against cancer is the characterization of molecules with immunogenic properties that can help in the activation of the immune cells; and also that could avoid or revert the immune tolerance towards transformed cells. A strategy used in prophylactic and therapeutic vaccine formulation involves the use of microbial antigens capable of stimulating Pattern Recognition Receptors (PRRs) or the glycolipid antigen presentation pathway through CD1d. Recently, their use in clinical and experimental anti-cancer treatment has proved to be an important strategy to be considered. Previous reports showed that the membrane molecule Lipopeptide-phosphoglycan from *Entamoeba histolytica* (EhLPPG) can both stimulate Toll-like Receptors (TLRs) and the CD1d antigen presentation pathway, suggesting an adjuvant potential. In this work we evaluated the adjuvant capacity of EhLPPG towards a tumor-specific antigen in a melanoma mice model. The use of EhLPPG as an adjuvant in a prophylactic vaccine model showed no protection against tumor growth when compared with model adjuvants. Nonetheless, its use as an adjuvant in a therapeutic vaccine model helped to retard the tumor growth, suggesting an acute or short-term immune response instead of a memory protection. The elucidation of the specific mechanisms for the adjuvant activity of the EhLPPG in this murine melanoma model remains for future studies.



## 2. LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>ACF</b>	Adyuvante Completo de Freund
<b>B16</b>	Línea celular de melanoma con fondo C57BL/6
<b>B16-MO4</b>	Línea celular B16 que expresa ovoalbúmina
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>CCR7</b>	Receptor de Quimiocinas C-C tipo 7
<b>CD</b>	Clúster de Diferenciación
<b>CD1d</b>	Clúster de Diferenciación tipo 1d
<b>CPA</b>	Célula Presentadora de Antígenos
<b>CTLA-4</b>	Antígeno 4 de Linfocitos T Citotóxicos
<b>DAMP</b>	Patrón Molecular Asociado a Daño
<b>DC</b>	Célula Dendrítica
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EhLPPG</b>	Lipopéptido-fosfoglicana de <i>Entamoeba histolytica</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
<b>GIPL</b>	Glicosilinositol-fosfolípido
<b>gp-100</b>	Glicoproteína-100
<b>GPI</b>	Glicosil-fosfatidilinositol
<b>HMGB1</b>	Proteína del Grupo de Alta Movilidad B1
<b>HSP70</b>	Proteína de Choque Térmico 70
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Interferón- $\alpha$
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón- $\gamma$
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LAMP-1</b>	Proteína de Membrana Asociada a Lisosoma-1
<b>LPPG</b>	Lipopéptido-fosfoglicana
<b>LPS</b>	Lipo-Polisacárido
<b>MAGE-3</b>	Antígeno 3 Asociado a Melanoma
<b>MAMP</b>	Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos
<b>Melan-A</b>	Antígeno A de Melanocitos
<b>MHC</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad
<b>MPLA</b>	Monofosforil Lípido A
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor Nuclear- $\kappa$ B
<b>NKT</b>	Célula T Natural Killer
<b>NLR</b>	Receptor tipo NOD
<b>OVA</b>	Ovoalbúmina
<b>PBMCs</b>	Células Mononucleares de Sangre Periférica
<b>PBS</b>	Solución de Buffer de Fosfatos
<b>PD-1</b>	Receptor de Muerte Programada 1
<b>PDL-1</b>	Ligando del Receptor de Muerte Programada 1
<b>poli I:C</b>	Ácido Pocitídílico-Poliinosina

<b>PRR</b>	Receptor de Reconocimiento de Patrones
<b>RLR</b>	Receptor Tipo RIG
<b>S100-A9</b>	Proteína A9 de Unión a Calcio S100
<b>T CD4+</b>	Célula T CD4+
<b>T CD8+</b>	Célula T Citolóxica CD8+
<b>TCR</b>	Receptor de Células T
<b>Th</b>	Célula T Cooperadora CD4+
<b>TLR</b>	Receptor Tipo Toll
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>Trp</b>	Proteína Relacionada a la Tirosinasa
<b><math>\alpha</math>GalCer</b>	$\alpha$ -Galactosil-Ceramida

# 3 INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

## 3.1 EL CÁNCER

Durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, intrincados sistemas de control regulan el balance entre la muerte y proliferación celular en respuesta a diversas señales. El cáncer ocurre cuando estos mecanismos que mantienen el balance de crecimiento celular y tisular se desregulan. De hecho, el cáncer puede ser considerado como una enfermedad que consiste en el malfuncionamiento de varios subsistemas celulares incapaces de mantener su capacidad de coordinación, lo que causa una división celular excesiva (Lodish et al., 2013; Wang, 2010). El cáncer se entiende como una enfermedad compleja e incluso algunos autores se refieren al fenómeno como el sistema biológico de mayor complejidad para estudiar (Pepper et al., 2014).

Mundialmente mueren de cáncer alrededor de 100 y 350 personas por cada 100 000 habitantes. Durante las últimas décadas, a pesar de que se ha observado un gran avance en la identificación de factores que contribuyen a su aparición, esto no siempre ha sido fácil de trasladar al desarrollo de tratamientos efectivos para combatir la enfermedad. En parte esto se debe a los aspectos que se desconocen suelen repercutir fuertemente a la hora de probar tratamientos que a primera vista parecen prometedores (Tarabichi et al., 2013).

Por otro lado, la amplia investigación acerca del cáncer nos ha permitido enlistar los rasgos más característicos que pueden tener en común las distintas variedades observadas de la enfermedad. Hanahan y Weinberg, han propuesto un marco conceptual sobre las características más representativas del cáncer, independientemente de su origen genético o celular (figura 1):

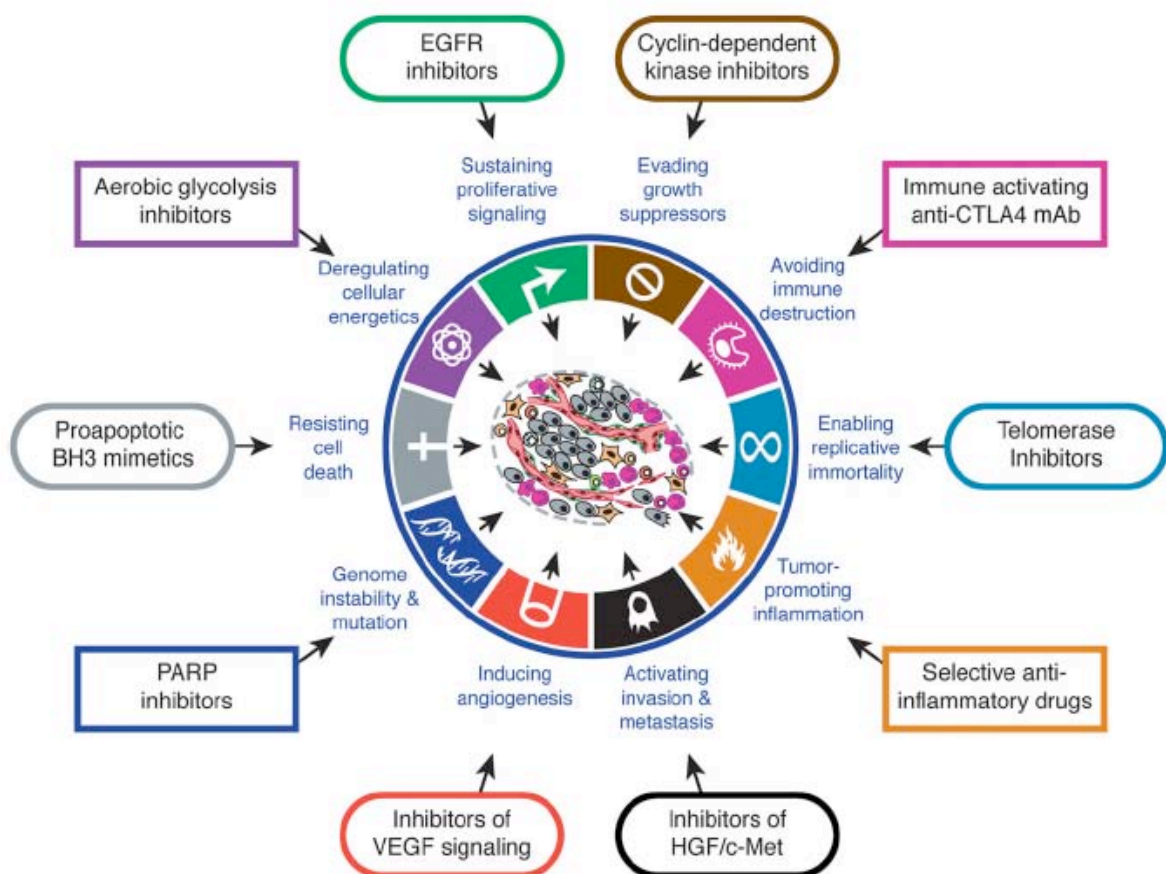
- Mantenimiento de señales de proliferación.
- Evasión de los supresores de crecimiento.
- Evasión del sistema inmune.
- Capacidad de división ilimitada.
- Inflamación asociada y promotora del tumor.
- Invasividad y metástasis.
- Inducción de angiogénesis.
- Resistencia a señales de muerte celular.
- Mutaciones e inestabilidad genómica.
- Reprogramación del metabolismo energético.

Las marcas distintivas del cáncer son capacidades que le permiten a las células cancerígenas sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas funciones pueden ser adquiridas por las células cancerígenas a través de diversos mecanismos y en diferentes momentos,

lo cual permite el inicio y/o mantenimiento de la enfermedad (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

Estas marcas características están interrelacionadas, lo cual le provee un estado de robustez al cáncer. Aunque actualmente es muy difícil de atacar todos los posibles blancos terapéuticos al mismo tiempo, es importante identificar las estrategias más adecuadas para poder controlar el desarrollo de la enfermedad.

El sistema inmune en esta enfermedad ha sido reevaluado recientemente como un jugador importante en distintas vertientes. Actualmente se reconoce que las células cancerígenas tienen la capacidad de evitar su eliminación por parte del sistema inmune, y que dicho fenómeno es el resultado de un proceso denominado inmunoedición (Vesely et al., 2011). La vacunación e inmunomodulación son blancos terapéuticos importantes a tomar en cuenta, dado que por sí mismo el sistema inmune estaría implicado en la aparición de otras de las distintas marcas distintivas del cáncer.



**Figura 1. Las marcas características del cáncer y sus posibles blancos terapéuticos.** La evasión del sistema inmune ha sido considerada una característica fundamental para el desarrollo del cáncer, por lo que actualmente es un campo de investigación activo para el desarrollo de tratamientos. Tomado de Hanahan and Weinberg, 2011.

### **3.1.1 Relevancia actual del cáncer**

En general, el avance y la profundidad del conocimiento sobre el cáncer ha sido significativo. Sin embargo, el desarrollo de tratamientos efectivos para combatir la enfermedad no ha sido equiparable. Por ejemplo, en EE. UU., a pesar de la declaración de la “guerra contra el cáncer” en 1971, su incidencia y mortalidad han disminuido menos de lo inicialmente esperado. Incluso en los últimos cinco años, la incidencia de cáncer en ese país declinó menos del 1%, y la mortalidad disminuyó en menos del 2% (Pepper et al., 2014). Este contexto refleja la importancia de buscar tratamientos complementarios o innovadores.

El presente trabajo está basado en un modelo experimental de melanoma. El melanoma maligno es el tumor más letal de los tumores de piel tanto por su gran capacidad de producir metástasis como por su quimiorresistencia. Esta neoplasia se origina en los melanocitos que derivan de la cresta neural. En estadios tempranos el tratamiento es quirúrgico, pero en estadios tardíos rara vez es curable con tratamiento estándar (quimio y radioterapia). Existen reportes de que las respuestas al tratamiento por quimioterapia difícilmente favorecen a más de 20% de los pacientes. El único tratamiento efectivo es la resección quirúrgica del tumor primario antes de que logre una profundidad mayor de 1 mm en el índice de Breslow (Gonzalez, 2011).

La Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de Cancerología reporta que en México, aún cuando carecemos de estadísticas de incidencia, esta neoplasia ha aumentado alrededor de un 500% en los últimos años. Es de esperarse que estas tendencias continúen hasta el año 2020, lo que ocasionará que este tipo de cáncer sea cada vez más cotidiano (Gonzalez, 2011). Ante la falta de efectividad de la terapia convencional para el tratamiento del melanoma (radio y quimioterapia), actualmente la terapia inmunológica ha resultado una alternativa con resultados prometedores en la investigación clínica.

### **3.2 EL DESARROLLO DEL CÁNCER Y SU RELACIÓN CON EL SISTEMA INMUNE**

Comparado a otras áreas donde la investigación médica ha tenido éxitos importantes al tratar enfermedades de solamente un agente causal identificado, el cáncer presenta retos fundamentalmente distintos. En parte esto se debe a que surge a partir de los tejidos propios, lo cual se complica cuando se aborda la enfermedad desde la perspectiva de la inmunología (Pepper et al., 2014).

La percepción actual de la carcinogénesis, obtenida de estudios clínicos y modelos animales, apunta a una relación compleja entre el sistema inmune y el desarrollo de tumores (de Visser et al., 2006). El primero es capaz de identificar y destruir a las células cancerosas incipientes en un proceso llamado en su momento inmunovigilancia, el cual actúa como una importante defensa activa antes del desarrollo de una malignidad (Vesely et al., 2011). De acuerdo a esta lógica, la aparición de tumores sólidos es resultado de la proliferación de células que han logrado de alguna manera evadir su detección por parte

del sistema inmune o han limitado su grado de eliminación (Hanahan and Weinberg, 2011).

El modelo actual de interacción del sistema inmune y las células cancerígenas se le denomina inmunoedición (Vesely et al., 2011), el cual se refiere a un proceso dinámico y a la vez complejo que comprende tres fases:

- la primera se refiere a una visión moderna de la inmunovigilancia, en la cual los mecanismos moleculares y celulares tanto de la inmunidad innata como adaptativa trabajan en conjunto para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruirlo antes que las manifestaciones clínicas sean aparentes;
- para la segunda etapa, algunas células cancerígenas que no son eliminadas entran a un estado de equilibrio, donde el sistema inmune controla el crecimiento neto del tumor;
- finalmente, como resultado de la inmunoedición, son eliminadas las clonas cancerígenas inmunogénicas. A nivel del hospedero, debido a factores que deriven en una inmunosupresión, ya sea por otras enfermedades, senescencia o tratamientos farmacológicos, permiten el crecimiento de células cancerígenas, desarrollándose así la enfermedad y sus consecuentes patologías.

### **3.2.1 El sistema inmune como blanco terapéutico contra el cáncer**

A finales del siglo XIX, el Dr. William Coley (EE.UU.) observó que ciertos pacientes que recibían cirugía para la remoción de sarcoma y que además contraían infecciones de *Streptococcus pyogenes*, presentaban fiebres agudas. Junto con estas infecciones, los pacientes eran capaces de inducir una regresión de los tumores sin dejar rastro aparente. Posteriormente esto dio lugar a que Coley formulara y aplicara intra-tumoralmente lo que se conoció como la “toxina de Coley”, cuya eficacia se ha propuesto entre el 30-80% (difícilmente superada por los tratamientos modernos). No obstante, debido a sus efectos secundarios y una denominada “falta de rigor científico” en su desarrollo, actualmente el tratamiento no se prescribe (Cann et al., 2003; Mellman et al., 2011). Este representa el antecedente moderno de la inmunoterapia para el cáncer.

La observación pionera de William Coley sobre el efecto de las inyecciones intra-tumorales repetidas de bacterias Gram<sup>+</sup> y Gram<sup>-</sup> inactivadas por calor, ha atraído nuevamente el interés de la comunidad científica. Actualmente sabemos que el material genético y las moléculas de superficie de las bacterias dan lugar a la activación de diferentes receptores de la inmunidad innata, como los Receptores Tipo-Toll (TLRs). Esto provoca la activación de diversos tipos celulares, así como la producción de citocinas y otros mediadores (Hennessy et al., 2010).

En años recientes se han desarrollado e implementado nuevas inmunoterapias que, en conjunto con los tratamientos convencionales, servirían para combatir diversos tipos de cáncer, incluyendo el melanoma (Mellman et al., 2011). Un objetivo primordial en la inmunoterapia es la inducción de una respuesta inmune celular que involucre la activación de linfocitos T citotóxicos (T CD8+) y linfocitos T cooperadores (Th) de tipo Th1 (Vesely et al., 2011). No obstante, en años recientes se ha observado que otros tipos de células cooperadoras como las Th17 y Th9 también desempeñan un papel importante para el control de la enfermedad (Martin-Orozco et al., 2009; Purwar et al., 2012).

### **3.2.2 El uso de inmunoterapias para el tratamiento del melanoma**

El melanoma es un tipo de cáncer notable por su rápida progresión, metástasis, quimioresistencia y mal pronóstico (menos del 20% de los pacientes viven más de 5 años). Estas características convierten al melanoma en un blanco atractivo de terapias dirigidas al sistema inmune, las cuales se presentan como una mejor opción y donde diversos ensayos clínicos han evaluado la capacidad de aumentar tanto el rechazo a los tumores como la supervivencia de los pacientes (Rotte et al., 2015; Tuong et al., 2012).

Entre las inmunoterapias evaluadas para el tratamiento del melanoma destacan las siguientes (Eggermont, 2010; Kaufman et al., 2013; Rotte et al., 2015):

- *$\alpha$ CTLA-4*. Para que las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) generen una respuesta inmunológica hacia un antígeno presentado en el contexto del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC), se requiere de las señales coestimuladoras de CD80-CD86 que se unen a CD28 en las células T. Para evitar su activación y proliferación, las células T expresan la molécula CTLA-4, la cual compite con CD28 a manera de inhibidor. Los anticuerpos monoclonales que se unen a CTLA-4 pueden bloquear su interacción con CD80/CD86. La inhibición de CTLA-4 suprime la tolerancia periférica, lo cual permite inducir una respuesta antitumoral contra el melanoma.
- *$\alpha$ PD-1*. Este anticuerpo monoclonal actúa contra el regulador negativo de células T, PD-1, cuyo ligando PD-L1 puede ser expresado directamente en células de melanoma. PD-1 actúa de un modo similar a CTLA-4, por lo que anticuerpos dirigidos contra esta molécula juegan un papel en la abolición de la tolerancia contra el melanoma.
- *Vacunas terapéuticas*. El desarrollo de una vacuna terapéutica efectiva contra el melanoma continua siendo elusivo, sin embargo ha habido algunos avances reportados. Ensayos clínicos en fases II y III han evaluado el efecto de la vacunación usando los antígenos de melanocitos gp-100 y MAGE-3, obteniendo títulos de anticuerpos contra dichos antígenos y la inducción de una respuesta T, no obstante estos resultados no son constantes entre pacientes.

- **Citocinas.** La Interleucina-2 (IL-2) es esencial para la proliferación y respuesta antitumoral de células T. El interferón- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) es una citocina con efectos antivirales e inmunomoduladores. Ya sea un uso por separado o en combinación, la administración periódica de IL-2 e IFN $\alpha$  se ha explorado para tratar el melanoma en etapas avanzadas.

A pesar de que dichas terapias han demostrado ser más eficaces que los tratamientos convencionales contra el melanoma, aún hace falta investigación básica que se traduzca en una mayor supervivencia de los pacientes y un mejor control de la enfermedad. Después de décadas de pruebas, no es sino hasta años recientes que se comenzó a observar éxito en este tipo de terapias. El diseño de vacunas contra ciertas malignidades es una estrategia importante a considerar, y un conocimiento de los principios inmunológicos para inducir una inmunidad protectora ha sido crucial para el diseño de vacunas contra enfermedades infecciosas y cancerígenas. Inducir la maduración de CPAs es un paso importante para el desarrollo de estos tratamientos.

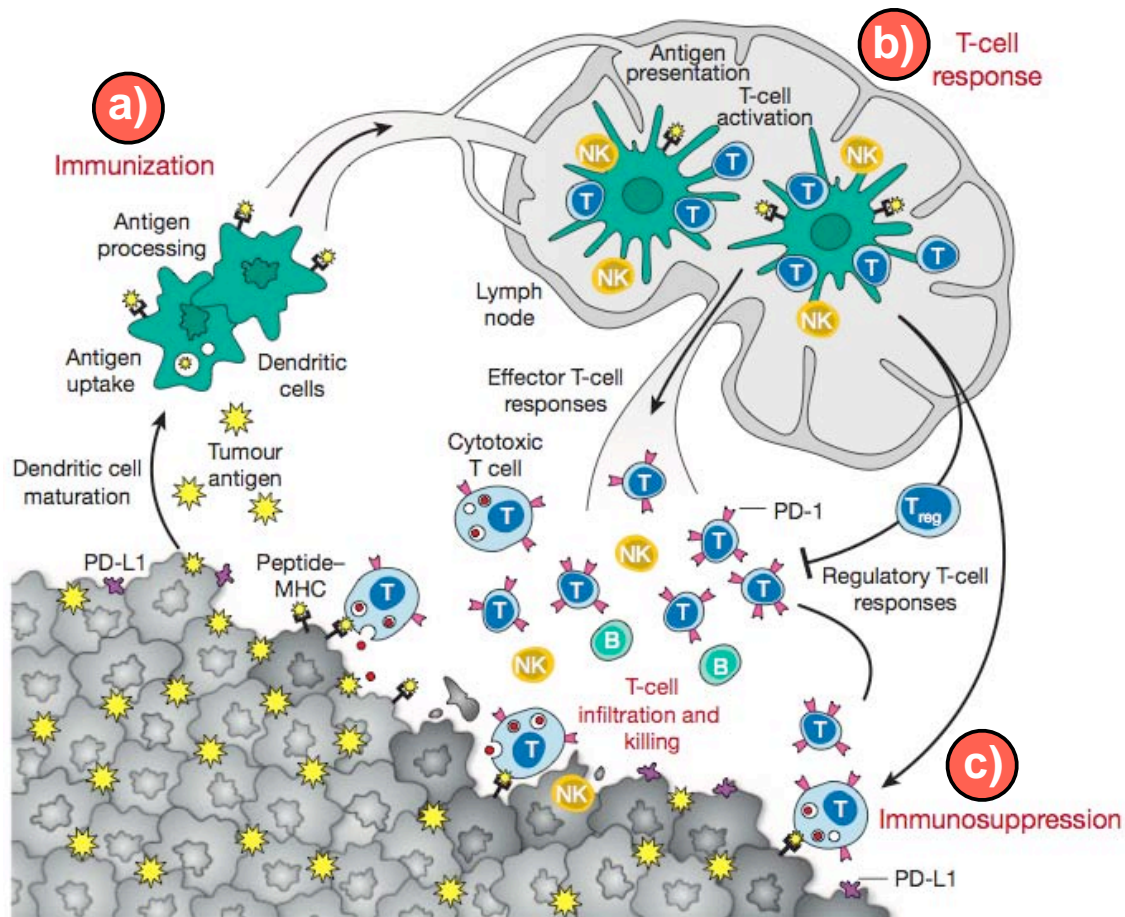
### **3.3 LA MADURACIÓN DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS COMO PASO IMPORTANTE PARA LA INDUCCIÓN DE UNA INMUNIDAD ANTITUMORAL**

Las CPAs, en especial las Células Dendríticas (DCs), inducirán una tolerancia inmunológica cuando encuentren autoantígenos derivados de un tumor, a menos que reciban señales de daño tisular o patógenos. Por esa razón, un elemento clave para la formulación de una vacuna exitosa radica en favorecer la maduración de DCs proinflamatorias, de tal manera que se pueda inducir una potente respuesta inmune adaptativa contra las células cancerosas (Corgnac et al., 2014).

Basándose en el conocimiento actual de la iniciación de la respuesta inmune, existen tres pasos importantes a seguir. Como primer paso, las DCs deben de acceder a los antígenos presentes en los tumores, los cuales pueden obtener *in situ* o provistos exógenamente como parte de una vacuna. Estos antígenos pueden ser: proteínas mutadas que se expresan típicamente en un cáncer (ej. p53, Ras); los productos de genes no mutados pero que se expresan preferentemente en las células cancerígenas (ej. Antígeno Prostático, Trp-1 y Melan-A) (Mellman et al., 2011). Para el caso de estudios experimentales es posible el uso de antígenos modelo (ej. Ovoalbúmina, Lisozima) que sean introducidos artificialmente en las células cancerígenas.

Tras el encuentro con el antígeno, la célula presentadora también necesita señales de activación (maduración) adecuadas, que le permita adquirir las capacidades necesarias para promover una inmunidad protectora (ver más adelante). La inducción de la respuesta protectora recae en la capacidad de las DCs para estimular a las células citotóxicas (principalmente linfocitos T CD8+) y que estas a su vez eliminen a las células potencialmente dañinas (Mellman et al., 2011)(figura 2).





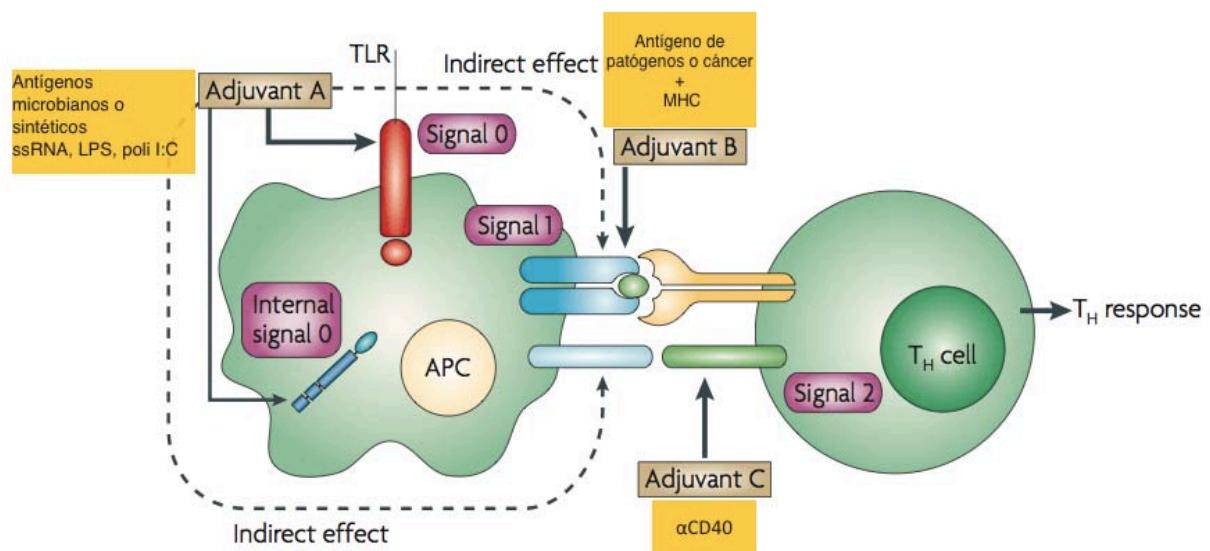
**Figura 2. Modelo general de generación y regulación de la inmunidad antitumoral.** La generación y regulación de inmunidad antitumoral sugiere al menos tres sitios para intervención terapéutica: **a)** promover la maduración y acceso a los antígenos tumorales por parte de las DCs, **b)** presentar los antígenos a las células T para generar la respuesta inmune y **c)** que dicha respuesta sea capaz de superar el ambiente inmunosupresor tumoral. Modificado de Mellman et al., 2011.

Para poder desarrollar vacunas eficientes, una manera de promover la maduración de CPAs ha sido el uso de adyuvantes. Los adyuvantes se definen como compuestos capaces de incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno, asistiendo en la inducción de una respuesta inmune potente y duradera (Guy, 2007). Además, su uso se traduce en los beneficios de utilizar una menor cantidad de antígeno y menos dosis.

Identificar y evaluar nuevos adyuvantes que permitan mejorar la eficacia de vacunas representa un reto y una necesidad, ya que actualmente existen enfermedades infecciosas (malaria, SIDA, tuberculosis) y no infecciosas (cáncer, Alzheimer) para las que no existen vacunas efectivas. Los adyuvantes de uso común como la alúmina y el Adyuvante Completo de Freund (ACF) no son óptimos, en el sentido que la alúmina polariza la respuesta inmune predominantemente hacia la producción de anticuerpos (humoral); mientras que el ACF puede inducir una respuesta inflamatoria exacerbada, además de que su uso no está aprobado en humanos (Fujii et al., 2003).

Los adyuvantes son de crucial importancia para la generación de una inmunidad antitumoral. El modelo más aceptado de iniciación de una respuesta inmune adaptativa establece que se requieren diferentes señales de las células presentadoras de antígenos a las células efectoras. La señal 1 es desencadenada por la presentación de péptidos específicos a través de las moléculas de MHC al receptor de células T (TCR). No obstante, a menos que se provea de señales adicionales, se inducirá una respuesta de anergia o tolerancia. Para evitar la inducción de anergia, se requiere de una señal coestimuladora, o señal 2, a través de la interacción célula-célula entre las APCs y las células T. Entre las interacciones moleculares más importantes APC:célula T destacan CD40-CD40L, OX40-OX40L y CD86/CD80-CD28. Posteriormente se descubrió que una señal adicional y más temprana, la llamada señal 0, era obligatoria para activar las APC y orientar la respuesta inmune subsecuente (Guy, 2007).

La señal 0 es inducida principalmente a través del reconocimiento de "Patrones Moleculares Asociados a Microorganismos" (MAMPs), por parte de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), entre los que destacan Receptores Tipo-Toll (TLRs), Receptores Tipo NOD (NLRs), y Receptores Tipo-RIG (RLRs). Los TLRs son una familia de receptores transmembranales de la inmunidad inata, con capacidad para detectar MAMPs, los cuales son productos microbianos conservados como por ejemplo el Lipopolisacárido (LPS), la flagelina o el RNA de cadena sencilla y doble (ssRNA y dsRNA) (Vacchelli et al., 2013). Este modelo general de la estimulación antigénica por células presentadoras se resume en la figura 3.



**Figura 3. Modelo de las 3 señales necesarias para la estimulación de células T por parte de células profesionales presentadoras de antígenos.** La señal 1 es representada por los péptidos presentados en el contexto de las moléculas MHC, y su origen puede ser tanto endógeno (cáncer) como exógeno (patógenos). La señal 2 la comprenden las moléculas coestimuladoras que interactúan durante la presentación antigénica, y las cuales promueven la maduración de los linfocitos y células presentadoras. Por último, la llamada señal 0 la comprenden las moléculas estimuladoras de PRRs las cuales promueven la presentación antigénica eficiente y suelen ser moléculas de origen microbiano y conservadas evolutivamente. Modificado de Guy; 2007.

Los PRRs son también responsables del reconocimiento de moléculas endógenas llamadas “Patrones Moleculares Asociados a Daño” (DAMPs), que como su nombre lo indica, son liberadas en tejidos dañados (Zhu et al., 2011). Los DAMPs incluyen, pero no se limitan a: las Proteínas de Choque Térmico (HSP60, HSP70), ácido úrico y la Proteína surfactante A, los cuales funcionan como agonistas del conjunto TLR2/TLR4; HMGB1 y la Proteína A9 de Unión a Calcio S100 (S100-A9), ambas operando como agonistas de TLR4; múltiples componentes y productos de la matriz extracelular, pueden activar TLR4; y el DNA mitocondrial actúa como agonista de TLR9 (Vacchelli et al., 2013).

La emisión definida espacio-temporalmente de DAMPs se ha propuesto que constituye la esencia de la muerte celular inmunogénica, un tipo particular de muerte celular que es capaz de activar al sistema inmune tanto en su vertiente innata como adaptativa. La liberación de DAMPs por las intervenciones (quimio)terapéutica permite su acceso a los TLRs, los cuales juegan un papel prominente en la orquestación de la respuesta inmune innata y adaptativa contra el cáncer (Vacchelli et al., 2013). Bajo este esquema, se evidencia que además del antígeno tumor-específico, se requiere de otros estímulos que promuevan la maduración de las APCs, y que además sean capaces de generar una respuesta inmune de tipo celular.

En modelos experimentales, también se ha explorado el uso de anticuerpos monoclonales agonistas del receptor CD40 ( $\alpha$ CD40) en APCs para inducir su maduración. Cuando además del estímulo de los antígenos exógenos dirigidos a APCs se usa  $\alpha$ CD40, se induce la maduración y presentación eficiente de antígenos por parte de las APCs a linfocitos T CD8+, los cuales producen IL-2 e IFN $\gamma$ . Comparado el uso como adyuvante de  $\alpha$ CD40 con el ACF, en el segundo esquema se observa un fenómeno de tolerancia al mismo antígeno (Bonifaz et al., 2002). El uso de  $\alpha$ CD40 como adyuvante ha demostrado su efectividad para la inducción de inmunidad protectora en modelos de cáncer e infecciones virales (Bonifaz et al., 2004), por lo que el uso de antígenos conocidos y  $\alpha$ CD40 como adyuvante representan un control positivo para evaluar la adyuvancia de otro tipo de moléculas.

En el caso de adyuvantes que actúen estimulando los receptores tipo Toll, el Ácido policitídílico poliinosítico (poli I:C, un ligando sintético de TLR3) es un buen ejemplo para la inducción de inmunidad protectora de tipo celular. Este antígeno actúa como una señal coestimuladora en las APCs y permite su maduración, así como montar una respuesta antígeno-específica en modelos experimentales de cáncer (Llopiz et al., 2008). Su uso en humanos se encuentra actualmente en fase de evaluación.

En conjunto, este conocimiento nos abre la puerta a la exploración y uso de nuevas moléculas adyuvantes, cuyo uso sea capaz de inducir una respuesta antitumoral protectora. Esto permitiría aumentar la inmunogenicidad contra antígenos tumorales o antígenos exógenos en modelos experimentales.

### 3.3.1 Uso de antígenos microbianos para la inducción de una respuesta inmune antitumoral

A pesar del interés clínico que rodea a los TLRs desde finales de los 1990s, solo tres agonistas de TLRs han sido aprobados actualmente por la FDA (en inglés, Administración de alimentos y fármacos) para su uso en humanos: el bacilo Calmette-Guérin (BCG), el cual es aprobado para la inmunoterapia del carcinoma de vejiga; el Monofosforil Lípido-A, un derivado del LPS de *Salmonella minnesota*, que forma parte de la licencia Cervarix®, una vacuna contra el virus del papiloma humano 16 y 18; y el Imiquimod (un derivado de imidazoquinolona, desarrollado como un antiviral tópico), usado para el tratamiento de verrugas genitales. Tanto el BCG como el MPL funcionan como agonistas de TLR2/TLR4, el imiquimod ejerce su función inmunoestimuladora a través de TLR7 (Vacchelli et al., 2013). Actualmente este enfoque se ha traducido en una mayor investigación clínica sobre ligandos de TLR que pudieran servir como agentes terapéuticos contra el cáncer (ver tabla 1).

<b>Tabla 1.</b> Compuestos dirigidos a los TLRs para tratamiento de cáncer (Modificado de Vacchelli, 2013)				
<i>Compuesto</i>	<i>Compañía</i>	<i>Blanco</i>	<i>Tipo de fármaco</i>	<i>Fase clínica</i>
Rintatolimod	Hemispherx Biopharma	TLR3	dsRNA	Fase preclínica
SMP-105	Dainippon Sumitomo Pharma	TLR2	Mycobacteria inactivada	Fase preclínica
IPH-3102	Innate Pharma	TLR3	dsRNA	Fase preclínica
CBLB502	Cleveland Biolabs Inc.	TLR5	Flagellin	Fase preclínica
IMO-2055	Idera Pharmaceuticals	TLR9	oligonucleótido de CpG	Fase clínica I
MGN-1706	Mologen	TLR9	DNA no-codificante	Fase clínica I
ANA773	Anadys Pharmaceuticals	TLR7	ssRNA	Fase clínica I
OM-174	OM Pharma	TLR2, TLR4	Derivado de Lipid-A	Fase clínica I
ISS1018	Dynavax Technologies	TLR9	Oligonucleótidos de DNA	Fase clínica II
Agatolimod	Pfizer	TLR9	Oligonucleótido de CpG	Fase clínica II
852A	3M Pharmaceuticals	TLR7	Oligonucleótido de ssRNA	Fase clínica II
Cadi-05	Cadila Pharmaceuticals	polyTLR	Mycobacteria inactivada	Fase clínica II

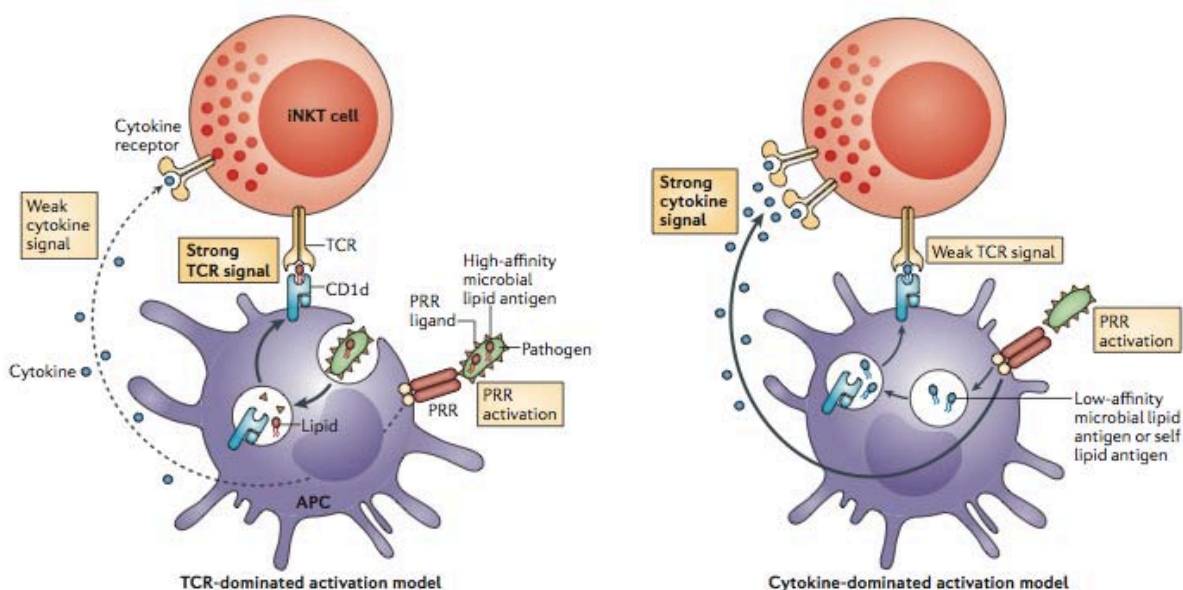
### 3.3.2 Estimulación de Células T Natural Killer como inductor de maduración de Células Presentadoras de Antígenos

Además del uso de moléculas agonistas de PRRs, otra alternativa para inducir la maduración de APCs es su interacción con células T Natural Killer (NKT) cuando existe una interacción célula-célula mediada por la presentación antigénica. Las NKTs son una población celular evolutivamente conservada que poseen TCRs semi-invariables que reconocen glicolípidos presentados a través de CD1d (en comparación con las células T

convencionales que reconocen antígenos peptídicos). CD1d es una proteína perteneciente a la familia del MHC (fig. 3) y su ligando más característico es la alfa  $\alpha$ -Galactosil-Ceramida ( $\alpha$ GalCer), una molécula glicolipídica que se caracterizó en las esponjas marinas *Agelas mauritianus* (Terabe and Berzofsky, 2012).

En el ratón y en el humano, la mayoría de las células NKT expresan un receptor TCR que posee una cadena alfa muy conservada en la región variable (V) y de unión (J) (V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 en ratones y V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 en humanos). A su vez, estas cadenas alfa generalmente se encuentran asociadas con segmentos de cadenas beta V $\beta$ 8 y V $\beta$ 11, en ratón y humano respectivamente (Terabe and Berzofsky, 2008; Terabe and Berzofsky, 2012). Las características del TCR semi-invariable de esta población las distingue como células iNKTs, aunque existen otras subpoblaciones que no serán abordadas en este trabajo, por lo tanto los nombres NKT e iNKT serán usados como sinónimos.

Estas células han sido ampliamente estudiadas y han sido involucradas en una gran variedad de condiciones, tanto fisiológicas como patológicas. Las NKTs tienen la capacidad de producir rápidamente gran variedad de citocinas y quimiocinas que modulan la inmunidad en varias condiciones, incluyendo infecciones, cáncer, autoinmunidad y alergias (Seiler et al., 2012).



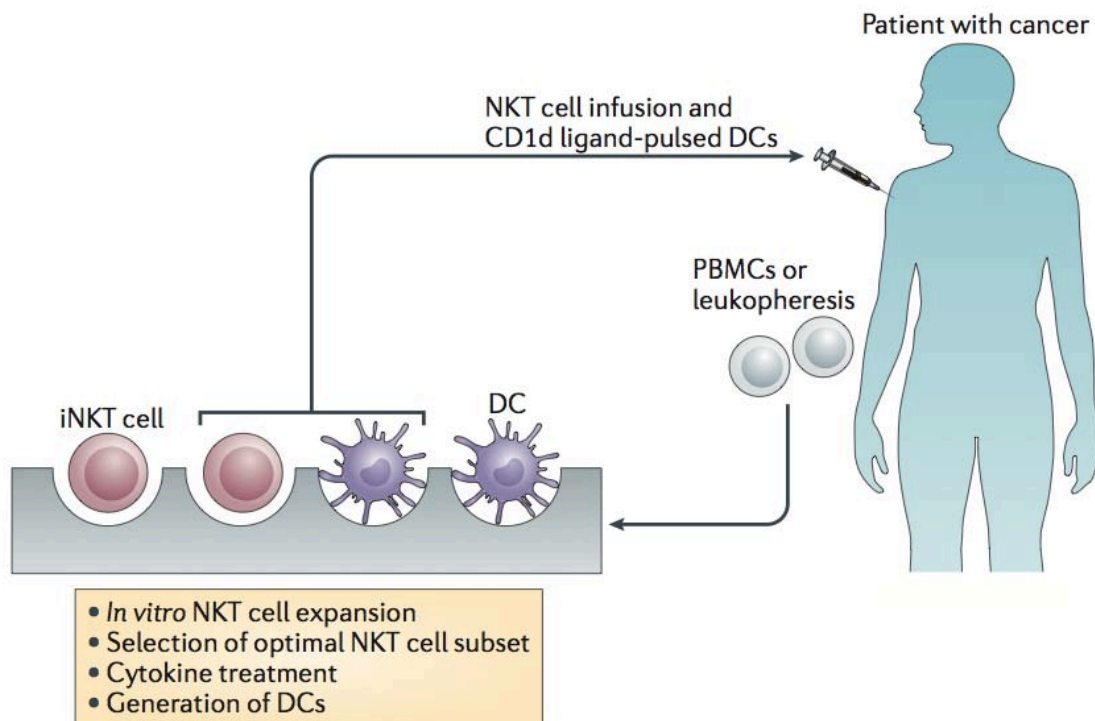
**Figura 3. Activación TCR-dependiente y Citocinas-dependiente de células NKT por APCs.** Este modelo señala dos formas principales de activación de las células NKTs. La señal provista al TCR por el complejo lípido-CD1d puede ser suficiente para activar estos linfocitos. Por otro lado, cuando las APCs son estimuladas a través de sus PRRs, las citocinas liberadas (IL-12) pueden ser suficientes para estimular las NKTs, no obstante la señalización por TCR sea débil. Se presume que la contribución relativa de ambas señales (TCR y citocinas) sean contexto dependiente. Modificado de Brennan et al., 2013.

La primera observación de que la activación de células NKT puede utilizarse para aumentar la eficiencia de vacunas fue realizada por Gonzalez-Aseguinolaza y colaboradores. En este trabajo, se inocularon ratones con esporozoitos irradiados o adenovirus recombinante que expresara el antígeno *AdpgCs* de *Plasmodium spp.* con o

sin  $\alpha$ GalCer (Gonzalez-Asequinolaza et al., 2002). Sólo aquellos ratones que recibieron la vacuna que consistía en la coadministración trofozoitos irradiados o *AdpgCs* junto con  $\alpha$ GalCer como adyuvante fueron protegidos contra la malaria.

Posteriormente, otro grupo confirmó que la actividad de las células NKT pueden servir como adyuvante al administrar  $\alpha$ GalCer en combinación con el antígeno modelo OVA, cuya expresión es inducida artificialmente en un modelo de cáncer. Una sola inyección de células dendríticas cargadas con OVA y  $\alpha$ GalCer aumentó la expansión *in vivo* de células T OVA-específicas comparado con que recibieron sólo OVA o  $\alpha$ GalCer (Fujii et al., 2003). Varias observaciones similares fueron realizadas, ilustrando que la maduración de DCs basada en su interacción con células NKT es dependiente de la interacción de CD40 (en APCs) con su ligando CD40L (en células T o NKTs), y que la expansión exitosa de células T tumor-específicas requiere de la presentación tanto de  $\alpha$ GalCer como del antígeno peptídico por parte de la misma APC (Terabe and Berzofsky, 2012).

En humanos, estudios observacionales enfocados a las NKTs indican que su frecuencia en tumores sólidos está disminuida (incluyendo melanoma, pulmón, mama y carcinoma escamoso de cabeza y cuello), y un incremento en la presencia de estas células está asociado a una mejor prognosis, dado que las citocinas que libera promueven la actividad de células citotóxicas (Vivier et al., 2012). Las estrategias para aumentar la actividad de esta población celular en el tratamiento del cáncer han aumentado en los últimos años.

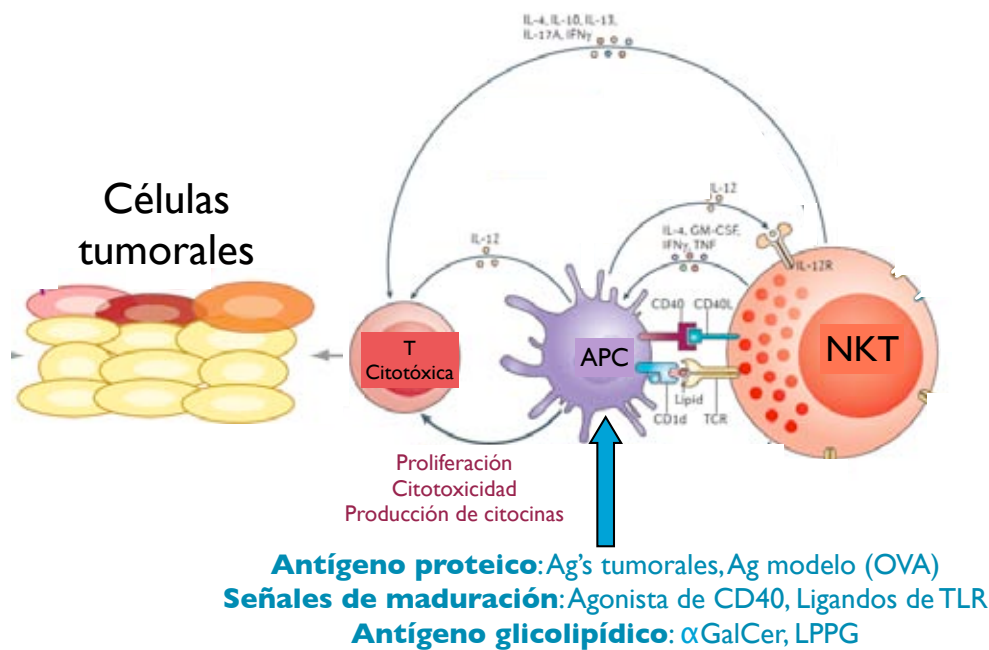


**Figura 4. Uso de las células NKTs para la terapia contra el cáncer.** La población celular de NKTs son aisladas de pacientes con cáncer y expandidas *in vitro* junto con DCs antes de ser administradas de regreso al paciente. La población de células NKTs puede ser coadministrada con células dendríticas pulsadas con ligandos de CD1d para aumentar la actividad antitumoral de las NKTs *in vivo*. PBMC, células mononucleares de sangre periférica. Tomado de Vivier et al. 2012.

La capacidad de las NKTs para promover la maduración de APCs y su función presentadora, que a su vez induce la activación de otros tipos celulares, como los linfocitos T citotóxicos (CTLs), ha sido investigada como blanco terapéutico en cáncer. Se han realizado estudios clínicos en fase I y II para el tratamiento del carcinoma escamoso recurrente de cabeza y cuello (Kunii et al., 2009; Yamasaki et al., 2011). En dichos estudios se recuperaron Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMCs) por leucoféresis. Posteriormente se enriquecieron las PBMCs de células NKTs y DCs (fig. 4). Tras realizar una medición por tomografía del tamaño de los tumores antes y dos semanas después de la administración de las células enriquecidas a los pacientes, se observó que aquellos que recibieron el tratamiento con células mostraron una disminución significativa de los tumores y un porcentaje de respuesta mayor (50%), comparado con la respuesta al tratamiento por quimioterapia (6-41%). Este efecto se vio correlacionado con un incremento en el número de NKTs infiltradas al tumor.

Experimentalmente también se ha evaluado con resultados positivos el potencial terapéutico de las NKTs contra malignidades de origen hematopoyético. Cuando se utilizaron células cancerosas irradiadas, cargadas previamente con  $\alpha$ GalCer (a manera de vacuna terapéutica), se inhibió el crecimiento de tumores ganglionares y aumentó la supervivencia de los animales tratados (Mattarollo et al., 2012). De manera importante, esta estrategia mostró ser efectiva tanto para linfoma de células B como para leucemia mieloide múltiple.

Esta evidencia nos permite esbozar un modelo de la actividad antitumoral de las células NKT, donde debido a su habilidad para liberar en corto tiempo citocinas como el IFN $\gamma$  y la expresión de moléculas coestimuladoras pueden inducir la maduración de DCs, las cuales pueden adquirir la capacidad presentadora de antígenos tumorales a las células T CD8 $^{+}$  (Fujii et al., 2003). Las células T CD8 $^{+}$  pueden entonces reconocer y eliminar a las células tumorales o patógenos intracelulares (fig. 5).



**Figura 5. La producción de citocinas y expresión de moléculas coestimuladoras de las NKTs permiten la maduración de células presentadoras que a su vez inducen una inmunidad antitumoral.** Las células NKT pueden inducir la maduración de DCs, las cuales a su vez adquieren la habilidad de presentar antígenos tumorales a las células T citotóxicas. Los linfocitos T citotóxicos activados pueden entonces reconocer y eliminar las células tumorales.

Bajo estas evidencias clínicas y experimentales vemos que el primer objetivo en una terapia inmunológica inducir la maduración de APCs y aumentar su capacidad presentadora. Requerimos entonces de antígenos peptídicos tumorales. En los modelos experimentales estos antígenos se pueden introducir artificialmente para su expresión en las células cancerosas (ej. Lisozima, OVA). Estos antígenos proteicos están dirigidos hacia los linfocitos T, principalmente los linfocitos T citotóxicos o CD8+. Las señales para inducir la maduración de las APCs pueden variar, entre agonistas de receptores como CD40, ligandos de PRRs, citocinas, etc.

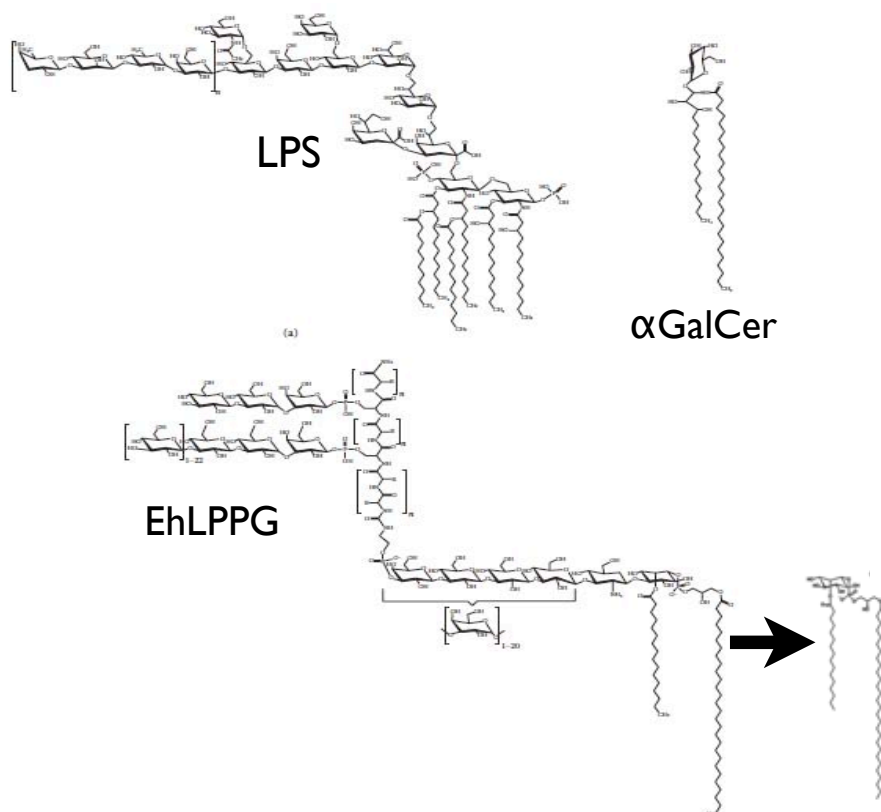
En el presente proyecto se utilizará un modelo de melanoma murino, inducido mediante la inoculación de células transformadas. Estas células tienen como característica importante la capacidad de expresar el antígeno modelo OVA. La OVA es una proteína que intrínsecamente no es inmunogénica e induce una respuesta de tolerancia en ausencia de adyuvantes, como sucede en condiciones de homeostasis tisular (Liu et al., 2002; Steinman et al., 2003). De tal manera que al conocer un antígeno presente sólo en las células transformadas, es posible evaluar la capacidad adyuvante de moléculas de origen microbiano, como la Lipopéptido-fosfoglicana de *Entamoeba histolytica*.



### 3.4 LA LIPOPÉPTIDO-FOSFOGLICANA DE *Entamoeba histolytica* COMO MOLÉCULA INMUNOESTIMULADORA

Para combatir las enfermedades infecciosas más importantes en México en los años 70's, el parásito protozoario *Entamoeba histolytica* (el agente causante del absceso hepático amibiano) fue estudiado para poder desarrollar vacunas y tratamientos. En 1969, Galanos et al desarrollaron un método para la extracción del LPS presente en bacterias Gram negativas. Utilizando un método similar al desarrollado para la extracción del LPS, el grupo de Isibasi y colaboradores obtuvo una molécula de la membrana de trofozoítos del parásito *Entamoeba histolytica* (Isibasi-Araujo et al., 1982a; Isibasi-Araujo et al., 1982b). El objetivo era determinar si el parásito tenía algún componente de membrana con propiedades químicas o inmunológicas similares a la molécula bacteriana. La molécula descrita en estos trabajos fue llamada Lipopéptido-fosfoglicana de *E. histolytica* (EhLPPG o simplemente LPPG).

Los análisis bioquímicos de la LPPG indican una variedad de componentes que sugieren una complejidad estructural tal, que nos podría dar indicios sobre su capacidad de estimular al sistema inmune a través de sus distintos mecanismos de reconocimiento.



**Figura 6. Modelo de la composición molecular de la LPPG de *E. histolytica* comparado con el LPS y αGalCer.** Estructura general de la LPPG obtenida a partir de estudios de caracterización bioquímica. A la derecha se señala la región GPI de la molécula, la cual ha reportado que es presentada en el contexto de CD1d. La fracción más externa glicosilada de la LPPG es capaz de estimular los TLRs 2,4 y 6. En comparación se muestran las estructuras moleculares de otros agentes inmunostimuladores como el LPS que estimula TLR-4 y la αGalCer, ligando de CD1d. Modificado de Wong-Baeza 2010.

El grueso de la composición de la LPPG es la porción de carbohidratos (fig. 6), la cual abarca aproximadamente el 85% del peso de la molécula. Esta porción se compone principalmente de Glucosa, Galactosa y Manosa. En cuanto al componente peptídico (8% del total), este se constituye de Aspartato y Glutamato, y en menos cantidad de Metionina, Tirosina, Cisteína e Histidina. El resto de la molécula se constituye de la porción lipídica de anclaje (2.5% aprox.), la cual se ha reportado en orden de abundancia, ácidos grasos de 12, 16 y 14 carbonos, esta porción también incluiría la porción fosfatídica (Wong-Baeza et al., 2010).

Diversos estudios han mostrado que las moléculas de anclaje tipo Glicosil-Fosfatidilinositol (GPI), son abundantes en parásitos protozoarios como *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, y *Toxoplasma gondii*. Al mismo tiempo, se ha reconocido que estas moléculas son reconocidas por TLRs, y son capaces de activar células de linaje linfoide y mieloide (Gazzinelli and Denkers, 2006).

**Tabla 2. Moléculas GPI presentes en protozoarios parásitos y con capacidad de estimular TLRs..**

PAMP	Parásito	Estadío de expresión	Estructura	TLR
GPI	<i>Entamoeba histolytica</i>	Trofozoíto	LPPG	TLR2,TLR4,TLR6
	<i>Leishmania major</i>	Promastigote,tripomastigote	LPG	TLR2
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Epimastigote	GIPL	TLR4
	<i>Plasmodium falciparum</i>	Merozoítos	GIPL	TLR2, TLR4
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Taquizoítos	GIPL	TLR2, TLR4

LPPG, lipopéptido-fosfoglicana; LPG, lipofosfoglicana; GIPL, glicosilinositol-fosfolípido. Modificado de Gazinelli y Denkers, 2006.

Diversos estudios con la LPPG han evidenciado su actividad estimuladora tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. En la línea celular HEK-293 (células de riñón embrionario) se determinó que LPPG la puede ser reconocida por receptores TLR-2 y TLR-4, y que esta interacción resulta en la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF $\alpha$  (Maldonado-Bernal et al., 2005). De igual manera, se ha reconocido que la LPPG es capaz estimular a la inmunidad adaptativa, dado que los pacientes diagnosticados con absceso hepático amibiano tienen niveles detectables de anticuerpos específicos contra la LPPG. Además, se han encontrado anticuerpos IgA anti-LPPG en el calostro de mujeres infectadas con *E. histolytica* (Meraz and Isibasi-Araujo, 1986).

En un estudio *in vitro* también se observó que en APCs (macrófagos y células dendríticas), la LPPG es internalizada a los endosomas tardíos y es capaz de activar su capacidad presentadora. Las DCs activadas con LPPG tienen un incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, así como un aumento en la expresión de las citocinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-8 e IL-12 (Vivanco-Cid et al., 2007). La colocalización de la LPPG con los organelos que contienen la Proteína de

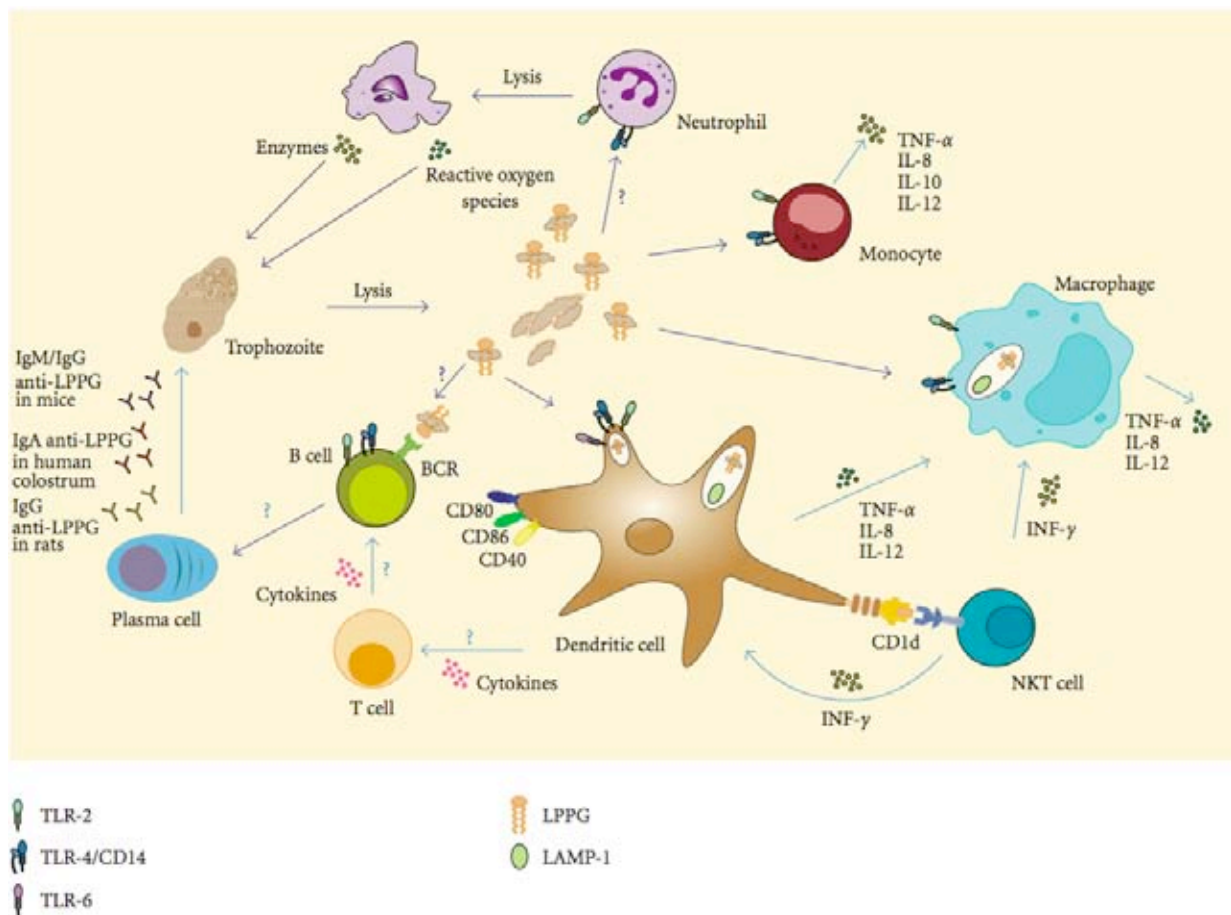
Membrana Asociada a Lisosoma-1 (LAMP-1) sugirió que en dichos compartimentos la molécula podría ser procesada y cargada en moléculas de presentación de antígenos.

Para el caso de otros patógenos protozoarios, se ha observado que la porción de GPI puede interactuar con CD1d. Las porción GPI de los componentes de membrana de *Leishmania donovani* son presentadas a través de CD1d a las células NKTs, las cuales a su vez intervienen en la respuesta inmune contra el patógeno (Amprey, 2004). Por otro lado, en el caso de infecciones con *Trypanosoma cruzii*, las NKTs también juegan un papel clave en la inmunidad protectora, no obstante, a diferencia del trabajo anterior, la actividad de estas células era más dependiente de IL-12 y la presentación de antígenos endógenos a través de CD1d (Duthie et al., 2005). Estos estudios señalan que los mecanismos la activación de las NKTs (ver figura 3) en infecciones por protozoarios es un fenómeno común, sugiriendo mecanismos similares actuando contra *E. histolytica*.

La capacidad de la LPPG para estimular a las células NKT y contribuir al control del absceso hepático amibiano, es una recientemente caracterizada recientemente en un modelo murino. En este estudio se evaluó la capacidad de la LPPG para estimular la producción de citocinas. Para ello se cultivó CPAs con LPPG o  $\alpha$ GalCer previo al co-cultivo con linfocitos de bazo o hígado. La estimulación con LPPG alcanzó niveles de producción de IFN $\gamma$  entre el 30-50% a los inducidos con la  $\alpha$ GalCer. No obstante, a diferencia de las células estimuladas con  $\alpha$ GalCer, la estimulación con LPPG no indujo la producción de IL-4, (Lotter et al., 2009).

También se demostró que los ratones deficientes de NKTs (J $\alpha$ 18<sup>-/-</sup> y CD1d<sup>-/-</sup>) mostraban una reducción importante en la producción de IFN $\gamma$  cuando se incubaron con CPAs pulsadas con LPPG o  $\alpha$ GalCer, indicando que las NKTs representan la fuente principal de esta citocina. En conjunto, estos resultados sugieren que la presentación dependiente de CD1d de la porción GPI de la LPPG induce la producción de IFN $\gamma$  por las NKTs. Por último, se pudo observar que es necesario el procesamiento de la LPPG por las CPAs para permitir su procesamiento a través de CD1d y los ratones que recibieron la aplicación por vía intraperitoneal de LPPG mostraron una protección significativa respecto a los controles en un modelo murino de absceso hepático amibiano.

Las evidencias señaladas anteriormente han llevado a proponer a la LPPG como una molécula cuyas propiedades inmunogénicas la convierten en un antígeno candidato para el desarrollo de una vacuna contra las infecciones causadas por el parásito, pero también para usarla como un adjuvante para una vacuna contra el desarrollo y tratamiento de tumores (figura 7).



**Figura 7. El papel de la Lipopéptidofosfoglicana de *Entamoeba histolytica* como estimulador del sistema inmune innato y adaptativo.** La LPPG de los trofozoitos de *E. histolytica* es reconocida a través de TLR-2 , TLR-6 y TLR-4/CD14 e induce la producción de IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF $\alpha$  en APCs. En los macrófagos y DCs la LPPG es internalizada en endosomas marcados con LAMP-1, y las DCs activadas con LPPG aumentan su expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40. Las células NKTs también son activadas por la LPPG, de manera CD1d dependiente. Para el caso de la inmunidad adaptativa, se han observado anticuerpos contra la LPPG pacientes con absceso hepático, en el calostro de mujeres infectadas, así como anticuerpos anti LPPG en modelos animales. Tomado de Wong-Baeza et al. 2010.

## 4. JUSTIFICACIÓN

La terapia inmunológica para el tratamiento del cáncer y en particular del melanoma, es una estrategia que puede ayudar en el control de la enfermedad. A su vez, la inmunoterapia puede complementar los tratamientos convencionales cuando estos no resultan eficaces. La inmunoterapia contra el melanoma ha mostrado mejores resultados que la terapia convencional, por lo que es importante identificar y evaluar moléculas capaces de promover una respuesta inmune eficiente contra las células cancerosas. La composición compleja de la LPPG de *Entamoeba histolytica* le confiere la capacidad de estimular al sistema inmune a través de diversos mecanismos celulares y moleculares. En vista de dichas propiedades, se evaluó la adyuvancia de esta molécula en un modelo de vacunación contra un antígeno melanoma-específico.

## **5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El uso de la LPPG de *Entamoeba histolytica* como adyuvante de un antígeno tumor-específico inducirá una respuesta inmune capaz de evitar o retardar el crecimiento tumoral en un modelo murino de melanoma?

## **6. HIPÓTESIS**

El uso del antígeno de LPPG de origen microbiano como adyuvante hacia un antígeno tumor-específico inducirá una respuesta antitumoral que evitara el crecimiento tumoral en un modelo de melanoma murino que exprese dicho antígeno.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Obtener y evaluar el uso de la LPPG de *Entamoeba histolytica* como adyuvante en la inducción de una respuesta inmune tumor-específica en un modelo de melanoma murino.

### 7.1 Objetivos Particulares

- Realizar un cultivo axénico de trofozoítos de la cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* para la obtención de biomasa.
- Extraer y caracterizar la LPPG de *E. histolytica*.
- Reproducir y estandarizar el modelo de melanoma murino que exprese un antígeno tumor-específico.
- Evaluar el potencial de la LPPG como adyuvante e inmunostimulante hacia el melanoma, en comparación con adyuvantes modelo.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

*Obtención de biomasa de trofozoítos.* En cuanto a la obtención de la biomasa, los trofozoítos de la cepa patogénica HM-1:IMSS fueron cultivados axénicamente en cajas de 75 cm<sup>2</sup> (Corning, NY, USA) a 36.5°C en medio TYI-S-33 para *E. histolytica*. Los frascos se cultivaron durante 48-72 horas, que corresponden a la fase de crecimiento logarítmico (o cuando las cajas tenían 90% de confluencia), tiempo en el cual se realizó la cosecha. Para cosechar los trofozoítos, los frascos se enfriaron sobre hielo durante 10-15 minutos. El contenido se recuperó en tubos cónicos de 50 ml para centrifuga (Corning, NY, USA) y se concentró centrifugando a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. El botón de trofozoítos se lavó con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) por dos veces, centrifugando en las mismas condiciones, para eliminar los componentes del medio. La biomasa se almacenó a -70°C hasta la fase de extracción de la LPPG.

*Preparación de medio TYI-S-33.* Los componentes del medio se disolvieron en agua destilada inyectable y se ajustó el pH a 6.8 para que posteriormente sea esterilizado a 121°C durante 15 minutos en autoclave. Para complementar el medio, se agregaron 10% del volumen final con suero bovino inactivado y una dilución de la mezcla de vitaminas de Diamond (LGC Promochem), así como 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco, USA).

*Extracción de la LPPG de Entamoeba histolytica.* Brevemente, de acuerdo al método de Lotter y González-Roldán (Lotter et al., 2009) la LPPG se aisló a partir de la biomasa total de trofozoítos. Se resuspendió el botón de biomasa en agua destilada inyectable. Las células fueron lisadas con 5 ciclos de frío calor a -20°C y 37°C, respectivamente. El homogenizado se centrifugó a 430 g a 4°C por 10 min y el sobrenadante se recuperó y se centrifugó a 150,000 g por 40 min. El botón obtenido se liofilizó toda la noche y posteriormente se le dio un tratamiento con una mezcla de cloroformo/metanol/agua 10:10:3 (para 20 ml de volumen final). El material insoluble se recuperó por centrifugación, se secó en frío, resuspendiendo en agua destilada libre de pirógenos y se extrajo tres veces con un volumen de 90% fenol a 68°C por 30 min en agitación constante. La fase acuosa que contiene la LPPG se recuperó después de una centrifugación de 12, 000 g por 30 min y se dializó por 3 días en agua inyectable. El dializado se liofilizó para proseguir con la caracterización.

*Cuantificación de carbohidratos de la LPPG.* El contenido de carbohidratos de la LPPG se determinó colorimétricamente por el método de antrona. Para llevar a cabo esta prueba, la muestra y los estándares de glucosa se hierven durante 10 minutos con una solución de antrona con 0.2% de ácido sulfúrico. En este proceso el ácido sulfúrico hidroliza los polisacáridos en sus extremos reductores y los monosacáridos libres, en forma de furfurales, forman un complejo azul-verdoso con la antrona; la absorbancia a 660 nm es proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra.



*Determinación de endotoxina.* La presencia de endotoxina o LPS contaminante en la LPPG se determinó mediante el lisado de amebocitos (células sanguíneas) de *Limulus polyphemus* (LAL) cromogénico QCL-1000 (Lonza, MD, USA). En el método de LAL de *Limulus*, la presencia de endotoxina activa una serie de enzimas de la cascada de coagulación. Posteriormente se agrega un substrato cromogénico, que en presencia de estas enzimas libera una molécula cromófora, lo cual resulta en una solución amarilla que se mide en un espectrofotómetro a 405 nm. La correlación entre concentración de endotoxina y absorbancia es lineal entre 0.1 y 1 unidades de endotoxina/ml (EU/ml).

*Electroforesis en gel de poliacrilamida.* La LPPG se caracterizó utilizando geles de poliacrilamida al 10% (BioRad, CA, USA). El corrimiento se realizó entre 2-3 horas a 60 volts en solución de corrimiento con pH 8.3. Posteriormente, los geles se tiñeron para revelar carbohidratos con el método de tinción de plata (Silver Stain Plus, BioRad).

*Cultivo de células B16-MO4 y expresión inducida de ovoalbúmina.* Debido a que los antígenos tumorales de naturaleza proteica no son diferentes la mayoría de las proteínas sintetizada por células no transformadas, cualquier proteína de sintetizada por un tumor podría funcionar como un antígeno tumoral. Sin embargo, esto no define antígenos tumor-específicos. Las clones de células de melanoma murino B16 están transfectadas con un plásmido capaz de expresar la proteína OVA y son denominadas MO4. Estas células son singénicas a la cepa de ratones C57BL/6 y en presencia de un antibiótico de selección (Geneticina o G418; Sigma-Aldrich, USA) expresan el antígeno a nivel de citoplasma, lo cual permite su presentación a través de moléculas MHC de clase I (Falo et al., 1995).

Las células B16-MO4 se crecieron en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SFB descomplementado previamente (56°C durante 30 min en baño maría). El medio fue adicionado con geneticina (300-500 µg/ml como indica el fabricante) como antibiótico de selección y se mantuvieron en cajas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Las células fueron descongeladas para cada ronda de experimentos a partir de un stock mantenido en Nitrógeno líquido, o bien a -70°C cuando estas se usaron en menos de 3 meses desde su congelación.

Para su expansión y cosecha, las cajas de cultivo las cajas de cultivo se lavaron 3 veces con 10 ml de PBS. Posteriormente fueron despegadas con 5 ml de una solución de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 2mM. Se les adicionaron 10 mL de PBS para diluir el EDTA y recolectar las células en tubos Falcon de 50 mL; centrifugando después por 5 min a 380 g y 4°C. Los tubos se decataron y se resuspendió el botón celular en 5 mL de PBS aproximadamente. A partir de esta última concentración se procedió a realizar el conteo de las células en una cámara de Neubauer para preparar las dosis requeridas.

*Animales de experimentación.* Se utilizaron hembras de ratón (*Mus musculus*) cepa C57BL/6 de 8-12 semanas mantenidos en el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Hospital General de México con comida *ad libitum*.

*Modelo de melanoma murino.* Para la inducción de los tumores con las células de melanoma, los ratones fueron preparados al menos un día antes de la inoculación de las células. Se les administró de manera intramuscular una combinación de ketamina/xilazina de 100mg/kg y 10mg/kg respectivamente. Posteriormente fueron depilados, ya sea con crema depiladora comercial o bien, con una rasuradora eléctrica. En este caso los ratones fueron depilados del costado derecho, tratando de despejar lo suficiente el área, tanto para poder inocular las células como para medir el crecimiento tumoral en los días subsecuentes. Los resultados con la rasuradora eléctrica fueron mejores, dado que se evita el daño de la piel de los animales al no usar sustancias agresivas.

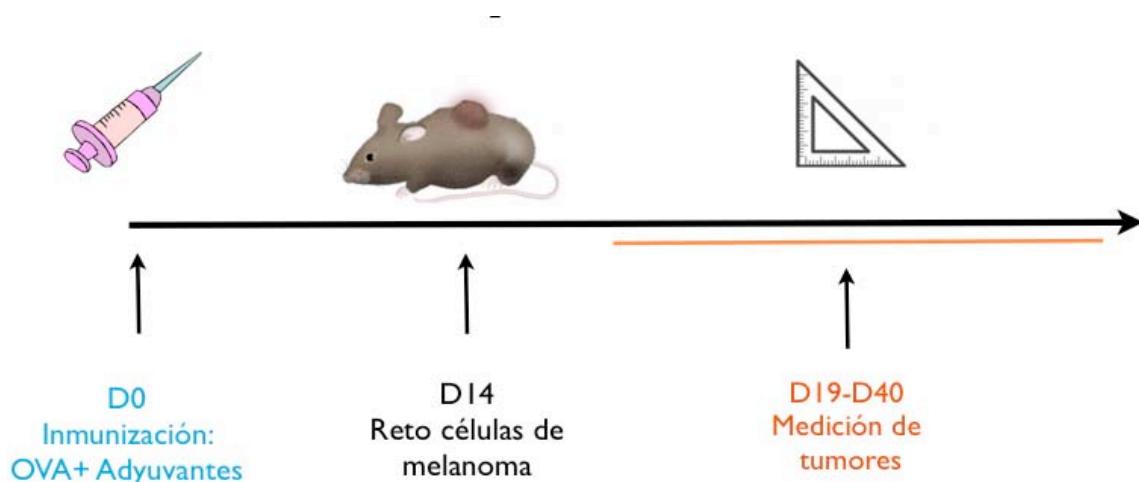
Una vez preparados los ratones, las células MO4 cosechadas fueron resuspendidas en una concentración de  $5 \times 10^5$  en 100 $\mu$ L medio RPMI sin suplementar por cada ratón. La suspensión celular se inyectó por la vía subcutánea en el costado derecho previamente depilado (una vez inoculadas las células se debe observar una protuberancia similar a una ampolla), y se monitoreó al rededor de 20 días el crecimiento del tumor. El volumen del tumor se calculó utilizando la fórmula  $(\text{diámetro mayor} \times \text{diámetro menor}^2)/2$ . Los ratones fueron sacrificados cuando se observó necrosis externa y/o el diámetro mayor del tumor rebasó los 2 cm (Purwar et al., 2012).

## 9. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para las diferentes estrategias experimentales (vacuna profiláctica, tratamiento intratumoral y vacuna terapéutica) se utilizaron grupos de 4-7 ratones hembras. En los animales donde se requerían inmunizaciones, estas fueron realizadas de manera subcutánea (cojinete plantar) con un volumen de 20µL-50µL por ratón distribuido en una o dos extremidades.

La dosis utilizadas de los adyuvantes αCD40 (25µg) con Poli I:C a (50µg) se determinó a partir de trabajos previos en el laboratorio. La dosis de LPPG como adyuvante se determinó a partir de la cantidad de molécula recuperada (< 3 mg totales) y el trabajo de Lotter et al (2009), donde se usó una cantidad de 10µg en ensayos *in vitro* e *in vivo*. La cantidad utilizada de αGalCer como adyuvante (2 µg) se determinó a partir de los trabajos reportados en la literatura para el modelo de melanoma B16 (Fujii et al., 2003) A continuación se resumen los diseños experimentales utilizados en este trabajo.

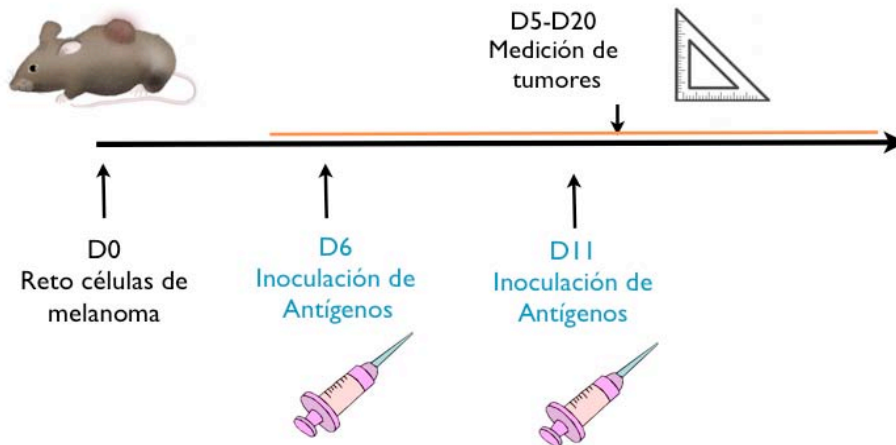
**Adyuvanticidad en una vacuna profiláctica.** En el modelo de vacuna profiláctica los animales fueron inmunizados con el antígeno tumor-específico OVA y adyuvantes. Catorce días después fueron retados con las células de melanoma B16-MO4, y a partir del día 5 postinoculación se monitoreó el crecimiento tumoral de los distintos grupos.



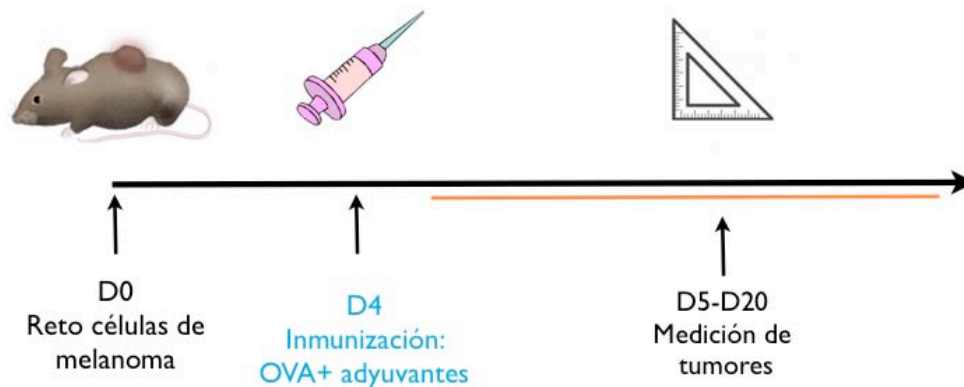
Los grupos evaluados fueron inmunizados de la siguiente manera (dosis/ratón).

Grupo de inmunización	Dosis/ratón
OVA	100 µg
OVA+EhLPPG	100µg + 10µg
OVA + αGalCer	100µg + 2µg
OVA+ αCD40+Poli I:C	100µg + 25µg + 50µg
PBS	100 µL

**Tratamiento intratumoral con LPPG.** Posteriormente, siguiendo una lógica similar a la utilizada en la *toxina de Coley*, se evaluó si las inoculación *in situ* de la LPPG sería capaz de controlar el crecimiento tumoral o inducir su rechazo, esto en ausencia del antígeno tumor-específico (OVA). Para ello se indujeron los tumores y, a la par de las mediciones del volumen tumoral (en los días 5-20 postinoculación), en los días 6 y 11 los ratones recibieron inoculaciones *in situ* de PBS (50  $\mu$ l) o LPPG (10  $\mu$ g/50  $\mu$ l).



**Adyuvanticidad en una vacuna terapéutica.** Para el modelo de vacunación terapéutica los ratones fueron primero retados con las células tumorales B16-MO4 para 4 días después recibir la vacuna con el antígeno tumor-específico más adyuvantes. El crecimiento tumoral fue evaluado a partir del día 5 al 20 postinoculación tumoral.



Los grupos comparados en estos experimentos fueron los siguientes:

Grupo de inmunización	Dosis/ratón
OVA	100 $\mu$ g
OVA + $\alpha$ GalCer	100 $\mu$ g + 2 $\mu$ g
OVA+EhLPPG	100 $\mu$ g + 20 $\mu$ g
$\alpha$ GalCer	2 $\mu$ g
EhLPPG	20 $\mu$ g

El crecimiento de los tumores se monitoreó de tal manera que se obtuvieran mediciones a los días 5, 10, 15 y 20. Los volúmenes calculados fueron graficados respecto al tiempo para comparar la curva de crecimiento de los tumores en los distintos grupos. También se compararon los volúmenes tumorales entre los distintos grupos al final de los experimentos. Por último, antes de su sacrificio, a los animales de estos últimos experimentos se les obtuvieron muestras de suero, y linfocitos CD3+ de ganglios drenantes, para los subsecuentes análisis en busca de indicadores relacionados al efecto observado (proliferación, citocinas).

*Análisis estadísticos.* Para determinar las diferencias estadísticas entre los grupos evaluados, se aplicó la prueba no paramétrica de t de Student para datos no pareados, realizados con el programa Prism 6 para Macintosh (GraphPad).

*Prueba de ELISA para IL-9 en suero y sobrenadantes de cocultivos.* (Purwar et al., 2012) reportaron la importancia de la respuesta antitumoral de células productoras de IL-9 en este modelo de melanoma murino. Por esta razón, decidimos evaluar la presencia de IL-9 en suero al final del experimento de vacuna terapéutica, así como su producción en cocultivos celulares de células T y APCs CD11c+ de los ratones en presencia del antígeno tumor-específico (OVA) .

En el día 20 después de la inoculación tumoral (finalización del experimento), se recuperaron muestras de suero por sangría de la vena facial. Posteriormente los ratones fueron sacrificados y se recuperaron las células CD3+ por selección negativa (panning), así como células CD11c+ mediante un kit de selección positiva con perlas magnéticas en columna, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (MACS, Miltenyi Biotec, Gladbach, Alemania). Los cocultivos se realizaron en placas de 96 pozos con fondo redondo a una proporción 3:1 de células CD3+:CD11c+, con  $1 \times 10^5$  células CD11c+. Las células se mantuvieron en presencia de 25µg de OVA/pozo, para 6 días después recuperar los sobrenadantes.

La cuantificación de IL-9 en suero y sobrenadantes se realizó empleando el respectivo kit de Biolegend (San Diego, CA, EUA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

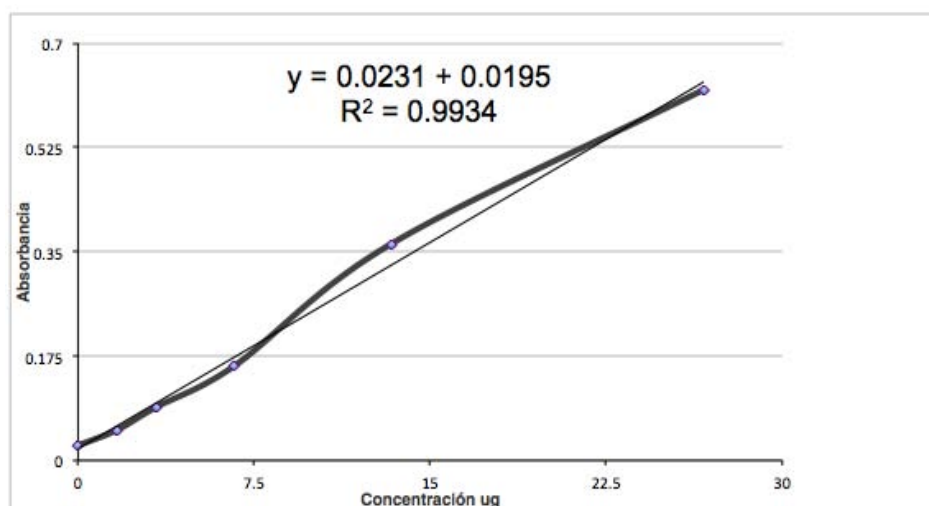
*Ensayo de proliferación de linfocitos.* Previo al ensayo de cocultivo, los linfocitos T fueron marcados con el fluorocromo de unión a proteínas citoplasmáticas CellTrace Violet (CTV) (Life Technologies) para medir su proliferación en presencia de APCs y el antígeno tumoral OVA. Al sexto día de cocultivo, las células se recuperaron y fueron preparadas para evaluar su proliferación mediante citometría de flujo.

## 10. RESULTADOS

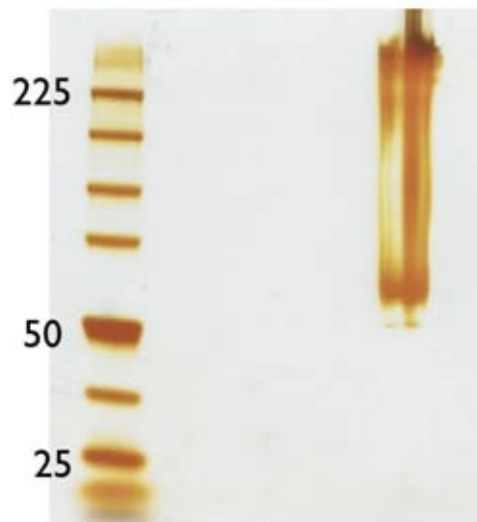
### 10.1 Obtención y caracterización de la Lipopéptido-fosfoglicana de *Entamoeba histolytica*

Se realizó un cultivo axénico de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* de la cepa HM1:IMSS en frascos de 75 cm<sup>2</sup>, cosechando las amibas durante la fase decrecimiento logarítmico (aprox. 50 frascos por 7-9 meses).

Para la extracción de la LPPG se obtuvo una biomasa de aproximadamente 40gr (peso húmedo). Se obtuvo LPPG por el método de extracción fenol-agua de Isibasi modificado Lotter y Gonzales-Roldán. La concentración de LPPG obtenida fue de 0.710 mg/ml cuantificando carbohidratos (el principal componente) por el método de antrona. Posteriormente se realizó la prueba de *Limulus spp.* para determinar la concentración de endotoxina, obteniendo 0.45 UE/ml. Finalmente se realizó un una electroforesis en gel y una tinción de carbohidratos, confirmando el barrido reportado de la molécula. El patrón de corrimiento corresponde a los descritos previamente (Alcántara-Hernandez, 2010; Lotter et al., 2009; Maldonado-Bernal et al., 2005), donde se observa un barrido característico de moléculas poliméricas.



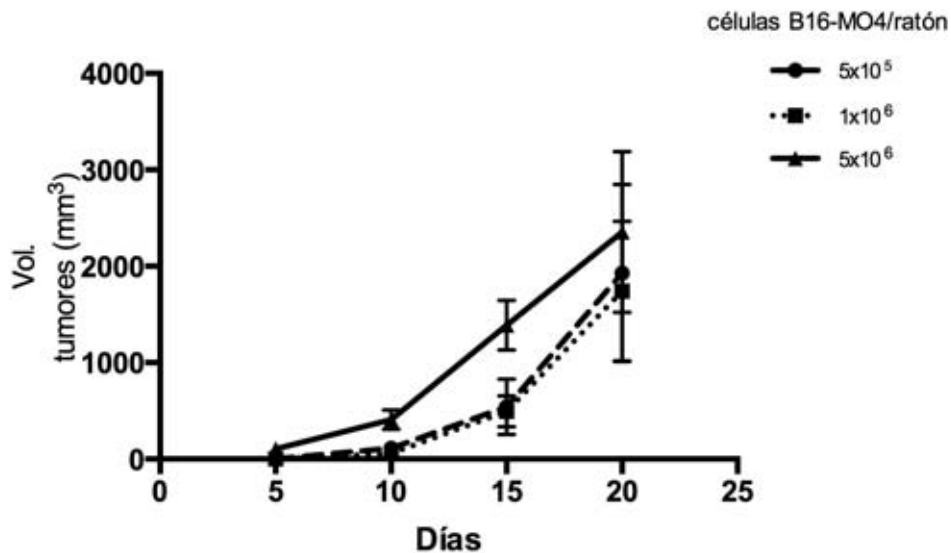
**Figura 8. Curva estándar de glucosa (Método de antrona).** Para determinar la cantidad de LPPG obtenida de la extracción se realizó una curva de referencia para carbohidratos (glucosa), comparando las absorbancias obtenidas contra las observancias medidas de muestras de LPPG, obteniendo una concentración de 710mg/mL de la molécula.



**Figura 9. Gel de poliacrilamida con el patrón de corrimiento de la EHLPPG.** Tras cuantificar la LPPG se procedió a la caracterización por electroforesis de la molécula obtenida, pudiendo observar el barrido caracterizado para la molécula, producto de la composición de carbohidratos de distintos pesos moleculares, pero distinto al LPS. Gel de poliacrilamida al 10% con tinción de plata.

## **10.2 Las células B16-MO4 son capaces de inducir un tumor sólido en los ratones hospederos**

Previo a la evaluación de la LPPG como adyuvante, se estandarizó el modelo de melanoma murino. Para ello utilizamos la línea celular B16-MO4 de fondo C57BL/6, con la cual se indujeron los tumores de melanoma en los ratones y se monitoreó el crecimiento del tumor a lo largo de 20 días. En esta etapa se probaron tres dosis de células de melanoma ( $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$ ) por cada ratón para determinar el crecimiento óptimo que permita evaluar la actividad adyuvante de la LPPG. Al mismo tiempo se buscó que los animales sobrevivan al menos 20 días y los tumores no crecieran más allá de 20mm de diámetro en cualquier dirección.



**Figura 10. Estandarización de dosis de células de melanoma para la inducción de tumores.** El modelo de melanoma murino se estandarizó evaluando distintas dosis de células B16-MO4 para poder llevar a cabo los experimentos subsecuentes. Los volúmenes y tiempo de desarrollo tumoral encontrados concuerdan con los trabajos reportados en la literatura. Se indican la media  $\pm$  e.s.,  $n=5$ .

No se observó una diferencia significativa en el crecimiento entre las dosis de  $5 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células de melanoma por ratón. En cuanto a la dosis de  $5 \times 10^6$ , el crecimiento tumoral fue más rápido, no obstante, los volúmenes tumorales finales eran similares.

Debido a la mayor facilidad para mantener los cultivos celulares, y la capacidad de supervivencia de los ratones por 20 días con los tumores, decidimos optar por la menor dosis ( $5 \times 10^5$  células B16-MO4/ratón) para los siguientes experimentos.

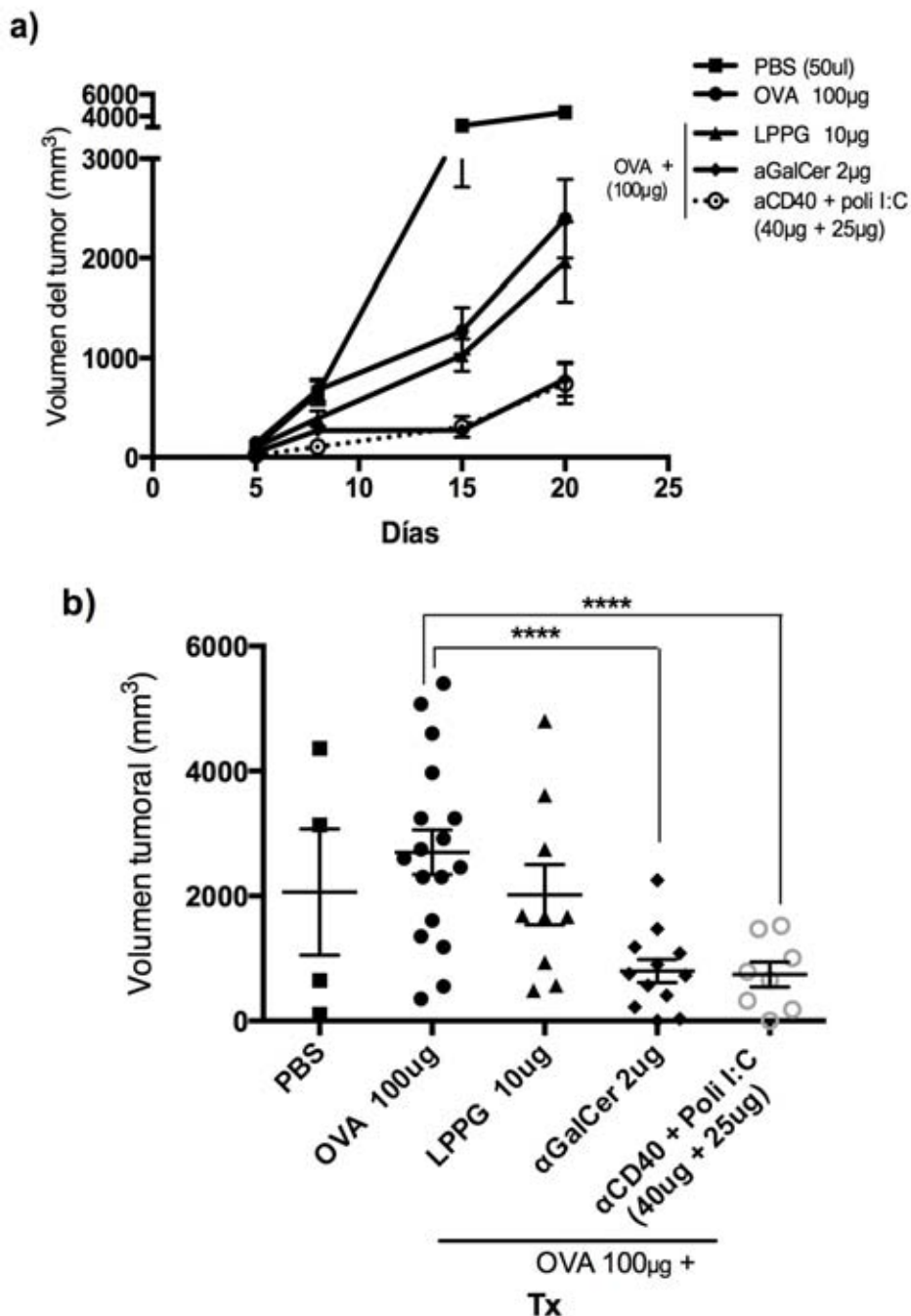
### 10.3 El uso de los la LPPG como adyuvante en un modelo de vacuna profiláctica no provocó algún efecto en el crecimiento de los tumores

Una vez comprobada la capacidad de las células MO4 de inducir tumores de manera reproducible, el siguiente objetivo fue evaluar el uso de la LPPG como adyuvante. En este sentido, fue importante evaluar a la LPPG comparándola con adyuvantes con eficiencia previamente demostrada en la protección contra tumores en el modelo de melanoma. Para comparar la LPPG con una molécula que también active células NKTs utilizamos  $\alpha$ GalCer. También comparamos a la LPPG con adyuvantes capaces de inducir la maduración de CPAs usando poli I:C junto con  $\alpha$ CD40.

El Ácido Policidílico-poliinosina (Poli I:C), es una molécula de RNA de doble cadena que actúa como ligando del TLR-3 (Alexopoulou et al., 2001), su uso junto con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ CD40 (imitando las funciones de CD40L) induce la maduración de células presentadoras. En esta etapa se evaluó la generación de memoria utilizando el antígeno tumor-específico OVA y los adyuvantes (LPPG,  $\alpha$ GalCer, poli I:C +  $\alpha$ CD40) 14 días antes del reto (ver la sección de diseño experimental).



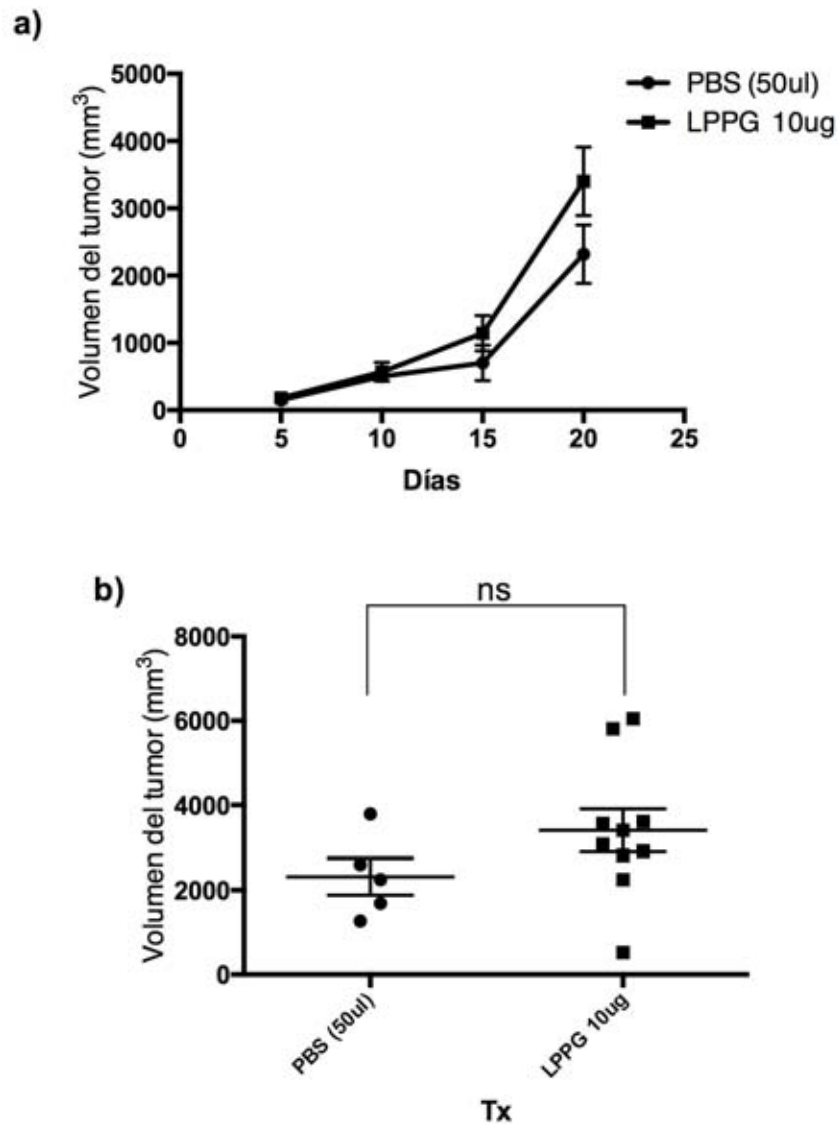
Bajo este esquema experimental se observó los animales inmunizados solamente con el antígeno OVA (100µg) o junto con la LPPG (10µg) como adyuvante, no controlaron el crecimiento tumoral. Además, los animales que no recibieron ningún tipo de inmunización mostraron un crecimiento exacerbado de tumores a lo largo de los experimentos. Solamente los animales que recibieron el antígeno tumor-específico OVA en presencia de los adyuvantes αGalCer (2µg) o bien, poli I:C (25µg) más αCD40 (40µg) mostraron un menor crecimiento tumoral a lo largo de los experimentos (valor  $P < 0.0001$ ), lo cual concuerda con los reportes de adyuvanticidad para estas moléculas.



**Figura 11. La inmunización profiláctica de OVA más LPPG no protegió a los animales contra el reto de células de melanoma B16-MO4.** En la parte superior a) se presentan los datos conjuntos de tres experimentos de crecimiento tumoral por 20 días. En la figura b) se muestran los volúmenes tumorales de los ratones que sobrevivieron al final de los 3 experimentos (día 20). Los animales inmunizados con OVA más los adyuvantes αGalCer o poli I:C más αCD40 mantuvieron un menor crecimiento tumoral en estos experimentos ( $P < 0.0001$ ). Se señalan la media  $\pm$  e.s., para cada experimento  $n=5-7$ .

#### 10.4 El tratamiento intratumoral con LPPG no produjo algún efecto en el crecimiento de los tumores

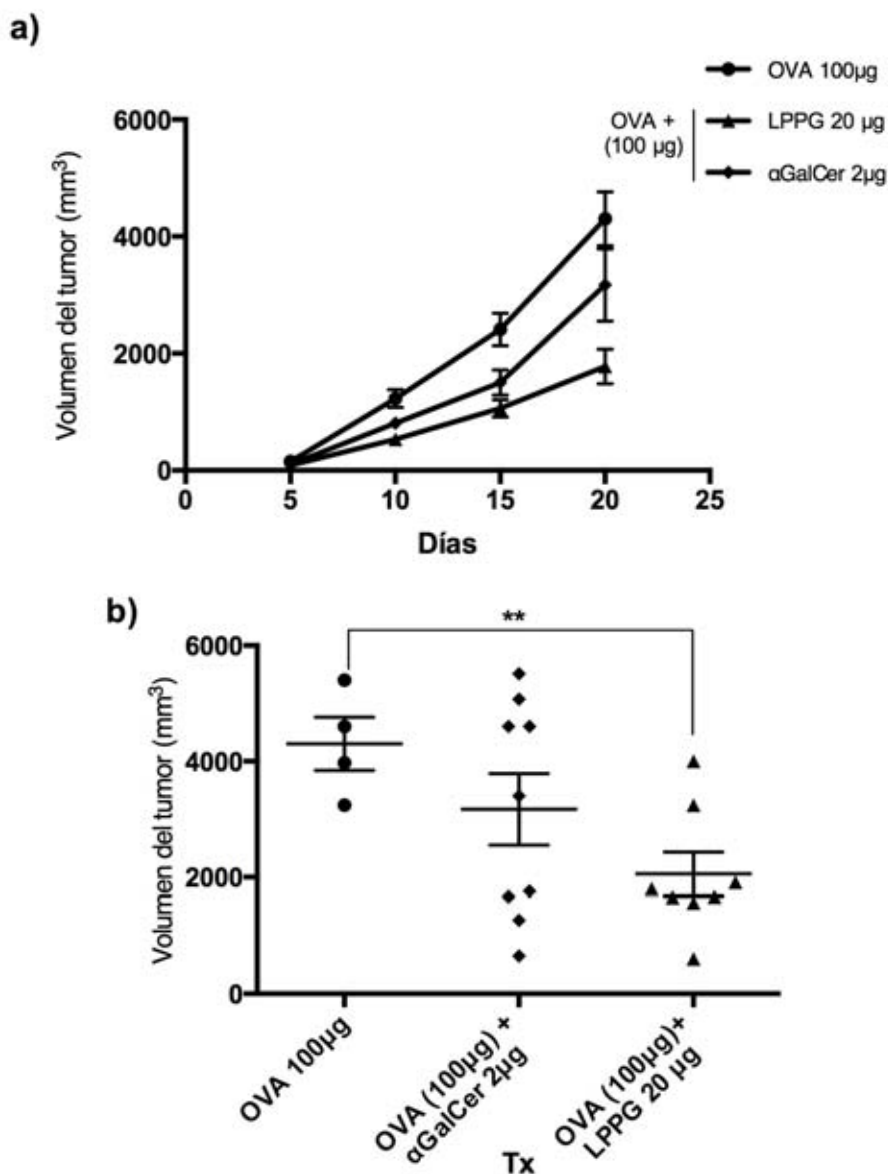
Posteriormente decidimos evaluar el potencial terapéutico de la LPPG al ser administrada intratumoralmente. La idea de usar el antígeno del parásito es similar al uso de la *toxina de Coley*, donde la administración *in situ* de extractos bacterianos es capaz de inducir la regresión tumoral. Para estos experimentos solamente se comparó la administración del antígeno contra el vehículo PBS y no se coadministró el antígeno tumor-específico OVA. Posterior de la inoculación de las células de melanoma, los animales recibieron tratamientos a los días 6 y 11. En este caso no se observó algún efecto en el tamaño de los tumores cuanto al uso de la LPPG. Inclusive se observó un ligero aumento en los tumores tratados con la molécula, sin embargo este no fue significativo ( $P < 0.05$ ).



**Figura 12. El tratamiento intratumoral de la LPPG no produjo ningún efecto significativo en el control de los tumores cuando se comparó con el vehículo PBS.** Las figuras son representativas de dos experimentos independientes. En **a)** se observa el crecimiento de los tumores por 20 días y en **b)** los volúmenes tumorales al final del experimento. Se muestra la media  $\pm$  e.s., en cada experimento  $n=6$ .

### 10.5 El uso como adyuvante de la LPPG en un modelo de vacuna terapéutica para un antígeno tumor-específico produjo un menor crecimiento tumoral

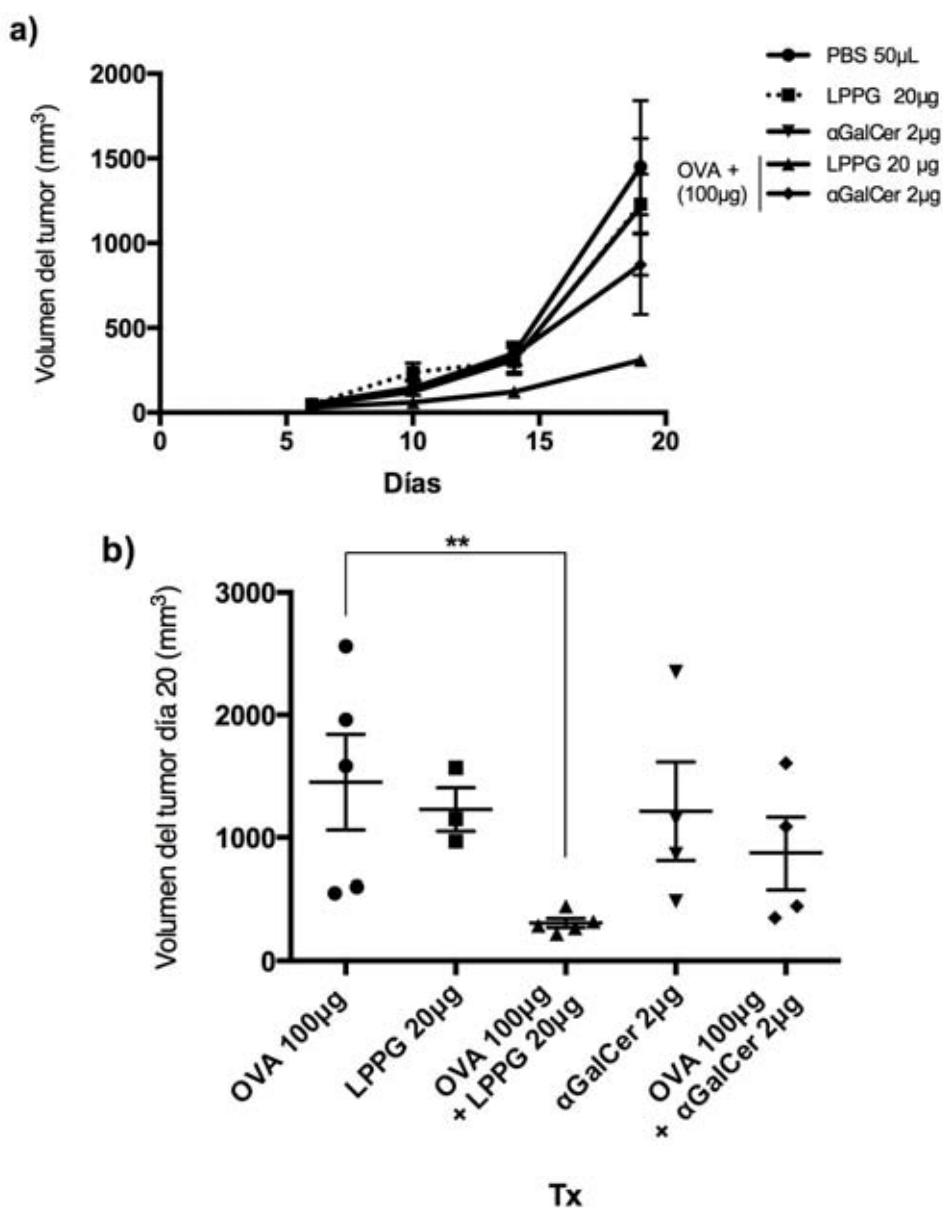
En vista de los resultados desfavorables hacia el uso de la LPPG como adyuvante e inmunógeno se realizó una ronda de experimentos utilizando a la LPPG a manera de adyuvante pero en esta ocasión apostando a una mayor dosis (20µg/ratón). En esta ocasión se evaluó un modelo de inmunización similar al utilizado en las vacunas terapéuticas, es decir, posterior al establecimiento de los tumores, pero anterior al desarrollo descontrolado de la malignidad. Específicamente el modelo consistió en primero inducir los tumores y cuatro días después los animales fueron inmunizados con el antígeno tumor-específico OVA con o sin los adyuvantes. En estos experimentos sólo se utilizó el adyuvante  $\alpha$ GalCer (2 µg) como adyuvante comparativo.



**Figura 13. El uso de la LPPG como adyuvante al antígeno tumor-específico en un modelo de vacunación terapéutica produjo un menor crecimiento tumoral.** Los animales tratados con OVA más LPPG mostraron un mejor control del crecimiento tumoral a lo largo de los experimentos comparado con los que solamente recibieron OVA u OVA +  $\alpha$ GalCer como adyuvante (valor  $P < 0.01$ ). Se muestran los datos conjuntos de dos experimentos independientes, indicando la media  $\pm$  e.s., en cada experimento  $n=5$ .

El uso de la LPPG como adyuvante de un antígeno tumor-específico en nuestro modelo de vacuna terapéutica permitió un crecimiento significativamente menor de los tumores en los ratones ( $P < 0.01$ ). Esto nos llevó a razonar sobre la posible implicación de células de la inmunidad adaptativa, donde la protección se perdería en ausencia del antígeno tumor-específico OVA. Por lo tanto, se realizó un tercer experimento con dos grupos de inmunización adicionales como control, usando las moléculas adyuvantes sin el antígeno tumor-específico OVA.

En la figura 14 se muestra el resultado de dicho experimento, en el que también se observa el efecto adyuvante de la LPPG. Además, dicho efecto inmunogénico sólo se observó en presencia del antígeno tumor-específico OVA, lo que concuerda con los experimentos de inoculación *in situ*.



**Figura 14.** El uso de la LPPG como adyuvante de un antígeno tumor-específico en un modelo de vacuna terapéutica le permite a los ratones controlar mejor el crecimiento tumoral. En ausencia del antígeno OVA se pierde observa un mayor crecimiento tumoral. Esto señala la importancia del uso tanto del antígeno proteico OVA y la LPPG como adyuvante para controlar los tumores en este modelo. Se indican la media  $\pm$  e.s. para un experimento con  $n=5$  y valor de  $P < 0.01$ .

En la figura 15 se presentan dos fotografías tomadas al término del experimento (día 20 postinoculación), donde se comparan los crecimientos tumorales de los grupos inmunizados con OVA y LPPG comparado con ratones inmunizados solamente con LPPG.



**Figura 15. Comparación del crecimiento tumoral en los grupos inmunizados con OVA más LPPG (izquierda) o solamente la molécula de LPPG (derecha).** El efecto sólo sobre el control tumoral solo se observó en presencia del antígeno tumor-específico OVA, validando la adyuvanticidad del antígeno microbiano.

Posteriormente se realizaron ensayos para indagar posibles mecanismos involucrados en el fenómeno observado. Para ello obtuvimos suero de los ratones al final del experimento y se les realizó una prueba de ELISA para detectar IL-9. En este modelo particular de melanoma, dicha citocina se ha asociado a una respuesta inmune protectora por parte de los linfocitos T CD4+ (Purwar et al., 2012). En otro ensayo, linfocitos T totales obtenidos de los ganglios linfáticos drenantes se cultivaron con APCs CD11c+ en presencia del antígeno tumor-específico OVA para evaluar tanto la capacidad de proliferación de los linfocitos como la producción de IL-9.

En dichos ensayos no se logró detectar la producción de IL-9 en suero como en los sobrenadantes de los cocultivos. Tampoco se detectó por citometría de flujo proliferación de células T en presencia de APCs CD11c+ y el antígeno tumoral OVA (datos no mostrados).

## 11. DISCUSIÓN

Un elemento clave para la formulación exitosa de vacunas es favorecer la maduración de células presentadoras con el fin de inducir una respuesta inmune antígeno-específica. Para tal propósito, el uso de adyuvantes como los ligandos de TLRs y antígenos presentados por CD1d se usan en vacunas experimentales contra cáncer (Cognac et al., 2014; Guy, 2007; Mellman et al., 2011). Esta estrategia resulta una alternativa en la clínica, cuando las terapias convencionales (radioterapia o quimioterapia) no son eficaces. También pueden complementar la inmunoterapia actual contra melanoma, donde se pretende suprimir la tolerancia o anergia a los tumores usando anticuerpos bloqueadores de CTLA-4 o PD-1 (Nikolaou et al., 2012; Rotte et al., 2015). Aún cuando lo ideal sería erradicar las malignidades avanzadas, un objetivo primordial de estos tratamientos es aumento en la sobrevida de los pacientes.

En la presente tesis, se realizó un cultivo axénico de trofozoitos de *Entamoeba histolytica* para obtener la molécula membranal Lipopéptido-fosfoglicana. Estos cultivos fueron monitoreados periódicamente con controles microbiológicos para evitar su contaminación. La LPPG ha mostrado capacidad de estimular TLRs (2, 4 y 6), así como activar células NKT a través de CD1d (Vivanco-Cid et al., 2007){Lotter 2009}. Debido a estas propiedades, se evaluó su capacidad adyuvante sobre un antígeno tumor-específico en un modelo de melanoma murino, una malignidad difícil de tratar.

Partiendo de una biomasa considerable de trofozoitos (>40gr peso húmedo), la concentración de LPPG obtenida con el *método de Isibasi modificado por Lotter* fue inferior a la reportada en estudios anteriores. En nuestro caso obtuvimos 0.710 mg/ml, muy por debajo a concentraciones por encima de 10 mg/ml reportadas anteriormente (Alcántara-Hernández, 2010). Esta pérdida considerable de producto podría atribuirse al uso de la solución Cloroformo-metano-agua (según el método de Lotter), la cual pretende eliminar contaminantes fosfolipídicos. A pesar de este inconveniente, se obtuvo suficiente producto para la realización de los distintos ensayos de este trabajo.

La cantidad de endotoxina medida en la solución de LPPG usada en los experimentos (0.45 UE/ml), es comparable a las utilizadas en reportes anteriores de Alcántara-Hernández (2010) y Gonzales-Roldán (2009) (0.41 y 0.25 UE/ml respectivamente). Esto sugiere que tanto el cultivo como el método de extracción se realizaron sin contaminación microbiológica o por endotoxina. De manera importante, esto también garantiza que los efectos biológicos observados se deben a la LPPG.

Después de aislar y caracterizar la LPPG, se prosiguió a realizar los experimentos para evaluar su capacidad adyuvante sobre un antígeno tumor-específico. Una vacuna de esta naturaleza pretende superar los mecanismos regulatorios e inmunosupresores presentes en el microambiente tumoral. Como se mencionó en la introducción, el bloqueo de estos mecanismos inmunosupresores son actualmente el principal blanco terapéutico en la

inmunoterapia contra el melanoma. Sin embargo, el diseño de vacunas también se considera una estrategia atractiva para su tratamiento.

Entre las limitantes para desarrollar vacunas contra el cáncer, conocer la identidad de los antígenos tumorales es de las más importantes a considerar. A excepción de ciertos tipos de cáncer inducidos por virus, los antígenos proteicos tumorales son en su mayoría epítomos de autoantígenos o autoantígenos alterados. En condiciones fisiológicas, estos antígenos no son inmunogénicos y son sometidos a mecanismos de tolerancia (Cognac et al., 2014). Por lo tanto, se requiere identificar antígenos específicos para cada caso, siendo que los antígenos tumorales pueden variar entre personas o incluso dentro del mismo tumor (Zhang et al., 2014).

Experimentalmente, para poder superar esta limitante, utilizamos células de melanoma B16-MO4 que expresan un antígeno exógeno definido (ovoalbúmina). En otros estudios, el uso de antígenos endógenos de melanoma (Trp, Melan-A) ofrece resultados similares al uso de OVA como antígeno tumor-específico (Overwijk and Restifo, 2001). Este modelo funciona como un trasplante de células singénicas (en la cepa murina C57BL/6), y tiene la ventaja de permitirnos conocer la identidad un antígeno tumor-específico y no ser intrínsecamente inmunogénico. Esta estrategia permite evaluar experimentalmente la adyuvancia de una molécula microbiológica como la LPPG.

Es importante señalar que los tumores derivados de células B16, comparado con otros tumores derivados de ratones C57BL/6, son menos inmunogénicos, posiblemente debido a que expresan bajos niveles de moléculas MHC-I (Ya et al., 2015). Además, hay que recalcar que nuestros resultados no requirieron de la transferencia adoptiva de células T CD8+ anti-OVA (OT-I), donde la respuesta inmune previa a los retos se encuentra sesgada. Esto permitió aprovechar el repertorio endógeno de células T para generar inmunidad antígeno-específica.

En resumen, a pesar de sus limitantes inherentes, los tumores derivados de células B16-MO4 son un modelo razonable del melanoma en humanos. Su crecimiento rápido, baja expresión de MHC-I, falta de respuesta a la quimioterapia y a la transferencia adoptiva de CTLs es comparable con las características de la enfermedad en humanos (Landsberg et al., 2012). Estas propiedades señalan a la evaluación de una inmunoterapia contra melanomas B16-MO4 como una prueba rigurosa a su efectividad, permitiéndonos valorar mejor los resultados derivados de este trabajo.

Como primer punto se evaluó la capacidad adyuvante de la LPPG en un esquema de vacunación profiláctica, es decir, primero se inmunizaron a los ratones y 14 días posteriores fueron retados con células de melanoma B16-MO4. Ante la falta de adyuvantes reportados con propiedades similares a la LPPG (activación de TLRs y presentación por CD1d), usamos adyuvantes cumplieran con la capacidad de: **i)** inducir la maduración de APCs con agonistas de TLRs, como el Poli I:C (agonista de TLR-3) que junto con  $\alpha$ CD40 tiene un efecto antitumoral antígeno-específica; y **ii)** que pueda activar

células NKTs a través de su presentación por CD1d, como la  $\alpha$ GalCer, adyuvante evaluado incluso en vacunas en humanos.

En esta ronda de experimentos (3 en total), no se observó algún efecto de la LPPG como adyuvante al reto con células B16-MO4. Bajo las condiciones evaluadas, una inmunización con OVA (100  $\mu$ g) y LPPG (10  $\mu$ g) no mostró un efecto adyuvante sobre el antígeno tumor-específico, a excepción de un experimento donde los tumores sí tenían un crecimiento significativamente menor ( $P < 0.05$ ) (datos no mostrados).

Por su parte, los ratones inmunizados ya sea con OVA más  $\alpha$ CD40 y poli I:C, u OVA y  $\alpha$ GalCer mostraron un crecimiento significativamente menor a los grupos control ( $P < 0.0001$ ). Estos resultados son congruentes con los reportados previamente para estos adyuvantes, reforzando la evidencia hacia su uso, tanto en vacunas contra el cáncer como en vacunas contra patógenos (Fujii et al., 2003; O'Hagan and Fox, 2015; Olafsdottir et al., 2015). Sería interesante evaluar si las células que lograron proliferar en estos grupos aún mantienen la expresión del antígeno OVA. Los ratones que no recibieron ningún tipo de antígeno previo al reto (grupo con PBS), mostraron un crecimiento descontrolado de sus tumores, además de una menor supervivencia antes de los 20 días postinoculación.

Sobre el uso de la LPPG como adyuvante profiláctico, diversos factores pudieron afectar su desempeño. Entre estos se pueden mencionar la incapacidad para estimular la maduración de las APCs, al menos con una sola dosis. De acuerdo a esta lógica, aún cuando las APCs sean capaces de acceder tanto al antígeno como al adyuvante LPPG, se podrían presentar al menos los siguientes escenarios:

- a) Las APCs no son capaces de responder a la inmunización. En este escenario las APCs son capaces de procesar y presentar el antígeno OVA en el contexto MHC-I, sin embargo el adyuvante es incapaz de activar eficientemente los TLRs y/o ser presentado por CD1d. Esto privaría de señales de maduración a las APCs, y por lo tanto de las células efectoras. Esto derivaría en la incapacidad de montar una respuesta inmune de memoria contra el antígeno, dado que el crecimiento de los tumores no mostró diferencia aparente respecto a los grupos inmunizados solamente con OVA.
- b) Las APCs son capaces responder a la inmunización pero solo de manera transitoria. En este caso las APCs pueden madurar y presentar el antígeno OVA a través del MHC-I y son estimuladas por la LPPG a través de TLRs y/o CD1d. Sin embargo, esta estimulación solo sería transitoria e insuficiente para generar memoria, por lo que aún cuando hubiera algún tipo de respuesta efectora, esta sería irrelevante al momento del reto con el melanoma.

En estos experimentos se utilizó una dosis de LPPG probada previamente en nuestro grupo (10  $\mu$ g), bajo la cual se observaron efectos biológicos relevantes (Lotter et al., 2009). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que dicha dosis fue evaluada en un modelo



de amibiasis, donde el tipo reto por infección y la vía de administración difieren con respecto a nuestros experimentos. Es importante realizar más experimentos utilizando distintas dosis y más de una inmunización para poder descartar completamente el uso de la LPPG como adyuvante en una vacuna profiláctica.

En los siguientes experimentos nos enfocamos en evaluar el uso de la LPPG como inmunomestimulante intratumoral, siguiendo una lógica similar al uso de la *toxina de Coley*, la cual actúa estimulando diversos PRRs en las células presentes en el ambiente tumoral, aumentando su inmunogenicidad y estimulando una respuesta inmune de rechazo. Los grupos tratados se compararon con la administración del vehículo PBS. En estos experimentos no se utilizó el antígeno tumor-específico OVA, en busca de una estimulación antitumoral generalizada. Para ello se administraron las células tumorales, y posteriormente se realizaron dos administraciones intratumorales de la LPPG o PBS (día 6 y 11 postinoculación). La medición de los volúmenes tumorales a durante los experimentos no mostró algún efecto de la LPPG, incluso los volúmenes tumorales de los ratones tratados con el antígeno mostraron un crecimiento ligeramente mayor que los controles, sin embargo este no fue significativo ( $P < 0.05$ ).

Entre las posibles explicaciones al efecto observado podemos mencionar que la presencia de la LPPG intratumoral podría activar mecanismos inflamatorios, pero no inmunogénicos. Un fenómeno ampliamente caracterizado en cáncer, donde la presencia de células y citocinas inflamatorias asociadas en el microambiente tumoral promueven su crecimiento, angiogénesis e invasividad (Coussens et al., 2013; Grivennikov et al., 2010). Diversas células del sistema inmune podrían intervenir en este proceso, incluyendo a las propias células de melanoma, las cuales son capaces de expresar TLR-4 (Pichika et al., 2013). La LPPG por si sola mostró incapacidad para revertir la tolerancia tumoral, a diferencia de la *toxina de Coley* que posee distintos ligandos de TLRs. Sería interesante evaluar el efecto de este tratamiento utilizando formulaciones que aumenten la distribución de nuestra molécula dentro del tumor, como sería mediante el uso de liposomas o formulaciones agua-aceite (Cordeiro et al., 2015).

Ante la inefectividad demostrada por la LPPG como adyuvante profiláctico o como agente inmunoestimulador, decidimos realizar una última ronda de experimentos donde los ratones serían tratados con una vacuna de tipo terapéutico. Este tipo de vacunas son utilizadas cuando el sistema inmune falla en la liberación del hospedero de una infección, o para provocar una respuesta inmune contra un tumor establecido. Las vacunas terapéuticas tienen un perfil de riesgo/beneficio diferente a las vacunas profilácticas, que se administran a poblaciones libres de enfermedad. Además, este tipo de vacunas pueden requerir una modulación del sistema inmune distinta, ya que tanto las infecciones crónicas como el cáncer se asocian a estados inmunosuprimidos (Kamphorst et al., 2015).

A diferencia de los resultados previos, el uso de la LPPG como adyuvante en una vacuna de tipo terapéutica logró retardar el crecimiento tumoral. En esta ronda de experimentos los ratones eran retados con las células de melanoma y cuatro días posteriores recibían

una sola inmunización con el antígeno tumor-específico OVA o junto con los adyuvantes LPPG o  $\alpha$ GalCer como control. A lo largo de los experimentos (20 días) solo los ratones inmunizados con OVA y LPPG controlaron mejor el crecimiento tumoral (figura 13).

La dosis utilizada para los experimentos de vacuna terapéutica fue mayor que en los experimentos de vacuna profiláctica (20 y 10 $\mu$ g respectivamente). No obstante, es difícil atribuir esta diferencia observada solamente a las dosis referidas, dado que las cantidades se mantienen en el mismo orden de magnitud. Para poder descartar el efecto de la dosis *per se*, sería ideal realizar ambos experimentos evaluando la distintas dosis.

En vista de este resultado, quisimos identificar los posibles mecanismos involucrados. Para ello se realizó un experimento donde los ratones recibirían los tratamientos utilizados anteriormente (OVA, OVA + LPPG y OVA +  $\alpha$ GalCer); pero además, se incluyeron grupos inmunizados solo con los adyuvantes. La idea detrás de este experimento fue saber si la respuesta antitumoral observada se debió a una respuesta antígeno específica sobre los tumores que expresan OVA o si resultó de una activación general e inespecífica, posiblemente mediada por PRRs y el sistema inmune innato. Este experimento también indicó que solamente cuando inmunizamos a los animales con el antígeno OVA y LPPG como adyuvante, el crecimiento de los tumores disminuía. Al igual que los experimentos intratumorales, la sola presencia de la LPPG no fue suficiente para inducir una respuesta antitumoral. De igual manera, sugiere la participación de células del sistema inmune adaptativo, como las células T, para reconocer epítomos derivados de OVA.

También se recuperó y estimuló *ex vivo* células dendríticas autólogas y linfocitos T (CD3+) de ganglios drenantes, esto en presencia del antígeno OVA. Después de seis días de cocultivo se evaluó la capacidad de proliferación y producción de IL-9 de los linfocitos. En ambos ensayos no identificamos diferencia significativa de los controles. A pesar de ello, no se descarta la posibilidad de observar alguna actividad de respuesta bajo otras condiciones, como sería la evaluación de la toxicidad directa hacia células B16-MO4. Asimismo, sería importante comparar estos experimentos usando linfocitos recuperados del ambiente intratumoral o circulantes, dado que son lugares ideales para encontrar células efectoras terminales (Sathaliyawala et al., 2013).

En los experimentos realizados, el uso de la LPPG como adyuvante en una vacuna profiláctica o terapéutica tiene resultados distintos, distinguiendo entre la inmunidad efectora y de memoria. Revisando la literatura sobre los mecanismos involucrados en la generación de la respuesta inmune adaptativa, se aprecia un panorama complejo de dicho proceso. Las células T efectoras y de memoria no representan un solo tipo celular sino que exhiben una considerable heterogeneidad desde las perspectivas fenotípica, funcional, anatómica y de desarrollo. En particular, la ontogenia de las células de memoria y su interrelación con los diferentes tipos de células T efectoras es considerado entre los temas más controversiales y estudiados en la inmunología actual (Chang et al., 2014; Crompton et al., 2015).

Los estudios experimentales en ratón, sugieren un modelo canónico para la generación de una inmunidad adaptativa por linfocitos T (Jiang et al., 2015; Kaech and Cui, 2012), donde se propone que, en respuesta a antígenos extraños, los linfocitos T naive llevan a cabo una respuesta compuesta de tres fases:

1. La *activación y expansión* clonal durante las primeras dos semanas, donde las células adquieren funciones de citotoxicidad y producción de citocinas;
2. posterior al pico de expansión, se ha observado que las células efectoras terminales sufren una fase de *contracción*, donde la mayoría de las células antígeno-específicas mueren por apoptosis (90-95% aproximadamente);
3. y por último la etapa donde se observan células T sobrevivientes a la fase de contracción (entre 5-10%), las cuales poseen marcadores de memoria (CD44+, CD45RO+, CCR7+, CD62L+).

Las células efectoras o de memoria generadas en dicho proceso, son capaces de mediar la protección inmediata o a largo plazo. Los factores determinantes de la diferenciación entre células efectoras y de memoria pueden ser variados. Entre estos se incluyen la intensidad de la señal del TCR, moléculas coestimuladoras, citocinas inflamatorias, microambiente del tejido, reguladores metabólicos y metabolitos, factores de transcripción específicos o el tipo de división celular (simétrico o asimétrico). Estos factores no son mutuamente excluyentes y pueden actuar de manera concertada, dando lugar a fenotipos heterogéneos.

Existen distintas hipótesis para tratar de explicar cómo se forman ambos subconjuntos durante las tres fases, entre los que se incluyen los modelos siguientes:

1. sucesión lineal (naive → efectora → memoria o naive → memoria → efectora);
2. precursores diferentes (naive → efectora, naive → memoria);
3. diferenciación decreciente, donde las células efectoras pierden progresivamente la capacidad de diferenciarse a células de memoria conforme consolidan su fenotipo;
4. un modelo donde la intensidad de señalización y coestimulación durante la presentación antigénica determinan su fenotipo posterior;
5. y el modelo de división celular asimétrica, donde la misma célula precursora da lugar a las subpoblaciones efectoras y de memoria.

De manera importante, dichos modelos no son mutuamente excluyentes y en términos generales coinciden en el resultado final, donde potencialmente se obtienen células con potencial de memoria y longevidad, y por otro lado células efectoras de respuesta aguda (Kaech and Cui, 2012).

En los experimentos de vacunación profiláctica, donde no se observó protección inmunológica, el reto con melanoma se presentaría justo al final de la fase de contracción (dos semanas posteriores a la inmunización). La vacunación terapéutica por su parte (cuatro días después del reto), donde se observó menor crecimiento tumoral, si pudo

haber ocurrido durante la fase de expansión de células efectoras, lo que puede generar una respuesta inmune aguda.

La diferencia en la respuesta inducida por el tipo de vacunación refleja la complejidad en la generación y desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. En un estudio reciente (Buchholz et al., 2013), al realizar el seguimiento *in vivo* de células se observó una diferenciación progresiva desde células de memoria de proliferación lenta hacia células efectoras de expansión rápida. Dado que la población de células de memoria declinó rápidamente (8 días), los autores sugieren que la generación y mantenimiento de la memoria inmunológica puede ser independiente a la expansión de células efectoras, por lo que una respuesta aguda no necesariamente implica el mantenimiento de memoria inmunológica.

Sobre la misma línea de estudios, Gerlach y colaboradores reportaron que, individualmente, los linfocitos T naive contribuyen de manera distinta a la protección a corto y largo plazo. El seguimiento individual *in vivo* de linfocitos mostró que la diferenciación, expansión, y capacidad de generar memoria varía entre una célula y otra. Esta variabilidad podría deberse a diferencias intrínsecas y extrínsecas, como las mencionadas anteriormente (Gerlach et al., 2013). Aunado a ello, las diferencias en el estatus de los hospederos (presencia o ausencia de tumores) también podrían contribuir a una respuesta distinta a las inmunizaciones profilácticas y terapéuticas, sin embargo los mecanismos subyacentes quedan fuera del alcance de nuestros estudios.

También es propio mencionar que existen diferencias fundamentales entre los estudios mencionados, el cáncer y nuestro modelo experimental, dado que la mayor parte de nuestro conocimiento respecto a la generación de inmunidad adaptativa proviene de estudios con virus y bacterias intracelulares. En el caso de los patógenos, los antígenos son exógenos y de mayor inmunogenicidad, dado que no involucran mecanismos de tolerancia, mientras que los antígenos tumorales son en su mayoría autoantígenos sometidos a mecanismos de tolerancia central o periférica (Kim and Ahmed, 2010).

En nuestro modelo usamos células tumorales que expresan el antígeno exógeno OVA, no obstante debemos recordar que dicho antígeno no es inmunogénico intrínsecamente, lo cual nos permite evaluar el uso de adyuvantes. También se ha observado previamente que los animales inmunizados con OVA que son capaces de sobrevivir al reto con células B16-MO4, también generan inmunidad protectora hacia células de melanoma parentales que no expresan dicho antígeno. Presumiblemente como consecuencia de una respuesta hacia otros antígenos (Falo et al., 1995). El uso de antígenos específicos de melanoma (gp100, Melan-A, tirosinasa, TRP-1 y TRP-2), tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos, puede brindar mayor claridad acerca de la efectividad de la LPPG como adyuvante y la generación de respuesta anti-melanoma.

Los resultados derivados de este trabajo resaltan la capacidad adyuvante de la LPPG para generar una inmunidad efectora aguda, sin embargo no se observa la generación de

memoria inmunológica hacia el antígeno tumor-específico. Queda por determinar el grado de contribución a la adyuvancia de la LPPG que provienen de la activación de TLRs o presentación por CD1d, o incluso otro mecanismo aún no descrito. También queda por definir la localización, identidad de los tipos celulares y mecanismos moleculares involucrados en los efectos inmunológicos observados.

## 12. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente proyecto nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

- El uso como adyuvante de la Lipopéptido-fosfoglicana obtenida de la cepa virulenta de *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS (EhLPPG) en una sola dosis de una vacuna profiláctica contra un antígeno tumor-específico no indujo una protección cuando se realizaron retos con células de melanoma B16-MO4.
- La inoculación intratumoral de la EhLPPG no provocó un rechazo o disminución de los tumores ya establecidos en los animales de experimentación. También se observó un crecimiento ligeramente mayor a los controles, sin embargo este no fue estadísticamente significativo.
- El uso como adyuvante de la EhLPPG en una sola dosis de una vacuna terapéutica contra un antígeno-tumor específico indujo un menor crecimiento de los tumores de melanoma B16-MO4 a los largo de 20 días, y este efecto no se observa en ausencia del antígeno tumoral durante la inmunización.

## 13. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se evaluó el potencial adyuvante de la EhLPPG hacia un antígeno tumor-específico en un modelo *in vivo* de melanoma. Dada la capacidad observada de generar una respuesta aguda contra el antígeno, se proponen las siguientes perspectivas del trabajo:

- Mejorar el método de obtención de la LPPG para poder obtener un mayor rendimiento con una menor disposición de biomasa de trofozoítos.
- Determinar la relación dosis-respuesta de la LPPG como adyuvante en los modelos de vacunación profiláctica y terapéutica.
- Definir el perfil de respuesta efectora generada por la vacuna en este modelo, así como los tipos celulares y citocinas claves en la generación de inmunidad.
- Determinar en la LPPG el grado de contribución entre la actividad agonista de TLRs y la presentación por CD1d sobre los efectos inmunogénicos observados.
- Comparar la adyuvancia de la LPPG proveniente de distintas cepas de *Entamoeba histolytica*, así como distintas sustancias de acarreo como emulsiones o liposomas.
- De igual manera es importante evaluar la capacidad adyuvante de la LPPG en otros modelos de tumores o incluso en modelos de infecciones agudas, como las virales.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

Alcántara-Hernandez, M. (2010). Evaluación de la respuesta inmune innata a la lipopéptidofosfoglicana de cepas de *Entamoeba histolytica* con diferentes grados de virulencia a través de Receptores tipo Toll. (Thesis) In Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica (Ciudad de México, Instituto Politécnico Nacional), p. 52.

Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S.-i., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., and Steinman, R.M. (2004). In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination. *Journal of Experimental Medicine* 199, 815-824.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine* 196, 1627-1638.

Buchholz, V.R., Flossdorf, M., Hensel, I., Kretschmer, L., Weissbrich, B., Gräf, P., Verschoor, A., Schiemann, M., Höfer, T., and Busch, D.H. (2013). Disparate Individual Fates Compose Robust CD8+ T Cell Immunity. *Science* 340, 630-635.

Cann, S. H., Van Netten, J. P., & Van Netten, C. (2003). Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate Medical Journal*, 79(938), 672-680.

Chang, J.T., Wherry, E.J., and Goldrath, A.W. (2014). Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nature Immunology* 15, 1104-1115.

Cordeiro, A.S., Alonso, M.a.J., and de la Fuente, M.a. (2015). Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. *Biotechnology Advances*.

Corgnac, S., Perret, R., Zhang, L., Mach, J. P., Romero, P., & Donda, A. (2014). iNKT/CD1d-antitumor immunotherapy significantly increases the efficacy of therapeutic CpG/peptide-based cancer vaccine. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2(1), 1-12.

Coussens, L.M., Zitvogel, L., and Palucka, A.K. (2013). Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science* 339, 286-291.

Crompton, J.G., Narayanan, M., Cuddapah, S., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Yang, W., Patel, S.J., Sukumar, M., Palmer, D.C., and Peng, W. (2015). Lineage relationship of CD8&plus;



T cell subsets is revealed by progressive changes in the epigenetic landscape. *Cellular & molecular immunology*.

de Visser, K.E., Eichten, A., and Coussens, L.M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature reviews Cancer* 6, 24-37.

Duthie, M.S., Kahn, M., White, M., Kapur, R.P., and Kahn, S.J. (2005). Both CD1d Antigen Presentation and Interleukin-12 Are Required To Activate Natural Killer T Cells during *Trypanosoma cruzi* Infection. *Infection and Immunity* 73, 1890-1894.

Eggermont, A.M.M. (2010). Advances in systemic treatment of melanoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 21 Suppl* 7, vii339-vii344.

Falo, L.D., Kovacsovics-Bankowski, M., Thompson, K., and Rock, K.L. (1995). Targeting antigen into the phagocytic pathway in vivo induces protective tumour immunity. *Nature medicine* 1, 649-653.

Fujii, S.i., Shimizu, K., Smith, C., Bonifaz, L., and Steinman, R.M. (2003). Activation of Natural Killer T Cells by  $\alpha$ -Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells In Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein. *Journal of Experimental Medicine* 198, 267-279.

Gazzinelli, R.T., and Denkers, E.Y. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews Immunology* 6, 895-906.

Gerlach, C., Rohr, J.C., Perie, L., van Rooij, N., van Heijst, J.W.J., Velds, A., Urbanus, J., Naik, S.H., Jacobs, H., Beltman, J.B., *et al.* (2013). Heterogeneous Differentiation Patterns of Individual CD8<sup>+</sup> T Cells. *Science* 340, 635-639.

Gonzalez, N.E.H. (2011). El melanoma en México. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 1-4.

Gonzalez-Aseguinolaza, G., Van Kaer, L., Bergmann, C.C., Wilson, J.M., Schmiege, J., Kronenberg, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., Koezuka, Y., and Tsuji, M. (2002). Natural killer T cell ligand  $\alpha$ -galactosylceramide enhances protective immunity induced by malaria vaccines. *The Journal of experimental medicine* 195, 617-624.

Grivnickov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140, 883-899.

Guy, B. (2007). The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology* 5, 505-517.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hennessy, E.J., Parker, A.E., and O'Neill, L.A.J. (2010). Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 293-307.
- Isibasi-Araujo, A., C., S.M., M., S., Ramirez-Aguilar, M., and Kumate, J. (1982a). Localization of a lipopeptidophosphoglycan extracted by phenol-water from trophozoites of the HK-9 strain of *Entamoeba histolytica*. *Arch investigación Médica* 13, 57-62.
- Isibasi-Araujo, A., M., S.C., Ramirez-Aguilar, M., and Kumate, J. (1982b). Immunochemistry of a lipopeptidophosphoglycan extracted from trophozoites of *Entamoeba histolytica* strain HK-9 cultivated in axenic media, using the phenol-water method. *Archivos de Investigación Médica* 13, 51-55.
- Jiang, Y., Li, Y., and Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death & Disease* 6, e1792.
- Kaech, S.M., and Cui, W. (2012). Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature Reviews Immunology* 12, 749-761.
- Kamphorst, A.O., Araki, K., and Ahmed, R. (2015). Beyond adjuvants: Immunomodulation strategies to enhance T cell immunity. *Vaccine* 33, B21-B28.
- Kaufman, H.L., Kirkwood, J.M., Hodi, F.S., Agarwala, S., Amatruda, T., Bines, S.D., Clark, J.I., Curti, B., Ernstoff, M.S., and Gajewski, T. (2013). The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* 10, 588-598.
- Kim, P.S., and Ahmed, R. (2010). Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology* 22, 223-230.
- Kunii, N., Horiguchi, S., Motohashi, S., Yamamoto, H., Ueno, N., Yamamoto, S., Sakurai, D., Taniguchi, M., Nakayama, T., and Okamoto, Y. (2009). Combination therapy of in vitro-expanded natural killer T cells and  $\alpha$ -galactosylceramide-pulsed antigen-presenting cells in patients with recurrent head and neck carcinoma. *Cancer Science* 100, 1092-1098.
- Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wölfel, T., Hölzel, M., and Tüting, T. (2012). Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490, 412-416.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2002). Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *The Journal of experimental medicine* 196, 1091-1097.
- Llopiz, D., Dotor, J., Zabaleta, A., Lasarte, J.J., Prieto, J., Borrás-Cuesta, F., and Sarobe, P. (2008). Combined immunization with adjuvant molecules poly(I:C) and anti-CD40 plus a

tumor antigen has potent prophylactic and therapeutic antitumor effects. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 57, 19-29.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., and Amon, A. (2013). *Molecular Cell Biology*, seventh edn (New York: W. H. Freeman and Company).

Lotter, H., González-Roldán, N., Lindner, B., Winau, F., Isibasi, A., Moreno-Lafont, M., Ulmer, A.J., Holst, O., Tannich, E., and Jacobs, T. (2009). Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. *PLoS pathogens* 5, e1000434.

Maldonado-Bernal, C., Kirschning, C.J., Rosenstein, Y., Rocha, L.M., Rios-Sarabia, N., Espinosa-Cantellano, M., Becker, I., Estrada, I., Salazar-González, R.M., Lopez-Macias, C., *et al.* (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. *Parasite immunology* 27, 127-137.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 31, 787-798.

Mattarollo, S.R., West, A.C., Steegh, K., Duret, H., Paget, C., Martin, B., Matthews, G.M., Shortt, J., Chesi, M., Bergsagel, P.L., *et al.* (2012). NKT cell adjuvant-based tumor vaccine for treatment of myc oncogene-driven mouse B-cell lymphoma. *Blood* 120, 3019-3029.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480-489.

Meraz, E., and Isibasi-Araujo, A. (1986). Detection of class IgA antibodies directed against a lipopeptidophosphoglycan of *E. histolytica* in samples of human colostrum. *Archivos de investigación médica* 02/1986; 17 Suppl 1(supplement 1):291-5.

Nikolaou, V.A., Stratigos, A.J., Flaherty, K.T., and Tsao, H. (2012). Melanoma: New Insights and New Therapies. *Journal of Investigative Dermatology* 132, 854-863.

O'Hagan, D.T., and Fox, C.B. (2015). New generation adjuvants, From empiricism to rational design. *Vaccine* 33, B14-B20.

Olafsdottir, T., Lindqvist, M., and Harandi, A.M. (2015). Molecular signatures of vaccine adjuvants. *Vaccine*.

Overwijk, W.W., and Restifo, N.P. (2001). B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*, 20.21. 21-20.21. 29.

Pepper, J.W., Dunn, B.K., Fagerstrom, R.M., Gohagan, J.K., and Vydellingum, N.A. (2014). Using Systems Biology to Understand Cancer as an Evolutionary Process. *Journal of Evolutionary Medicine* 2014, 1-8.

- Pichika, M., Mai, C.W., and Kang, Y.B. (2013). Should a Toll-like receptor 4 (TLR-4) agonist or antagonist be designed to treat cancer? TLR-4: its expression and effects in the ten most common cancers. *OncoTargets and Therapy*, 1573.
- Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H.S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A.M., Khoury, S.J., Fuhlbrigge, R.C., Kuchroo, V.K., *et al.* (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9–producing T cells. *Nature medicine*.
- Rotte, A., Bhandaru, M., Zhou, Y., and McElwee, K.J. (2015). Immunotherapy of melanoma: Present options and future promises. *Cancer and Metastasis Reviews*.
- Sathaliyawala, T., Kubota, M., Yudanin, N., Turner, D., Camp, P., Thome, J.J.C., Bickham, K.L., Lerner, H., Goldstein, M., Sykes, M., *et al.* (2013). Distribution and Compartmentalization of Human Circulating and Tissue-Resident Memory T Cell Subsets. *Immunity*.
- Seiler, M.P., Mathew, R., Liszewski, M.K., Spooner, C., Barr, K., Meng, F., Singh, H., and Bendelac, A. (2012). Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nature Immunology*, 1-10.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., and Inaba, K. (2003). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 987, 15-25.
- Tarabichi, M., Antoniou, A., Saiselet, M., Pita, J.M., Andry, G., Dumont, J.E., Detours, V., and Maenhaut, C. (2013). Systems biology of cancer: entropy, disorder, and selection-driven evolution to independence, invasion and “swarm intelligence”. *Cancer and Metastasis Reviews* 32, 403-421.
- Terabe, M., and Berzofsky, J. (2008). Chapter 8 The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Advances in Cancer Research* 101, 277-348.
- Terabe, M., and Berzofsky, J.A., eds. (2012). *Natural Killer T cells: Balancing the Regulation of Tumor Immunity (Cancer Drug Discovery and Development)*, 2012 edn (Springer).
- Tuong, W., Cheng, L.S., and Armstrong, A.W. (2012). Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatologic Clinics* 30, 113-124.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Sautès-Fridman, C., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e25238.
- Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual review of immunology* 29, 235-271.

- Vivanco-Cid, H., Alpuche-Aranda, C., Wong-Baeza, I., Rocha-Ramirez, L.M., Rios-Sarabia, N., Estrada-García, I., Villasis-Keever, M.A., Lopez-Macias, C., and Isibasi, A. (2007). Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* activates human macrophages and dendritic cells and reaches their late endosomes. *Parasite immunology* 29, 467-474.
- Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 12, 239-252.
- Wang, E. (2010). *Cancer Systems Biology*, (Book) First edn (London: Chapman & Hall/CRC).
- Wong-Baeza, I., Alcántara-Hernández, M., Mancilla-Herrera, I., Ramírez-Saldívar, I., Arriaga-Pizano, L., Ferat-Osorio, E., López-Macías, C., and Isibasi, A. (2010). The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 254521.
- Ya, Z., Hailemichael, Y., Overwijk, W., and Restifo, N.P. (2015). Mouse Model for Pre-Clinical Study of Human Cancer Immunotherapy. *Current Protocols in Immunology*, 20.21. 21-20.21. 43.
- Yamasaki, K., Horiguchi, S., Kurosaki, M., Kunii, N., Nagato, K., Hanaoka, H., Shimizu, N., Ueno, N., Yamamoto, S., Taniguchi, M., *et al.* (2011). Induction of NKT cell-specific immune responses in cancer tissues after NKT cell-targeted adoptive immunotherapy. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 138, 255-265.
- Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D.C., Song, X., Zhang, J., Seth, S., Chow, C.W., Cao, Y., Gumbs, C., *et al.* (2014). Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* 346, 256-259.
- Zhu, Y., Yao, S., and Chen, L. (2011). Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity* 34, 466-478.