



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Efecto del ácido ursólico, ácido masticadienónico o ácido  
3-alfa hidroximasticadienoico en la inmunoterapia  
antitumoral basada en células dendríticas derivadas de  
médula ósea cargadas con MAGE-AX en un modelo de  
melanoma murino**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**María Fernanda Reyes Riquelme**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dra. Gabriela Piñón Zárate**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

2018



## **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 está registrado 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, la reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor

**1. Datos del alumno**

Apellido paterno	Reyes
Apellido materno	Riquelme
Nombre(s)	María Fernanda
Teléfono	5522919667
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	309264862

**2. Datos del tutor**

Grado	Dra. en C.
Nombre(s)	Gabriela
Apellido paterno	Piñón
Apellido materno	Zarate

**3. Datos del sinodal 1**

Grado	Dr. en C.
Nombre(s)	Sául
Apellido paterno	Gómez
Apellido materno	Manzo

**4. Datos del sinodal 2**

Grado	Dra. en C.
Nombre(s)	Katia
Apellido paterno	Jarquín
Apellido materno	Yañez

**5. Datos del sinodal 3**

Grado	Dr. en C.
Nombre(s)	Christián Adrián
Apellido paterno	Cárdenas
Apellido materno	Monroy

**6. Datos del sinodal 4**

Grado	Q.B.P.
Nombre(s)	Ma. Beatriz
Apellido paterno	Sánchez
Apellido materno	Monroy

**7. Datos del trabajo escrito.**

**Título** *Efecto del ácido ursólico, ácido masticadienónico o ácido 3-alfahidroximasticadienoico en células dendríticas derivadas de médula ósea en la inmunoterapia antitumoral basada en células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con MAGE-AX en un modelo murino de melanoma.*

**Año** 2017

**Páginas** 97

## ÍNDICE

Listado de abreviaturas.....	8
<b>Índice de figuras y gráficas.....</b>	<b>11</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>16</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Melanoma.....</b>	<b>18</b>
1.2 Epidemiología del melanoma cutáneo en México.....	20
1.3 Diagnóstico.....	20
1.4 Estadificación.....	21
1.5 Abordaje y tratamiento.....	21
<b>2. Inmunoterapia.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Inmunoterapia basada en células dendríticas (CDs).....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Biología de las CDs.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Tipos de CDs utilizadas en la inmunoterapia.....</b>	<b>25</b>
2.3.1 CDs derivadas de monocitos.....	25
2.3.2 CDs derivadas de sangre periférica.....	26
2.3.3 CDs derivadas de precursores hematopoyéticas CD34+.....	26
<b>2.4 Ensayos clínicos utilizando CDs.....</b>	<b>27</b>
<b>3. Antígenos tumorales.....</b>	<b>28</b>
3.1 MAGE.....	30
3.2 Familia de genes MAGE.....	31
3.3 Expresión de MAGE en el cáncer.....	31
3.4 Función de las proteínas MAGE.....	32
3.5 MAGE en la inmunoterapia.....	33
3.6 MAGE-AX.....	34
<b>4. Maduración e interacción con Linfocitos T.....</b>	<b>34</b>
4.1 Reconocimiento de antígenos, procesamiento y presentación de antígenos.....	35
<b>5. Moléculas coestimuladoras.....</b>	<b>37</b>
5.1 Vía CD80/CD86-CTLA-4/CD28.....	38
5.2 CD40.....	39
5.3 Moléculas coinhibitorias.....	40
5.4 CD273 y CD274.....	44
<b>6. Adyuvantes.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Triterpenos.....</b>	<b>47</b>
7.1 Ácido Ursólico.....	50
7.2 Ácido Ursólico en la inflamación.....	51
7.3 Propiedades inmunomoduladoras del Ácido Ursólico.....	51
7.4 Ácido Masticadienónico (1) y Ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico (2).....	52
<b>8. Justificación.....</b>	<b>54</b>
<b>9. Hipótesis.....</b>	<b>55</b>

	<b>10. Objetivos</b>
<b>10.1 Generales</b> .....	<b>55</b>
<b>10.2 Particulares</b> .....	<b>55</b>
<b>11. Materiales y Métodos</b> .....	<b>56</b>
11.1 Ratonos.....	56
11.2 Triterpenos.....	56
11.3 Peptidos.....	57
11.4 Líneas celulares.....	57
11.5 Anticuerpos.....	57
11.6 Producción de sobrenadante rico en GM-CSF.....	57
11.7 Generación y diferenciación de Células dendríticas derivadas de médula ósea .....	58
11.7 Ensayo de viabilidad.....	58
11.8 Estudio del fenotipo de las CDMOs tratadas con los triterpenos.....	59
11.9 Inducción de tumores y grupos de tratamiento.....	60
11.10 Medición de tamaño tumoral.....	60
11.11 Análisis estadístico.....	60
<b>12 Resultados</b> .....	<b>61</b>
12.2 Diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea (CDMO) .....	62
12.3 Ensayo de Viabilidad.....	63
12.4 Cultivo y caracterización de las CDMOs.....	64
12.5 Efecto del ácido ursólico en células dendríticas derivadas de médula ósea.....	66
12.6 Efecto del ácido masticadienónico en células dendríticas derivadas de médula ósea.....	68
12.7 Efecto del ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico en células dendríticas derivadas de médula ósea.....	70
12.8 Tasa de crecimiento tumoral en ratones tratados con MODC's.....	72
<b>13 Discusión</b> .....	<b>76</b>
13.2 Diferenciación y caracterización de CD's derivadas de médula ósea en ratón.....	76
13.3 Efecto de los triterpenos en la viabilidad celular .....	77
13.4 Efecto de los triterpenos en el fenotipo de las CDMO's y su efecto en el tamaño tumoral y sobrevida de ratones .....	80
<b>14 Conclusiones</b> .....	<b>85</b>
<b>15 Perspectivas</b> .....	<b>86</b>
<b>16 Referencias</b> .....	<b>87</b>
<b>17 ANEXO</b> .....	<b>94</b>

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Quiero empezar por agradecer el gran apoyo brindado, por su orientación y ayuda en la formación de ese trabajo a la Dra. Gabriela Piñón Zárata, éste trabajo no hubiera sido posible por su gran atención, en verdad muchas gracias por tener una asesora como usted, me siento muy afortunada. Así mismo quiero agradecer al Jefe de Laboratorio al Dr. Andrés Castell Rodríguez por abrirme sus puertas al laboratorio, acobijarme y aceptarme, ha sido un gusto el poder trabajar en estos temas de investigación, así mismo quiero agradecer al Dr. Miguel Herrera por sus consejos, comentarios y apoyo.

A los miembros de mi jurado por sus apreciables comentarios, sugerencias y consejos, que a continuación nombro:

- Dr. Saúl Gómez Manzo
- Dra. Katia Jarquín Yañez
- Dra. Gabriela Piñón Zárata
- Dr. Cristián Cárdenas Monroy
- Dra. Ma. Beatriz Sánchez Monroy

Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por contribuir con los materiales y reactivos necesarios para el aislamiento, purificación e identificación de los ácidos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD.

Y por su asesoría técnica al laboratorio a:

- Biól. Luisa Wendolyne Lara Díaz
- M. en C. Laura Bucío López
- Biól. Alejandra Oseguera Rodríguez

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Quisiera agradecer primero a mis padres por todo este tiempo que han apoyado brindado su cariño, atención, estoy agradecida por permitirme hacer lo que más me gusta y siempre darme consejos y apoyo. También a mis hermanos Ericka, Ricardo y Rosa, gracias por todos los momentos bonitos, divertidos que hemos tenido juntos, se que siempre voy a contar con ustedes, son una fuerte fuente de inspiración y orgullo para mi.

Gracias a mis amigos por siempre esos momentos de risa, a mis amigos de la secu que aún sigo conservando: Josue, Alicia y Jorge, es bonito saber que después de diez años seguimos en contacto, hablándonos y ser así siempre tan sencillos, sé que siempre estarán ahí.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias que sigo conservando desde el primer semestre a Jorge por siempre, siempre estar ahí, a Karol por que los semestres no hubieran sido lo mismo sin nuestras risas y apoyo en lo académico, a Lau por sus palabras chistosas en momentos adecuados, a Omar porque me entiendes al cien por ciento y ser tan chistoso, a Pactli porque siempre me haces abrir los ojos y ver que exagero y siempre molestar me y ayudarme en lo que sea, a mis demás compañeros como Vianey, Marco, Ángel, Anita, Oralia esas idas de la Facultad al metro, nuestras ocurrencias y miles de historias juntos no las olvidaré.

Por último, pero no por eso menos importante a mis compañeros del laboratorio (Wendy, Laura, Ale, Jennip5, Ili, Erick), el laboratorio no hubiera sido lo mismo sin ustedes con nuestras platicas, risas, idas a lugares, congresos, su apoyo emocional, todooo, tanto su ayuda incondicional en el laboratorio como en el bioterio, en proyectos etc. En especial a Wendy y a Laura ustedes dos fueron las mejores amigas, cómplices etc que pude tener en el laboratorio, espero que después de esto sigamos teniendo esa amistad bonita que hemos construido desde hace tres años.

Por último, a la Facultad de Ciencias por forjarme como una profesionista y permitirme ser parte de su alumnado.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

<b>aa: aminoácidos</b>
<b>APC: aloficocianina</b>
<b>BRAF: homólogo B del oncogen del protooncogen B-Raf</b>
<b>CD: cluster differentiation</b>
<b>CDKN2A: inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2<sup>a</sup></b>
<b>CDmo: células dendríticas derivadas de monocitos</b>
<b>CDp: células dendríticas plasmacitoides</b>
<b>CDs: células dendríticas</b>
<b>CDV: cisplatino, vinblastina, dacarbazina</b>
<b>CL: células de Langerhans</b>
<b>COX-2: ciclooxigenasa-2</b>
<b>CPA: Células presentadoras de antígenos</b>
<b>CpG: (5'-C-fosfato-G-3) islas ricas en Guanina y Citosina</b>
<b>CTA: Antígenos de cáncer de testículo</b>
<b>CTL: linfocitos citotóxicos</b>
<b>CTLA-4: Antígeno 4 de linfocito T citotóxico</b>
<b>DMAPP: dimetil difosfato</b>
<b>DNA: Ácido desoxirribonucleico</b>
<b>EGFR: Factor de crecimiento epidermal</b>
<b>FCH: Fase de Crecimiento Horizontal</b>
<b>FCV: Fase de Crecimiento Vertical</b>
<b>FIT-C: Isocianato de fluoresceína</b>
<b>Flt3: Tirosina cinasa 3 parecida a FMS</b>
<b>GM-CSF: Factor estimulante de granulocitos y macrófagos</b>
<b>gp100: proteína melanocítica</b>
<b>HLA: antígenos leucocitarios humanos</b>
<b>IAP: Proteínas inhibidores de la apoptosis</b>
<b>IDO: Idoleamina 2,3 dioxigenasa</b>

<b>Ig: Inmunoglobulina</b>
<b>IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1</b>
<b>IL-10: Interleucina tipo 10</b>
<b>IL-2: Interleucina tipo 2</b>
<b>INF<math>\alpha</math>: Interferon alfa</b>
<b>INF<math>\gamma</math>: Interferon gamma</b>
<b>iNOs: óxido nítrico sintasa</b>
<b>IPP: isopentenil difosfato</b>
<b>LITs: linfocitos infiltrantes de tumores</b>
<b>LPS: Lipopolisacárido</b>
<b>MAGE: Antígenos asociados a melanoma</b>
<b>MAPK-ERK: proteína cinasa activada por mitógenos</b>
<b>MEP: metileritritol 4-fosfato</b>
<b>MHC I o II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad Clase I o II</b>
<b>MHD Dominio de Homología MAGE</b>
<b>NFKB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas</b>
<b>NK: Células Natural Killer</b>
<b>PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos</b>
<b>PBMCs: células mononucleares de sangre periférica</b>
<b>PD-1: Receptor de muerte programada 1</b>
<b>PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas</b>
<b>PE: ficoeritrina</b>
<b>PRRs: receptores de reconocimiento de patrones</b>
<b>PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa</b>
<b>RNA: Ácido ribonucleico</b>
<b>RT-PCR: Reacción en cadena polimerasa en tiempo real</b>
<b>TCD8: linfocitos T CD8</b>
<b>TCR: Receptor de linfocitos T</b>
<b>Th1: Células T cooperadoras 1</b>
<b>Thfo: Células T cooperadoras foliculares</b>

<b>TLR: Receptores tipo toll</b>
<b>TNF<math>\alpha</math>: Factor de necrosis tumoral tipo alfa</b>
<b>Tregs: Células T reguladoras</b>
<b>MVA: ácido mevalónico</b>
<b>NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</b>
<b>FADH: Flavín adenín dinucleótido</b>
<b>FMNH: Flavín mononucleótido</b>
<b>NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido</b>
<b>HBSS: solución salina de Hanks</b>
<b>PBS: Tampón fosfato salino</b>

## Índice de figuras y gráficas

Título de la figura	Página
<b>Figura 1.</b> Eventos biológicos en la progresión del Melanoma. Ilustración tomada modificada de Miller <i>et al</i> , 2006.	19
<b>Figura 2.</b> El melanoma de piel comparado con otros cánceres. Imagen tomada de <a href="http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html">seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html</a>	20
<b>Figura 3.</b> Pasos para el desarrollo de una respuesta inmune celular contra antígenos asociados a tumor. Imagen tomada y modificada de Melero <i>et al</i> , 2015	24
<b>Figura 4.</b> Tipos de antígenos tumorales. Imagen tomada y modificada de Obeid <i>et al</i> , 2016	30
<b>Figura 5.</b> Vías de procesamiento y presentación de antígenos. Imagen tomada y modificada de Gilboa, 2007.	37
<b>Figura 6.</b> Moléculas coinhibitorias y coestimuladoras más importantes para la activación de linfocitos T. Imagen tomada y modificada de Paterson <i>et al</i> , 2009	44
<b>Figura 7.</b> Mecanismo de acción de adyuvantes. Imagen tomada y modificada de Guy, 2007.	46
<b>Figura 8.</b> Especies vegetales como fuentes de triterpenos. Imagen obtenida de Yadav <i>et al</i> , 2010	48
<b>Figura 9.</b> Biosíntesis de triterpenos. Imagen tomada y modificada de Ikeda <i>et al</i> , 2008.	49
<b>Figura 10.</b> Estructura química del AU. Imagen tomada y modificada de Ikeda <i>et al</i> , 2008	50
<b>Figura 11.</b> Estructuras químicas del ácido masticadienónico (AMD) y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoico (3 $\alpha$ -OHAMD). Imágenes tomadas de Sánchez-Monroy <i>et al</i> , 2017	53
<b>Figura 12.</b> Grados de diferenciación de células precursoras de médula ósea tratadas con GM-CSF.	62
<b>Figura 13.</b> Representación gráfica del porcentaje de viabilidad de CDMOs a diferentes dosis de los triterpenos. Se tomaron en cuenta las CDs que no fueron tratadas como el 100% de viabilidad celular. Todos los ensayos se	63

realizaron por triplicado.	
<b>Figura 14.</b> Análisis del fenotipo de la CDs obtenidas del cultivo de células precursoras de médula ósea con GM-CSF	65
<b>Figura 15.</b> Efecto de diferentes concentraciones de AU en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias de CDMOs diferenciadas con GM-CSF.	67
<b>Figura 16.</b> Efecto de diferentes concentraciones de AMD en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias de CDMOs diferenciadas con GM-CSF.	69
<b>Figura 17.</b> Efecto de diferentes concentraciones de 3 $\alpha$ -OHAMD en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en CDMOs diferenciadas con GM-CSF.	71
<b>Figura 18.</b> Efecto de los triterpenos (AU, AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD) a una sola concentración, en la expresión de moléculas coestimuladoras y inhibitorias en CD derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF.	73
<b>Figura 19.</b> Tamaño tumoral de los ratones inoculados con CDMOs tratadas con AU/MAGE-AX, AMD/MAGE-AX, 3 $\alpha$ -OHAMD/MAGE-AX.	75

## Resumen

**Introducción:** El melanoma es un tumor maligno que resulta de la transformación y proliferación incontrolada de los melanocitos. Los tratamientos convencionales son generalmente insuficientes debido a que el tumor puede ser resistente a la quimio y radioterapia, los pacientes pueden desarrollar metástasis en regiones inoperables e incluso existen tumores con alta tasa de crecimiento, lo cual puede inducir la muerte en los pacientes con esta enfermedad. Existen múltiples alternativas terapéuticas contra el cáncer, no obstante, generalmente son invasivas y poco exitosas, por lo que actualmente se investigan alternativas que puedan inducir la activación del sistema inmune del paciente para contrarrestar la enfermedad. La inmunoterapia, se basa en el uso de citocinas, células o anticuerpos que pueden inducir la activación del sistema inmune del paciente. Un tipo de inmunoterapia es la basada en células dendríticas tratadas con antígenos tumorales y uso de adyuvantes que puedan primero inducir la maduración de las células dendríticas y después, aumentar la respuesta inmunológica ya inducida por la inoculación de las células dendríticas. Para inducir una respuesta inmunológica antígeno específica, es necesario el uso de antígenos tumorales. MAGE-AX fue el antígeno empleado en este trabajo y se construyó como alternativa para el estudio de la inmunoterapia contra el melanoma en un modelo murino. Este se caracteriza por poseer una secuencia consenso con los antígenos MAGE A1-A3 y A-5, además de poseer una alta afinidad a MHC I de ratones. Mientras que los adyuvantes empleados fueron los triterpenos, que son compuestos de 30 átomos de carbono con varios átomos de oxígeno. Uno de ellos es el ácido ursólico, el cual es capaz de aumentar ligeramente la expresión de moléculas CD1a, CD80, CD83, HLA-DR y CCR7 en células dendríticas derivadas de monocitos humanos. Existen otros terpenos derivados del escualeno que se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en el C-3, dando así compuestos heterocíclicos ya sea tetra o pentacíclicos, entre los que podemos encontrar al ácido masticadienónico y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoico. Se ha constatado que estos compuestos tienen efectos anti-inflamatorios; son capaces de reducir el edema inducido por TPA; y han mostrado ser capaces de reducir el tamaño

tumoral en ratones atímicos xenotrasplantados con células de carcinoma prostático. No obstante, poco se sabe de los efectos del ácido masticadienónico y ácido 3 $\alpha$ -hidroximasticadienoico como adyuvante en células dendríticas. Por lo que este estudio se basó en el uso de AU/AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD como adyuvantes en una vacuna basada en células dendríticas contra el melanoma experimental.

**Material y método:** Se obtuvieron células dendríticas a partir de cultivos de células precursoras de médula ósea con GM-CSF. Posteriormente las células dendríticas se trataron con diferentes concentraciones de AU, AMD o 3 $\alpha$ -OHAMD [(0.3, 0.03 y 0.003 mM] durante 24 h. Después de la incubación, se midió la citotoxicidad inducida por los compuestos así como el porcentaje y el nivel de expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias. Para estudiar el efecto de las células dendríticas tratadas con los diferentes triterpenos, se inocularon ratones C57BL/6 con la línea celular de melanoma B16-F10. Una semana después del inóculo, los ratones se trataron con las células dendríticas tratadas con los triterpenos y se midió el tamaño tumoral cada dos días durante tres semanas.

**Resultados:** Todos los compuestos a la dosis de 0.003 mM no generaron una disminución en la viabilidad celular sobre las células dendríticas aun cuando la dosis de 0.03 mM para todos los compuestos generó una viabilidad del 70 %, esta dosis del ácido 3 $\alpha$ -OHAMD fue capaz de aumentar el porcentaje de células positivas para las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 y coinhibitorias CD273 y CD274 así mismo, a esta dosis en comparación con los otros dos compuestos (AMD y AU) fue el único capaz en aumentar el nivel de expresión para las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Esto se vio reflejado en el tamaño tumoral donde aquellos ratones que recibieron el tratamiento de CDMOs/MAGE y 3 $\alpha$ -OHAMD mostraron el menor tamaño tumoral en comparación con el grupo de ratones tratados con CDMOs madurados con TNF $\alpha$ , AU y AMD. Por otra parte, las CDMOs tratadas con AMD no mostraron diferencias significativas entre las diferentes dosis empleadas, con excepción de la dosis de 0.03 mM, la cual si mostró una tendencia positiva en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40. Los ratones que recibieron el tratamiento

con células dendríticas tratadas con AMD, mostraron un tamaño tumoral menor en comparación de aquellos ratones que no recibieron tratamiento. El AU a la dosis de 0.003 mM fue la única en inducir la maduración de las CDMOs, sin embargo, los ratones que fueron tratados con AU a la dosis de 0.03 mM mostraron un aumento en el tamaño tumoral en comparación con el grupo control.

**Conclusiones:** Se demostró que los triterpenos de tipo tirucallano fueron mejores adyuvantes en la terapia de CDMOs que el triterpeno ácido ursólico (triterpeno de tipo ursano), debido a que indujeron la maduración de CDMOs al contrario del ácido ursólico.

Los triterpenos indujeron una disminución en la viabilidad celular de CDMOs tratadas con los ácidos masticadienónico y 3-hidroximasticadienoico, no obstante, estas células indujeron una respuesta inmunológica protectora que se reflejó en la disminución significativa del crecimiento tumoral de los ratones con cáncer inducido, en comparación con los ratones control (sin tratamiento) y con los ratones con melanoma tratados con CDMOs/AU.

## Abstract

**Introduction:** Melanoma is a malignant tumor that results from the uncontrolled transformation and proliferation of melanocytes. Conventional treatments are generally insufficient, because the tumor can be resistant to chemo and radiotherapy, patients can develop metastases in inoperable regions and there are even tumors with a high growth rate, which can lead to death in patients with this disease. There are multiple therapeutic alternatives against cancer, nevertheless, generally there are invasive and not very successful, so alternatives that can lead the activation of the patient's immune system to counteract the disease are currently being investigated. Immunotherapy is based on the use of cytokines, cells or antibodies that can induce the activation of the patient's immune system. One type of immunotherapy is based on dendritic cells treated with tumor antigens and the use of adjuvants that in one hand, are able to induce the maturation of dendritic cells and in the other hand, increase the immune response developed by the inoculation of dendritic cells in patients. In order to induce an antigen-specific immune response, the use of tumor antigens is necessary. MAGE-AX was the antigen used in this investigation and was constructed as an alternative for the study of immunotherapy against melanoma in a murine model. It is characterized by having a consensus sequence with the MAGE A1-A3 and A-5 antigens, and having a high affinity to MHC I molecules. While the adjuvants used were the triterpenes, characterized by having 30 carbon atoms linked with several oxygen atoms. The ursolic acid is a triterpene able to slightly increase the expression of CD1a, CD80, CD83, HLA-DR and CCR7 molecules in dendritic cells derived from human monocytes. There are other terpenes derived from squalene that are characterized by having a hydroxyl group in C-3, giving place to heterocyclic compounds either tetra or pentacyclic, among which we can find the masticadienonic acid and the 3- $\alpha$ -hydroxymasticadienoic acid. It has been found that these compounds exhibit anti-inflammatory effects; are able to reduce the edema induced by TPA; and have been shown to be able to reduce tumor size in athymic mice xenotransplanted with prostatic carcinoma cells. Nevertheless, little is known about the effects of masticadienonic acid and 3- $\alpha$ -hydroxymasticadienoic acid as adjuvants in dendritic cells based immunotherapy. So this study was based on the use of AU / MDA and 3 $\alpha$ OHMDA as adjuvant in a dendritic cells based vaccine based against experimental melanoma

**Material and method:** Dendritic cells were obtained from cultures of bone marrow precursor cells with GM-CSF. Later, dendritic cells were treated with different concentrations (0.3, 0.03 and 0.003 mM) of AU / MDA or 3aOHMDA during 24 h. After the incubation time, the cytotoxicity induced by the compounds was measured in dendritic cells treated with the different triterpenes. To study if the dendritic cells treated with triterpenes were efficient as a treatment against murine melanoma C57BL / 6 mice were inoculated with the cell line B16-F10, one week after the inoculum, mice were treated with the dendritic cells cultured with the triterpenes. The tumor size was measured every two days for three weeks.

**Results:** All compounds at the 0.003mM dose had not generated a decrease on dendritic cells viability. Even though the 0.03 mM dose for all the compounds has generated a viability of 70 %, the 3-A-OHMDA 0.03mM dose was able to increase the percentage of positive cells for the co-stimulatory molecules CD80, CD86 and CD40 and the coinhibitory molecules CD274 and CD273. The same dose (0.03mM) with the other two compounds (MDA and UA), was the only one able to increase the level of expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86. All mention above, was reflected in the tumor development, since, those mice that received the MODCs / MAGE and 3aOHMDA treatments, showed the smallest tumor size in comparison with the group of mice treated with MODCs matured with TNFa, AU or MDA. On the other hand, the MODC treated with MDA did not show significant differences between the different doses used, besides, the 0.03 mM dose, did show a positive tendency in the expression of the co-stimulatory molecules CD86 and CD40. Mice that received treatment with MDA dendritic cells showed a smaller tumor size compared to those mice that did not receive treatment. Finally, the UA at the dose of 0.003 was the only one to induce the maturation of the MODCs, however, the mice that were treated with UA at the dose of 0.03 mM showed an increase in the tumor size in comparison with the control group.

**Conclusions:** It was demonstrated that tirucallane-type triterpenes were better adjuvants in the therapy of MOCDsthan triterpene ursolic acid (triterpene of ursan type), due that they induced the maturation of MOCDs in contrast to ursolic acid.

Triterpenes induce a decrease in the cell viability of MODCs treated with masticadienonic and 3-hydroxymethicadienoic acids, however, these cells induced a protective immune response that was reflected in the significant decrease in tumor growth of mice with cancer induced, in comparison with the control mice (without treatment) and with the melanoma

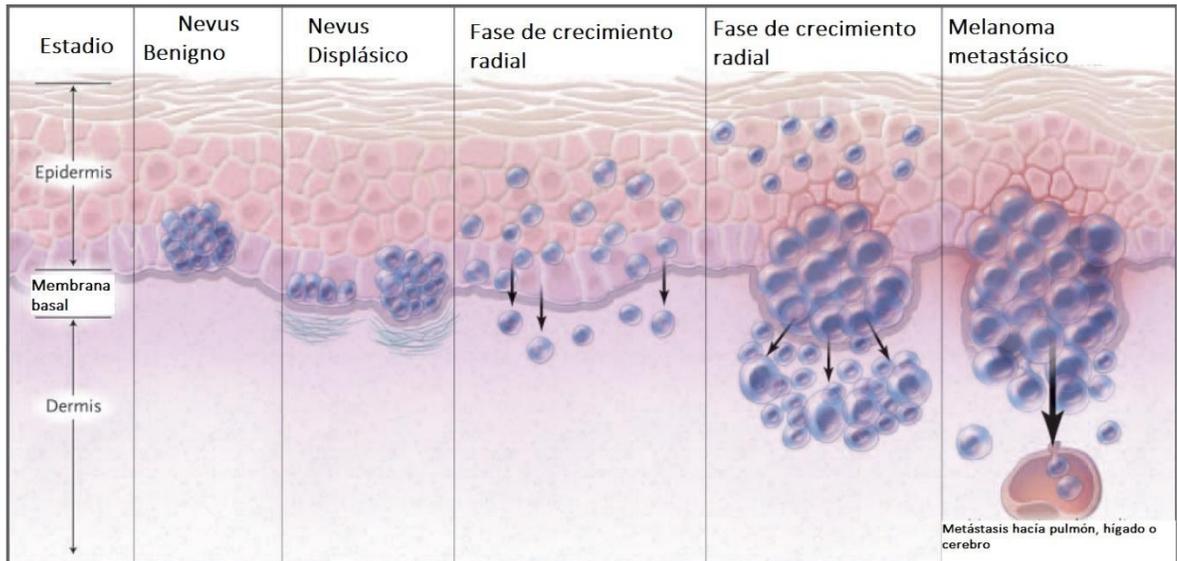
## 1. Introducción

### 1.1 Melanoma

El melanoma es un tumor maligno que resulta de la transformación y proliferación incontrolada de los melanocitos. Aunque la mayoría de los melanomas se presentan en la piel (melanoma cutáneo), también puede surgir en otros sitios a los que migran las células de la cresta neural, incluyendo piel, superficies mucosas y la retina (Gray-Schopfer *et al.*, 2007; Shadendorf *et al.*, 2015; Wolf- Horrell *et al.*, 2015).

El melanoma tiene dos fases de crecimiento, una radial y otra vertical. La fase de crecimiento radial se refiere al patrón de crecimiento horizontal, intra-epidérmico, pre-invasor o mínimamente invasor. La fase de crecimiento vertical se refiere al patrón de crecimiento dérmico región altamente vascularizada, por lo que existe mayor riesgo de metástasis (Wolf- Horrell *et al.*, 2015).

De los modelos que explican la progresión del melanoma, la más empleada es el modelo de Clark, el cual representa la progresión de los melanocitos en el proceso de formar nevos y el subsecuente desarrollo de displasia, hiperplasia invasión y metástasis (Miller, & Mihm, 2006). De acuerdo a este modelo, el inicio de la neoplasia depende de mutaciones en genes reguladores de crecimiento como MAPK-ERK, BRAF, N-RAS, CDKN2A, PTEN, la producción de factores de crecimiento autocrinos como PDGF, NGF e IGF-1, la pérdida de receptores de adhesión (E-caderinas) y la expresión de N-caderina, lo que contribuye a la transformación de los melanocitos que dan como resultado la proliferación, migración celular y la posterior formación de un nevo benigno o lunar común en la dermis o en la epidermis (Fig.1). El siguiente paso es el crecimiento anormal de melanocitos de nevus preexistentes, resultando en una lesión pre maligna con citología atípica (melanoma *in situ*), que adquiere la habilidad de proliferar horizontalmente fase de crecimiento horizontal (FCH) en la epidermis. Posteriormente, los melanocitos pueden pasar a la fase de crecimiento vertical (FCV), en la cual las células poseen un alto potencial metastásico debido a la pérdida en la expresión de E-caderinas, dando la habilidad a las células de disociarse de la lesión primaria, formar nichos de células que invaden la dermis, migrar a través del estroma circundante, e invadir a los vasos sanguíneos y linfáticos para formar un tumor en un sitio distante (Miller *et al.*, 2006; Wolf- Horrell *et al.*, 2015).



**Figura 1. Eventos biológicos en la progresión del Melanoma.** Ilustración tomada y modificada de Miller *et al*, 2006.

## 1.2 Epidemiología

El melanoma cutáneo es la quinta neoplasia maligna en Estados Unidos (Fig. 2), y su incidencia a nivel mundial aumenta a un ritmo acelerado. Solo representa el 4% de todos los tipos de cáncer de piel, sin embargo, es la forma más agresiva y con mayor índice de muertes relacionados con cáncer de piel, afectando a más de 100, 000 personas cada año en el mundo. No obstante, si se diagnostica en etapas tempranas, existe hasta un 90% de sobrevivir los siguientes cinco años. Como se mencionó anteriormente, el melanoma tiende a expandirse de manera horizontal y/o vertical desde su sitio de origen, pero después las células tumorales pueden migrar a través del cuerpo por la vía linfática o sanguínea. En estos casos, la probabilidad de sobrevivir en los próximos cinco años disminuye a menos del 20% (Wolf-Horrell *et al*, 2015; Gray-Shopfer *et al*, 2015).

La incidencia entre los diferentes países varía ampliamente, las tasas más altas se encuentran en Australia y Nueva Zelanda (60 casos por cada 100, 000 habitantes por año), mientras que, en Estados Unidos, se reportan 30 casos por cada 100, 000 habitantes (Shadendorf *et al*, 2015).

En relación con la edad, el melanoma afecta principalmente a individuos, de entre 62 y 69 años, aunque en la actualidad la incidencia de este tipo de cáncer ha aumentado en los adultos jóvenes de 20-29 años debido al constante uso de cámaras de bronceado. En consecuencia, la pérdida calculada de vida en años, se encuentra entre las más altas, cuando se compara con otros tipos de cáncer.



**Figura 2. El melanoma de piel comparado con otros cánceres, es la quinta neoplasia en Estados Unidos.** En 2017, se estima que habrá 87.110 nuevos casos de melanoma de la piel y que 9.730 personas morirán de esta enfermedad. Imagen tomada de [seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html](http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html)

### 1.3 Epidemiología del melanoma cutáneo en México

En América Latina no existen estadísticas fidedignas de la epidemiología del melanoma, debido a pocos estudios epidemiológicos realizados, sin embargo, las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, la incidencia del melanoma ha aumentado hasta un 500% en los últimos años. Por otro lado, las estimaciones de la International Agency for Research on Cancer muestran una incidencia del melanoma de 2 por cada 100, 000 habitantes en México. Es importante hacer notar que, en nuestro país, el melanoma ocupa el tercer lugar de entre los cánceres de la piel con un 14.1% de aparición entre los distintos casos de cáncer de piel (Fuente-García & Ocampo Candiani, 2010).

### 1.4 Diagnóstico

El diagnóstico de melanoma se realiza con la dermatoscopia y otros métodos no invasivos, pero se confirma con histopatología. Macroscópicamente al examinar una lesión pigmentada mediante la prueba de ABCDE, se deben evaluar cinco características: Asimetría, Borde irregular, Coloración, Diámetro (mayor de 6 mm) y Elevación. Aunque con estas

características se presume que la lesión es maligna, ninguna de ellas, ni la combinación de ellas, puede fortalecer la sospecha de que la lesión es maligna. Para esto se deberá realizar una biopsia de cualquier lesión pigmentada que confirme el melanoma. La biopsia por escisión, es el mejor procedimiento, de igual manera es importante explorar las adenopatías (trastornos inespecíficos de los ganglios) mediante la técnica del ganglio centinela, si es que la lesión está en las extremidades (Fuente-García *et al.*, 2010 y Shadendorf *et al.*, 2015). El diagnóstico en nuestra población es difícil, sobre todo al inicio de la neoplasia, ya que suele confundirse con verrugas, hongos, hemangiomas, hematomas y queratosis seborreico, entre otros (Herrera-González *et al.*, 2010).

### **1.5 Estadificación**

En el 2002 el *American Joint Committee on Cancer* desarrolló un sistema de estadificación denominado TNM (T: profundidad, N: número de ganglios afectados M: sitio de la metástasis). De acuerdo con éste, la ulceración y la profundidad en milímetros (con base en el Índice de Breslow), son los principales pronósticos para melanoma localizado (estadios I y II). El número de metástasis ganglionares, el tamaño tumoral y la ulceración son los factores relevantes implicados en la sobrevivencia de los pacientes en estadio III. Finalmente, el sitio anatómico donde se encuentre la metástasis es el factor más importante en pacientes en estadio IV).

### **1.6 Abordaje y tratamiento**

El tratamiento de elección contra el melanoma localizado consiste en la escisión quirúrgica con márgenes proporcionales al micro estadio de la lesión primaria, no obstante, de acuerdo a la extensión de la lesión, así como micro o macro metástasis, los tratamientos cambian.

A continuación, se describen los estadios de evolución de la enfermedad, así como su tratamiento.

1. Estadio 0 (*in situ*): escisión de la lesión con márgenes de 0.5 cm
2. Estadio IA: escisión con márgenes acorde con el Índice de Breslow (profundidad tumoral en milímetros), con o sin ganglio centinela.

3. Estadio IB y II: escisión con márgenes de acuerdo al Índice de Breslow, con o sin ganglio centinela. En caso de Índice de Breslow mayor a 4 mm considerar coadyuvancia con interferón alfa (INF $\alpha$ ) o inclusión en protocolo terapéutico.
4. Estadio III (micrometástasis): escisión y linfadenectomía (extracción de ganglios linfáticos) o inclusión en protocolo terapéutico. Considerar coadyuvancia con INF $\alpha$ .
5. Estadio III (macrometástasis): escisión y linfadenectomía. Considerar inclusión en protocolo terapéutico o coadyuvancia con INF $\alpha$  o radioterapia en caso de IIIC (en el estadio IIIC, el tumor tiene más de 4 milímetros de grosor y hay ulceración) con presencia de múltiples adenopatías (alteración de los ganglios linfáticos) o extensión extranodal.
6. Estadio IV: algunos quimioterapéuticos como la dacarbazina y temozolomida, tanto combinados o en monoterapia han demostrado efectividad. La dacarbazina sigue siendo el estándar de oro, y a su vez el estándar de comparación para nuevos regímenes. Tanto la dacarbazina como la temozolomida presentan una tasa de respuesta aproximada de 10 a 20%, con una duración de respuesta media de tres a cuatro meses. La administración de IL-2, a dosis altas, produce respuestas en aproximadamente del 12 al 21%, de los pacientes con una respuesta completa duradera en 6% y respuesta parcial en 10% de los pacientes, pero con alta toxicidad. La bioquimioterapia es la combinación de quimioterapia con agentes biológicos. En un estudio inicial en fase II, la combinación CVD (cisplatino, vinblastina, dacarbazina), INF $\alpha$  e IL-2, produjo una respuesta general de 64%, con una tasa de respuesta completa de 21% de los pacientes (Kee & McArthur 2017). Este tratamiento frecuentemente tiene efectos secundarios muy graves, como colapso hemodinámico, que a menudo requiere hospitalización y admisión de cuidados intensivos. Estos medicamentos han limitado su uso a centros especializados y a pacientes con sistemas cardiovasculares saludables y excelente estado de funcionamiento. Además, nunca se ha establecido a través de pruebas de fase III en ensayos clínicos un beneficio de supervivencia global para la IL-2. Por estas razones, la IL-2 no ha sido ampliamente adoptada en los EE. UU., y rara vez se utiliza en Europa, Canadá o Australia. Por todas estas circunstancias se exigen nuevas modalidades de tratamiento para los pacientes con melanoma (Kee & McArthur, 2017).

A pesar de lo anterior, la metástasis de células tumorales es frecuente, lo cual aumenta la tasa de mortalidad. Los tratamientos convencionales son generalmente insuficientes debido a que la metástasis en múltiples ocasiones es inoperable y resistente a la quimio y radioterapia.

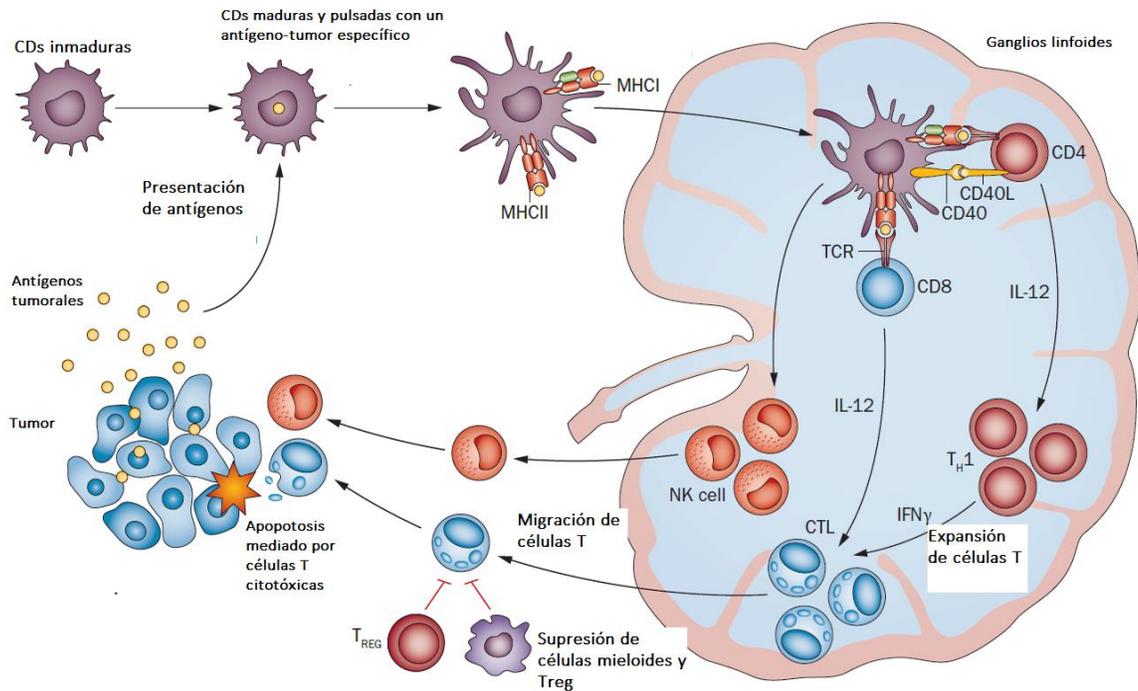
## **2. Inmunoterapia**

La inmunoterapia contra el cáncer se refiere a una serie de enfoques destinados a activar el sistema inmunológico del paciente para inducir respuestas objetivas con el fin de controlar o curar la enfermedad (Palucka *et al.*, 2005; Drake *et al.*, 2014).

El concepto de que el sistema inmune pueda ser aprovechado para erradicar células malignas data desde el siglo XIX cuando William B. Coley inoculó productos bacterianos alrededor del tumor y observó una disminución del tamaño tumoral hasta la eliminación del tumor. Desde entonces, muchas observaciones, como 1) las raras remisiones espontáneas en lesiones primarias, 2) la alta incidencia de cáncer en pacientes inmunosuprimidos, 3) las observaciones histopatológicas de la presencia de células T infiltradas en los tumores primarios y 4) así como la identificación y caracterización de antígenos asociados a tumor, ha estimulado la búsqueda de inducir respuestas inmuno-específicas que puedan persuadir la muerte de células tumorales. (Parmiani *et al.*, 2003; Melero *et al.*, 2015).

### **2.1 Inmunoterapia basada en CD8**

La inmunidad resulta de una relación compleja entre el sistema inmune innato y adaptativo. Las células dendríticas (CDs) proveen la unión entre el sistema innato y adaptativo, induciendo la activación de macrófagos, células NK, NKT, pertenecientes al sistema inmune innato, y la activación de linfocitos T, las cuales están involucradas en el desarrollo de respuestas inmunológicas adaptativas. Así, el objetivo de la vacunación basada en CDs es inducir la activación de células T efectoras antígenos tumorales específicas capaces de inducir la eliminación de células tumorales y con ello la reducción del tamaño tumoral y la generación de memoria inmunológica. Para lograr esto, las CDs deben someterse a un estímulo de maduración y cargarse con antígenos específicos del tumor, para que posteriormente las CDs puedan ser inoculadas en el paciente (Fig. 3). Para entender mejor el uso terapéutico de las vacunas basadas en CDs, es importante entender la biología de estas células, como a continuación se describen (Sábado & Bhardwaj, 2010; Palucka *et al.*, 2013).



**Figura. 3. Pasos para el desarrollo de una respuesta inmune celular en contra de antígenos asociados a tumor.** Primero, las CDs inmaduras deben sufrir un proceso de maduración, posteriormente deben de ser pulsadas con antígenos asociados a tumores. Una vez cargadas, las CDs migran a los ganglios linfáticos para presentar los antígenos a las células T, donde activan linfocitos T con la ayuda de moléculas coestimuladoras como CD40. Una vez activadas los linfocitos T, estos producen citocinas como IL-12 e IFN $\gamma$  que van a favorecer la polarización de una respuesta Th1 y la activación otras células como los linfocitos NK, los cuales puedan atacar y destruir directamente a células tumorales, además de inhibir células mieloides y linfocitos Treg. Imagen tomada y modificada de Melero *et al.*, 2015

## 2.2 Biología de las Células Dendríticas (CDs)

Las CDs se diferencian a partir de células madre CD34+ en la médula ósea y se localizan en prácticamente todos los tejidos. Las CDs inician la respuesta inmune capturando, procesando y presentando antígenos a las células T en los tejidos linfoides. Comparadas con otras células presentadoras de antígenos (CPA), las CDs son las más eficientes ya que se necesita de menor cantidad de CDs para activar a las células T, además de expresar altos niveles de moléculas coestimuladoras y/o coinhibitorias y secretar citocinas como IFN $\gamma$  e IL-12 para el desarrollo

de diversas respuestas inmunológicas. Después que las CDs reconocen múltiples antígenos, pueden madurar e iniciar la activación de las células T con funciones únicas y un perfil de citocinas específica. Así, las células T CD4+ pueden diferenciarse en células T colaboradoras (Th1, Th2, Th17, Thfo Treg), mientras que las células T CD8+ vírgenes, pueden dar lugar a células T citotóxicas (CTL). Además de lo anterior, las CDs pueden interactuar y activar a otras células del sistema innato como células NK, fagocitos y mastocitos, exacerbando así la respuesta inmunológica desarrollada ante determinados antígenos (Lesterhuis et al., 2008; Palucka et al., 2012).

Los fenotipos de las CDs en el organismo son diversos, no obstante actualmente en la inmunoterapia actualmente se emplean CDs diferenciadas a partir de monocitos o de células CD34+, incluso se han realizado ensayos con CDs aisladas de sangre periférica.

### **2.3 Tipos de CDs utilizadas en la inmunoterapia**

Para el estudio de la inmunoterapia se tuvieron que desarrollar métodos de obtención de CDs *ex vivo*. Actualmente no existe un consenso sobre un método óptimo para la generación de CDs entre los diferentes métodos que podemos encontrar puede ser a partir de la diferenciación de precursores de monocitos, precursores hematopoyéticos CD34+ o a partir de la expansión *in vivo* de CDs circulantes de sangre periférica, entre estos métodos no existe una comparación directa, se ha demostrado en estudios pre-clínicos hasta en ensayos clínicos que cualquier método para obtener CDs es lo suficiente capaz para estimular a células T antígeno-específicas. A continuación, se describe los diferentes métodos para obtener CDs.

#### **2.3.1 CDs derivadas de monocitos (CDmo)**

Para la obtención de CDs derivadas de monocitos, estos se obtienen a partir de leucoféresis, seleccionando a los monocitos CD14+ de las demás células mononucleares de sangre periférica, por su capacidad de adherencia al plástico o a partir de perlas inmunomagnéticas CD14+ (perlas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD14+) Posteriormente, los monocitos son inducidos a diferenciarse a CDs inmaduras (CD14- CD83-) mediante el cultivo de IL-4 y GM-CSF durante varios días. Las CDs obtenidas muestran fenotipo inmaduro, por lo que luego son tratadas con TNF $\alpha$  o ligandos de CD40 o medio acondicionado para monocitos

para inducir su maduración. Las CD maduras obtenidas muestran un fenotipo CD14-CD83+ y expresan altos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I y II (MHC I y II) y moléculas coestimuladoras (Nencioni *et al.*, 2008; Sabado & Bhardwaj, 2010).

### **2.3.2 CD de sangre periférica**

Las CD también pueden obtenerse a partir de CD circulantes. Los subconjuntos de CD comprenden menos del 1.0 % de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). La expansión *in vivo* de las células puede ser lograda mediante la administración de factores de crecimiento hematopoyéticos como Flt3-L seguido de una leucoféresis. La administración diaria de Flt3L durante 10 días permite la expansión de 48 veces de CD mieloides y una ampliación de células dendríticas plasmacitoides (CDp). Estas CD expandidas *in vivo*, muestran un aumento de marcadores de maduración y citocinas, y son muy eficaces en la estimulación de células T (Sábado & Bhardwaj, 2010).

### **2.3.3 CDs derivadas de progenitores hematopoyéticos CD34+**

Las células precursoras CD34+ se obtienen mediante leucoféresis de una muestra de médula ósea, donde las células obtenidas se expanden en cultivo durante 1 semana con la presencia de GM-CSF, Flt3-L y TNF $\alpha$ . Las células obtenidas de este cultivo son una mezcla de CD derivadas de monocitos, una gran proporción de CD mieloides en diferentes etapas de la diferenciación, pero son fenotípicamente similares a las células de Langerhans (CLs) (Sabado & Bhardwaj, 2010). En el caso de un modelo murino, el número de CD que se pueden obtener de un cultivo primario de tejidos linfáticos y no-linfáticos es muy bajo, por lo que existen dos enfoques experimentales principales para obtener CD's murinas, y ambos están basados en el cultivo de células de médula ósea con citocinas específicas. La población obtenida difiere en el fenotipo, morfología, propiedades funcionales a los subconjuntos de CD's *in vivo*, pero son altamente inmunogénicas (Mac-Keón *et al.*, 2015).

En el primer enfoque, los precursores de médula ósea se cultivan con GM-CSF solo o con la adición de IL-4. Estas células muestran un fenotipo inmaduro (baja expresión de moléculas coestimuladoras y MHC de clase II), expresan altos niveles de CD11b y tienen una baja capacidad migratoria para viajar a los ganglios linfáticos después de la inyección subcutánea. Las CD obtenidas pueden secretar IL-12p70, TNF $\alpha$ , IL-10, RANTES y CCL2 en respuesta a agonistas de TLR y conferir inmunidad protectora frente a la exposición tumoral en presencia

de agentes de maduración tales como CD40L o después de co-cultivo con células tumorales o apoptóticas. La ausencia de IL-4 durante el cultivo *in vitro* conduce a la presencia de una población inmune adicional como los macrófagos F4/80+ y los neutrófilos Ly6G + (Mac-Keón *et al.*, 2015).

En el segundo enfoque, los precursores de médula ósea se cultivan con Flt3-L. Este cultivo está compuesto por al menos tres poblaciones de CDs diferentes que, según su fenotipo, patrón de expresión de TLRs, la expresión de los receptores de quimiocinas y la producción de citoquinas, se asemejan mucho a los tres subconjuntos de CDs *in vivo*: CDsp B220+, CDs CD24high CD11b low (equivalente a CDsc CD8+) y CD24 low CD11b high DCs (equivalente a CDs CD8-). En ausencia de adyuvantes, sólo el subconjunto CD24 high CD11b low podría presentar eficazmente antígenos a células T CD8 +. Las DCs derivadas de cultivos tratados con Flt3-L también pueden secretar IL-12p70 y RANTES en respuesta a agonistas de TLR, mientras que se encontró lo contrario con TNF- $\alpha$ , IL-10 y CCL2. Su capacidad para migrar a ganglios linfáticos después de la inyección subcutánea fue superior a las CD derivadas de GM-CSF / IL-4. Así mismo, las CDs se diferencian de los macrófagos por firmas transcripcionales únicas como CCR7, Zbt46, el receptor de FltL y Kit (Mac-Keón *et al.*, 2015).

#### **2.4 Ensayos clínicos utilizando células dendríticas (CDs)**

La inmunoterapia basada en CDs tiene la ventaja que pueden emplearse antígenos tumorales específicos del paciente o de un determinado tipo de cáncer. De tal manera que las CDs pueden ser cultivadas con péptidos, proteínas, lisados de células tumorales, RNA derivado de células tumorales etc. (Parmiani *et al.*, 2003), provocando así el desarrollo de respuestas inmunológicas específicas. Los ensayos en los que se han empleado CDs como tratamiento contra el melanoma son múltiples, en un primer ensayo, los pacientes recibieron vía intranodal CDs pulsadas con Melan A/ Mart-1, Tirosinasa, gp-100, MAGE-A1 o lisados tumorales y se observó una tasa de respuesta del 25% en los pacientes mientras que tres pacientes presentaron respuesta completa (Shadendorf D *et al.*, 2001). En otro estudio a pacientes con melanoma metastásico, se les inoculó CDs pulsadas con un coctel de proteínas (gp100, MAGE-A-1, A-2, A-3, MART-1 y tirosinasa) además de un adyuvante (KHL); estos pacientes mostraron una tasa de supervivencia mayor en comparación de aquellos pacientes que no fueron inmunizados (21.9 vs 8.1 meses respectivamente), así como el desarrollo de una respuesta inmunológica dependiente de linfocitos T CD8 (Oshita *et al.*, 2012). Se observaron

resultados parecidos fueron observados en un estudio con 29 pacientes con melanoma en estadio III y IV. Los pacientes se trataron con CDs tratadas con epítopes de gp100 y tirosinasa, se observó un aumento en la inducción de una respuesta antitumoral dependiente de linfocitos T CD8 mejorando la supervivencia en estos pacientes en comparación con aquellos que no fueron tratados (15 meses vs 8 respectivamente). Por otro lado, Shuler y colegas trataron a pacientes con melanoma con cinco inoculaciones (tres intradermal y dos intravenosa) de CDs pulsadas con MAGE-A3. Se observó un aumento de CTL en 8 de 11 pacientes, en el cual se vio reflejado en la regresión de metástasis en 6 de 11 pacientes (Smith C *et al.*, 2001; Wolchock & Livingston, 2001).

Es importante mencionar que sólo una vacuna basada en el uso de CDs ha sido aprobada por la FDA. Sipuleucel-T es una vacuna de CD autólogas cultivadas con una proteína híbrida formada por la unión de un péptido de próstata (PAP) y GM-CSF. El uso de Sipuleucel mostró un aumento en la supervivencia global (4.1 meses) en los pacientes en fase III de cáncer de próstata (Obeid *et al.*, 2016)

En resumen, se ha mostrado que la vacunación con CDs es segura y puede inducir sobre todo la activación de linfocitos T antígenos tumorales específicos, que pueden incluso inducir la regresión de tumores primarios y metástasis a distancia. Aunado a lo anterior, son muy pocos los efectos adversos que se han encontrado, entre ellos están: fiebre, reacción en el sitio de inyección, fatigas o adenopatías.

En el presente proyecto, se emplearon antígenos tumorales de melanoma, específicamente los antígenos MAGE, como se describen en la siguiente sección.

### **3. Antígenos tumorales**

Las proteínas alteradas o que se expresan aberrantemente en las células tumores, se les conoce como antígenos tumorales (Prieto-Martín *et al.*, 2005). La selección de antígeno dirigida a una vacuna contra el cáncer es crítica para inducir una respuesta inmune efectiva y específica. Como se muestra en la (Fig.4), primero, los antígenos tumorales pueden ser compartidos entre múltiples tumores o pueden ser paciente específico. Los antígenos tumorales compartidos se dividen en antígenos de diferenciación tisular, proteínas sobre expresadas en células cancerígenas, los fosfopéptidos y los antígenos de línea germinal. Por

otro lado, los antígenos paciente-específico generalmente son aquellos productos de una mutación y se dividen en antígenos mutados compartidos y neoantígenos (Obeid *et al.*, 2016).

**-Antígenos de diferenciación tisular:** estas proteínas, se expresan tanto en células normales como en células cancerígenas. La expresión de estos antígenos en tejidos normales predispone a la tolerancia y a la autoinmunidad. Pueden ser considerados en terapia contra el cáncer, siempre y cuando los tejidos o las células que expresan estas proteínas puedan perderse sin comprometer la sobrevivencia del paciente, ejemplos de estos antígenos son: MART1/Melan A, gp100, Tirosinasa (Parmiani *et al.*, 2003; Melero *et al.*, 2014; Obeid *et al.*, 2016).

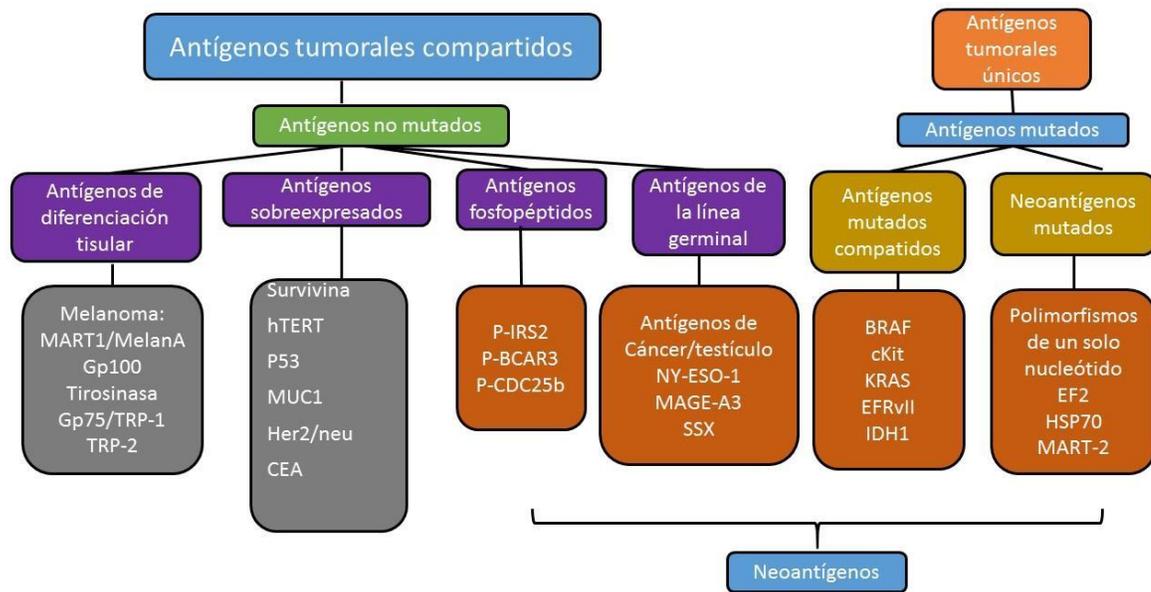
**- Antígenos aberrantemente expresados o sobre expresados:** Son antígenos altamente expresado en células tumorales y con baja, pero detectable expresión en tejidos sanos. Dentro de esta categoría se incluyen los antígenos Her2/Neu y el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), los cuales han sido empleados como marcadores tumorales de cáncer de mama y otros tumores derivados de células epiteliales (Parmiani *et al.*, 2003; Obeid *et al.*, 2016).

**-Neo antígenos:** Son aquellos que surgen de *novo* después que un gen supresor de tumor u oncogen sufre una mutación. Obeid y colaboradores propusieron en el 2016 que se deberían llamar neo antígenos a todos los antígenos que no son expresados por células somáticas, pero sí en tumorales. Entre estos se incluyen neo antígenos mutados, antígenos de cáncer/células germinales y antígenos fosfopeptídicos (Obeid *et al.*, 2016).

**-Neo antígenos mutados:** son aquellos antígenos que derivan de mutaciones en polimorfismos en un solo nucleótido. Se localizan en células malignas, pero no en células normales. Estos antígenos resultan de una mutación única-específica del paciente o que sea muy común en muchos pacientes como por ejemplo las mutaciones en BRAF, c-Kit, KRAS, NRAS. Dentro de los antígenos podemos encontrar (MART-2, TRP-2) (Obeid *et al.*, 2016).

**-Antígenos cáncer/línea germinal:** se expresan en un rango de diferentes cánceres y comúnmente se expresan en estadios avanzados. Estos antígenos también se expresan durante el desarrollo fetal, en adultos solo se expresan en gametos que se localizan en sitios inmunoprivilegiados. Ejemplo de este tipo de antígenos son: MAGE-A1, MAGE-A3, GAGE, BAGE, RAGE, NY-ESO-1 y TAG (Obeid *et al.*, 2016).

**-Antígenos fosfopéptidos:** se derivan de proteínas que se autofosforilan y están relacionadas con la activación oncogénica y son presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad I o II (MHC I o MHC II) (Obeid *et al.*, 2016).



**Figura 4. Tipos de antígenos de cáncer, con cada ejemplo.** Imagen tomada y modificada de Obeid *et al.*, 2016

La identificación de los antígenos diana adecuados es el primer y más importante paso en el desarrollo exitoso de la inmunoterapia contra el cáncer antígeno-específico. Para que los antígenos tumorales sean posibles dianas inmuno terapéuticas, los antígenos deben tener nula expresión en tejidos normales o ser altamente restringidos de modo que la autoinmunidad se puede prevenir. Los antígenos de cáncer de testículo (CTA), representan una clase única de antígenos tumorales que se expresan en una amplia variedad de tumores malignos, pero la expresión en el tejido normal está restringida principalmente a células germinales de los testículos, ovario fetal, y de placenta (Sang *et al.*, 2011). Es importante destacar que de todos los antígenos antes mencionados las proteínas MAGE son las que han tenido mayor éxito en la inmunoterapia contra el melanoma (Parmiani *et al.*, 2003).

### 3.1 MAGE (Antígenos Asociados a Melanoma)

El descubrimiento del gen que expresa MAGE se remonta a 1991 cuando Van der Bruggen y col. (1991), identificaron el gen del antígeno asociado al melanoma que fue llamado *MAGE - A1*. Su importancia radica en que, éste antígeno aislado de una línea celular de melanoma

humano MZ-2, es reconocido por los linfocitos T citotóxicos (CTL). Desde entonces, la familia *MAGE* ha sido ampliamente investigada, y se han encontrado más de 25 genes en humanos. Se clasifican como Antígenos de Cancer- Testículo (CTA) por su expresión restringida a los testículos y ocasionalmente en ovario y placenta, además de ser expresado en distintos tipos de cánceres, lo cual es muy importante dado que se trata de una molécula inmunogénica. El enfoque de los estudios sobre las proteínas *MAGE* ha sido de gran relevancia para la inmunoterapia contra el cáncer, dado que los péptidos derivados de los genes *MAGE* pueden unirse fuertemente al Complejo Mayor de Histocompatibilidad I y II. Por otra parte, se ha ganado un creciente interés en el uso de los antígenos *MAGE* como marcador en diferentes tipos de cáncer (colon, melanoma, cerebro, pulmón próstata y mama) (Barker & Salehi, 2002; Weon & Potts, 2015).

### **3.2 Familia de genes *MAGE***

Los genes *MAGE* están conservados en todos los eucariontes. Los miembros de la familia *MAGE* en humanos, se dividen en dos categorías con base en su patrón de expresión en tejidos y su localización en el cromosoma. Los genes *MAGE* tipo I se dividen en tres subfamilias (*MAGE-A*, *MAGE-B* y *MAGE-C*, y están agrupados en el cromosoma X, (*MAGE-A* en el Xq28, *MAGE-B* en Xq 21 y *MAGE-C* en el Xq26-27). Los genes *MAGE* tipo II están divididos en las subfamilias *MAGE-D*, -E, -F, -G, -H, -L y *Necdin*, se expresan en varios tejidos y no están restringidos al cromosoma X. Tanto *MAGE* tipo I y II contienen un dominio de homología *MAGE* (MHD) que contiene aproximadamente 170 aa (Weon & Potts, 2015; Barker & Salehi, 2002).

### **3.3 Expresión de *MAGE* en el cáncer**

Teniendo en cuenta la especificidad limitada de los anticuerpos anti-*MAGE* disponibles para distinguir diferentes proteínas *MAGE*, la mayoría de los investigadores utilizan el análisis de microarreglos, RT-PCR e hibridación *in situ* para caracterizar la expresión de genes *MAGE*. Mediante el uso de estas técnicas, la activación aberrante y la expresión de transcritos de RNAm codificantes para *MAGE* se encontró en varios tipos de cáncer humano de una manera linaje-independiente. De los diferentes tipos de cáncer, melanoma y cáncer de pulmón, en particular de células escamosas, poseen la frecuencia más alta de expresión RNAm-*MAGE-I*. En contraste, los tumores malignos hematopoyéticos, incluyendo linfomas y leucemia, así

como renal, colon, y cáncer de páncreas, tienen baja frecuencia de expresión de RNAm-MAGE-I. Por otro lado, cáncer derivado de células epiteliales, como el cáncer de mama, de vejiga y de próstata, se caracterizan por tener una expresión intermedia de RNA codificante para MAGE I, por ejemplo, la expresión de RNAm codificante de MAGE-A3 se observó en el 85% de carcinoma de pulmón, pero sólo en 41% de mieloma múltiple, 37% de cáncer de vejiga y 1% en cáncer de mama (Sang *et al.*, 2011).

También se ha observado que la expresión de los genes *MAGE* en varios cánceres, está asociada con bajos resultados clínicos y un bajo pronóstico, por ejemplo, la expresión de MAGE-A3 y -A9 está significativamente correlacionada con la disminución de la tasa de supervivencia en cáncer de pulmón de células no pequeñas (Weon & Potts, 2015).

### **3.4 Función de las proteínas MAGE**

En relación con la función de las proteínas MAGE, existe una creciente evidencia que sugiere su implicación en la regulación de la progresión del ciclo celular y la apoptosis. Las proteínas MAGE II Necdin, MAGE-D1 (también nombrado como NRAGE o Dlxin,) y MAGE-D4 (Magphinin) están involucradas en la detención del ciclo celular y la muerte celular. Necdin puede unirse al factor de transcripción E2F-1, que es responsable de inducir la promoción de la progresión del ciclo celular de G1 a la fase S (Taniura *et al.*, 1998) Además, Necdin también inhibe la apoptosis mediada por p53 aumentando el efecto inhibitorio de p53 en la progresión del ciclo celular. MAGE-D1, se une a varias proteínas, incluyendo el receptor p75 neurotrofina y proteína inhibidora de la apoptosis (IAP), bloquean la progresión del ciclo celular y facilita el factor de crecimiento nervioso de apoptosis mientras que MAGE-D4 ha sido sugerido como regulador de la proliferación celular durante la gametogénesis, dado que la expresión ectópica suprime la proliferación celular (Taniura *et al.*, 1999; Sang *et al.*, 2011).

Por otro lado, MAGE también tiene un papel en la apoptosis a través de la unión de MAGE-A3 a la caspasa 12 (Sang *et al.*, 2011).

Mientras que también se ha estudiado que los genes *MAGE* están implicados en el desarrollo embrionario, dado que se ha constatado que la familia MAGE-A se expresa brevemente durante el desarrollo embrionario temprano en ciertas células somáticas como el tallo cerebral (Meek & Marcar, 2012).

Han sugerido reportes de los genes *MAGE* como iniciadores de la tumorigénesis. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de *MAGE-A6* y *C2* en líneas celulares de cáncer aumenta su potencial invasivo *in vitro*; *MAGE-A3* y *A6* promueven la transformación de fibroblastos y aumentan el crecimiento de células tumorales. Además, el bloqueo del gen *MAGE C* retrasó la formación de melanoma metastásico *in vivo*. Con lo anterior se sugiere que las proteínas *MAGE* tipo I poseen una actividad oncogénica (Weon & Potts, 2015).

### **3.5 *MAGE* en la inmunoterapia**

Las proteínas *MAGE* se han estudiado para la inmunoterapia contra cáncer. Debido a que cuando los genes se sobreexpresan en el citosol de las células cancerosas, los genes de tipo I se escinden y son transportados hacia el retículo endoplásmico, donde los péptidos se unen al MHC I y II y son transportados a la superficie celular, promoviendo la activación de linfocitos T. Así mismo la expresión restringida de los genes *MAGE* tipo I y su antigenicidad ha estimulado la investigación del uso de estos antígenos como blancos para la inmunoterapia (Barker & Salehi, 2002; Weon & Potts, 2015).

En múltiples ensayos en los que se han empleado los antígenos *MAGE*, se ha demostrado regresión tumoral en pacientes con cáncer inmunizados con el antígeno *MAGE A3* (Barker & Salehi, 2002). En otro ensayo con el péptido *MAGE-A3* en pacientes HLA-A1, siete de los 25 pacientes mostraron una regresión significativa del tumor, incluyendo tres casos de remisión completa (Meek & Marcar, 2012).

De esta manera, la identificación de Antígenos Asociados a Tumor que puedan ser reconocidos mediante el TCR de los linfocitos T, ha sido la base para la inmunoterapia celular contra el cáncer. Como se mencionó anteriormente, estos antígenos deben tener expresión única en tumores y no deben tener expresión en células normales para evitar reacción cruzada.

Hasta la fecha hay un sinnúmero de estudios que hablan sobre la inmunogenicidad de los antígenos *MAGE* en humano, y su uso en la inmunoterapia, sin embargo, hay pocos trabajos que se restringen al estudio de un epítipo que sea capaz de ser presentado por el MHC I en ratones. Ante esta necesidad, Eggert y colaboradores en el 2006 se dieron a la tarea de identificar un epítipo peptídico capaz de unirse al MHC I de ratón.

### 3.6 MAGE AX

MAGE AX fue construido como alternativa para el estudio de la inmunoterapia contra el melanoma en un modelo murino, contiene una secuencia consenso localizado en los antígenos MAGE A1-A3 y MAGE-A5 de ratón y posee una alta afinidad a MHC I, Eggert y cols. (2004) observaron que MAGE-AX inducía protección contra el melanoma cuando CDs de bazo fueron cargadas con el antígeno MAGE AX, además, corroboró el desarrollo de una respuesta inmune dependiente de INF $\gamma$  y linfocitos TCD8, así como una disminución en el número de tasa de metástasis (Eggert *et al.*, 2004).

Posteriormente, en 2014 Piñón-Zárate y cols, utilizaron este péptido para cargar CDs derivadas de médula ósea de ratón (CDMOs), utilizando como adyuvante a GK1, un péptido derivado de *Taenia crassiceps* el cual confiere protección inmunológica contra el virus de influenza. Como resultado se observó que este tratamiento indujo en las CDMOs el aumento significativo de CD86 e IL-12. Además, el uso de CDs derivadas de médula ósea de ratón tratadas con TNF $\alpha$ /GK-1/MAGE-AX indujo entre los diferentes grupos, la tasa más grande de supervivencia, así como los tumores más pequeños, encontrándose así mismo un aumento en los niveles de linfocitos CD8 y la producción de INF $\gamma$  (Piñón-Zárate *et al.*, 2014). Por estas razones, se aporta evidencia del uso potencial del péptido MAGE-AX para la inmunoterapia celular contra el cáncer.

### 4. Maduración de Células Dendríticas

En 1973 Ralph Steinman y sus colegas, quienes descubrieron a las CDs, demostraron que estas células son capaces de madurar lo que significa que las CDs adquieren nuevas funciones una vez que se encuentran con algún patógeno. Como se mencionó anteriormente las CDs se encuentran en los tejidos periféricos, ahí las CDs se caracterizan por poseer un fenotipo inmaduro, es decir, éstas, tienen la gran capacidad de capturar eficientemente antígenos y cargarlos a MHC II, además que expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras (Palucka *et al.*, 2012). Para el reconocimiento de antígenos, estímulos o “señales peligro”, las CDs poseen receptores de reconocimiento de patógenos, entre los que podemos encontrar: receptores de tipo Toll (TLR's) y receptores citoplasmáticos tipo NOD o RIG que sirven como sensores de DNA y RNA. Además las CDs pueden no sólo pueden reconocer los patógenos sino fagocitarlos a través de receptores FC (FC $\gamma$  o CD64) y receptores FC $\gamma$  tipo II (CD32), integrinas (A $\alpha$ 3 o A $\alpha$ 5), receptores de lectina tipo C (receptor de manosa DEC205), receptores de

células apoptóticas y receptores scavenger (Palucka *et al.*, 2013; Sábado *et al.*, 2017). Posterior al reconocimiento las CD procesan los antígenos en péptidos que son cargados en el MHC para su presentación a células T y se someten a una serie de cambios fenotípicos y funcionales estos incluyen : 1) disminución de la actividad de captura de antígenos, 2) aumento de la expresión de moléculas de superficie (MHC II) y moléculas coestimuladoras, 3) adquisición de receptores de quimiocinas (CCR7) el cual permite la migración de las CD a los ganglios linfáticos 4) la habilidad de secretar diversas citocinas (Por ejemplo IL-12, que controla la diferenciación celular hacia una respuesta Th1) y 5) expresión de moléculas de adhesión (ICAM o CD54) que se unen al antígeno en linfocitos T para formar contactos estables duraderos, para la óptima activación de las células T (Sabado & Bhardwaj, 2010; Palucka *et al.*, 2012; Palucka *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2014). Además, las citocinas producidas durante el proceso de maduración, juegan un rol en la diferenciación y activación de los linfocitos NK, NKT, monocitos, linfocitos B y T. De los diferentes subtipos de células T CD4+, así se pueden desarrollar diferentes tipos de respuestas inmunológicas como las Th1, Th2, Th17 y Treg. Cada tipo de respuesta puede ser predominante en determinadas condiciones. De tal manera, la respuesta Th1 es importante para respuestas inmunológicas en contra de patógenos intracelulares. La respuesta Th2 es importante para respuesta en contra de parásitos. Las células Th17 recientemente descritas son importantes para una respuesta inmune en contra de bacterias extracelulares y hongos, pero al mismo tiempo también pueden controlar la autoinmunidad. Las células T regulatorias son importantes para el control de respuestas inmunes. Así mismo las citocinas producidas por las CD, reclutan a células NK, NK-T, monocitos y células B (Sabado & Bhardwaj, 2010; Sabado *et al.*, 2017).

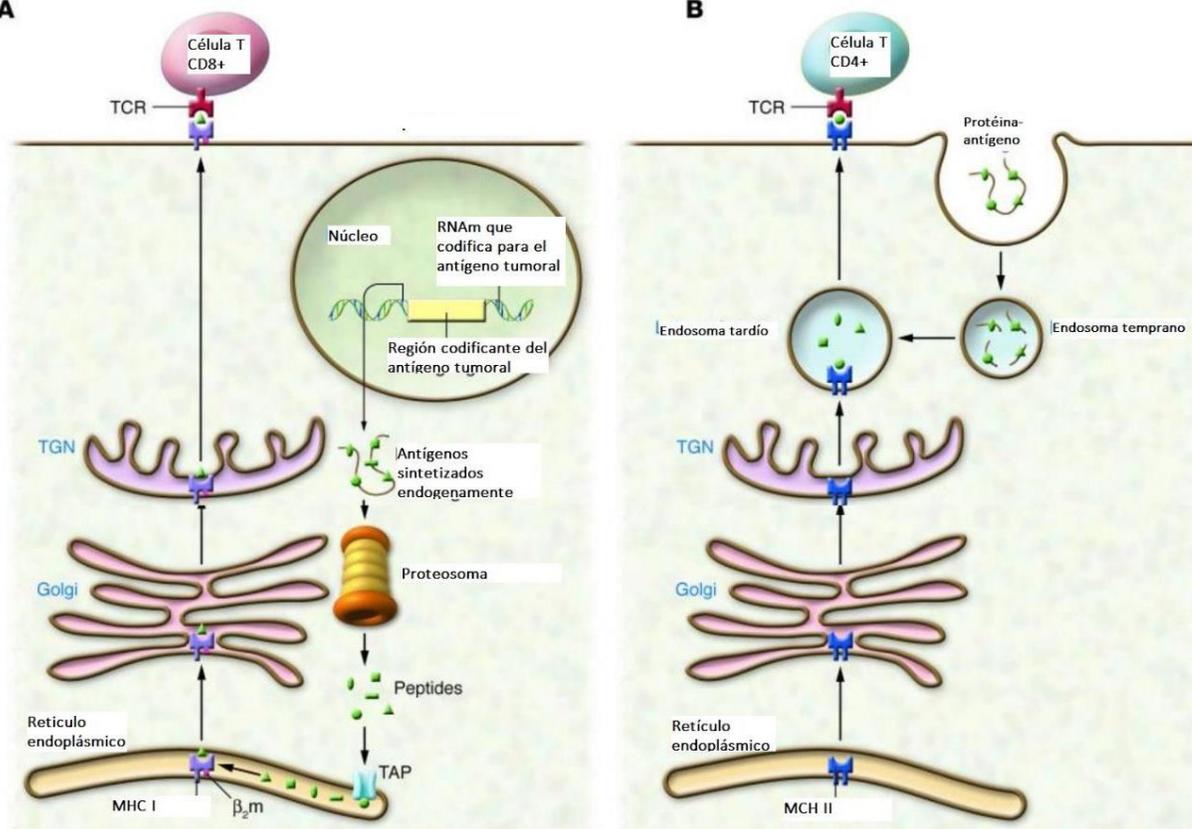
#### **4.1 Reconocimiento, procesamiento y presentación de antígenos**

Las CD pueden presentar antígenos intracelulares y extracelulares o exógenos. Los antígenos intracelulares, usualmente son presentados vía MHC I (mediante la vía citosólica), mientras que los antígenos exógenos se presentan generalmente vía MHC II (por la vía vacuolar). Un paso crucial en la inmunoterapia contra el cáncer es la presentación de antígenos tumorales exógenos mediante la vía MHC I, con el objetivo de inducir una respuesta dependiente de linfocitos T CD8 las cuales están implicadas en la eliminación de células tumorales (Lesterhuis *et al.*, 2008 y Sábado *et al.*, 2017).

Por otro lado, los antígenos intracelulares, son degradados a péptidos por el proteosoma, posteriormente los péptidos son transportados al retículo endoplásmico rugoso (RER) a través de transportadores para la presentación de antígenos (TAP) y luego son colocados en moléculas clase I. A continuación, el complejo péptido-MHC I, es transportado hacia la superficie de la CD para que se lleve a cabo la presentación de antígenos a los linfocitos TCD8+.

En el caso de los antígenos exógenos primero son reconocidos y luego procesados en los endosomas, los cuales, contienen proteasas que degradan a los antígenos-proteicos en péptidos. Posteriormente estos son cargados en moléculas MHC II. Así el complejo péptido-MHC II es entonces transportado a la superficie celular para que se lleve a cabo la presentación de péptidos a las células T CD4+ (Fig.5).

Dado que, la señal inducida por el reconocimiento de TCR-MHC I/II no es suficiente para la activación completa de las células T, debe existir una segunda señal durante la presentación de antígenos, relacionada con la interacción entre las moléculas coestimuladoras localizadas en las CD's con sus ligandos en los linfocitos T. De hecho, los primeros trabajos de Jenkins, Schwartz y cols. (1987), mostraron que la sola unión de TCR con el MHC induce anergia o falta de respuesta y que la señal estimuladora es necesaria para una exitosa presentación de antígenos. Por lo que la expresión de las moléculas coestimuladoras es muy importante para la activación de linfocitos T, que generen respuestas inmunológicas, dando así importancia terapéutica a estas moléculas (Sharpe & Freeman, 2002).



**Figura 5. Vías de procesamiento y presentación de antígenos: A)** La vía de presentación de antígenos intracelulares son presentados por la vía MHC I, los antígenos pueden ser producidos por la propia célula o ser introducidos al citoplasma de la APC para posteriormente ser degradados por el proteosoma, para formar péptidos cortos que se tranloquen al retículo endoplásmico (RE) a través de poros especiales controlados por el transportador asociado a proteínas (TAP). En el lumen del RE, los péptidos se asocian a moléculas clase I (MHC I) y son transportadas a la superficie celular, donde el antígeno es presentado a células T CD8+ mediante la unión MHC I/ TCR de las células T. **B)** La vía comienza cuando la CD captura un antígeno exógeno o extracelular, donde el antígeno es degradado en los endosomas para posteriormente unirse con Moléculas clase II (MHC II), este complejo (MHC II/antígeno) es transportado a la superficie celular para que el antígeno exógeno sea presentado a los linfocitos T CD4+.

## 5. Moléculas coestimuladoras

Todas las moléculas de la familia B7 junto con sus receptores son glicoproteínas transmembranales tipo I y son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Aunque los miembros de la familia B7 sólo comparten entre el 20-30% de identidad en la secuencia de aminoácidos, comparten una estructura secundaria: un dominio extracelular Ig-C y un dominio Ig-V. La familia de moléculas B7 está comprendida por siete miembros, que son CD80 (también conocido como B7.1), CD86 (también conocido como B7.2), B7-DC (también conocido como PD-L2 o CD273), B7-H1 (también conocido como PD-L1 o CD274), B7-H2 (también conocido como ICOSL), B7-H3 (también conocido como CD276) y B7-H4 (también conocido como B7S1 o B7x) (Zou & Chen, 2002). A continuación, se describen las diferentes interacciones entre las proteínas de la familia B7 durante la presentación de antígenos.

## 5.1 La vía CD80/86-CTLA-4/CD28

En esta vía se incluye a los miembros de la familia B7.1 Y B7-2 también llamados CD80 y CD86. Su expresión está restringida a las CPA (CDs, células de Langerhans, macrófagos activados y células B), pero raramente expresada en células estromales y en células tumorales no hematopoyéticas (Zou & Chen, 2002).

En relación con la expresión de CD86 en CPA, ésta se encuentra expresada constitutivamente a bajos niveles y es rápidamente aumentada, ante un estímulo inflamatorio, mientras que CD80 se expresa posterior a la activación de las APCs. La expresión temprana de CD86 indica que es un co-estimulador más importante para iniciar respuestas inmunológicas (Sharpe & Freeman, 2002; Zou & Chen, 2002; Wang & Chen, 2004; Schildberg *et al.*, 2016). De acuerdo a su conformación, CD80 está presente en forma dimérica predominantemente en la superficie celular mientras que CD86 es monomérica. Tanto CD80 como CD86 poseen una unión dual, uno es con el receptor activador CD28 y el otro con el receptor inhibidor CTLA-4. No obstante, se ha observado que cuando hay una competencia, CD86 tiene una preferencia relativa por CD28, en comparación con CD80 que se une a mayor afinidad con CTLA-4 (Esensten *et al.*, 2016; Schildberg *et al.*, 2016)

Las diferencias funcionales entre CD80 y CD86 parecen reflejarse en la expresión diferencial, en varios tipos de células o en diferentes momentos durante una respuesta inmune, pero puede haber algunas diferencias funcionales intrínsecas. Así, CD80 y CD86 proporcionan señales coestimuladoras importantes para aumentar y mantener una respuesta de células T a través de la interacción con CD28. Se ha observado que cuando un antígeno se une al TCR de las células T, éste adquiere una conformación espacial diferente, lo que hace que CD28 tenga una unión más afín a CD80. Por otra parte, la expresión de CD28 es constitutiva en la superficie de las células T y se encuentra expresada alrededor del 80% de las células T CD4+, y en el 50% de células T CD8+. Actúa como una señal para promover la activación de las células T, resultando en la traducción de la producción de citocinas tales como IL-2 para la producción clonal y la diferenciación, además de la expresión de CD25, también confiere señales de supervivencia a través de la vía Bcl-XL (Sharpe & Freeman, 2002; Wang & Chen, 2004). Aunque está bien establecido que una de las funciones de la vía de CD80/86-CD28 consiste en promover la activación de células T, otra función que se les ha establecido es el de promover la tolerancia en células T. Por lo tanto, CD28 actúa como pro, o anti-inflamatorio,

dependiendo con el tipo de células T que se encuentran. Es decir, CD28 actúa previniendo la autoinmunidad espontánea (Schildberg *et al.*, 2016). Se ha observado que ratones deficientes para CD28 o para sus ligandos (CD80 y CD86) disminuye en el número de células T reguladoras (Tregs) en el timo y en la periferia, lo que los predispone a enfermedades autoinmunes, tales como la diabetes en ratones no obesos (Wang & Chen, 2004; Greenwald *et al.*, 2005; Esensten *et al.*, 2016; Schildberg *et al.*, 2016;).

En cambio, la expresión de CTLA-4 es regulada positivamente posterior a la activación de las células T (Schildberg *et al.*, 2016). CTLA-4 proporciona una señal negativa, inhibiendo la síntesis de IL-2 y la progresión del ciclo celular y terminando las respuestas inmunológicas mediadas por células T. Debido a sus características, CTLA-4 ha sido empleado como blanco terapéutico en personas enfermas con cáncer y enfermedades autoinmunes (Sharpe & Freeman, 2002). Por otro lado, se ha descrito otro mecanismo de acción en donde se ve involucrado CTLA-4 para inhibir una respuesta en células T. Este mecanismo está relacionado con la unión de CTLA-4 con sus ligandos en las CDs, lo que genera que estas últimas produzcan INF $\gamma$  que puede inducir la producción deIDO (idoleamina 2,3 dioxigenasa), implicada en la apoptosis e inhibición en la activación de células T (Greenwald *et al.*, 2005).

## 5.2 CD40

CD40 es un receptor miembro de la superfamilia de factor de necrosis tumoral, los primeros estudios de CD40 enfatizaron que su expresión estaba en las células B y que su ligando (CD40 L o CD154) inducía la proliferación de las células B. Posteriormente anticuerpos monoclonales anti-CD40, el análisis de mRNA y expresión de proteínas encontraron que CD40 se encontraba expresada constitutivamente en bajos niveles en CD's, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y endoteliales. El descubrimiento de CD40 en otras líneas celulares se encontró que generaba una respuesta diferente a los que hacía en células B, por ejemplo la unión de CD40 en células B promueve la proliferación; mientras que en células endoteliales, su unión provoca la muerte y en otros promueve la producción de GM-CSF esto es debido a que CD40 contiene una cola citoplasmática que contiene sitios que recluta a proteínas asociadas a la familia TNF (TRAF's), lo que genera una cascada de señalización que activa genes involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias (IL-1B, IL-6, IL-8, IL-15, TNF $\alpha$ , MIP-1a e IL-12). Esta última citocina es la encargada de generar una polarización de la respuesta Th1 en linfocitos T, así como un aumento en las moléculas coestimulatrias CD80 y

CD86, se considera a CD40 como un marcador para distinguir a las CDs de inmaduras a maduras. Por otra parte, se ha observado que la regulación de CD40 se ve inducida mediante TLR-4,7 y 9 en CD's (Shönbeck *et al.*, 2000; Daphne & Clark, 2009; Fonsati *et al.*, 2010).

Así mismo, el ligando de CD40 comúnmente llamado CD40-L o CD154 se ha encontrado en una variedad de CDs como en CL, CDp, CD de bazo y CD de pulmón. La unión con su ligando CD154 modula la expresión de moléculas de adhesión (E- selectina, VCAM-1 o CD54) y activa macrófagos y células NK (Shönbeck *et al.*, 2000; Fonsati *et al.*, 2010). En condiciones patológicas, CD40 también es expresado en muchos tumores malignos linfoides como en Linfoma de Hodking, leucemias agudas mieloide y en células de mieloma, es menos conocido que CD40 esté expresado en tumores sólidos; en melanoma, su expresión es relativamente común, por lo que se ha propuesto un anticuerpo monoclonal (anti-CD40) como tratamiento (Peters *et al.*, 2010; Shönbeck *et al.*, 2000).

## **Moléculas coinhibitorias**

### **5.3 CD273 Y CD274**

También llamados PD-L1 (CD274) y PD-L2 (CD273) son homólogos de la familia B7, y tienen como ligando a PD-1. Cuando PD-1 está bloqueado o se encuentra ausente, CD274 puede funcionar como una molécula coestimuladora, uniéndose a CD80 de las células T. Además, CD274 puede transmitir señales a las células tumorales o a las células T. Por lo tanto, CD274 puede funcionar tanto como ligando, como receptor. Se ha observado que la expresión de CD273 y CD274, se encuentra tanto en órganos linfoides y no linfoides, en comparación con CD80 y CD86 cuya expresión se restringe a células hematopoyéticas (Sharpe & Freeman, 2002 y Zou & Chen, 2002).

En el caso de CD274, se puede localizar en todo el cuerpo. Específicamente se ha constatado que CD274 se expresa en células tumorales cuando se activa la vía PTEN (phosphatidilinositol-3-cinasa), aunque la mayoría de las células tumorales humanas *in vitro* tienen una baja expresión de CD274. También se ha encontrado que las células tumorales que expresan CD274 inducen apoptosis en los linfocitos T efectores (Shilderberg *et al.*, 2016).

CD274 puede expresarse en células T, células B, CD's, monocitos /macrófagos, células NK, células endoteliales vasculares, células madre mesenquimales y mastocitos derivados de

médula ósea. La expresión de CD274 también ha sido localizada en sitios inmunoprivilegiados como en los ojos y la placenta, indicando que la molécula CD274 podría inhibir células T autorreactivas o células B y por lo tanto controlar las respuestas inflamatorias en estos tejidos y órganos (Sharpe & Freeman, 2002; Zou & Chen, 2002). En el caso específico de las CD8 se expresan bajas concentraciones de este receptor, sin embargo, aumenta drásticamente cuando las CD8 se encuentran en contacto con células tumorales, como en el caso de tumores del adenocarcinoma ovárico (Wang & Chen, 2004).

La expresión de CD274 también puede ser inducida por citocinas, siendo INF $\gamma$  una de las más potentes, dado que puede inducir la alta expresión de CD274 en hepatocitos, células tumorales, células epiteliales (como el endotelio) en mucosas y en CD8 mieloides (Sharpe & Freeman, 2002; Zou & Chen, 2002; Wang & Chen, 2004). Aunado a lo anterior, la generación de una respuesta fuerte tipo Th1 puede inducir a la expresión de CD274 en las CPA u otros tipos celulares a través de la producción de INF $\gamma$ , con el objetivo de mantener la adecuada activación de células T y así evitar daños a los tejidos u órganos. De manera que CD274 puede ser inducida en respuestas a la inflamación y a señales de peligro sostenibles.

En el caso de CD273, su expresión es más amplia que CD274. CD273 se encuentra expresada en células Treg (CD4+CD25+), en células no hematopoyéticas, células endoteliales y órganos no linfáticos como corazón, pulmón, páncreas, músculo y placenta. La expresión de CD273 en órganos no linfoides sugiere que puede regular células T o B autorreactivas en los tejidos periféricos y/o pueden regular respuestas inflamatorias en esos órganos (Greenwald *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, CD273 y CD274 se unen a PD-1 (Proteín Death-1), este se caracteriza por carecer un motivo MYPPPY que se encuentra en CD28 y CTLA-4 lo que le confiere a estas estructuras la capacidad de formar homodímeros. PD-1 se expresa en células activadas, sobre todo en células T CD4+, CD8+, células B en células mieloides y en células NK-T, aunque la expresión es siempre baja en comparación con CD28 y CTLA-4, los cuales se expresan predominantemente en células T (Sharpe & Freeman, 2002 y Wang & Chen, 2004). La unión de CD273 por PD-1 en células T genera un arresto del ciclo celular de G0 a G1, sin embargo, no incrementa o genera muerte celular.

Así mismo, estudios han mostrado que la expresión de CD273 está asociada en la activación celular, no en muerte celular. Ratones “*knock out*” para PD1 mostraron un aumento en células T doble positivos, sin embargo, redujo el número de células positivas para CD8, así mismo estos ratones transgénicos de la cepa C57BL6 desarrollaron artritis reumatoide y lupus; acelerando la progresión de la enfermedad, mostrando síntomas a los seis meses de edad (Sharpe & Freeman, 2002).

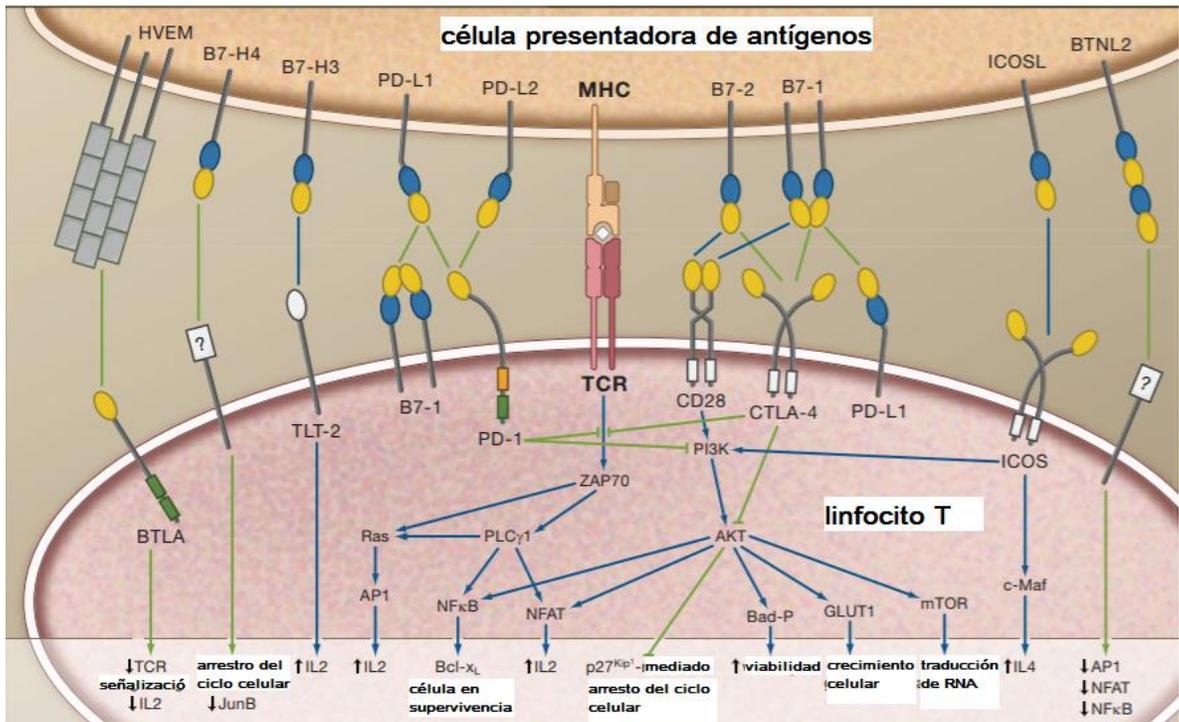
En CDs en concentraciones muy bajas de antígenos, CD273 y CD274 inhiben la proliferación y producción de citocinas en las células T, aun cuando haya fuertes señales coestimuladoras por CD80/86 hacia CD28. Por el contrario, a altas concentraciones de antígeno, CD273 y CD274 no inhiben la proliferación de células T, sin embargo, sí reducen notablemente la producción de citocinas. También se observó que CD273 y CD274 actúan en células T “exhaustas” o sobre activadas. A pesar de lo anterior, la inhibición generada por estas moléculas puede ser superada mediante la adición exógena de IL-12, y por una fuerte interacción coestimuladora entre CD80/86-CD28, pero no mediante señales coestimuladoras inducida por anticuerpos exógenos (Sharpe & Freeman, 2002).

Tanto CD273 como CD274 pueden expresarse en células tumorales, y generalmente son empleadas para evadir la destrucción tumoral mediante la respuesta inmune. Es por lo anterior que el uso de anticuerpos, capaces de bloquear receptores co-inhibitorios, (CTLA-4 y PD-1), fueron los más prometedores para reducir, el tamaño tumoral y la progresión de tumores como el melanoma avanzado o el carcinoma renal (Leung & Suh, 2014). Tratamientos con anticuerpos anti-CTLA-4 muestran un aumento en la activación de células T, generando una regresión del tumor y supervivencia mayor del paciente. Dos anticuerpos (Ipilimumab e Iambrolizumab) se han investigado en la fase clínica, y han demostrado éxito en la inmunoterapia del cáncer, sobre todo en melanoma. El primero de ellos (Ipilimumab) demostró tener un aumento en el número de células T circulantes-activada. Así mismo, en combinación con una vacuna de péptidos, este anticuerpo demostró generar una respuesta inmune-específica. En 2010, un ensayo clínico seminal de fase III de monoterapia con ipilimumab proporcionó resultados alentadores, ya que los pacientes tratados con melanoma metastásico previamente tratados con dacarbazina aumentaron la supervivencia global. Basado en estos resultados la FDA (Food and Drug Administration o Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) y la Agencia Europea de Medicamentos ha

aprobado el Ipilimumab para el tratamiento del melanoma metastásico en 2011 (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011; Leung & Suh, 2014).

En numerosos modelos de cáncer murino, la inhibición o la ausencia del receptor inhibidor PD-1 se ha mostrado en la generación de respuestas anti-tumorales, resultando en una disminución del tamaño tumoral. De la misma manera, en modelos de cáncer murino, muestra que el bloqueo del ligando puede rescatar la actividad de las células T y así generar la regresión de tumores. Sin embargo, estudios del bloqueo de PD-L2 (CD273) han proporcionado resultados contradictorios, dudando del papel inhibidor que tiene esta proteína (Leung & Suh, 2014).

Si bien el bloqueo para el receptor de CTLA-4 se ha caracterizado en pacientes humanos, los estudios clínicos que examinan el bloqueo para el receptor PD-1 se han iniciado recientemente, y por lo tanto los datos disponibles son limitados. Sin embargo, los primeros ensayos han sido satisfactorios; el primer estudio clínico incluyó un anticuerpo anti-PD-1 (MDX-1106), el cual provocó respuestas parciales en pacientes con melanoma y carcinoma renal. En estudio adicional con otro anticuerpo anti-PD-1 (BMS-936558) también se demostró que hubo respuesta objetiva en pacientes con cáncer de células no pequeñas de pulmón, melanoma y cáncer de células renales, lo que no ocurrió en los pacientes cuyos tumores fueron negativos para el PD-L1. El tratamiento con lambrolizumab, otro anticuerpo que bloquea PD-1, ha producido una regresión tumoral sostenida en pacientes con melanoma avanzado (Leung & Suh, 2014).



**Figura 6. Moléculas coestimuladoras y coinhibitorias más importantes para la activación de células T.** La activación de linfocitos T se inicia cuando se reconoce el antígeno presentado por las CPAs, por el complejo MHC/TCR y con la ayuda de las moléculas coestimuladoras. Una vez que se dio la activación de las células T, muchas moléculas coinhibitorias se ven aumentadas en su expresión para atenuar las moléculas coestimuladoras. Algunos moléculas coestimuladoras y coinhibitorias están expresadas en células hematopoyéticas, CPA, tumores, células T etc. como se indica en el texto. Las moléculas coestimuladoras y coinhibitorias de la familia B7-CD28 son las encargadas de que se dé una respuesta efectora, regulatoria, de memoria o células T exhaustas. Imagen tomada y modificada de Paterson *et al.*, 2009.

## 6. Adyuvantes

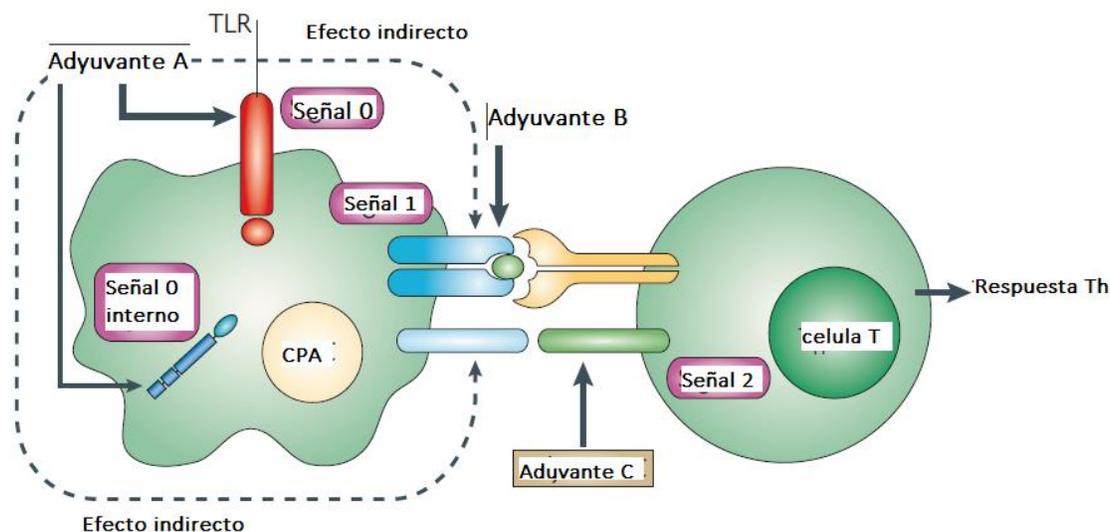
Los adyuvantes son un grupo heterogéneo de componentes, esto suele confundirse con la palabra inmunoestimulante, sin embargo, los estimulantes son compuestos simples con propiedades inmunoestimulantes intrínsecas e inmunomoduladoras, mientras que los adyuvantes pueden poseer diferentes actividades como: acarreador (depósito), inmunoestimulante e inmunomodulador (Guy, 2007).

El término adyuvante proviene del latín *adjuvare*, que significa ayudar o mejorar. ¿Por qué las vacunas necesitan ayuda y por qué las nuevas vacunas necesitan más ayuda que las vacunas ya establecidas?: Los adyuvantes pueden usarse para diversos fines: 1) aumentar la inmunogenicidad de antígenos altamente purificados o recombinantes; 2) reducir la cantidad de antígeno o el número de inmunizaciones necesarias para la inmunidad protectora, 3) mejorar la eficacia de las vacunas en los recién nacidos, los ancianos o las personas

inmunodeprimidas, 4) como sistemas de suministro de antígeno para la captación de antígenos por la mucosa, 5) para provocar respuesta inmunes fuertes y duraderas y 6) para la inducción de respuestas celulares fuertes, que incluya la participación de linfocitos Th y citotóxicos, además de la producción de anticuerpos (Aguilar & Rodríguez, 2007; Guy 2007).

Según la hipótesis de las tres señales, para que se de la inducción de una respuesta Th, se requiere de tres señales, denominadas como señal 0, 1 y 2. En teoría los adyuvantes pueden actuar en estas tres señales, y dependiendo en donde actúen los adyuvantes se clasifican en A, B y C (Fig.7). Los adyuvantes de tipo B interactúan con CPA y el reconocimiento del antígeno mediante la amplificación de la señal 1, los adyuvantes de tipo C actúan en el aumento de la señal 2 a través de la interacción con moléculas coestimuladoras sobre las CPA, un ejemplo bien conocido es TGN1412, un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD28 que estimula directamente a las células T. Y finalmente los adyuvantes de tipo A, estos son agonistas de TLR's, por lo tanto, pueden actuar sobre la señal 0 e indirectamente sobre la señal 2 activando a las CPA y desencadenando la secreción de citocinas como IL-12 (Guy, 2007; Brunner *et al.*, 2010;).

Ante una invasión patógena, los microorganismos poseen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son reconocidos por células del sistema inmune innato a través de receptores no polimórficos (PRR's), entre los cuales podemos encontrar a los TLR's, NOD, NLR's RIG, y ALR's. Los TLR's son proteínas que se encuentran ancladas en la membrana o en los endosomas de algunas células del sistema inmune innato como monocitos, macrófagos y CDs. Entre los diferentes PRR's, los TLR's han mostrado ser cruciales en los primeros pasos en la respuesta inmune. Estos receptores fueron descubiertos en células humanas y nombradas posteriormente por el gen Toll en *Drosophilla melanogaster*. La cola citoplasmática de los TLR's contiene Interleucina-1 que puede interactuar con vías de señalización río abajo. Los mecanismos por los cuales los ligandos de TLR's pueden romper la tolerancia a antígenos asociados a tumores en CDs es debido a que una vez que se une el ligando al TLR, una vía de señalización se activa dando como resultado la expresión de genes asociados a la producción de citocinas proinflamatorias y un aumento en la regulación de las moléculas coestimuladoras antes mencionadas como CD80/CD86/CD40 (Guy, B. 2007; Temizoz, et.al, 2016).



**Figura 7. Mecanismo de acción de adyuvantes.** La iniciación de una respuesta Th requiere de tres señales, referidos como señal 0, señal 1 y señal 2. En teoría los adyuvantes pueden actuar en cada una de las tres señales. Los adyuvantes más recientes desarrollados, son los agonistas de receptores de tipo Toll, estos son llamados adyuvantes de tipo A. Adyuvantes y formulaciones que ayudan en el procesamiento de antígenos por las CPA o la captura de antígenos, son adyuvantes de tipo B, actuando en la señal 1, y su efecto es mediado por el aumento de presentación de antígenos hacia las células T. Los ligando específicos para moléculas coestimuladoras, como los agonistas de CD28, pueden aumentar la señal 2 y son llamados adyuvantes tipo C. La señal 3 representa mediadores liberados de las CPA hacia los linfocitos, por ejemplo, IL-12. Imagen tomada y modificada de Guy, 2007.

## 6.1 Receptores Tipo Toll (TLRs) y adyuvantes

De los TLRs derivados de la *Drosophila toll*, diez de ellos se han descrito hasta ahora en los seres humanos. El ligando de TLR1-2, a diferencia de la mayoría de los TLR's que funcionan solos, el TLR-2 funciona dimerizándose con el TLR1 o TLR-6. Donde el heterodímero de TLR1-TLR2 es responsable de la detección de los lipopéptidos de bacterias Gram (-), mientras que el heterodímero de TLR2-TLR6 detecta las lipoproteínas de bacterias Gram (+). El TLR-3 es una molécula endosómica que ante una infección de tipo viral, detecta hebras de doble cadena de RNA. TLR4-4 reconoce estructuras de lipopolisacáridos (LPS) altamente tóxicas, sin embargo, los derivados no tóxicos del lipopolisacárido (LPS), como el monofosforil lípido A (MPL) y el glucopiranosil lípido A (GLA), están actualmente disponibles para su uso en vacunas experimentales o aprobados para ser utilizados en vacunas humanas; TLR7 reconoce el RNA de cadena sencilla viral. Aunque el modo de acción no se conoce completamente, se sabe que la inducción de interferones de tipo I a través de la vía TLR7-MyD88-IRF7 desempeña un papel importante para mediar sus actividades antivirales y antitumorales. El TLR9 es otro TLR endosómico que reconoce moléculas de DNA intracelular de origen microbiano debido a la presencia de motivos CpG no metilados que se encuentran en genomas bacterianos y

virales. CpG ODN es un ligando TLR9 sintético capaz de activar la vía de señalización TLR9-MyD88-IRF7 para inducir interferones de tipo I además de activar la vía de señalización TLR9-MyD88-NF- $\kappa$ B para inducir la producción de citoquinas pro inflamatorias a partir de células inmunitarias (Aguilar & Rodríguez, 2007; Smyth, M *et al.*, 2016; Temizoz *et al.*, 2016).

En este sentido, se ha observado que combinaciones de adyuvantes, que se pueden unir a diferentes TLRs, generan una respuesta sinérgica y por lo tanto una respuesta más potente. Por ejemplo, el adyuvante AS15 actúa vía TLR 4 y TLR 9. Se ha informado, de una vacuna compuesta con MAGE A3 y de adyuvante AS15 y se obtuvieron respuestas inmune específicas en personas con melanoma en fase II (Palucka *et al.*, 2013).

A pesar de los resultados prometedores en los ensayos clínicos utilizando nuevos adyuvantes, sólo hay unos pocos adyuvantes autorizados para su uso en la inmunoterapia contra el cáncer, lo que indica la necesidad de ensayos clínicos a gran escala y la necesidad de caracterizar los tipos de respuestas inmunitarias suscitadas por estos nuevos adyuvantes ya que pueden inducir respuestas de inmunidad tanto tumorales como antitumorales. (Temizoz *et al.*, 2016)

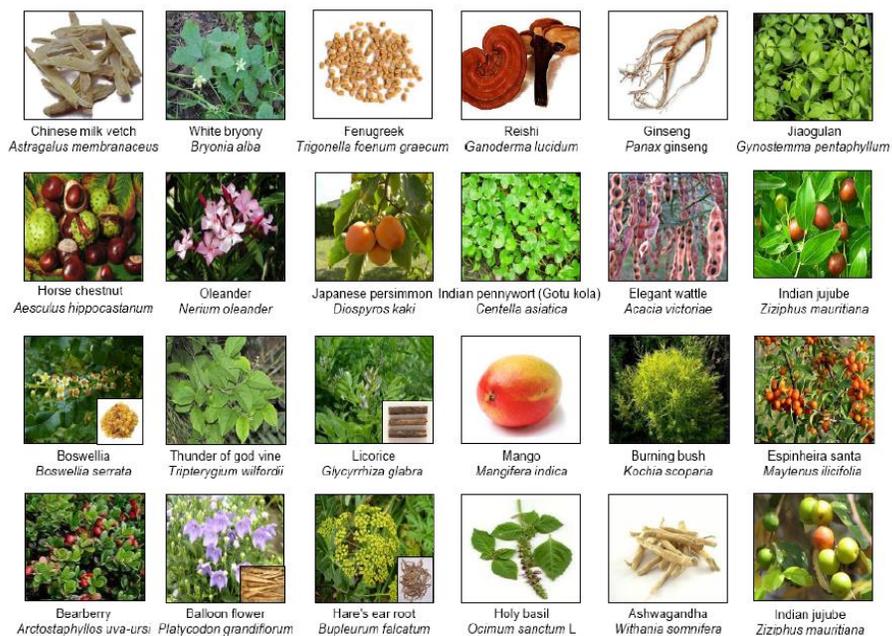
De este modo, deben desarrollarse más adyuvantes para vacunas contra el cáncer, así los adyuvantes deben ser estables con larga vida útil, biodegradables, baratos para ser producidos en grandes cantidades, sin inducir citotoxicidad y promover una respuesta inmunitaria apropiada, dependiendo del tipo de respuesta que se requiere producir (Aguilar & Rodríguez, 2007).

## **7. Triterpenos**

Las plantas sintetizan metabolitos primarios involucrados en los procesos metabólicos; asimismo, sintetizan metabolitos secundarios que están involucrados en las interacciones de la planta con el medio. Los terpenoides son derivados del isopreno, donde se encuentran los triterpenos, un gran grupo de compuestos de 30 átomos de carbono (Fig. 8). Es el grupo de metabolitos secundarios más abundante y funcional que se encuentra en las plantas, y están involucrados en la respiración, fotosíntesis, o la regulación y el crecimiento de la planta. También protegen a las plantas de respuestas defensivas constitutivos e inducidos contra los insectos y el estrés ambiental (Ikeda *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2010; Montoya-Pelaez *et al.*, 2013).

Los triterpenos se producen principalmente en las superficies de las plantas, como la cáscara de la fruta, la corteza del tallo o las hojas (Fig 8). Se sintetizan en el citosol a partir de la ciclación del escualeno epoxidado que es el precursor del grupo diverso de triterpenos policíclicos. Estas estructuras policíclicas pueden presentarse como triterpenos libres o conjugados. Los triterpenos pueden de hecho ser acilados (con ácidos hidroxicinámicos o glicosilados) y en esta forma, se llaman saponinas triterpenoides.

Los triterpenos se encuentran en varios vegetales y frutas y por lo tanto son parte esencial de la dieta humana, en recientes años han sido considerados por poseer una serie de efectos biológicos. Incluso, en muchos países asiáticos han sido consumidos como agentes antioxidantes, anticancerígenos y anti-inflamatorios con fines medicinales para combatir una gran variedad de enfermedades. Los triterpenos representan una gran familia de compuestos dado que se han caracterizado más de 30 000 triterpenoides (Ikeda *et al.*, 2008; Yadav *et al.*, 2010; Montoya-Peláez *et al.*, 2013; Furtado *et al.*, 2017).

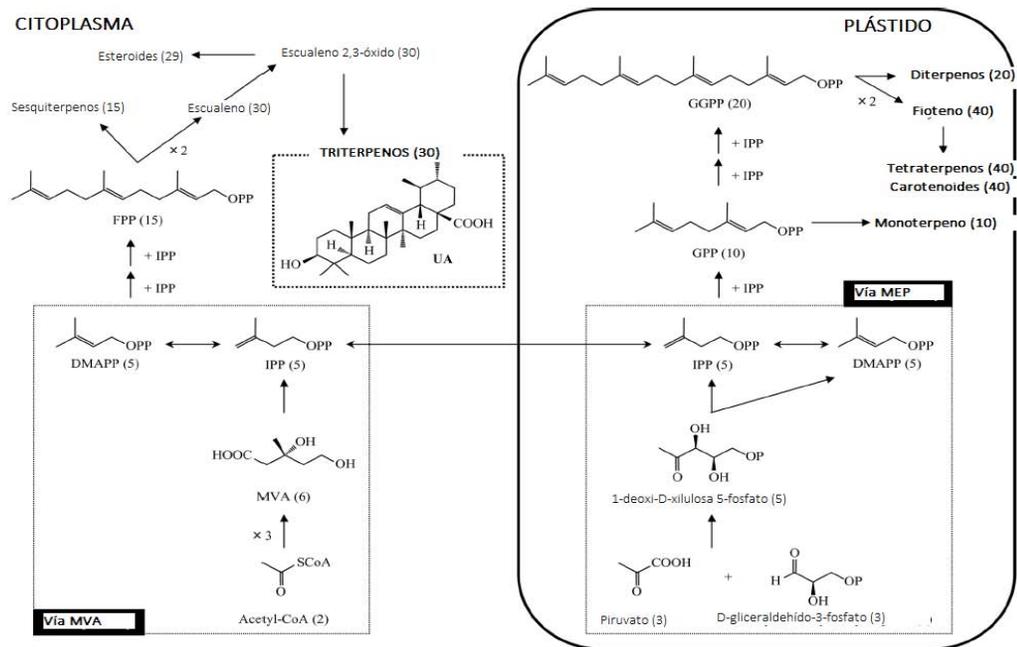


**Figura 8. Especies vegetales como fuentes de triterpenos.** Imagen obtenida de Yadav *et al.*, 2010

## 7.1 Biosíntesis

Los terpenos o isoprenoides se sintetizan en las plantas y pueden hacerlo mediante dos vías: vía ácido mevalónico (MVA) en el citoplasma y/o vía metileritrol 4-fosfato (MEP) en los plástidos. En las dos vías, se debe iniciar con la biosíntesis del isopreno (molécula de 5 carbonos). En la vía MVA a partir de acetil CoA se sintetiza isopentenil difosfato (IPP) para después sufrir una isomerización y convertirse a dimetilalil difosfato (DMAPP).

Mientras que en la vía MEP, IPP y DMAPP se sintetizan a partir de piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato. IPP y DMAPP son compuestos importantes puesto que a partir de estos se forman unidades de 30 carbonos comúnmente llamado escualeno o escualeno, 2,3-óxido, además de triterpenos pentacíclicos como el AU (Fig.9). Es importante recalcar que, aunque en las dos vías se da la formación de IPP y DMAPP, la vía MEP es preferencial para la síntesis de monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos (moléculas de 10C, 20C y 40C, respectivamente).



**Figura 9. Biosíntesis de triterpenos.** La biosíntesis de los terpenos se realiza dentro de las plantas ya sea en citosol (vía MVA) o en los plástidos (Vía MEP) dando la síntesis de triterpenos como el AU, AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD. Imagen tomada y modificada de Ikeda *et al.*, 2008.

## 7.2 Ácido Ursólico

El ácido ursólico (3 $\beta$ -hidroxi-12-urs-12-en-28-óico) (AU) es un tipo de triterpeno pentacíclico (Fig.10) aislado a partir de múltiples tipos de plantas medicinales como *Eriobotryajaponica*, *Rosmarinus officinalis*, *Hedyotis diffusa*, *Ligustrum lucidum*, *Glechoma hederacea*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Vaccinium macrocarpon*, *Rhododendron hymenanthes Makino*, *Calluna vulgaris*, *Ocimum sanctum*, *Eugenia jambolana* y en el recubrimiento de ceras de algunas peras, manzanas y ciruelas pasas. Se ha informado que presentan una amplia gama de efectos biológicos entre los que destacan los siguientes: como sedativo, anti-diabético, anti-bacterial, anti-ulceras, antioxidante, antiinflamatorio, anti-cancerígeno y actividades hepato-protectoras, así como su baja toxicidad en células normales (Zang *et al.*, 2014).

El AU ha sido demostrado en inducir apoptosis en múltiples líneas celulares incluyendo HL-60 y K562 leucemia huma, HT-29 cáncer de colon humano, MCF-7 cáncer de mama humano, A549 y H460 cáncer de pulmón humano. PC-3 cáncer de próstata, M4Beu melanoma y en HepG2 hepatoblastoma humano, Se ha demostrado que los mecanismos de acción del AU en inducir la apoptosis en estas líneas celulares esto es debido a que inhiben la replicación del DNA, aumento en la expresión de genes MMP. Inducción de p53, activación de la vía de señalización JNK1/2, de las caspasas-3,-8,-9 y un decremento en la expresión de proteínas de la familia bcl-2. Así mismo, el AU es recomendado como una terapia para cáncer de piel, así como cosméticos que contienen AU han sido patentados en Japón para la prevención de cáncer de piel (Ikeda *et al.*, 2008).

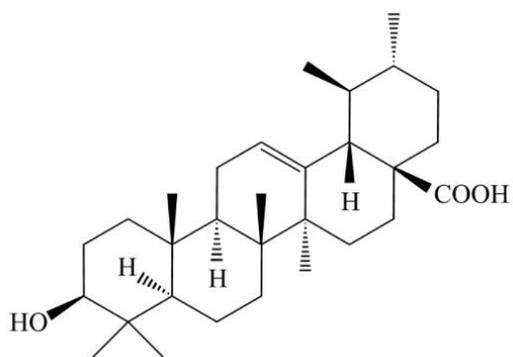


Figura 10. Estructura química del AU. Imagen tomada y modificada de Ikeda *et al.*, 2008

### 7.3 AU en la inflamación

Los efectos anti-inflamatorios del AU se han investigado desde la década de los 90's, donde Suh y cols (1998) mostraron que el pretratamiento con AU atenuaba la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2) mediante la represión de la vía NF- $\kappa$ B en macrófagos previamente estimulados con INF $\gamma$  o LPS en ratones RAW264.7; por otro lado Ryu y cols., (2000) demostraron que el AU inhibía fuertemente la producción de NO (óxido nítrico) en las misma líneas celulares (Ikeda *et al.*, 2008).

Sin embargo, en el 2001 resultados experimentales contradictorios llevaron a cuestionar estos hallazgos, debido a que el tratamiento de AU causó el aumento de óxido nítrico (NO) y la expresión de mRNA para TNF $\alpha$  tras la activación vía NF $\kappa$ B en macrófagos no estimulados en ratones RAW264.7. Estos resultados implicaron que el AU tiene un efecto dual sobre la activación de NF- $\kappa$ B que dependen del estado biológico de los macrófagos ya sea estimulados o no estimulados. Años posteriores el mismo grupo de Ikeda y cols (2007) informó por primera vez que el AU aumenta la liberación de factor de inhibición de la migración de macrófagos (MIF) mediante la activación extracelular señal regulada quinasa (ERK)-2 (Fig. 10). Sus otros estudios sobre la piel de ratón informaron un aumento significativo en la expresión de ciclooxigenasa COX-1, COX-2 y TNF $\alpha$  e IL-1B en macrófagos tratados con AU (Kashyap *et al.*, 2016).

### 7.4 Propiedades inmunomodulatorias del AU

Jung y colaboradores (2010) estudiaron el efecto que podría tener el AU en el fenotipo y la maduración de las CDs derivadas de monocitos humanos, observaron que los niveles de expresión de CD1a, CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CCR7 aumentaron ligeramente, así mismo observaron que en una forma dosis dependiente de AU aumentó la capacidad de las CDs de estimular a los linfocitos T. Es importante destacar que, se constató que el AU es reconocido por TLR 2 y TLR4, en las CDs además de que el tratamiento indujo la producción de IL-12p. Lo anterior es sumamente importante, puesto que el aumento

en los niveles de moléculas coestimuladoras en CDs y la producción de IL12p, son imprescindibles en el desarrollo de una respuesta inmune Th1, la cual ha sido implicada en una respuesta inmune antitumoral específica efectiva, por lo que se consideró al AU como

alternativa para ser empleado como adyuvante en una vacuna basada en CDs contra el cáncer (Jung *et al.*, 2010).

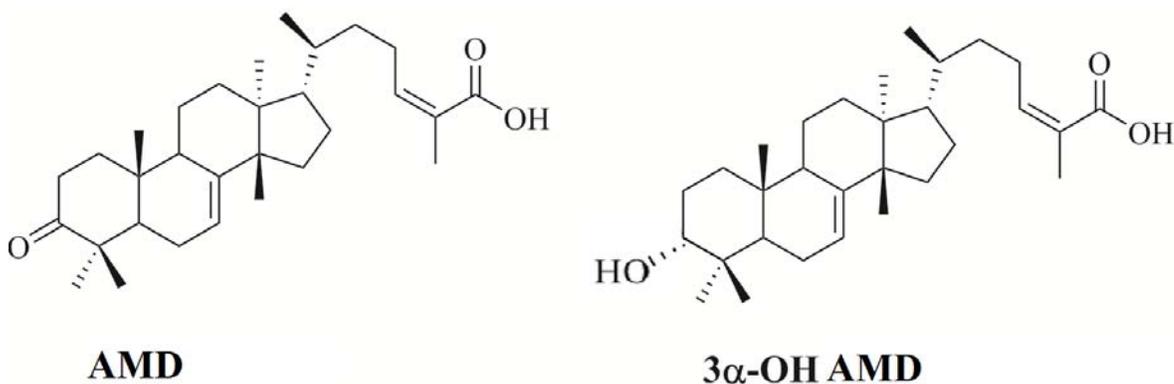
Dadas las características del AU, es importante investigar el posible uso de otros triterpenos que puedan ser empleados como adyuvantes. Así, existen terpenos derivados del escualeno o escualeno 2,3-óxido, que se caracterizan por poseer un grupo hidroxilo en el C3 que les permite unirse con una o varias moléculas glucosídicas, dando lugar a estructuras heterocíclicas, entre en los que podemos encontrar a los triterpenos (tetra o pentacíclicas) y esteroides. Estos compuestos, específicamente ácido masticadienónico y ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico, se han estudiado como agentes antitumorales contra diferentes líneas tumorales como carcinoma hepatocelular (HepG2), adenocarcinoma cervical (HeLa) carcinoma epidermoide (A-431) e *in vivo* en ratones atímicos xenotrasplantados con células de carcinoma de próstata (PC-3), mostrando regresión tumoral dependiente de muerte por apoptosis (Sánchez-Monroy *et al.*, 2017). Además, otros reportes demostraron que los triterpenos pueden inducir *in vitro* la diferenciación de respuestas Th1 o Th2, a través de CDmo (Take *et al.*, 2008). Dado lo anterior, es posible que el ácido masticadienónico y ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico puedan inducir no solo la maduración de CDMOs sino que puedan aumentar la respuesta inmune inducida por la inmunoterapia contra al melanoma, sobre todo si se emplean antígenos tumorales. Por lo que en el presente trabajo, se comparó el efecto del ácido masticadienónico y ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico con el efecto inducido por el AU, molécula que ya ha sido empleada en la inmunoterapia basada en CDs contra el melanoma en varios modelos murinos (Jin-Wei *et al.*, 2015)

### **7.5 Ácido masticadienónico y ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico.**

Los ácidos masticadienónico (**AMD**) y 3  $\alpha$ - hidroximasticadienoico (**3 $\alpha$ -OHAMD**) (Fig. 11) son los principales constituyentes de los extractos orgánicos de la corteza de *Amphipterygium adstringens* un árbol endémico de México y América Central. Esta planta es conocida en México como “cuachalalate” o “cuachalala”, y ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional. Su importancia etnofarmacológica se debe aparentemente por el hecho de tener más de 40 usos tradicionales. En particular la cocción de la corteza es comúnmente utilizada para el tratamiento de úlceras gástricas, cáncer gastrointestinal y varias condiciones inflamatorias (Olivera Ortega *et al.*, 1999). Las propiedades anteriormente mencionadas han estimulado una serie de investigaciones relativas de los efectos biológicos de los extractos

acuosos y orgánicos de la corteza. Estudios posteriores se dedicaron principalmente a evaluar las propiedades antiinflamatorias, mostrando la capacidad del ácido AMD para inhibir la aparición de edema en ratas (Oviedo-Chávez *et al.*, 2004) e inhibir significativamente la producción de óxido nítrico en macrófagos estimulados y no estimulados con LPS (Chávez *et al.*, 2005).

Tanto AMD como 3 $\alpha$ -OHAMD son triterpenos de tipo tirucallano (tetracíclicos), a diferencia del AU que es un triterpeno del tipo ursano (pentacíclico). Además, se ha informado de que AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD son capaces de reducir la magnitud de los procesos inflamatorios inducidos por TPA en pruebas crónicas con ratones. Además, 3 $\alpha$ -OHAMD suprimió completamente la producción de leucotrieno B4 (LTB 4) en leucocitos polimorfonucleares (PMNL) tratados con 100  $\mu$ M (Ríos *et al.*, 2002). Esta evidencia sugiere que las actividades anti-inflamatorias de AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD probablemente dependen de su capacidad para prevenir la producción de algunos mediadores pro-inflamatorios.



**Figura 11.** Estructuras químicas del ácido masticadienónico (AMD) y ácido 3- $\alpha$ -hidroximasticadienoico (3 $\alpha$ -OHAMD).

## **8. Justificación**

El melanoma maligno ocupa el tercer lugar en frecuencia de las neoplasias cutáneas, además su incidencia ha incrementado 500% en México. Las terapias actuales como la quimioterapia, radioterapia hasta ahora empleadas han tenido un éxito limitado, por lo que es importante la búsqueda de nuevas alternativas como la inmunoterapia.

La inmunoterapia basada en células dendríticas es una herramienta eficaz contra el melanoma, no obstante, es necesario la búsqueda de moléculas que induzcan el aumento en la respuesta inmune antitumoral antígeno específica, por lo que proponemos el uso de los triterpenos (AU, AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD) como inmunomoduladores de células dendríticas que posteriormente puedan ser empleadas en la inmunoterapia contra el melanoma.

## **9. Hipótesis**

Si los triterpenos inducen la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea, entonces éstas podrán ser empleadas como tratamiento contra el melanoma murino para inducir la disminución en el crecimiento tumoral y la sobrevida de los ratones.

## **10. Objetivos**

### **10.1 Objetivos Generales**

Evaluar el efecto de los triterpenos: ácido ursólico, ácido masticadienónico y ácido 3-alfa hidroximasticadienoico en la maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea y su posterior aplicación en la inmunoterapia contra el melanoma murino.

### **10.2 Objetivos Particulares**

1. Evaluar si los triterpenos inducen toxicidad en CDMOs mediante ensayos *in vitro*.
2. Analizar el efecto *in vitro* de los triterpenos en la maduración de las CDMOs mediante la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias (CD80, CD86, CD40, CD274 y CD273).
3. Analizar el efecto de las CDMOs tratadas con triterpenos y MAGE-AX en la sobrevida y crecimiento tumoral en ratones con melanoma inducido.

## **11. Material y Método**

### **11.1 Ratones**

Para todos los experimentos se emplearon ratones machos de la cepa C57BL/6 de seis a ocho semanas de edad, los cuales se criaron y mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad a temperatura controlada y alimentados *ad libitum* en el Bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM. De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999). Los ratones se mantuvieron en grupos de máximo 4 ratones, en cajas con pisos y paredes continuas sólidas con bordes y aristas redondeados y con tapa de reja removible, (artículo 5.1.1). Las cajas se prepararon con una cama de celulosa en condiciones limpias y secas (artículo 5.1.4). El alimento y el agua potable eran de libre acceso durante toda la vida del animal (artículo 5.1.3.1). El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM (CONBIOÉTICA 09CEI06620140212, numero de oficio 141/2015).

### **11.2 Triterpenos**

Los ácidos masticadienónico y ácido 3-alfahidroximasticadienoico fueron aislados de la corteza de *Amphipterygium adstringens*. Los compuestos fueron purificados e identificados por la estudiante del Doctorado en Ciencias Biomédicas, Ma. Beatriz Sánchez Monroy en conjunto con el Dr. Mariano Martínez Vázquez en el laboratorio 1-4 del Instituto de Química de la UNAM, Departamento de Productos Naturales. Los triterpenos se disolvieron como se muestra en el ANEXO

### **11.3 Péptidos**

El péptido MAGE-AX con la secuencia LGITYDGM se sintetizó por Research Genetics (Invitrogen, Leiden, Holanda), con una pureza del 94% y se almacenó a -70°C. Se utilizó a una concentración de 25 ug/mL (Piñón-Zárate *et al.*, 2014).

#### **11.4 Líneas celulares**

Para la inducción de melanoma se utilizó la línea celular B16F10 de melanoma murino (European Collection of cell cultures U.K) cultivada con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibióticos Penicilina/Streptomycin (Gibco).

La doctora Edda Sciutto, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, donó gentilmente la línea celular de carcinoma de ovario de hámster chino (CHO) transfectada con el gen del factor de crecimiento granulocito-macrófago (GM-CSF)

#### **11.5 Anticuerpos**

Anticuerpos monoclonales anti-mouse para la tinción de células analizadas por citometría de flujo, CD11c-aloficocianina (cat: 117310), CD40-PE (Cat: 124610), CD80-PE (Cat:104708), CD86-PE (Cat:553692), Ia/Ie-FITC (Cat:107606), todos los anticuerpos se adquirieron de Biolegend, EE.UU.

#### **11.6 Producción de sobrenadante rico en GM-CSF**

Se ha comprobado que es posible diferenciar células dendríticas *in vitro* en presencia de proteínas como la IL-4 + GM-CSF o IL-4 + IL-3 en cultivo de monocitos. Sin embargo, también se ha comprobado que el uso de sobrenadante rico en GM-CSF obtenido a partir de células VHO transfectadas con el gen murino que codifica para GM-CSF es igual de eficiente (Lutz *et al.*, 1999). La concentración de GM-CSF es de 200 U/mL de sobrenadante (Wilkins-Rodríguez *et al.*, 2010; Lutz *et al.*, 1999).

Para la obtención de sobrenadante se siguió el método obtenido por Medrano-Hernández et al (2012). Se descongeló un vial con células y se sembraron en una botella de 25 cm<sup>2</sup> con medio F12 de selección (Ham's F12, suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomycin +1 ug/mL de geneticina). Cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia se les agrega Tripsina 0.05%/EDTA 0.02%, las células que se desprendieron fácilmente fueron eliminadas mientras que a las células que permanecieron adheridas se les colocó medio F12 de selección nuevo, este procedimiento se repitió tres veces. Posteriormente, las células seleccionadas fueron cultivadas con medio F12 suplementado con suero bovino fetal. A continuación, cuando las células alcanzaron el 90% de confluencia se lavaron con HBSS (solución salina de Hanks) y se les adicionó medio F12 sin suero fetal

bovino y se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 a 72 horas. Se recolectó el sobrenadante, se filtró (0.22 µm) y se congeló a -20 hasta su uso.

*Nota: El snGM-CSF obtenido de las células CHO se degenera con el tiempo por lo que es necesario mantener una línea de producción constante y no almacenar por más de dos meses el sobrenadante obtenido por esta metodología.*

### **11.7 Generación y diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea**

Para la obtención de CD derivadas de MO se utilizó el método de (Lutz *et al.*, 1999 con algunas modificaciones). Ratones de la cepa C57BL/6 fueron sacrificados mediante dislocación cervical, posteriormente los huesos fémur y las tibia se disectaron de las extremidades inferiores. A continuación, las estructuras óseas se lavaron con etanol al 70 % y PBS en condiciones estériles. Luego los fémures y tibias, se colocaron en cajas Petri de 10 cm<sup>2</sup> con medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino y coctel de antibióticos/antimicóticos, se cortaron las epífisis y se obtuvo la médula ósea mediante perfusión con medio RPMI-1640. Se recolectaron las células, se lavaron con medio RPMI-1640 y finalmente fueron resuspendidas en medio RPMI-1640 para determinar el número de células obtenidas. Las células precursoras de médula ósea se colocaron a una densidad de 1 a 1.5 x10<sup>7</sup>células en cajas Petri de 75 cm<sup>2</sup>. Los cultivos se suplementaron con 20 % de la solución final con sobrenadante rico en GM-CSF y se incubaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **11.8 Ensayo de viabilidad**

Al sexto día de diferenciación, se recolectaron y se sembraron a una densidad de 2x10<sup>4</sup> células por pozo en placas de 96 pozos. De acuerdo a múltiples ensayos previamente realizados se determinó que las concentraciones de 0.003, 0.03 y 0.3 mM son los ideales para tratar a las CDMOs. Como control positivo de sobrevivencia se utilizaron células dendríticas en medio de cultivo. Todos los tratamientos se llevaron a cabo a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

La viabilidad celular se midió por medio del ensayo colorimétrico Presto Blue, el cual consiste en la conversión de la resazurina en resorufina, el cual es reducido en la respiración celular al aceptar electrones de NADPH, FADH, FMNH, NADH y citocromos, lo que conduce a que aquellas células vivas emitan fluorescencia. La conversión es proporcional al número de

células metabólicamente activas y se puede evaluar cuantitativamente usando fluorescencia o medidas de absorbancia (Lancaster & Fields, 1996; Yu *et al.*, 2003).

El reactivo Presto Blue se utilizó a una relación de 1:9 en una placa de 96 pozos. En cada pozo se le adicionaron 100 µl de la solución y se llevó a incubación durante 45 min a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo, se colectaron 30 uL de sobrenadante y se llevó a una nueva placa de 96 pocillos donde el cambio en la fluorescencia de la prueba reactivo (resazurina a resorufina) se midió en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los porcentajes de citotoxicidad se calcularon considerando las absorbancias de cada grupo de ensayo con respecto a las del grupo control.

### **11.9 Estudio del fenotipo de las CDMOs tratadas con los triterpenos**

La expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en las CDMOs tratadas con AU, AMD y 3-αOHAMD se midió mediante citometría de flujo. Al sexto día de diferenciación, las CDMOs se trataron, con concentraciones de 0.003, 0.03 y 0.3 mM de AU, AMD, y 3α- OHAMD durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las CDMOs fueron tratadas durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se formaron los siguientes grupos: 1) Sin tratamiento, 2) AU 0.3mM 3) AU 0.03 mM, 4) AU 0.003 mM, 5) AMD 0.3 mM 6) AMD 0.03Mm, 7) AMD 0.003mM, 8)3-αOHAMD 0.3mM, 9) 3-αOHAMD 0.03mM y 10) 3-αOHAMD 0.003mM.

Después del tratamiento, las células se procesaron para ser analizadas mediante citometría de flujo. Las CDMOs se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron con 200 ul de buffer de tinción (PBS 0.5 % de albumina y 0.02 % de azida de sodio). Posteriormente las células se incubaron durante 30 min a 4°C con el anticuerpo de interés a una disolución 1:200 en buffer de tinción. Los anticuerpos utilizados fueron anti-CD11c-APC; anti-Ia-isotiocianato, anti-CD40-Biotina, anti-CD80-Biotina, anti-CD86-PE, anti-CD273-PE y anti-CD274-PE. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron PBS de tinción y luego se fijaron con PBS de fijación (0.5 % de paraformaldehído). Posteriormente las muestras se adquirieron en un citómetro FACScalibur y luego los datos se analizaron en el software FlowJo versión 8.7.

### **11.10 Inducción de tumores y grupos de tratamiento**

Para la inducción de melanoma, 5x10<sup>4</sup> células de la línea celular B16/F10, se inocularon vía subcutánea en la región abdominal 10 ratones C57BL/6 por cada grupo experimental. Quince

días posteriores a la inducción del melanoma, los ratones se trataron con la terapia de dendríticas ( $1 \times 10^6$ ) de acuerdo a los siguientes grupos: 1) CDMOs tratadas con AU, 2) CDMOs tratadas con AM, 3) CDMOs tratadas con  $3\alpha$ -OHAMD, 4) CDMOs tratadas TNF $\alpha$  y 5) CDMOs sin tratamiento. Todos los triterpenos utilizados en esta parte experimental fue a una concentración de 0.03 mM

Las CDMOs empleadas en los grupos 1 al 4 se trataron con 0.25 mM de MAGE-AX durante 24 horas para inducir una respuesta antígeno específica. Todos los grupos solo recibieron una sola vacuna de CDMOs tratadas con los diferentes triterpenos y cargadas con MAGE-AX, durante el desarrollo del experimento. Posterior a la inoculación de melanoma, se evaluó el tamaño tumoral durante tres semanas.

#### **11.11 Supervivencia y medición del tamaño tumoral**

Posterior a la inoculación de CDMOs con triterpenos y cargadas con MAGE AX, se midió el diámetro menor y mayor a los tumores desarrollados cada tercer día con la ayuda de un vernier durante tres semanas. Mediante la siguiente fórmula:  $(A^2 \times B) / 2$  se registró el volumen tumoral de los ratones por cada tratamiento a través del tiempo. Donde A: es el diámetro menor del tumor y B el diámetro mayor (Lee et al., 2008). Donde el algoritmo se puede expresar como  $V = \pi/6 * (\text{diámetro mayor} * [\text{diámetro menor}]^2)$ .

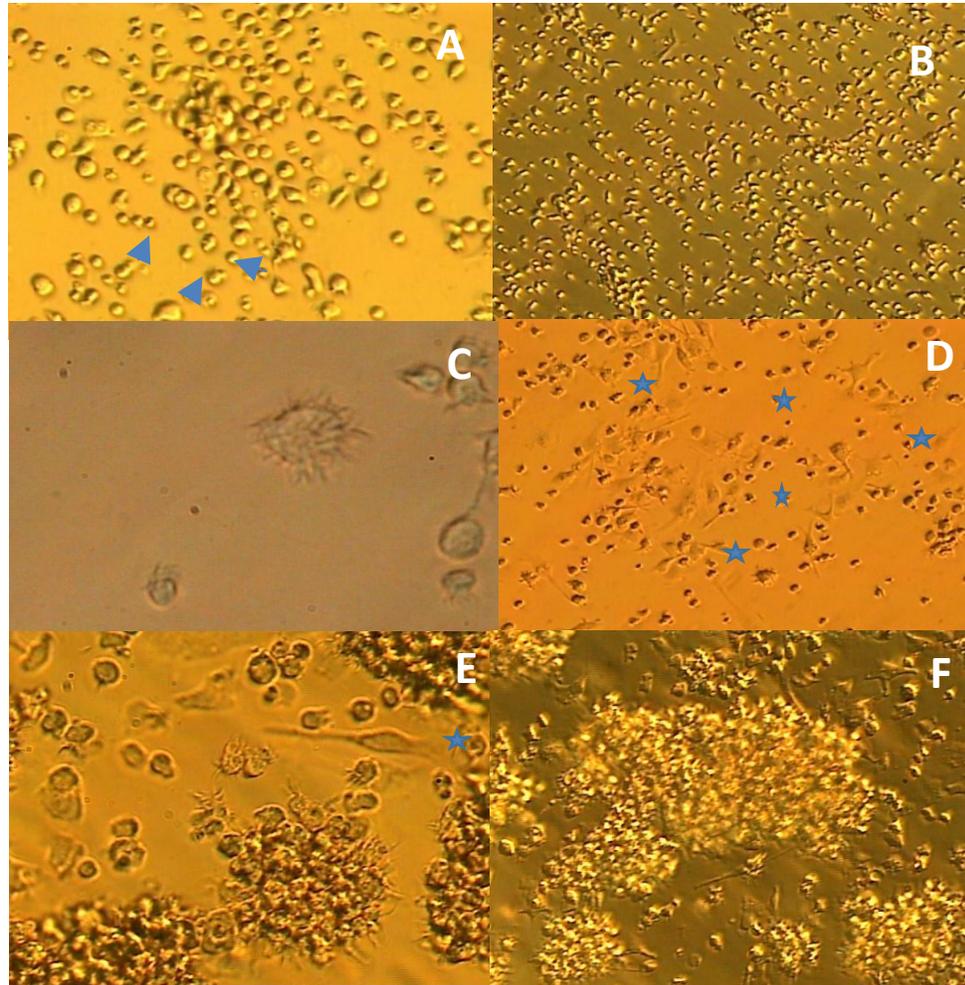
#### **11.12 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se muestran como medias y error estándar. Así mismo se realizó una prueba ANOVA de una vía y la prueba post hoc de Tukey con el fin de evaluar la importancia de los efectos de los diferentes tratamientos. Un valor P <0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Todos los datos mostraron una distribución normal. Los análisis se realizaron en el software GraphPad Prism 5.

## **12. RESULTADOS**

### **12.1 Diferenciación de células dendríticas**

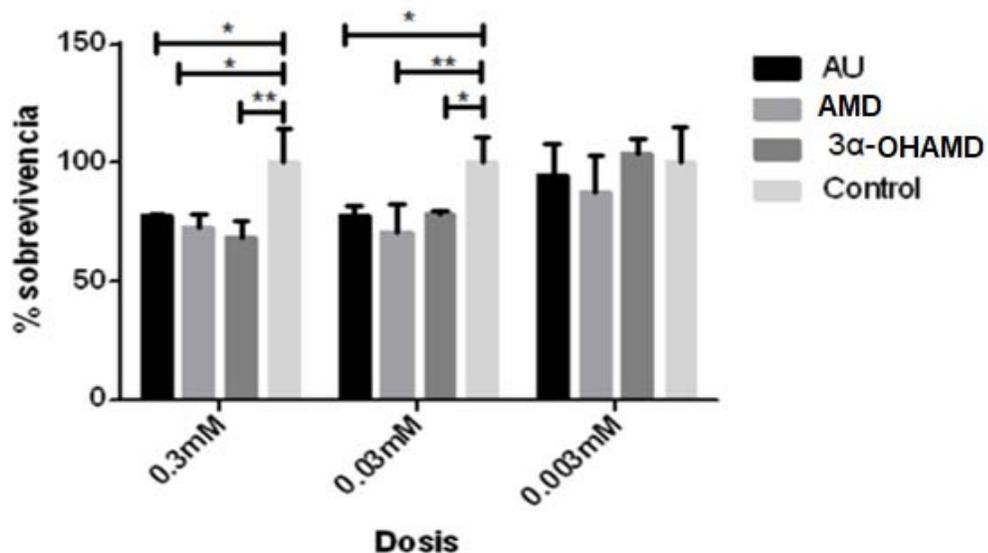
Para comparar el efecto de AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD con el efecto inducido por el AU, se obtuvieron CDs a partir de cultivos de células precursoras de médula ósea cultivadas con GM-CSF. En primer lugar, se estudiaron los cambios morfológicos en las células precursoras en el cultivo. Éste se caracterizó por la presencia de dos poblaciones celulares, células adheridas y no adheridas al plástico. Las células adheridas al plástico se caracterizaron por poseer una morfología alargada, se trataba de las células estromales. Mientras que las poblaciones no adheridas al plástico se caracterizaron por ser redondas y muy pequeñas en los primeros días de diferenciación (Fig. 12A y B). Al paso de los días, las células no adheridas proliferaron, comenzaron a presentar prolongaciones citoplasmáticas alargadas (Fig. 12C y 12D), y generaron aglomeraciones celulares formando colonias de CDs (Fig. 12E y 12F). En las subsecuentes figuras se muestran microfotografías de los cultivos suplementados con GM-CSF a lo largo de los días (0, 3 y 6 de diferenciación).



**Fig. 12. Grados de diferenciación de células precursoras de médula ósea tratadas con GM-CSF.** A. Cultivo de células en el tiempo cero el cual muestra que toda la población se caracteriza por ser redondas y pequeñas, aunque se puede observar algunos eritrocitos señalados con flechas Fig. B-Día 0 de diferenciación vista en un aumento menor (10x). Fig. C y D. Día 3 de diferenciación, las células ya poseen prolongaciones citoplasmáticas y se observa ya una población adherida al plástico, el cual poseen una característica de ser muy alargadas (asteriscos), mientras aún sigue habiendo una gran cantidad de células que no se han diferenciado, esto debido a que siguen siendo redondas. Figs. E y F. Las CDs ya se diferenciaron completamente, poseen una morfología con prolongaciones citoplasmáticas muy largas el cual le da capacidad de unirse a otras células, formando colonias.

## 12.2 Ensayo de Viabilidad

Con la finalidad de analizar si los triterpenos ejercían un efecto citotóxico sobre las CDs, éstas se trataron con los tres triterpenos durante 24 horas y luego se analizó el grado de citotoxicidad mediante el uso del reactivo de Presto Blue. En la figura 13 se muestra una comparación del porcentaje de sobrevivencia de las CDs tratadas con los diferentes triterpenos a diferentes dosis [0.003, 0.03 y 0.3 mM]. Se puede observar que la dosis de 0.003 mM de todos los triterpenos no indujo cambios en la viabilidad celular en comparación con el grupo control (células no tratadas). No obstante, la dosis de 0.3 mM y 0.03 mM de AU sí afectó la viabilidad celular. Es importante destacar que no se encontraron cambios significativos entre estas dos dosis (77.52 % vs 79.13 % de sobrevivencia respectivamente). En el caso del triterpeno 3 $\alpha$ -OHAMD, la dosis de 0.3mM fue la que mayor afectó la viabilidad celular de las CDMOs, dado que sólo el 67.92% de la población de CDs se encontraban vivas, sin embargo, cuando se empleó la dosis de 0.03Mm la viabilidad de las CDs incrementó (67.92 % a 78.64 % de sobrevida, respectivamente) mientras las CDs tratadas con 0.03 mM mostraron una menor viabilidad que las tratadas con la dosis de 0.3 mM (70.58% vs 72.84% de sobrevida respectivamente).



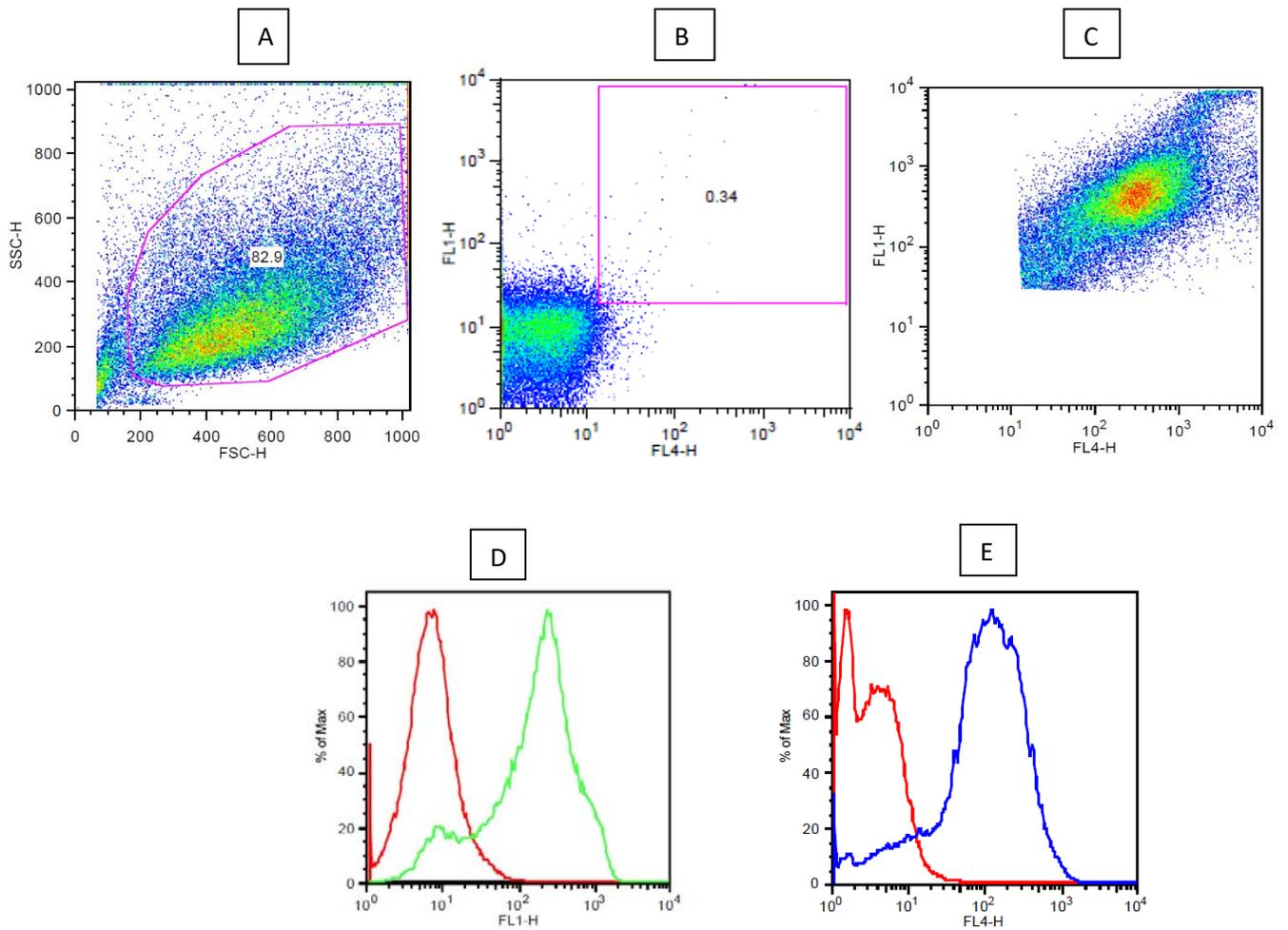
**Figura 13.** Representación gráfica del porcentaje de viabilidad de CDMOs a diferentes dosis de los triterpenos. Se tomaron en cuenta las CDs que no fueron tratadas como el 100% de viabilidad celular. Todos los ensayos se

realizaron por triplicado. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, n=3.

### **12.3 Cultivo y caracterización de las CDMOs**

Después de analizar la viabilidad de las CDs, se analizó el efecto de los triterpenos en la maduración de las CDMOs midiendo el porcentaje de células positivas a moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y coinhibitorias (CD273 y CD274) y el nivel de expresión de las mismas moléculas en las CDMOs

A través de una gráfica de puntos se muestra a toda la población de células obtenidas a partir del cultivo de médula ósea con GM-CSF. El eje de las X representa el tamaño (FSC-H) y el eje de las Y representa la granularidad (SSC-H), por lo que, a partir de la población total, se delimitó a aquellas células que eran grandes y granulares (características de CDs), esto también descarta a todas las células muertas o detritos celulares (los cuales se encuentran muy cerca del origen) (Fig.14A). Una vez delimitada la población, se seleccionaron las células CD11c+ MHCII+, empleando como referencias CDMOs sin tinción con anticuerpos. Con base en lo anterior se constató que las células positivas para CD11c (FL-4H) y MHC II (FL1-H) abarcaron un rango de  $\log_{10}^1$  a  $\log_{10}^5$  de expresión (Fig. 14B y C). Así se obtuvo que 78.58 % de células MHCII+ y 87.7% de células MHCII+ CD11C+, es decir, en cada ensayo se obtuviera un promedio cercano al 80% de CDMOs en el cultivo. Posteriormente, se analizó la expresión para los marcadores CD80/CD86/CD40/CD273 y CD274 en las CDMOs para analizar el grado de maduración en las células inducido por los distintos triterpenos.

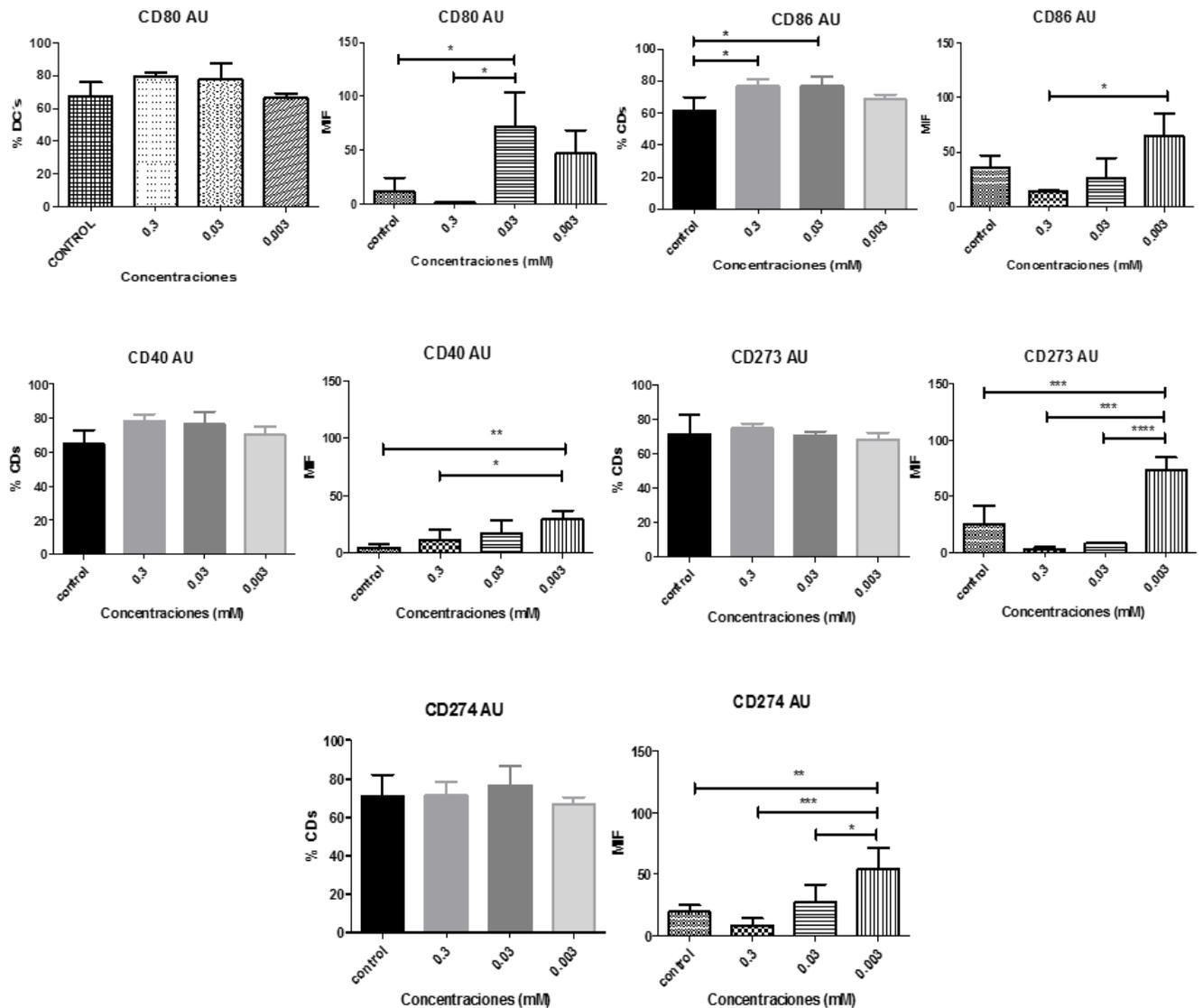


**Fig. 14. Análisis del fenotipo de la CDs obtenidas del cultivo de células precursoras de médula ósea con GM-CSF.** **A.** Gráfica de puntos donde se grafica granularidad (SSC-H) vs tamaño (FSC-H) de las células obtenidas después del cultivo. De toda la población celular se seleccionó en color rosa, aquellas células que fueran grandes y granulares (características de CDs), así mismo excluyendo detris celulares, para este caso se observa que, de la población seleccionada, 82.9% correspondía con mayor tamaño. **B.** Control negativo. Células que no fueron teñidas para ningún anticuerpo, se empleó para conocer la fluorescencia basal de las células y para discriminar a las células positivas para los marcadores empleados para reconocer a las CDs (CD11c y MHCII). **C.** Células del cultivo con GM-CSF teñidas con anti- CD11c y MHCII. FL-4 corresponde a CD11c y FL-1 a MHCII. **D** Mediante histogramas, se analizó la expresión de CD11c y de MHCII en la población de células obtenidas en C. Se observó que de las células obtenidas del cultivo 78.5% fueron positivas a MHCII y el 87.7% fueron positivas para CD11c (Fig. 18). **E**

#### 12.4 Efecto del AU en CDMO

Para analizar el efecto que tuvo el AU, AMD y 3- $\alpha$ OHAMD se analizó el porcentaje de CDs positivas para las diferentes moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) mediante citometría de flujo. Se analizó el grado de expresión de las moléculas coestimuladoras en las CDs mediante el uso de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de cada molécula en las CDs. MIF indica la expresión de cada molécula coestimuladora en una población determinada de CDs. Así, se puede determinar al mismo tiempo el porcentaje de CDs positivas para cada molécula coestimuladora y el grado de expresión de las moléculas en las CDs (Fig.15).

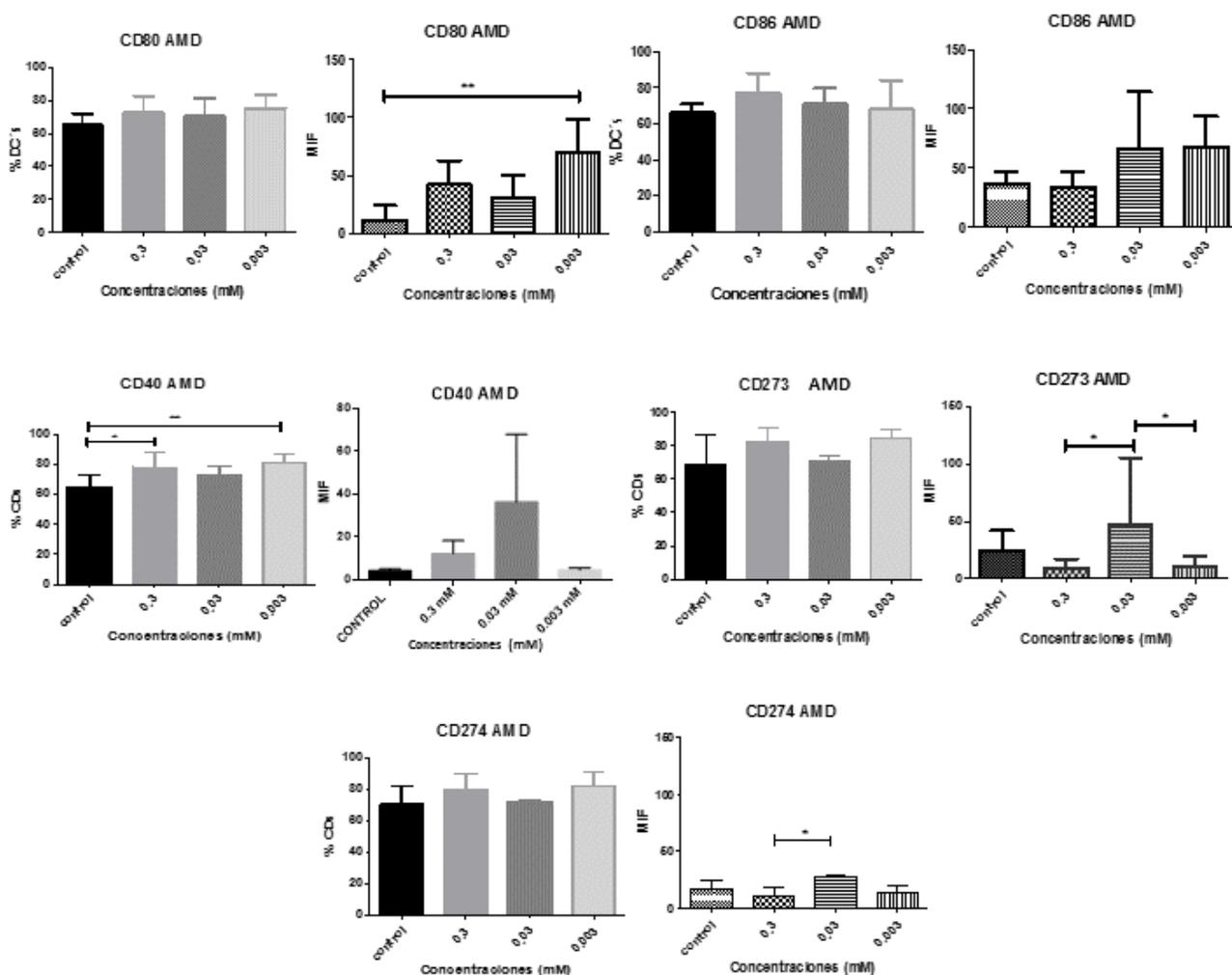
La dosis de 0.3 mM de AU generó un aumento en el porcentaje de células positivas para CD80, CD86 y CD40 encontrándose una relación dosis-dependiente, es decir, a mayor concentración de AU empleado, mayor porcentaje de CDs positivas para estas moléculas. Sin embargo, su expresión fue la más baja a comparación del grupo control. A pesar que se observaron múltiples CDs positivas a CD86 y CD40, se observó baja expresión de CD80, CD86, CD273 y CD274 en comparación con el grupo control. Es decir, la dosis de 0.3 mM de AU no indujo la maduración de CDs. En contraste, la dosis más pequeña de AU [0.003 mM] generó un aumento significativo en la expresión de casi todas las moléculas a excepción de CD80, por lo que esta dosis de AU si indujo la maduración de CDs. Finalmente, la dosis de 0.03 mM de AU indujo un ligero aumento en el porcentaje de CDMOs positivas para las moléculas CD80, CD86 y CD40, así como un aumento en la expresión de CD80 y disminución en la expresión de CD273 y CD274 en comparación con el grupo control. Lo anterior es relevante, dado que esta dosis indujo no solo la maduración de CDs sino el aumento en el número de CDs maduras. Es importante hacer mención que el aumento en la expresión de CD80, CD86 y CD40 indica maduración de CDs, mientras que el aumento en la expresión de CD273 y CD274 indica que las CDs pueden inhibir a los linfocitos T.



**Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de AU a diferentes concentraciones, en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias de CDMOs derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF.** Al sexto día de diferenciación, las CDs fueron tratadas con distintas dosis de Ácido Ursólico: 0.3 mM, 0.03 mM y 0.003 mM durante 24 horas, al cabo del tratamiento, se midió mediante citometría de flujo la expresión de cada molécula. En este grupo de barras representan los datos correspondientes, las barras en blanco y negro de la columna izquierda corresponde el porcentaje de CDs que expresan las moléculas evaluadas, mientras que las gráficas de la derecha corresponden a la Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF), para cada molécula CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274, el control corresponde a aquellas células sin tratamiento. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, n>3

### **12.5 Efecto del AMD en CDMO**

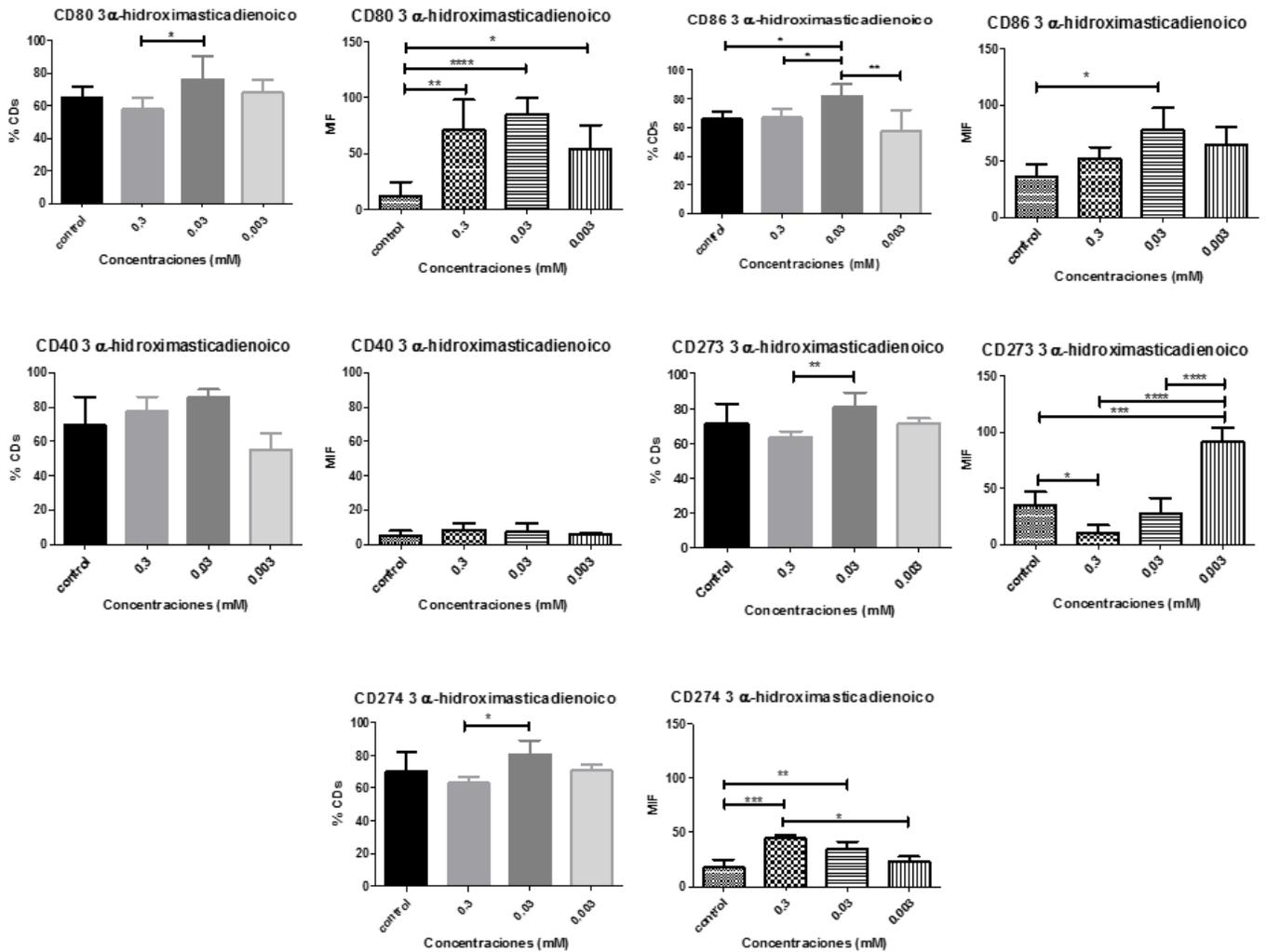
Se analizó el efecto de AMD a diferentes dosis para conocer su efecto en relación al porcentaje y expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias. Se encontró que las dosis de 0.3 y 0.003 mM provocaron la disminución en la expresión de moléculas CD40, CD273 y CD274, y el aumento en la expresión de CD80 en comparación con el grupo control, de manera que estas dosis indujeron la semi maduración de CDs, sobre todo porque se observaron altos niveles solo en CD80. La dosis de 0.03 mM indujo el aumento en la expresión de CD273, sin embargo, es importante destacar que a pesar de que no se observaron cambios significativos en la expresión de CD40 y CD86, si se observó una tendencia positiva, es decir, es muy probable que estas CDs terminen su maduración en un lapso corto de tiempo, por lo que muy probable estas CDs sean altamente inmunogénicas. (Fig. 16).



**Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de AMD en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en CDMOs derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF.** Al sexto día de diferenciación, las CDs fueron tratadas con distintas dosis de ácido masticadienónico: 0.3 mM, 0.03 mM y 0.003 mM durante 24 horas, al cabo del tratamiento, se midió mediante citometría de flujo la expresión de cada molécula. En este grupo de barras se representa los datos correspondientes, las barras de la columna izquierda corresponde el porcentaje de CDs que expresan las moléculas evaluadas, mientras que las gráficas de la derecha, corresponde a la Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF), para cada molécula CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274, el control corresponde a aquellas células sin tratamiento. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, n>3.

### **12.6 Efecto del 3 $\alpha$ -OHAMD en CDMO**

En el caso de 3 $\alpha$ -OHAMD se observó que la dosis de 0.03 mM indujo aumento no solo en el porcentaje de CDs positivas para CD86 y CD40, en comparación con el grupo control y las dosis 0.3 y 0.003 mM. Mientras que la expresión de CD80, CD86 y CD274 se incrementa en las CDs tratadas con esta dosis. Lo anterior es relevante, dado que se observó aumento en la expresión de las dos moléculas coestimuladoras, relevante en la maduración de CDs y activación de linfocitos T. La dosis de 0.3 mM indujo aumento en la expresión de CD80, CD274 y disminución en la expresión de CD273. Este tipo de células pueden considerarse semi-maduras, dado que mostraron altos niveles de una molécula coestimuladora que no es tan relevante en la presentación de antígenos como CD86 y CD40, además las células mostraron altos niveles de CD274, la cual se trata de una molécula inhibitoria. Finalmente, la dosis de 0.003 mM indujo aumento en la expresión de CD80 y CD273 en comparación con el grupo control, también se observó disminución en la expresión de CD274 en comparación con las CDs tratadas con la dosis más alta (0.3 mM). Al igual que dosis de 0.3 mM, las CDs tratadas con 0.003 mM son consideradas semi maduras (Fig. 17), estos datos sugieren un efecto dual de los ácidos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD sobre las CDs.



**Figura 17. Efecto de diferentes concentraciones de 3α-OHAMD en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en CD derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF.** Al sexto día de diferenciación, las CD fueron tratadas con distintas dosis de 3αOHMD: 0.3 mM, 0.03 mM y 0.003 mM durante 24 horas, al cabo del tratamiento, se midió mediante citometría de flujo la expresión de cada molécula. En este grupo de barras se representa los datos correspondientes, las barras de la columna izquierda corresponde el porcentaje de CD que expresan las moléculas evaluadas, mientras que las gráficas de la derecha, corresponde a la Media de la Intensidad de Fluorescencia (MIF), para cada molécula CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274, el control corresponde a aquellas células sin tratamiento. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, n>3.

En conclusión, dependiendo del compuesto, fue la dosis que indujo la maduración o semi-maduración de las CDs. De tal manera que, la dosis de 0.03 mM de AU y 3 $\alpha$ -OHMD fue la que indujo un mejor resultado en la maduración de CDMOs, por lo que esta concentración fue la que se utilizó para tratar a las CDMOs que posteriormente serían empleadas para la terapia antitumoral. No obstante, en el caso de AM, la dosis que obtuvo mejores resultados fue la de 0.003 mM. Sin embargo, la dosis de 0.03 mM indujo una tendencia positiva en relación a la expresión de CD86 y CD40, es decir, es posible que las CDs tratadas maduraran en un corto periodo de tiempo. Por lo que se optó por escoger la dosis de 0.03 mM porque fue la única capaz de aumentar la expresión de las moléculas coestimuladoras más importantes como CD40 y CD86, así como el de disminuir el porcentaje de células positivas para CD273 y CD274. Para analizar mejor el efecto de la dosis de 0.03 mM en los diferentes triterpenos, se presenta una comparación del porcentaje de CDs positivas para las diferentes moléculas coestimuladoras e inhibitorias, así como su nivel de expresión para cada molécula.

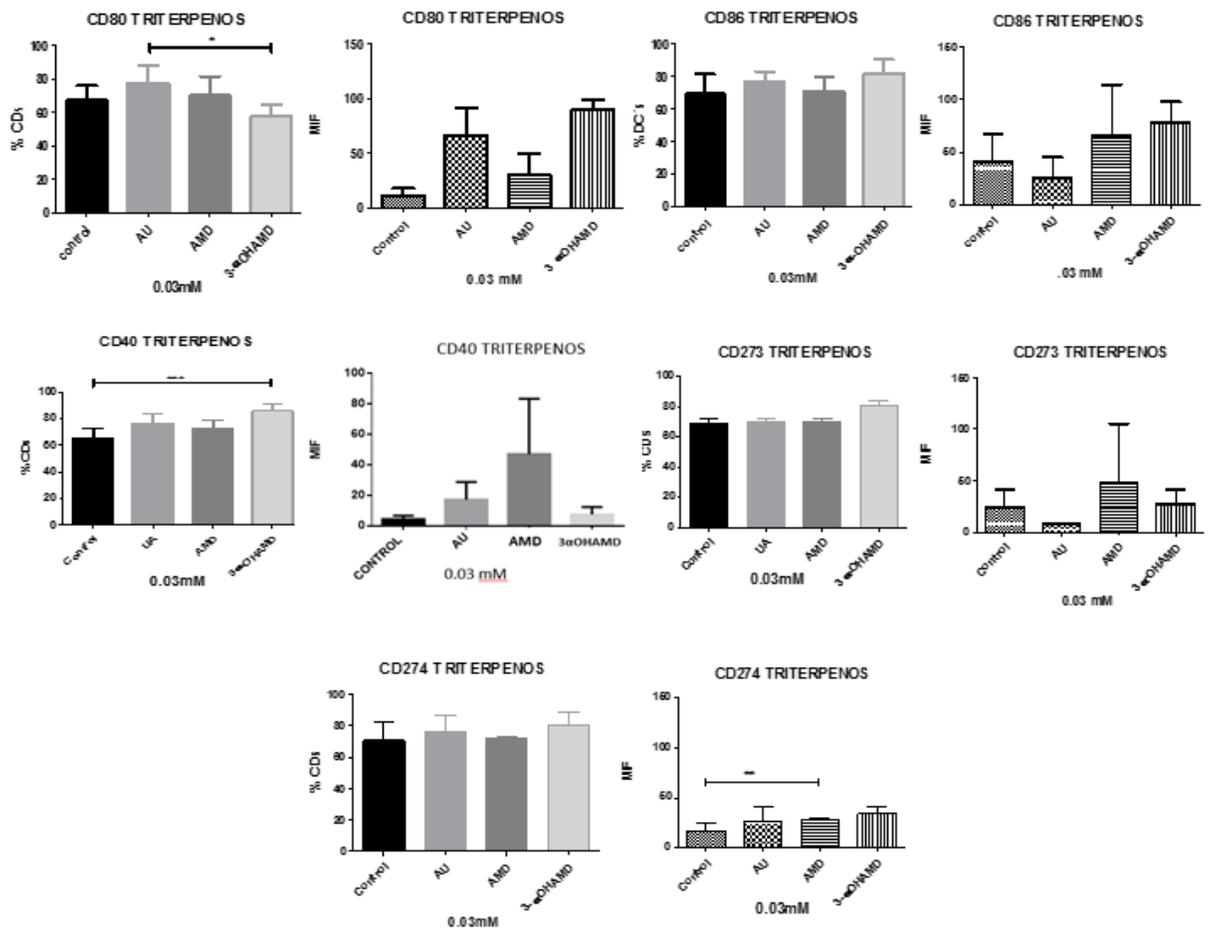
**CD80:** 3 $\alpha$ -OHAMD indujo disminución en el número de CDMOs CD80+, sin embargo, la expresión de CD80 fue elevada en comparación con los demás triterpenos y el grupo control. Esto es relevante porque a pesar que había pocas células CD80+, éstas expresaban altos niveles de esta molécula estimuladora. En el caso AU, se observó un aumento tanto en el porcentaje de células positivas como en su nivel de expresión. Mientras que AMD indujo un ligero aumento en el porcentaje de CDMO, sin embargo, su expresión fue el menor comparado con los otros dos triterpenos. En conclusión, el mejor compuesto fue 3 $\alpha$ -OHAMD.

**CD86:** No se observaron cambios en la expresión, ni en el número de células CD86+ entre los diferentes compuestos.

**CD40:** En el caso de 3 $\alpha$ -OHMD indujo un aumento en el número de CDMOs CD40+ en comparación con el grupo control, no obstante, no se encontraron cambios en la expresión de esta molécula. AMD solo mostró una tendencia positiva en la expresión de esta molécula, no obstante, no se observaron cambios significativos.

**CD273:** El tratamiento con AU, AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD no mostró cambios ni en el número de CDMOs CD273+ ni en la expresión de este el marcador.

**CD274:** El tratamiento de 3 $\alpha$ -OHAMD fue el único en generar un aumento significativo en comparación con el grupo control.



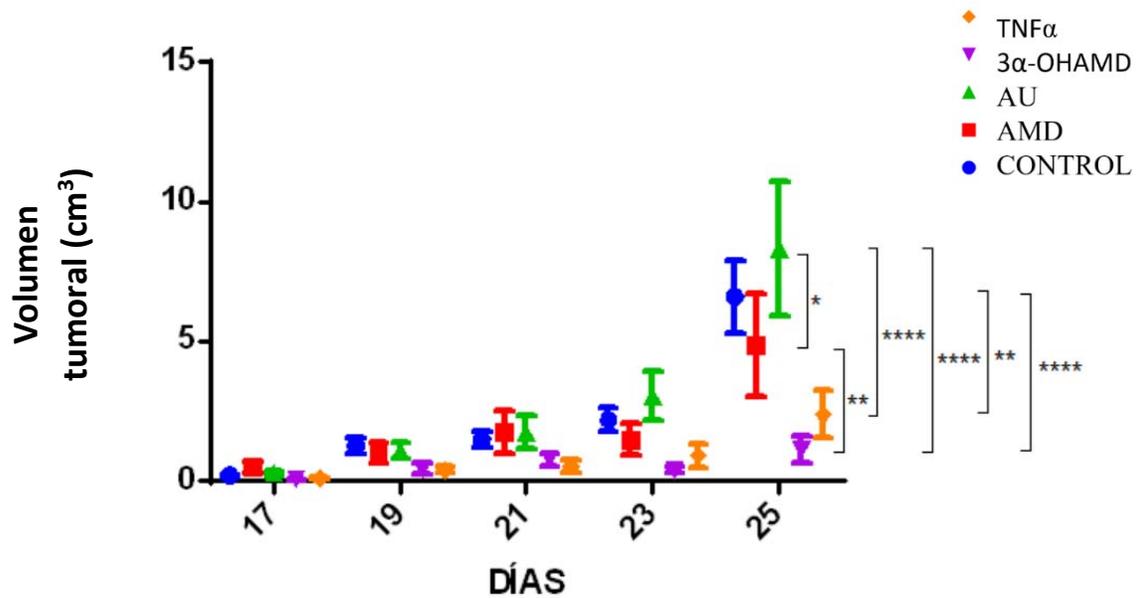
**Figura 18. Efecto de los triterpenos (AU, AMD y 3 $\alpha$ OHAMD) a una sola concentración, en la expresión de moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en CD derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF. Al sexto día de diferenciación, las CDs fueron tratadas a una dosis de 0.03 mM con los diferentes triterpenos (AU, AMD y 3 $\alpha$ OHAMD) durante 24 horas, al cabo del tratamiento, se midió mediante citometría de flujo la expresión de cada molécula. En este grupo de barras se representan los datos correspondientes, las barras de colores de la columna izquierda corresponde el porcentaje de CDs que expresan las moléculas evaluadas, mientras que las gráficas de la derecha y en gris, corresponde a la Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF), para cada molécula CD80, CD86, CD40, CD273 y CD274, el control corresponde a aquellas células sin tratamiento. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P<0.0001, n>3.**

## 12.7 Tasa de crecimiento tumoral en ratones tratados con MOCD's

Después de corroborar el efecto de los triterpenos en la maduración de las CDMOs y escoger la dosis adecuada para tratar las CDs empleadas en la inmunoterapia, se procedió a evaluar su efecto *in vivo* en ratones con melanoma. Ratones de la cepa C57BL/6 de 5-7 semanas de edad, se les inoculó 50,000 células de la línea de melanoma B16-F10, una semana después los ratones desarrollan un tumor que sólo puede ser observado mediante microcirugía, pero es hasta el día diecisiete posterior a la inducción de melanoma, que el tumor es palpable (tamaño aproximado de 0.2 a 0.5 cm de diámetro mayor). Los ratones se trataron con CDs/triterpenos en una sola ocasión al día quince después de haber sido inoculados con melanoma.

Se puede observar en la gráfica 20 que el grupo de ratones que recibieron CDMOs tratadas con 3 $\alpha$ -OHAMD cargadas con MAGE-AX, fue aquel que durante todo el tratamiento mostró un tamaño tumoral menor en comparación con los demás grupos, incluyendo el grupo con CDMOs maduradas con TNF $\alpha$  considerado como el control positivo. Por el contrario, el grupo de ratones que recibieron CDMOs con AU/MAGE-AX mostraron un tamaño tumoral aún mayor en comparación con todos los grupos, incluso mayor que el grupo que no recibió ningún tratamiento. (10 vs 7.5 cm<sup>3</sup>). Por otra parte, los ratones que recibieron CDMOs tratadas con AMD/MAGE-AX mostraron un menor tamaño tumoral comparación del grupo control. Es importante señalar que aun cuando todos los grupos desarrollaron tumores, todos los ratones sobrevivieron 25 días posteriores a la terapia de CDs así como 40 días después de la inducción de melanoma.

Por otra parte, se puede observar que a partir del día 20 al día 23 hay una ligera reducción en la tasa de crecimiento tumoral en los ratones de los tumores tratados con CDMOs con AMD/MAGE-AX y 3 $\alpha$ OHAMD/MAGE-AX. Sin embargo, el grupo de ratones tratados con CDMOs/AMD/MAGE-AX mostró una tasa de crecimiento tumoral mayor que la de los ratones tratados con CDMOs 3 $\alpha$ -OHAMD/MAGE-AX.



**Figura 19. Volumen de los tumores en ratones C57BL/6.** Tamaño tumoral de los ratones inoculados con CDMOs tratadas con AU/MAGE-AX, AMD/MAGE-AX, 3- $\alpha$ OH/MAGE-AX, desde el día 21 al 23 se observa que tamaño tumoral se ve ligeramente reducido en aquellos grupos tratados con CDMOs AM/MAGE AX y 3 $\alpha$ OH/MAGE-AX. Así mismo este último grupo fue el grupo con menor tamaño tumoral incluso a comparación del grupo TNF $\alpha$ . Por otra parte, el grupo AU/MAGE-AX generó un tamaño tumoral aún mayor que el grupo que no recibió ningún tratamiento. En todos los grupos se observa como el volumen del tumor aumento drásticamente después del día 23 posterior a la inducción del melanoma. Las barras corresponden el promedio +/- el error estándar. \*P<0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001, n=10.

### 13. Discusión

En el presente trabajo se investigó el efecto de los triterpenos, AU, AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD en CDMOs que posteriormente serían empleados como inmunoterapia adoptiva contra el melanoma murino. Los resultados mostraron que el AU, AMD y el 3 $\alpha$ -OHAMD a diferentes dosis son capaces de modificar la expresión de las moléculas coestimuladoras y coinhibitorias en CDMOs. Se encontró que el cultivo de CDMOs tratadas con AU (0.03 mM) mostró un aumento en la expresión de CD80, CD40 y la disminución en la expresión de CD273 (Fig. 15), mientras que el AMD a la dosis de 0.03 mM generó el aumento en la expresión de las moléculas CD86, CD40 (Fig. 16). Mientras que 3 $\alpha$ -OHAMD generó el aumento en el nivel de expresión para las moléculas CD80 CD86 y CD274 en CDMOs (Fig. 17). Además, ratones con melanoma tratados con CDMOs cultivadas con el antígeno tumoral MAGE-AX y con AMD o 3 $\alpha$ -OHAMD, generaron la disminución en la tasa de crecimiento tumoral en comparación con el grupo control y con los ratones tratados con CDMOs/AU/MAGE-AX. Por otra parte, aquellos ratones que tuvieron el tratamiento de CDMOs/3 $\alpha$ -OHAMD/ MAGE-AX tuvieron un crecimiento tumoral menor en comparación con los ratones con melanoma tratados con CDMOs/TNF $\alpha$ /MAGE-AX, considerados como el control positivo de tratamiento (Fig. 19)

#### 13.1 Diferenciación y caracterización de CDs derivadas de médula ósea en ratón.

Existen diversos protocolos para la obtención de CDs en ratón, los primeros estudios demostraron que puede aislarse alrededor de  $6 \times 10^4$  células de Langerhans de la epidermis de una oreja; aproximadamente  $1-10 \times 10^5$  CD de un bazo o timo de la sangre de un ratón se pueden generar  $1 \times 10^6$  CD con el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), mientras que los precursores de médula ósea tratados con GM-CSF revelan que puede obtenerse aproximadamente  $5 \times 10^8$  CDs después de 6-8 días (Inaba *et al*, 1992). El método empleado en el presente trabajo, fue el de Lutz, 1999, con pequeñas modificaciones. Así se redujo el tiempo de cultivo y no se reemplazaron las cajas de cultivo, como lo indica Lutz, sin embargo, el número de CDs obtenido en cada cultivo y empleando la médula ósea de un ratón fue aproximadamente de  $8 \times 10^6$  CD mientras que Lutz indicó que obtenía  $5 \times 10^8$  CDs. Como se muestra en la figura 13, el cultivo se caracteriza por células adheridas y no-adheridas al plástico, los protocolos comentan que la población adherida al plástico está constituida por macrófagos y células estromales (Inaba, 1992). Mientras que, la población no adherida está

constituida por granulocitos, macrófagos y por CDs, estas últimas se caracterizan por expresar la integrina CD11c y la molécula MHC II. Debido a lo anterior, se consideraron estas moléculas para analizar la población de células CD11c+ y MHC II+ en los cultivos realizados en esta investigación. Varios autores indican que los macrófagos y CDs comparten múltiples funciones e incluso marcadores como (CD64, CD115 o, CD14) así como altos niveles de SIRPa, F4/F80 y CD11b (Helft *et al.*, 2015)., pero se considera que las células obtenidas del cultivo con GM-CSF corresponden a diferentes estados de maduración de las CDs. Es importante mencionar que estos marcadores no se encuentran en CDs, sobre todo en CDs maduras, ya que éstas poseen marcadores como CD135, CCR7 y CD117 y alta expresión de CD24, DEC 205, PD-L2 e IRF4. Es importante decir que, aunque ambos tipos de células son consideradas como CPAs sus funciones son diferentes. Se demostró que los macrófagos, se caracterizan por secretar más citocinas pro-inflamatorias que las CDs; sin embargo, las CDs poseen mayor movilidad que los macrófagos, y por último las CD plasmacitoides (CDp) pueden inducir una activación más eficiente de linfocitos T, lo cual se demostró cuando los macrófagos necesitaron 10 veces más concentración de LPS que las CDs para inducir la activación de linfocitos T (Na *et al.*, 2016). Para caracterizar mejor a las CDs obtenidas, se propone emplear los marcadores ya mencionados, no obstante, en ese estudio, se observó la presencia de múltiples poblaciones cuando se emplearon los marcadores CD11c y MHC II, mientras que en nuestros cultivos se obtuvo una población homogénea de CDMOs CD11c+ MHCII+, por lo que se infiere que se trata de CDs.

### **13.2 Efecto de los triterpenos en la viabilidad celular**

Paracelsus señaló en el siglo XVI: "Todas las sustancias son venenos; no hay ninguno que no sea veneno. La dosis correcta diferencia un veneno de un remedio". Al igual que muchos ingredientes a base de hierbas, la selección de la dosis adecuada de estos triperpenoides fue crítica. Aunque los triterpenoides empleados tienen una dosis letal sumamente alta, es importante verificar si son tóxicas para las CDMOs (Liu Jie 2005). Se ha observado que el AU tiene efectos pleiotrópicos, puede actuar como un agente anti-inflamatorio, anti-proliferativo, pro-apoptótico, anti-metastásico y anti-angiogénico en células tumorales pero no es tóxico en células no tumorales (Zang lili, *et al.*, 2014). Se constató que la dosis de 0.003 mM de todos los compuestos no causó disminución significativa en la viabilidad celular. No obstante, cuando se emplearon las dosis de 0.3 mM y 0.03 mM se observó que los tres compuestos indujeron

disminución en la viabilidad de CDMOs (Fig. 13). Esto contradice estudios anteriores utilizando triterpenos sobre CPA's. Los primeros estudios sobre el efecto de los triterpenos en células del sistema inmune indican que el AU vía intraperitoneal en ratas (50  $\mu$ moles/kg), generó en un aumento en células de la médula ósea indicando su efecto en la hematopoyesis (Raphael & Kuttan, 2003). Por otro lado, los macrófagos tratados con dosis desde 0.16 hasta 10  $\mu$ M de AU por seis horas hasta 48 horas, no mostraron disminución en la viabilidad celular (Ho jin *et al.*, 2001; Ikeda *et al.*, 2005; Min-Hye *et al.*, 2011). Nuestros datos también se corroboran con el realizado por Jung, quien realizó un estudio con CDs derivadas de monocitos (moCDs) para determinar el efecto citotóxico del AU. Jung y cols (2011) observaron una viabilidad celular mayor del 95% cuando se trataron moCDs con dosis de 0.01-1 $\mu$ M durante dos días (Jung *et al.*, 2011).

Hasta ahora se ha estudiado el mecanismo de acción por medio del cual el AU tiene un efecto citotóxico en células tumorales. Se ha observado que el AU inhibe las proteínas relacionadas a la supervivencia celular en las vías de señalización como: PI3K/Akt y EGFR/MAPK y AMPK, Bcl-2, FoxM1 e inhibe la proliferación celular mediante la liberación de citocromo C activando las caspasas 3, 8 y 9, modulando la vía intrínseca de la apoptosis, así mismo, el AU se ha conocido por regular moléculas relacionadas al ciclo celular, inhibiendo el paso de G0-G1 aumentando la regulación de p21 (Shangugam *et al.*, 2013; , Zang lili, *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2016). El mecanismo de acción por el cual el AU es tóxico en células tumorales y no en células normales no se ha estudiado a fondo, sin embargo, un trabajo llevado in silico supone que los triterpenos actúan como inhibidores competitivos, debido a su estructura química y las posibles interacciones hidrofóbicas que pueda tener con múltiples receptores (Yamaguchi *et al.*, 2011). Otro estudio realizado, indicó que los grupos radicales del AU son esenciales para inducir muerte en células tumorales, dado que cuando se generaron diferentes derivados del AU al momento de inducir la esterificación del grupo OH en el carbono 3 y el COOH del carbono 17, estos no conferían citotoxicidad, por lo que se demostró que mantener los grupos polares en las posiciones del 3-OH y/o 17-COOH es esencial para la actividad citotóxica (Chao-Mei M *et al.*, 2005; Jing-Wei Shao *et al.*, 2011).

Por otro parte AMD Y 3 $\alpha$ -OHAMD son triterpenos de tipo tirucalano. Son los principales componentes de los extractos orgánicos en la corteza de *Amphipterygium adstringens*, el extracto acuoso es comúnmente utilizado en la medicina tradicional como un agente

gastroprotector, anti-inflamatorio, además de ser citotóxico en células tumorales como leucemia, HeLa, Gep G2, A-431, entre otras (Dalla-Via *et al*, 2012).

Se ha observado que 3 $\alpha$ -OHAMD es citotóxico en estas líneas celulares en concentraciones pequeñas (10 $\mu$ M), dado que actúa como un agente pro-apoptótico, generando la permeabilización de la membrana mitocondrial y la posterior liberación del citocromo c y el factor AIF (Factor Inductor de la Apoptosis); mientras que a dosis altas (100 $\mu$ M) el triterpeno protege a las mitocondrias impidiendo el paso de Ca<sup>2+</sup> (Dalla-Via *et al*, 2012). Así mismo otro estudio dio paso a sintetizar dos triterpenos de tipo tirucallano, en este estudio se mostró la actividad anti proliferativa de los diferentes triterpenos en diferentes células tumorales, éste estudio junto con el trabajo de Dalla, dio paso a sugerir de que no es necesario el poseer el grupo hidroxilo en el C-3 ni el doble enlace en el C-24 o 25 para conferir citotoxicidad (Oviedo-Chávez *et al*, 2005; Dalla-Via *et al*, 2012),

Por otro lado, el efecto citotóxico de AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD también se ha observado en macrófagos, aunque de forma indirecta. En primer lugar, se estudiaba el efecto antiinflamatorio de AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD en macrófagos. Se sabe que los macrófagos liberan grandes cantidades de óxido nítrico (NO), por lo tanto, evaluaron la modulación en la producción de NO ya sea en macrófagos no tratados o estimulados con LPS, se observó que el extracto de hexano (EH) de la corteza de *A. adstringens* tenía un gran potencial para inhibir la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS, pero se debe a que los triterpenos indujeron la disminución en la viabilidad de los macrófagos; mientras que el extracto acuoso (EA) de la corteza de *A. adstringens* no indujo muerte en macrófagos. Es importante resaltar que la dosis empleada fue de 100  $\mu$ M (Oviedo-Chávez, et al., 2004), es decir 2 veces más que la dosis empleada en este trabajo, por lo que, las dosis empleadas no indujeron muerte celular en las CDMOs.

Las citotoxicidades de estos terpenoides deben considerarse con cautela al utilizar estos compuestos para obtener beneficios para la salud. La mayoría de los terpenoides son sustancias lipofílicas que pueden dirigirse a las membranas celulares, controlando la infiltración química en la membrana, la movilidad y la señalización celular, o modulando la vía del mevalonato para inducir la muerte celular. En un estudio el cual evaluó a 27 terpenos observaron que los terpenos con mayor número de carbonos tenían mayor efecto citotóxico en células inmunes, lo que sugiere que los terpenoides de mayor peso molecular pueden

inducir más fácilmente la inestabilidad de la membrana celular y la muerte (Chi-Mei Ku & Jin-Yuarn Lin, 2013).

### **13.3 Efecto de los triterpenos en el fenotipo de las CDMOs y su efecto en el tamaño tumoral y sobrevida de ratones.**

En el presente trabajo se evaluó si el AU, AMD o 3 $\alpha$ -OHAMD eran capaces de modificar el fenotipo de CDMOs *in vitro* de forma independiente. Se demostró que el cultivo de CDMOs inmaduras con AU, a la dosis más alta (0.3 mM) generó una disminución en la expresión de la mayoría de las moléculas excepto por CD40, el cual no generó cambios. Mientras que a la dosis más baja (0.003 mM) el efecto fue contrario, se observó un aumento en la expresión de CD86, CD40, CD273 y CD274. Mientras que la dosis de 0.03 mM generó un aumento en el porcentaje de CDMOs positivas a CD86 pero la expresión de CD86 y CD273 bajó en comparación con el grupo control. (Fig. 15).

¿Cómo es que el AU indujo la maduración de las CDMOs? Jung en el 2011 demostró que el AU puede ser reconocido por receptores tipo toll (TLR) 2 y 4, puesto que cuando inactivaban esta vía mediante anticuerpos, la producción de IL-12 e INF $\gamma$  se redujo drásticamente. También se demostró que el AU es capaz de aumentar ligeramente la expresión de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86, HLA-DR) en CDs (Jung *et al.*, 2011). Se ha observado que el AU aumenta la producción de citocinas en macrófagos mediante la activación de la vía NF-KB, p38, MAPK y ERK. No obstante, se ha observado que el AU inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias inhibiendo la vía JNK (Ye-Ling Yu *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican, que las dosis empleadas de AU inhibieron la producción de citocinas inhibitorias además de la expresión de CD86, parámetros esenciales para que se lleve a cabo una adecuada presentación de antígenos y una posterior respuesta inmune antígeno específica. Así, también es posible que el AU sea reconocido por otros receptores además de los TLRs (Jung *et al.*, 2011). Lo anterior explica el aumento en la tasa de crecimiento tumoral observado en los ratones con melanoma que fueron tratados con las CDMOs/AU (Fig.19).

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en donde se analiza el efecto del AU, aunque en distintos tipos celulares y en otras dosis. Así, en estudios recientes se ha corroborado la capacidad del AU para inhibir la expresión de moléculas coestimuladoras (CD19, CD80 y CD86) y MHC II en células B tratadas con LPS, lo cual sugiere que el AU puede

tener diversos efectos dependiendo la dosis y las células estudiadas (Checker *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha sugerido que el AU puede tener efectos anti-oxidantes (Checker *et al.*, 2012). Investigaciones recientes sugieren que el estado redox puede jugar un papel en la regulación de respuestas inmunes. Así, se ha demostrado que los agentes anti-oxidantes pueden tener efectos inhibitorios en relación a la activación (inhibición en la expresión de CD69, CD255 y CD134), proliferación y el tipo de citocinas producidas por los linfocitos T (Zeng *et al.*, 2017). El grupo de Checker Raúl ha demostrado que el AU puede inhibir la expresión de moléculas tanto coestimuladoras como inhibitorias mediante la inducción en la fosforilación de factores de transcripción relacionadas a la producción de citocinas pro-inflamatorias como NF-KB y AP-1, NF-AT (Checker *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se ha estudiado el efecto del AU en macrófagos, linfocitos B y T. Un informe reciente de Liu *et al.*, (2011) dio a conocer que la inoculación de AU en un modelo murino de trasplante de corazón indujo la activación de linfocitos T, B y macrófagos (Liu *et al.*, 2011). Además, Xu Tao *et al.*, en el mismo año, demostraron que los efectos antiinflamatorios del AU están mediados a través de la supresión del regulador de la transcripción ROR $\gamma$ t lo cual resulta en la disminución de la expresión de IL-17 en células Th17 (Xu *et al.*, 2011). Aunado a lo anterior, también se ha observado que el AU es capaz de modular una respuesta tipo Th2 cuando se utiliza a dosis altas [50  $\mu$ M], generando en un aumento de IL-10 y una disminución de IL-2 en splenocitos murinos (Chi-Mei Ku & Jin-Yuarn Lin, 2013).

En resumen, ésta investigación demuestra que el tratamiento con AU indujo la disminución en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD86 y CD40), y que el tratamiento de ratones con melanoma tratados con CDMOs cultivadas con AU mostraron aumento en la tasa de crecimiento tumoral, lo cual sugiere que las CDMOs/AU indujeron una respuesta Treg o Th2, dado que se ha constatado que este tipo de respuestas inmunológicas se caracterizan por inducir el aumento en la tasa de crecimiento tumoral. No obstante, todavía es necesario el estudio de la respuesta inmunológica inducida por el tratamiento de CDMOs cultivadas con AU. Por lo anterior, el AU puede ser empleado en los tratamientos contra enfermedades autoinmunes, como colitis ulcerosa, diabetes, miocardio autoinmune, lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, así como el trasplante de órganos sólidos.

A diferencia de los triterpenos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD, son pocos los estudios reportados. Se ha observado que el AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD son capaces de aumentar la producción de óxido nítrico

(NO) en macrófagos no estimulados, los autores sugieren que el doble enlace en el C24-25 en la estructura de estos triterpenos son los sitios activos encargados de la inducción en la liberación de NO (Oviedo-Chávez, *et al.*, 2005), sin embargo, hasta el momento no hay informes acerca del efecto de ambos triterpenos en algún tipo de CDs.

El presente trabajo de investigación es el primero en explorar el efecto del AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD en el fenotipo de las CDMOs, y sobre todo es el primer trabajo en estudiar el efecto terapéutico de las CDMOs tratadas con AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD en ratones con melanoma. Se observó que el AMD fue capaz de aumentar ligeramente la expresión de CD80 en todas las concentraciones utilizadas, sin embargo solo la dosis de 0.003 mM fue capaz de aumentar la expresión de CD80 (Fig.16). En relación a las moléculas coinhibitorias, las dosis de 0.3 y 0.003 mM de AMD fueron capaces de disminuir la expresión de CD273 y CD274, pero sólo la concentración de 0.03 mM fue la única capaz de disminuir el porcentaje de células positivas para CD273 y CD274, así como fue la única en inducir el aumento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD86 y CD40 (Fig. 16). Por otra parte, el 3 $\alpha$ -OHAMD a la dosis de 0.03 mM fue el único en inducir el aumento tanto en el porcentaje de células positivas para las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 CD40 como en la expresión de las mismas moléculas con excepción de CD40. En relación a las moléculas coinhibitorias, 3 $\alpha$ -OHAMD indujo a la dosis de 0.003 y 0.3 mM una disminución en la expresión de CD273, pero un aumento en la expresión de CD274 (Fig. 17). Mientras que la dosis de 0.03 mM indujo una disminución en la expresión de CD273 y un ligero aumento en la expresión de CD274 con relación al grupo control de CDMOs no tratadas.

Es importante hacer mención de las diferencias estructurales entre los triterpenos empleados. Una de las diferencias radica en los grupos metilo en el C-4 del AU y un grupo hidroxilo en el C-3, en comparación del AMD que posee un grupo carbonilo en el C-3. Acorde con esto, probablemente el poseer un grupo carbonilo en el C-3 para el AMD y el poseer doble enlace en el C24-C25 para el AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD sea más importante para que se lleve la maduración y activación de las CDs en comparación de la metilación del C-3 que posee el AU. Así mismo tanto el AMD como el 3 $\alpha$ -OHAMD son compuestos tetracíclicos a comparación del AU que es pentacíclico. Es importante destacar que a pesar que el AU no indujo la maduración de CDMOs, los triterpenos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD sí indujeron la maduración de CDMOs. También algunos reportes han mostrado que otros triterpenos pueden estimular la maduración de CDs

y promover la activación de linfocitos Th1 y Th2 (Arrieta *et al.*, 2003). Así, la estructura de los triterpenos es relevante para la función inmunoreguladora de las CDs, por lo que es necesario su estudio para poder establecer las respuestas inmunológicas que desarrollan con el objetivo de emplearlos en un futuro como agentes terapéuticos.

Los triterpenos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD cuando son empleados en conjunto con las CDMOs son capaces de generar la disminución de la tasa de crecimiento tumoral en comparación con los ratones que no tuvieron un tratamiento, sin embargo, el 3 $\alpha$ -OHAMD fue el único de generar una disminución significativo de la tasa de crecimiento tumoral incluso en comparación con los ratones tratados con CDMOs/TNF $\alpha$ , grupo considerado como control positivo. La respuesta de este triterpeno radica en que fue el único compuesto que no sólo indujo un mayor porcentaje de CDMOs CD80 CD86+ sino que indujo también la expresión de ambas moléculas. Aunado a lo anterior, 3 $\alpha$ -OHAMD indujo la disminución en la expresión de CD273, molécula que se caracteriza por inhibir la activación de linfocitos T. Estos resultados son consistentes con un estudio en el cual se observó que el tratamiento oral del extracto acuoso del cuachalalate en ratones inmunodeprimidos aumentaba significativamente la tasa de proliferación de esplenocitos, mediante una prueba de hipersensibilidad tipo retardada. Se observó que a una dosis de 10 mg/kg, el extracto de cuachalalate es capaz de aumentar la respuesta inmune celular *in vivo* sugiriendo que el extracto acuoso de *A. adstringens* podría restaurar la inmunidad celular de los ratones inmunosuprimidos a niveles de ratones sanos (Ramírez-León *et al.*, 2013). Para esto, se debe de tener en cuenta que en una hipersensibilidad de tipo retrasado intervienen múltiples células como los linfocitos T, células dendríticas, queratinocitos, células endoteliales, macrófagos y células polimorfonucleares (Akiba, *et al* 2002). De acuerdo con estos resultados y los nuestros podemos concluir que los triterpenos AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD los cuales son los principales metabolitos secundarios de la corteza de *A. adstringens* pueden inducir la maduración de CDMOs, aumentando la expresión de moléculas coestimuladoras e inhibiendo la expresión de moléculas coinhibitorias.

Por otra parte, el éxito de una vacuna también se debe a la elección del antígeno usado. En este trabajo se utilizó el antígeno MAGE-AX. Este péptido fue sintetizado por la necesidad de generar epítopes que sean reconocidos por el H2Kb de ratones y generar una respuesta antitumoral específica. Este péptido tiene la característica de poseer una secuencia compartida con MAGE A1-A3 y A5 (Eggert *et al.*, 2004). Así se ha observado en vacunas con

péptidos a comparación de las vacunas polivalentes que incorporan diferentes antígenos o epítopes es menos probable que se genere un escape de la respuesta antitumoral. Estudios anteriores han demostrado que el antígeno MAGE AX puede conferir inmunidad antitumoral, así como la formación de linfocitos T CD8+ y secreción de INF $\gamma$ -específico además de una disminución del tamaño tumoral (Piñón-Zárate *et al.*, 2014; Herrera *et al.*, 2015). Por lo que, la combinación del uso del antígeno MAGE-AX con los triterpenos indujo una respuesta antitumoral antígeno específica efectiva que se tradujo en una disminución en la tasa de crecimiento tumoral, incluso mayor que la observada en los ratones tratados con CDMOs/TNF $\alpha$ . Por esta razón es importante estudiar qué citocinas pueden ser producidas en CDMOs después de ser tratadas con triterpenos como el AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD. Así mismo, es relevante el estudio de los niveles de linfocitos TCD8+ y CD4+ tanto en el estroma tumoral como en los órganos linfoides para poder analizar la respuesta inmunológica desarrollada por el tratamiento de CDMOs/AMD/3 $\alpha$ -OHAMD.

#### **14. Conclusiones**

En el presente trabajo se demostró que los triterpenos de tipo tirucallano fueron mejores adyuvantes en la terapia de CDMOs que el triterpeno ácido ursólico (triterpeno de tipo ursano), debido a que el ácido masticadienónico y el ácido 3-hidroxiastidenónico lograron en CDMOs un aumento significativo en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) y la disminución de moléculas coinhibitorias. El AU no indujo la maduración de CDMOs.

Los triterpenos indujeron una disminución en la viabilidad celular de CDMOs tratadas con 0.3 y 0.03 mM de ácidos masticadienónico y 3-hidroxiastidienoico. A pesar de lo anterior, las CDMOs tratadas con ácido masticadienónico y el ácido 3-hidroxiastidenónico indujeron una respuesta inmunológica protectora que se reflejó en la disminución significativa del crecimiento tumoral de los ratones con cáncer inducido, en comparación con los ratones control (sin tratamiento) y con los ratones con melanoma tratados con CDMOs/AU.

## **15. Perspectivas**

Dado que se demostró que las CDMOs tratadas con AMD y 3 $\alpha$ -OHAMD fueron capaces de disminuir la tasa de crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados, sería conveniente medir las citocinas involucradas en la formación de una respuesta Th1 como son IL-1 (citocina pro-inflamatoria), IL-12 e IL-15 (citocina involucrada en la activación de NK's) así como medir la citocina IL-10 que probablemente estuvo aumentada para el caso del triterpeno AU. También sería importante analizar la reacción alogénica de linfocitos, con el fin de evaluar, si las CDs tratadas con los triterpenos fueron capaces de estimular adecuadamente a los linfocitos T. Por otra parte, es relevante analizar los receptores que reconocen tanto al AMD como al 3 $\alpha$ -OHAMD, sobre todo en las CDMOs.

## 16. Referencias

1. Ohm, Á. E., Fierro, E., Velásquez, V. E., & Rueda, X. (2009). **Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología.** (Spanish). *Revista De La Asociación Colombiana De Dermatología Y Cirugía Dermatológica*, 17(2), 87-108.
2. Aguilar, J., & Rodríguez, E. (2007). **Vaccine adjuvants revisited.** *Vaccine*, 25(19), 3752-3762. doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.111
3. Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, Krasteva M, Horand F, Kaiserlian D. **Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis.** *J Immunol.* 2002; 168(6):3079–3087.
4. Arrieta, J., Benítez, J., Flores, E., Castillo, C., & Navarrete, A. (2003). **Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons.** *Planta Medica*, 69(10), 905-909.
5. Banchereau, J., & Palucka, A. K. (2005). Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, 5(4), 296-306. Doi: 10.1038/nri1592
6. Barker, P. A., & Salehi, A. (2002). **The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease.** *Journal of Neuroscience Research*, 67(6), 705-712.
7. Belz, G. T., & Nutt, S. L. (2012). **Transcriptional programming of the dendritic cell network.** *Nature Reviews Immunology*, 12(2), 101-113. Doi: 10.1038/nri3149
8. Brunner, R., Jensen-Jarolim, E., & Pali-Schöll, I. (2010). **The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview.** *Immunology Letters*, 128(1), 29-35. doi:10.1016/j.imlet.2009.10.005aguil
9. Cárdenas, M. L., & García, L. (2010). **Células dendríticas y melanoma.** (Spanish). *Revista De La Asociación Colombiana De Dermatología Y Cirugía Dermatológica*, 18(4), 218-224.
10. Chávez, I. O., Apan, T. R., & Martínez-Vázquez, M. (2005). **Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes.** *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(9), 1087-1091.

11. Chávez, I. O., Apan, T. R., & Martínez-Vázquez, M. (2005). **Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes.** *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 57(9), 1087-1091
12. Dalla Via, L., Braga, A., García-Argáez, A. N., Martínez-Vázquez, M., & Toninello, A. (2012). **3 $\alpha$ -Hydroxymasticadienonic acid as an antiproliferative agent that impairs mitochondrial functions.** *Journal of Natural Products*, 75(4), 557-562. Doi: 10.1021/np200607b
13. **Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof?.** (2008). *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 118
14. Drake, C. G., Lipson, E. J., & Brahmer, J. R. (2014). **Breathing new life into immunotherapy: review of melanoma, lung and kidney cancer.** *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 11(1), 24-37. doi:10.1038/nrclinonc.2013.208
15. Durai, V., & Murphy, K. M. (2016). **Functions of Murine Dendritic Cells.** *Immunity*, 45(4), 719-736. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.010
16. Durrant, L. G., & Scholefield, J. H. (2009). **Principles of cancer treatment by immunotherapy.** *Surgery (0263-9319)*, 27(4), 161. doi:10.1016/j.mpsur.2009.01.005
17. Eggert, A. ), Voigt, H. ), Schrama, D. ), Kämpgen, E. ), Becker, J. ), Andersen, M. ), & thor Straten, P. ). (2004). **Characterization of mouse MAGE-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes.** *European Journal of Immunology*, 34(11), 3285-3290. doi:10.1002/eji.200324618
18. Erin M. Wolf Horrell, Kalin Wilson and John A. D’Orazio (2015). **Melanoma — Epidemiology, Risk Factors, and the Role of Adaptive Pigmentation, Melanoma - Current Clinical Management and Future Therapeutics**, Prof. Mandi Murph (Ed.), ISBN: 978-953-51-2036-0, InTech, DOI: 10.5772/58994. Available from: <http://www.intechopen.com/books/melanoma-current-clinical-management-and-future-therapeutics/melanoma-epidemiology-risk-factors-and-the-role-of-adaptive-pigmentation>
19. Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). **CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy.** *Immunity*, 44(5), 973-988. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.020
20. Fonsatti, E., Maio, M., Altomonte, M., & Hersey, P. (2010). **Biology and clinical applications of CD40 in cancer treatment.** *Seminars In Oncology*, 37(5), 517-523. doi:10.1053/j.seminoncol.2010.09.002
21. Fuente García, A. I., & Ocampo Candiani, J. (n.d). **Melanoma cutáneo.** 2010.
22. Furtado, N. C., Pirson, L., Edelberg, H., Miranda, L. M., Loira-Pastoriza, C., Preat, V., & ... André, C. M. (2017). **Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies.** *Molecules*, 22(3), 1-24. doi:10.3390/molecules22030400

23. Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). **Melanoma biology and new targeted therapy.** *Nature*, (7130), 851.
24. Greenwald, R. J., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2005). **THE B7 FAMILY REVISITED.** *Annual Review Of Immunology*, 23(1), 515-548.
25. Guillermo L. Montoya, P., Jelver A., S., Fernando, A., Ulrike, H., & Jose R., R. (2013). **Pentacyclic triterpenes from *Cecropia telenitida* with immunomodulatory activity on dendritic cells.** *Revista Brasileira De Farmacognosia*, (5), 754. doi:10.1590/S0102-695X2013000500006
26. Gutiérrez Vidrio, R. ), & Cortés Lozano, N. ). (2007). **Confronting melanoma in the 21st century.** *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*, 35(1), 3-13.
27. Guy, B. (2007). **The perfect mix: recent progress in adjuvant research.** *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 505-517. doi:10.1038/nrmicro1681
28. Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., & Reis e Sousa, C. (2015). **GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells.** *Immunity*, 42(6), 1197-1211. doi:10.1016/j.immuni.2015.05.018
29. Herrera González, N. E., & Aco Flores, A. Y. (n.d). **El melanoma en México.** 2010.
30. Ikeda, Y., Murakami, A., & Ohigashi, H. (2005). **Ursolic acid promotes the release of macrophage migration inhibitory factor via ERK2 activation in resting mouse macrophages.** *Biochemical Pharmacology*, 70(10), 1497-1505.
31. Ikeda, Y., Murakami, A., & Ohigashi, H. (2008). **Ursolic acid: an anti- and pro-inflammatory triterpenoid.** *Molecular Nutrition & Food Research*, 52(1), 26-42. doi:10.1002/mnfr.200700389
32. Jung, T., Pham, T. N., Umeyama, A., Shoji, N., Hashimoto, T., Lee, J., & Takei, M. (2010). Immunopharmacology and Inflammation: **Ursolic acid isolated from *Uncaria rhynchophylla* activates human dendritic cells via TLR2 and/or TLR4 and induces the production of IFN- $\gamma$  by CD4+ naïve T cells.** *European Journal Of Pharmacology*, 643297-303. doi:10.1016/j.ejphar.2010.06.030
33. Kashyap, D., Tuli, H. S., & Sharma, A. K. (2016). **Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential.** *Life Sciences*, 146201-213. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.017
34. Kee, D., & McArthur, G. (2017). **Immunotherapy of melanoma.** *European Journal Of Surgical Oncology: The Journal Of The European Society Of Surgical Oncology And The British Association Of Surgical Oncology*, 43(3), 594-603. doi:10.1016/j.ejso.2016.07.014
35. Ku, C., & Lin, J. (2013). **Anti-inflammatory effects of 27 selected terpenoid compounds tested through modulating Th1/Th2 cytokine secretion profiles using**

**murine primary splenocytes.** Food Chemistry, 141(2), 1104-1113. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.044.

Lee JS, Kim JW, Choi CH, et al. Anti-tumor activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein. A on dendritic cell-based immunotherapy against murine melanoma. J Microbiol 2008; 46:221

36. Leung, J., & Suh, W. (2014). **The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy.** Immune Network : Official Journal Of The Korean Association Of Immunobiologists, (6), 265

37. Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rössner, S., Koch, F., Romani, N., & Schuler, G. (1999). **An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.** Journal Of Immunological Methods, 223(1), 77-92.

38. Ma, D. Y., & Clark, E. A. (2009). **The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.** Seminars In Immunology, 21(5), 265-272. doi:10.1016/j.smim.2009.05.010

39. Meek, D. W., & Marcar, L. (2012). **MAGE-A antigens as targets in tumour therapy.** Cancer Letters, 324(2), 126-132. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.011

40. Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., & ... Mellstedt, H. (2014). **Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials.** Nature Reviews. Clinical Oncology, 11(9), 509-524. doi:10.1038/nrclinonc.2014.111

41. Miller, A., & Mihm, M. C. (2006). **Molecular Mechanisms in Melanoma.** New England Journal Of Medicine, 355(13), 1395-1396. doi:10.1056/NEJMc062093

42. Na, Y. R., Jung, D., Gu, G. J., & Seok, S. H. (2016). **GM-CSF Grown Bone Marrow Derived Cells Are Composed of Phenotypically Different Dendritic Cells and Macrophages.** Molecules And Cells, 39(10), 734-741.

43. Nencioni, A., Grunebach, F., Schmidt, S., Muller, M., Boy, D., Patrone, F., & Brossart, P. (n.d). **The use of dendritic cells in cancer immunotherapy.** Critical Reviews In Oncology Hematology, 65(3), 191-199.

44. Obeid, J., Hu, Y., & Slingsluff, C. J. (2015). **Vaccines, Adjuvants, and Dendritic Cell Activators--Current Status and Future Challenges.** Seminars In Oncology, 42(4), 549-561. doi:10.1053/j.seminoncol.2015.05.006

45. Olivera Ortega, A. G., Soto Hernández, M., Martínez Vázquez, M., Terrazas Salgado, T., & Solares Arenas, F. (1999). **Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, *Schiede ex Schlecht*).** Journal Of Ethnopharmacology, 68(1-3), 109-113.

46. Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., & Martínez-Vázquez, M. (2004). **Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-**

**inflammatory activity.** *Phytomedicine: International Journal Of Phytotherapy And Phytopharmacology*, 11(5), 436-445.

47. Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). **Cancer immunotherapy via dendritic cells.** *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 265-277. doi:10.1038/nrc3258

48. Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). **Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines.** *Immunity*, 39(1), 38-48. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.004

49. Parmiani, G., Castelli, C., Rivoltini, L., Casati, C., Tully, G. A., Novellino, L., & Santinami, M. (2003). **Immunotherapy of melanoma.** *Seminars In Cancer Biology*, 13(6), 391. doi:10.1016/j.semcancer.2003.09.001

50. Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez, M. Á., Hernández-Téllez, B., Jarquín-Yáñez, K., & Castell-Rodríguez, A. E. (2014). **GK-1 Improves the Immune Response Induced by Bone Marrow Dendritic Cells Loaded with MAGE-AX in Mice with Melanoma.** *Journal Of Immunology Research*, 1-12. doi:10.1155/2014/158980

51. Ramírez-León, A., Barajas-Martinez, H., Flores-Torales, E., & Orozco-Barocio, A. (2012). **Immunostimulating effect of aqueous extract of *Amphypterygium adstringens* on immune cellular response in immunosuppressed mice.** *African Journal Of Traditional, Complementary, And Alternative Medicines: AJTCAM*, 10(1), 35-39.

52. Sabado, R. L., & Bhardwaj, N. (2010). **Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment.** *Immunotherapy*, 2(1), 37-56. doi:10.2217/imt.09.43

53. Sabado, R. L., Balan, S., & Bhardwaj, N. (2017). **Dendritic cell-based immunotherapy.** *Cell Research*, 27(1), 74-95. doi:10.1038/cr.2016.157

54. Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., & Shan, B. (2011). **MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy.** *Vaccine*, 29(47), 8496-8500. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.014

55. Sang, M., Wang, L., Ding, C., Zhou, X., Wang, B., Wang, L., & Shan, B. (2011). **Melanoma-associated antigen genes - an update.** *Cancer Letters*, 302(2), 85-90. doi:10.1016/j.canlet.2010.10.021.

56. Sánchez-Monroy, M. B., Jacobo-Herrera, N. J., Zentella-Dehesa, A., Hernández-Téllez, B., & Martínez-Vázquez, M. (2017). **Masticadienonic and 3 $\alpha$ -OH Masticadienoic Acids Induce Apoptosis and Inhibit Cell Proliferation and Tumor Growth in Prostate Cancer Xenografts in Vivo.** *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(9), doi:10.3390/molecules22091479

57. Schadendorf Dirk, David E. Fisher, Claus Garbe, Jeffrey E. Gershenwald, Jean-Jacques Grob, Allan Halpern, Meenhard Herlyn, Michael A. Marchetti, Grant McArthur, Antoni Ribas, Alexander Roesch & Axel Hauschild. (abril 2015). **Melanoma.** noviembre 2015, de Nature reviews Sitio web: <http://www.nature.com/articles/nrdp20153>.

58. Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2016). **Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family**. *Immunity*, 44(5), 955-972. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.002
59. Schönbeck, U., Mach, F., & Libby, P. (2000). **CD154 (CD40 ligand)**. *The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology*, 32(7), 687-693.
60. Segura, E. (2016). **Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets**. *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 14233-15. doi:10.1007/978-1-4939-3606-9\_1
61. Seuradge Justine y Wong Eric. (Julio 2006). **Melanoma**. noviembre 2015, de McMaster Pathological review Sitio web: <http://www.pathophys.org/melanoma/>
62. Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. (2002). **THE B7-CD28 SUPERFAMILY**. *Nature Reviews Immunology*, 2(2), 116.
63. Temizoz, B., Etsushi, K., & Ishii, K. J. (2016). **Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics**. *International Immunology*, 28(7), 329-338. doi:10.1093/intimm/dxw015
64. Terando, A. M., Faries, M. B., & Morton, D. L. (2007). **Vaccine therapy for melanoma: current status and future directions**. *Vaccine*, 25 Suppl 2B4-B16.
65. Wang, S., & Chen, L. (n.d). **Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses**. *Microbes And Infection*, 6(8), 759-766.
66. Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015). **The MAGE protein family and cancer**. *Current Opinion In Cell Biology*, 371-8. doi:10.1016/j.ceb.2015.08.002
67. Wolchok, J. D., & Livingston, P. O. (2001). **Vaccines for melanoma: translating basic immunology into new therapies**. *The Lancet. Oncology*, 2(4), 205-211.
68. Yadav, V. R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., & Aggarwal, B. B. (2010). **Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer**. *Toxins*, 2(10), 2428-2466. doi:10.3390/toxins2102428
69. Yamaguchi, H., Yu, T., Noshita, T., Kidachi, Y., Kamiie, K., Yoshida, K., & Ryoyama, K. (2011). **Ligand-receptor Interaction between Triterpenoids and the 11  $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 $\beta$ HSD2) Enzyme Predicts Their Toxic Effects against Tumorigenic rim HM-SFME-1 Cells**. *Journal Of Biological Chemistry*, 286(42), 36888-36897. doi:10.1074/jbcM111.265900
70. Yu, Y., Chen, I., Shen, K., Huang, R., Wang, W., Chou, C., & Chu, C. (2009). **A triterpenoid methyl antcinatate K isolated from *Antrodia cinnamomea* promotes dendritic cell activation and Th2 differentiation**. *European Journal Of Immunology*, 39(9), 2482-2491. doi:10.1002/eji.200839039

71. Zang, L., Wu, B., Lin, Y., Wang, J., Fu, L., & Tang, Z. (n.d). **Research progress of ursolic acid's anti-tumor actions**. Chinese Journal Of Integrative Medicine, 20(1), 72-79.
72. Zeng, G., Chen, J., Liang, Q., You, W., Wu, H., & Xiong, X. (2012). **Ursolic acid inhibits T-cell activation through modulating nuclear factor- $\kappa$  B signaling**. Chinese Journal Of Integrative Medicine, 18(1), 34-39. doi:10.1007/s11655-011-0858-0
73. Zou, W., & Chen, L. (n.d). **Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment**. Nature Reviews Immunology, 8(6), 467-477.
74. Ramírez-León, A., Barajas-Martinez, H., Flores-Torales, E., & Orozco-Barocio, A. (2012). **Immunostimulating effect of aqueous extract of Amphypterygium adstringens on immune cellular response in immunosuppressed mice**. African Journal Of Traditional, Complementary, And Alternative Medicines: AJTCAM, 10(1), 35-39.
75. Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D., & ... Nicolas, J. (2002). **Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis**. Journal Of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 168(6), 3079-3087.
76. H. Taniura, N. Taniguchi, M. Hara, K. Yoshikawa, **Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1**, J. Biol.Chem. 273 (1998) 720-728.
77. H. Taniura, K. Matsumoto, K. Yoshikawa, **Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53**, J. Biol.Chem. 274 (1999) 16242-16248.
- Hodi, F. S., S. J. O'Day, D. F. McDermott, R. W. Weber, J. A. Sosman, J. B. Haanen, R. Gonzalez, 77. C. Robert, D. Schadendorf, J. C. Hassel, W. Akerley, A. J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J. M. Vaubel, G. P. Linette, D. Hogg, C. H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J. I. Clark, J. D. Wolchok, J. S. Weber, J. Tian, M. J. Yellin, G. M. Nichol, A. Hoos, and W. J. Urba. 2010. **Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma**. N. Engl. J. Med. 363: 711-723.
78. Robert, C., L. Thomas, I. Bondarenko, S. O'Day, J. Weber, C. Garbe, C. Lebbe, J. F. Baurain, A. Testori, J. J. Grob, N. Davidson, J. Richards, M. Maio, A. Hauschild, W. H. Miller, Jr., P. Gascon, M. Lotem, K. Harmanakaya, R. Ibrahim, S. Francis, T. T. Chen, R. Humphrey, A. Hoos, and J. D. Wolchok. 2011. **Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma**. N. Engl. J. Med. 364:2517-2526.

## 17. ANEXO

### Protocolo de tinción de células dendríticas

#### 1. Obtención de células dendríticas (CDs).

- a. Pipetear el medio de cultivo de la caja Petri o de la botella en donde se encuentren las células.
- b. Colocar el sobrenadante en tubos falcon de 15ml o de 50ml
- c. Centrifugar por 5 min a 1500 rpm
- d. Tirar sobrenadante y colocar 2ml de buffer de tinción a las células
- e. Colocar en el bortex las células o disgregar el botón con una micropipeta
- f. Centrifugar por 5 min a 1500 rpm
- g. Tirar sobrenadante y colocar 200 microlitros de PBS de tinción a las células. Disgregar.

## 2. Tinción de células

- a. Se tendrán varios tubos eppendorf, a los cuales les pondremos los siguientes nombres:
  - 1. Sin teñir
  - 2. CD11c
  - 3. MHCII
  - 4. CD11c MHCII
- b. Colocar 50 microlitros de la solución de PBS de tinción con células a cada uno de los tubos eppendorf.

## 3. Cocteles

- a. En este caso se tendrán tres cocteles con anticuerpos: a) anti-CD11c, b) anti-MHCII y el último con c) anti CD11c y anti-MHCII. Cada coctel se realizará en un tubo eppendorf, por lo que se nombrarán los tubos: a, b, c.
- b. Colocar 50 microlitros de PBS de tinción en cada uno de los tubos eppendorf a, b y c.
- c. Los anticuerpos se utilizan 1:400, por lo que en el caso del coctel 1 se colocarán: 0.25microlitros de anti-CD11c al tubo eppendorf **a**.
- d. Para el coctel 2, se colocarán 0.25 microlitros de anti-MHCII al tubo eppendorf **b**.
- e. Coctel 3, se colocarán 0.25 microlitros de anti- MHCII y 0.25 microlitros al tubo eppendorf **c**.

## 4. Tinción de células

- a. Colocar el coctel **a** (todo su contenido) en el tubo 2 o CD11c y mezclar.
- b. Colocar el coctel **b** (todo su contenido) en el tubo 3 o MHCII y mezclar.
- c. Colocar el coctel **c** (todo su contenido) en el tubo 4 o MHCII/CD11c y mezclar.
- d. Incubar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 20 minutos.
- e. Después que las células hayan sido incubadas, colocar 1000 microlitros de PBS de tinción a cada uno de los tubos (1, 2 y 3) y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos.
- f. Tirar el sobrenadante.
- g. Colocar 1000 microlitros de PBS de tinción a los tubos (1, 2 y 3) y centrifugar a 1500rpm por 5 minutos.
- h. Tirar sobrenadante.

- i. Colocar 300 microlitros de PBS de fijación
- j. Colocar las células ya fijadas en tubos FACS
- k. Guardar en el refrigerador y en oscuridad.

**PBS: amortiguador salino de fosfatos pH 7.2-7.4**

- Fosfato de potasio 0.43 g
- Fosfato de sodio 1.43 g
- Cloruro de sodio 7 g
- Solución total 1L

**HBSS pH 7.2-7.4 (1L)**

- Cloruro de potasio 0.4 g
- Fosfato de potasio 0.06 g
- Bicarbonato de sodio 0.36 g
- Fosfato de sodio 0.048 g
- D-glucosa o dextrosa 1 g

**PBS de tinción:** PBS 1x, 0.5% de albúmina, 0.02% de azida de sodio

**PBS de fijación:** PBS1x, 0.5% para formaldehído.

**Disolución de triterpenos**

- Pesar 0.010 g de los triterpenos
- Se disolvió en 1 mL DE DMSO
- y de este STOCK se tomaron:

0.7  $\mu$ L para la dosis de 0.003 mM

7  $\mu$ L para la dosis de 0.03 mM

70  $\mu$ L para la dosis de 0.3 Mm

Peso molecular de AMD: 454g/mol

Peso molecular de 3  $\alpha$ -OHAMD: 456 g/mol