



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Inmunoestimulación a través de un andamio de  
gelatina-ácido hialurónico entrecruzado, en un  
modelo murino con melanoma**

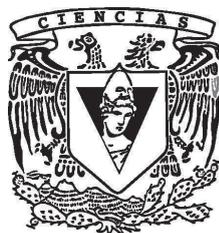
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I O L O G O**

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

**CARLOS DE LA ROSA LEDESMA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE  
2021**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



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.

## **Agradecimientos.**

### **Al comité revisor de la tesis por su tiempo y comentarios:**

- Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez.
- Dr. Jair Romero López.
- Dra. Gabriela Piñón Zárata.
- Dra. Nadia Adriana Vázquez Torres.
- Dra. Martha Ustarroz Cano.

### **Por su tutor y realización de la tesis:**

- M. en C. Laura Bucio por introducirme al proyecto.
- Dra. Gabriela Piñón Zárata, por su continuo apoyo para la realización y finalización de la tesis con todos sus comentarios, apoyo y disposición constante.

### **Por su continuo apoyo tecnico y academico:**

- Biól. Beatriz Hernández Téllez.
- M. en C. Miguel Herrera Enríquez.

## **Agradecimientos personales.**

### **A los miembros de mi familia:**

A mi mamá, Mtr. Patricia Ledesma Vazquez, por su continuo apoyo a través de la carrera y la elaboración de este trabajo.

Mi hermano, Francisco Gomez Ledesma.

Mi padre, Carlos De La Rosa Olvera, qepd.

### **Agradecimiento especial:**

Gabriela Maximina González Orozco.

<b>Resumen.</b>	<b>3</b>
<b>1. Melanoma.</b>	<b>4</b>
1.1. Desarrollo del melanoma.	4
1.2. Tipos de melanoma.	5
1.3. Factores de riesgo.	7
1.4. Epidemiología del melanoma.	7
1.5. Diagnóstico del melanoma.	8
1.6. Estadios de la enfermedad.	9
<b>2. Sistema inmune.</b>	<b>10</b>
<b>3. Sistema inmune innato.</b>	<b>10</b>
3.1. Principales células del Sistema Inmune Innato.	11
3.1.1. Neutrófilos.	11
3.1.2. Macrófagos.	13
3.1.3. Células dendríticas.	14
3.1.3.1. Presentación de antígenos.	15
3.1.3.2. Maduración.	17
3.1.3.3. Activación de las células T.	18
<b>4. Respuesta inmune contra el cáncer.</b>	<b>19</b>
4.1. Inmunoedición.	19
4.2. Fase de eliminación.	19
4.3. Fase de equilibrio.	21
4.4. Fase de escape.	21
<b>5. Tratamiento.</b>	<b>22</b>
<b>6. Inmunoterapia.</b>	<b>23</b>
6.1. Retos de la inmunoterapia.	25
<b>7. Biomateriales.</b>	<b>25</b>
7.1. Biomateriales poliméricos.	27
7.2. Biomateriales e inmunoterapia.	28
7.3. Ácido hialurónico.	30
7.4. Gelatina.	31
<b>8. Entrecruzante.</b>	<b>33</b>
8.1. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.	33
<b>Antecedentes.</b>	<b>34</b>
<b>Justificación.</b>	<b>35</b>

<b>Hipótesis.</b>	<b>36</b>
<b>Objetivo.</b>	<b>36</b>
<b>Objetivos particulares.</b>	<b>36</b>
<b>Método.</b>	<b>37</b>
<b>Material biológico.</b>	<b>37</b>
<b>Fabricación del andamio.</b>	<b>38</b>
<b>Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea.</b>	<b>39</b>
<b>Obtención de células de bazo.</b>	<b>39</b>
<b>Adhesión celular in vitro.</b>	<b>40</b>
<b>Evaluación de citotoxicidad in vitro del andamio.</b>	<b>40</b>
<b>Cultivo de células de melanoma B16-F10.</b>	<b>41</b>
<b>Inducción de melanoma.</b>	<b>41</b>
<b>Implantación del andamio en ratones.</b>	<b>41</b>
<b>Análisis histológico.</b>	<b>41</b>
<b>Ensayo de liberación de proteína y degradación del andamio in vitro.</b>	<b>42</b>
<b>Resultados.</b>	<b>43</b>
<b>Fabricación del andamio.</b>	<b>43</b>
<b>Adhesión y viabilidad celular.</b>	<b>43</b>
<b>Ensayo de liberación de proteína y degradación del andamio.</b>	<b>46</b>
<b>Análisis histológico.</b>	<b>47</b>
<b>Crecimiento tumoral y análisis histológico del estroma tumoral.</b>	<b>55</b>
<b>Discusión.</b>	<b>57</b>
<b>Conclusión.</b>	<b>62</b>
<b>Bibliografía:</b>	<b>62</b>

## Resumen.

El melanoma es un tipo de cáncer de piel de incidencia creciente y con alta capacidad metastásica, que se origina a partir de la proliferación descontrolada de melanocitos. En etapas tempranas del melanoma, el tratamiento puede ser 100% efectivo y consiste en la remoción del área afectada, mientras que en etapas avanzadas, la tasa de supervivencia a un año disminuye hasta el 50%, con una tasa de respuesta del 10% al 20% de las personas tratadas con quimioterapia, extirpación quirúrgica del área afectada y ganglios linfáticos cercanos. Para incrementar la efectividad del tratamiento, se han desarrollado terapias alternativas, como la inmunoterapia, que modula las respuestas inmunológicas del paciente para que combata y elimine el tumor. Un tipo de inmunoterapia es la no específica, la cual busca principalmente la modulación del sistema inmune innato a través de citocinas y señales de daño o patógenos, que a su vez puede potenciar indirectamente la activación del sistema inmune adaptativo, induciendo la activación de varios tipos de leucocitos, iniciando una respuesta inmune con la capacidad de eliminar células tumorales. Así de igual forma se ha buscado implementar estrategias en conjunto con la inmunoterapia a través del uso de biomateriales, los cuales son materiales con la capacidad de ser implantados en un organismo sin generar una reacción de rechazo. Los biomateriales pueden ser usados para la fabricación de andamios los cuales pueden ser cargados con elementos inmunoterapéuticos o incluso ser fabricados con biomateriales que contengan características inmunoestimuladoras, de tal forma que, al ser implantados en un organismo tendrían la capacidad de liberar señales inmunomoduladoras durante un tiempo prolongado hasta su completa degradación. Los biomateriales provenientes de la matriz extracelular presentan reducida citotoxicidad, aumentan la biocompatibilidad y pueden expresar moléculas de adhesión por lo que son de particular interés para la fabricación de andamios, por ello dos biomateriales que destacan son la gelatina (Ge) y el ácido hialurónico (HA). El HA tiene una alta capacidad de interactuar con el agua mediante sus grupos hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH), asimismo es reconocido mediante receptores CD44 presentes en la mayoría de células humanas y de ratón, a su vez, cuando el HA es degradado puede ser reconocido como una señal de daño (DAMP) por el sistema inmune a través de receptores TLR. Por su parte la Ge proviene de la colágena, por lo que contiene abundantes sitios RGD (arginina-glicina-aspartato) que son reconocidos por las integrinas de múltiples tipos celulares, permitiendo la adhesión celular. Las características de ambos materiales permitirían la fabricación de andamios que promuevan la infiltración celular y su reconocimiento por el sistema inmune. Por lo que se buscó construir andamios de Ge/HA para evaluar sus características *in vitro* y su efecto terapéutico mediante su implantación subdérmica en ratones C57BL/6 con melanoma inducido. La fabricación del andamio se llevó a cabo mediante una solución de Ge/HA en una concentración 1:4, la cual fue liofilizada y entrecruzada con EDC a una concentración de 50mM. Estos andamios demostraron en ensayos *in vitro* que no generaban una respuesta citotóxica, la capacidad de liberar proteínas durante su degradación y la inducción de adhesión celular. Al ser implantados subdérmicamente en ratones C57BL7/6 con tumores de melanoma inducidos a partir de la inoculación de 60,000 células B16-F10, se observó la capacidad del andamio de reclutar y mantener en su matriz leucocitos, degradándose continuamente durante 10 días sin concluir su degradación, a la vez que redujo la tasa de crecimiento tumoral al compararse con el control. Por lo que el andamio presenta características terapéuticas, las cuales podrían ser aprovechadas para la construcción de andamios cargados con citocinas adyuvantes, fármacos o antígenos para mejorar su eficacia y continuar con estudios de terapias para melanoma.

## 1. Melanoma.

El melanoma es un tipo de cáncer de piel con alta capacidad metastásica, es decir que al desarrollarse se disemina rápidamente a otros órganos, la enfermedad se origina a partir de la proliferación de melanocitos neoplásicos. Los melanocitos en condiciones normales son células productoras de pigmento distribuidas por todo el cuerpo dando color, entre otros tejidos, a la piel (Gutiérrez & Cortés, 2007; Schadendorf *et al.*, 2015). Los melanocitos pueden tornarse neoplásicos a partir de mecanismos hereditarios o adquiridos (Aris, 2009; Schadendorf *et al.*, 2018).

### 1.1. Desarrollo del melanoma.

Para el estudio de la enfermedad, su desarrollo se divide en 6 etapas (Fig. 1) (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016). La primera etapa, también conocida como de nevo común, se caracteriza por la presencia o aparición de un nevo común o lunar, que es una masa formada por una población de melanocitos atípicos capaces de migrar en la epidermis, proliferando en grupos hasta formar un nevo (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016). Estas células no proliferan continuamente y normalmente se encuentran en estado inactivo (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016).

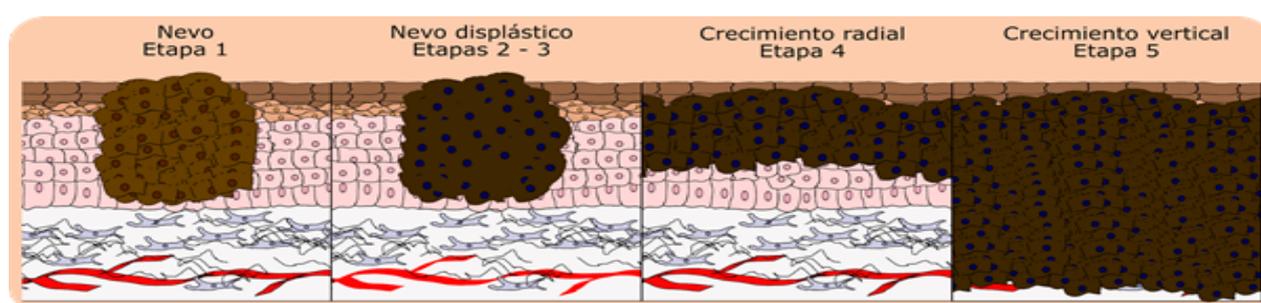


Figura 1 - Etapas del desarrollo de Melanoma desde un nevo común hasta el crecimiento vertical.

En la segunda y tercera etapa, de nevo displásico, los nevos comunes pueden pasar por cambios fisiológicos y morfológicos convirtiéndose en displásicos. Este tipo puede originarse por sí solo o a partir de un nevo común, tienen una forma y coloración irregular, rasgos que evidencian la adquisición de mutaciones, lo que los

hace más propensos a desarrollarse como melanoma (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016).

La cuarta etapa; de crecimiento radial, se caracteriza porque los melanocitos adquieren la capacidad de invadir y sobrevivir en la dermis proliferando y extendiéndose radialmente a partir de la lesión de origen (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016).

Al alcanzar la quinta etapa, etapa de crecimiento vertical, los melanocitos proliferan verticalmente creciendo dentro de la dermis (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016).

Finalmente, la etapa de metástasis, en la que las células de la lesión pueden atravesar todo el grosor de la piel hasta estar en contacto con vasos sanguíneos o linfáticos, los cuales acarrean las células de melanoma a otros órganos donde tienen la oportunidad de invadir nuevos tejidos. Es importante denotar que el desarrollo del melanoma puede saltar varias fases, incluso puede iniciar en un crecimiento vertical, si esto ocurre se considera que se ha formado un melanoma de novo (Clark *et al.*, 1984; Clark & Tucker, 1998; Elder, 2016).

## **1.2. Tipos de melanoma.**

Existen cuatro tipos de melanoma (Fig. 2) definidos por sus características histopatológicas, estos son: melanoma nodular, de extensión superficial, lentigo maligno y acral lentiginoso (Goldstein & Goldstein, 2001; Acosta *et al.*, 2009).

*Melanoma de extensión superficial:* Es el tipo de melanoma más común asociado a daño por radiación solar, morfológicamente se observa como una mancha asimétrica de bordes y color irregulares, variando entre tonos azules, rosa, café y negro. Tiende a permanecer durante un tiempo prolongado en la etapa de extensión radial, tardando años antes de penetrar a la dermis. Cuando este tipo de melanoma entra en la etapa de extensión vertical comúnmente pierde su pigmentación (Goldstein & Goldstein, 2001; Acosta *et al.*, 2009).

*Melanoma lentigo maligno*: Asociado a la exposición crónica a la radiación solar presentándose principalmente en cara y brazos. Morfológicamente se caracteriza como una lesión de color pardo con bordes irregulares que tiende a oscurecerse mientras la lesión aumenta en extensión durante la fase de crecimiento radial, la cual puede potencialmente durar años antes de entrar en la fase de crecimiento vertical (Goldstein & Goldstein 2001; Acosta *et al.*, 2009).

#### 4 FORMAS CLÍNICAS

Tipo	Duración de la fase radial	Localización	
Extensión superficial (MES)	1-7 años	Cualquier localización, especialmente en el dorso de varones y en las piernas de mujeres.	
Nodular (MN)	meses-2 años	Cualquier localización.	
Lentigo maligno (MLM)	5-20 años	Áreas expuestas especialmente en la cara.	
Acral (MLA)	1-3 años	Palmas, plantas, lecho ungueal, superficies mucosas.	

Figura 2- Cuatro formas clínicas de melanoma (Modificado de: Prevención y diagnóstico precoz del melanoma, 2020).

*Melanoma nodular*: Comúnmente se presenta de novo en la dermis. Se identifica como una masa regular que puede o no estar pigmentada (Goldstein & Goldstein, 2001; Acosta *et al.*, 2009).

*Melanoma acral lentiginoso*: El tipo más común de melanoma en individuos de piel oscura, está poco relacionado a daños por radiación solar. Aparece como una

mancha irregular oscura en zonas como palmas, plantas y área bajo las uñas (Goldstein & Goldstein 2001; Acosta *et al.*, 2009).

### **1.3. Factores de riesgo.**

Se pueden encontrar diversos factores de riesgo que pueden incrementar la probabilidad de desarrollar melanoma. Estos pueden agruparse en factores, personales, genéticos y ambientales (Goldstein & Goldstein, 2001; Acosta *et al.*, 2009; García & Ocampo, 2010).

Los factores personales comprenden datos de historia familiar y antecedentes personales, de melanoma en la familia, color de piel, presencia de nevos congénitos o adquiridos, estado del sistema inmune y edad. El individuo es más propenso cuando presenta piel clara, gran cantidad de lunares con lo cual aumenta el riesgo si son displásicos, sistema inmune debilitado y ser mayor de 45 años (García & Ocampo, 2010). En adición, se consideran factores genéticos cuando los individuos poseen mutaciones características de melanocitos y/o en oncogenes y genes supresores de tumores. Ejemplo de lo anterior es el síndrome familiar de melanoma, atribuido a mutaciones en el gen CDKN2A ubicado en el cromosoma 9 y mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (García & Ocampo 2010).

En relación con los factores ambientales, estos se limitan principalmente a la exposición a la radiación ultravioleta, la cual puede inducir rompimientos y entrecruzamientos en el ADN ocasionando mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, induciendo así el desarrollo de una lesión tumoral (García & Ocampo, 2010).

### **1.4. Epidemiología del melanoma.**

En 2020, en México se registraron 2,051 nuevos casos de melanoma, junto con 773 defunciones, para 2025 se esperan aproximadamente 2,351 incidencias y 896

defunciones, estimándose un aumento en la incidencia de 30.7% para el 2030 en comparación al 2020. Globalmente para el 2020 se registraron 324,635 casos de melanoma con 57,043 defunciones y para el 2025 se esperan 367,362 incidencias con 65,375 defunciones (GCO, 2020).

### 1.5. Diagnóstico del melanoma.

Para realizar un diagnóstico y pronosis adecuados de melanoma, existen herramientas como (Fig. 3): la regla ABCDE, el algoritmo de Glasgow, la profundidad de Breslow, la presencia de ganglios linfáticos comprometidos y la presencia de metástasis, el uso conjunto de estas herramientas más el uso del dermatoscopio permite realizar un diagnóstico más certero, no obstante, si existe alta probabilidad de melanoma el estudio para confirmar es la biopsia, al ser los resultados histopatológicos el estándar de oro para el diagnóstico (Gutiérrez & Cortés, 2007; Acosta *et al.*, 2009; Rajpara *et al.*, 2009; García & Ocampo, 2010)

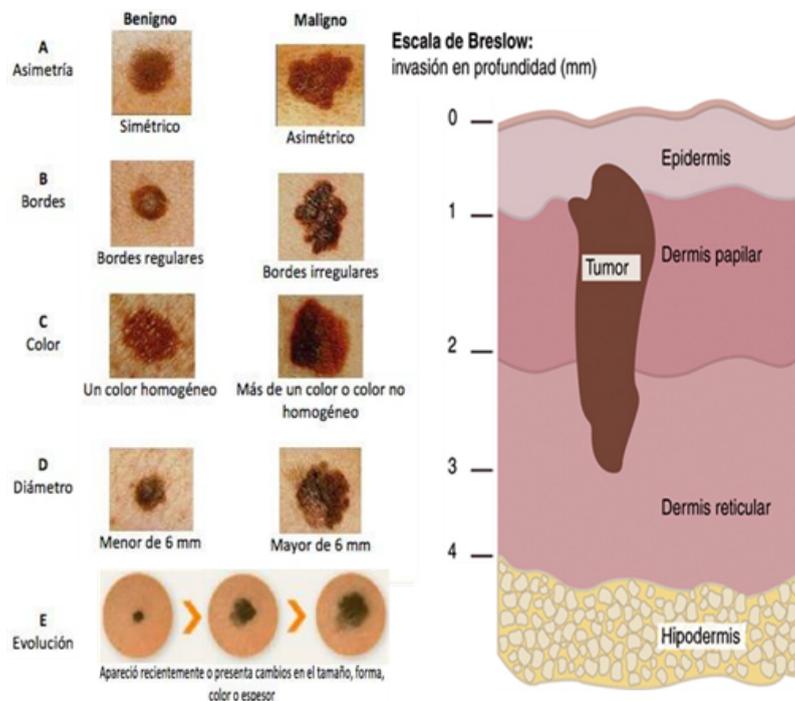


Figura 3 - Representación de la regla ABCDE, junto con la escala de Breslow (Modificado de: ABC.jpg, 2020 y Duflo *et al.*, 2008).

La Regla ABCDE está relacionada con el estudio de las características morfológicas del melanoma. Así, A se refiere a la asimetría de la lesión; B indica el estudio de los bordes, los cuales deben ser irregulares; C se refiere al color irregular de la lesión; D indica el diámetro, el cual debe ser mayor a 5mm; finalmente, E se refiere a la evolución y elevación de la lesión, la cual debe de ser irregular. Con base en estos cinco parámetros, un observador entrenado puede definir el riesgo de que la lesión sea maligna (Acosta *et al.*, 2009; García & Ocampo, 2010).

Por otro lado, la profundidad de Breslow se basa en el análisis de la profundidad del tumor a partir de su punto más profundo en milímetros, entre más profunda sea la lesión el pronóstico se vuelve menos favorable (Acosta *et al.*, 2009; García & Ocampo, 2010).

Finalmente, para verificar metástasis a distancia, se realiza una biopsia de los ganglios linfáticos más cercanos a la lesión. Si se confirma la aparición de células tumorales en ganglios, existe un pronóstico poco favorable, dado que la enfermedad comienza a diseminarse o ya lo hizo (Acosta *et al.*, 2009; García & Ocampo, 2010).

### **1.6. Estadios de la enfermedad.**

Gracias al uso de las herramientas arriba mencionadas, es posible estadificar el avance de la enfermedad en cinco estadios. Así, el estadio 0 se caracteriza por encontrar la lesión confinada en la epidermis, es decir que el melanoma no es invasivo. En el estadio 1, la enfermedad comienza a invadir el tejido circundante. A partir del estadio 2, se considera un melanoma de alto riesgo, dado que el tamaño de la lesión se encuentra entre 1 mm a 4 mm o superior. Del estadio 3 al 4, el melanoma se denomina avanzado, donde en el estadio 3, las células tumorales se han diseminado por todo el grosor de la piel, alcanzando los ganglios linfáticos más cercanos, mientras que en el estadio 4, las células tumorales se han extendido más allá de los ganglios linfáticos más lejanos a otros órganos (Schadendorf *et al.*, 2018).

## **2. Sistema inmune.**

Normalmente los organismos son capaces de detectar y combatir el cáncer con mecanismos propios denominados en conjunto sistema inmune, el cual a su vez está dividido en sistema inmune innato y sistema inmune adaptativo, que se componen de células, moléculas y tejido linfoide. Con estas herramientas un individuo sano es capaz de detectar y eliminar cualquier brote de células cancerosas, a través de distintas células y moléculas efectoras (Toche, 2012; Leon & Pareja, 2018).

## **3. Sistema inmune innato.**

El sistema inmune innato es el primer mecanismo de defensa contra cualquier amenaza, se caracteriza por desarrollar una respuesta rápida y no específica ante cualquier tipo de agresión detectada. Está constituido por tres componentes principales, barreras físicas, células y moléculas (Cruvinel *et al.*, 2010).

Se les denomina barreras físicas a los epitelios que cubren las cavidades, tejidos y órganos, como la piel y las mucosas. En los epitelios se pueden encontrar moléculas con propiedades bactericidas, como la lisozima; además existen moléculas que inducen cambios en el pH de las mucosas, inhibiendo así el crecimiento bacteriano (Cruvinel *et al.*, 2010). Cuando una amenaza supera las barreras físicas, en el caso del cáncer, son los componentes humoral y celular del sistema inmune innato los que actúan en conjunto para llevar a cabo la defensa del organismo. Los componentes celulares del sistema inmune innato son los neutrófilos, los mastocitos, los macrófagos, y las células dendríticas (Berraondo *et al.*, 2016), los cuales son capaces de detectar patógenos de origen exógeno y endógeno, iniciando diferentes respuestas inmunológicas (Turvey & Broide, 2010). Las amenazas son reconocidas por las células del sistema inmune innato a partir de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) ubicados en la membrana celular, el citosol y vesículas intracelulares. Los PRR se dividen en patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y en patrones moleculares asociados a daño tisular (DAMPs). Los primeros están involucrados en el reconocimiento de infecciones y los

segundos reconocen moléculas asociadas a daño tisular general, entre ellos cáncer. Ejemplos de PRRs son los receptores tipo toll (TLRs), receptores tipo NOD (NLR), receptores de tipo RIG-I (RLR) y los receptores de lectina tipo C (CLR) (Turvey & Broide, 2010). Una vez que la amenaza es detectada, células como los macrófagos y las células dendríticas producen citocinas proinflamatorias, quimiocinas y péptidos antimicrobianos, que provocan una reacción inflamatoria local y el reclutamiento de más células del sistema inmune (Cruvinel *et al.*, 2010).

### **3.1. Principales células del Sistema Inmune Innato.**

#### **3.1.1. Neutrófilos.**

La primera línea de defensa ante una amenaza son los neutrófilos (Fig. 4), un tipo de célula perteneciente al sistema inmune innato, que se caracteriza por presentar un núcleo lobulado, una alta capacidad fagocítica y la presencia de gránulos en su citoplasma (Toche, 2012; McDonald & Levy, 2019). Las funciones principales de los neutrófilos son eliminar patógenos y liberar citocinas proinflamatorias implicadas en el reclutamiento de distintas células del sistema inmunológico, principalmente macrófagos (Selders *et al.*, 2017).

Los neutrófilos se producen diariamente en la médula ósea, de donde migran a la periferia vascular. Ante lesiones, procesos infecciosos o tumorigénesis en la piel, los neutrófilos son reclutados mediante señales quimioatrayentes y proinflamatorias producidas por los queratinocitos o las células tumorales, como lo son el factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 (IL-1), e interleucina 6 (IL-6) (Dunn *et al.*, 2002; Castrillón *et al.*, 2008; Uribe-Querol & Rosales, 2015; Elsevier Connect, 2019). Estas señales inducen la migración de los neutrófilos desde la periferia vascular al sitio de interés reconociendo los DAMPs o PAMPs a través de sus PRRs principalmente TLRs (Selders *et al.*, 2017).

Al llegar al sitio de daño o infección, los neutrófilos liberan colagenasas y gelatinasas contenidos en sus gránulos, para poder atravesar el endotelio entrando al tejido en donde reconocen y combaten la amenaza. Los neutrófilos pueden

eliminar patógenos incluyendo células tumorales mediante degranulación liberando moléculas como, el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), especies reactivas de oxígeno (ROS) y la mieloperoxidasa (MPO); la fagocitosis y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Uribe-Querol & Rosales, 2015; Masucci *et al.*, 2019).

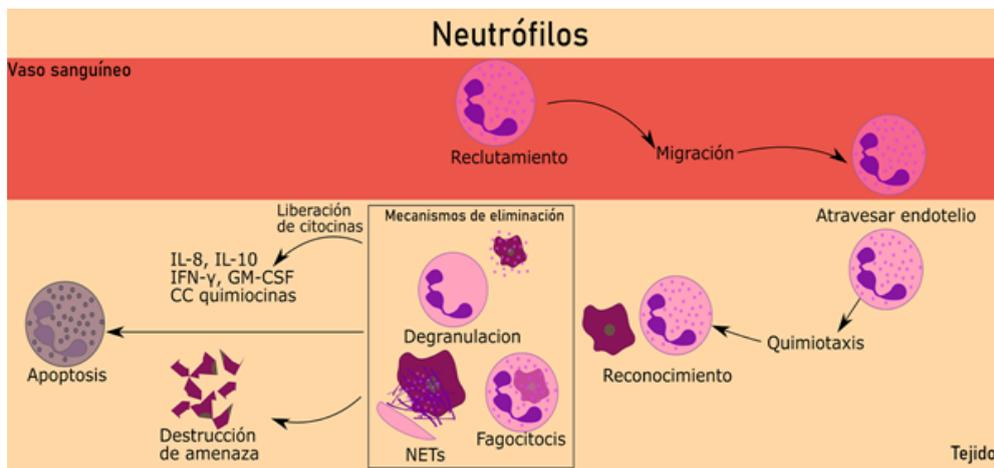


Figura 4 - Acción general de los neutrófilos ante una amenaza.

Los neutrófilos pueden reconocer los patógenos a través de PRRs, lo que les permite fagocitarlos o inducir la liberación de fosfatasas y péptidos antibacterianos como especies reactivas de oxígeno, que al entrar en contacto con la membrana de células tumorales pueden eliminarlas. Adicionalmente, los neutrófilos inducen apoptosis en células tumorales mediante TRAIL (Uribe-Querol & Rosales, 2015; Masucci *et al.*, 2019). Además de la fagocitosis y degranulación, los neutrófilos tienen la capacidad de formar NETs las cuales son redes compuestas por cromatina e histonas cubiertas por los gránulos del neutrófilo, estas redes pueden formarse a partir del contenido de la mitocondria o del contenido del núcleo. Las redes pueden abarcar una extensión de hasta 15 veces el tamaño del neutrófilo en donde expondrá a los patógenos atrapados a las moléculas bactericidas pertenecientes a los gránulos, normalmente las redes se forman cuando la amenaza es demasiado grande para fagocitar (Selders *et al.*, 2017). Junto con las enzimas proteolíticas los gránulos contienen citoquinas como, IL-8, interleucina 10 (IL-10), interferón gamma (IFN-gamma), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), además de quimiocinas. Este conjunto de factores son de importancia para

mantener la acción del sistema inmune, ya que modulan la inflamación, promueve la acción de células T y reclutan células del sistema inmune al lugar de la amenaza, principalmente macrófagos y neutrófilos (Selders *et al.*, 2017). Los macrófagos reclutados se encargan de fagocitar a los detritos celulares de los patógenos aniquilados por los neutrófilos y los restos celulares de las células muertas (Selders *et al.*, 2017).

### 3.1.2. Macrófagos.

Los macrófagos son células del sistema inmune innato (Fig. 5), se encargan de eliminar células infectadas, células neoplásicas, amenazas bacterianas, fragmentos de tejido y restos celulares. Los macrófagos se originan en la médula ósea como células precursoras denominadas monocitos, localizadas en el tejido sanguíneo, de donde pueden migrar a epitelios donde se diferencian a macrófagos (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Mcdonald & Levy, 2019). Los macrófagos se encuentran tanto como monocitos en la periferia vascular y como macrófagos residentes en tejidos. Los monocitos en la sangre periférica son reclutados al sitio de la agresión por la acción de quimiocinas, y citocinas como IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) provenientes de los neutrófilos y los queratinocitos de la piel, al entrar a la piel se diferencian a macrófagos detectando las señales de DAMPs, PAMPs y citocinas proinflamatorias.

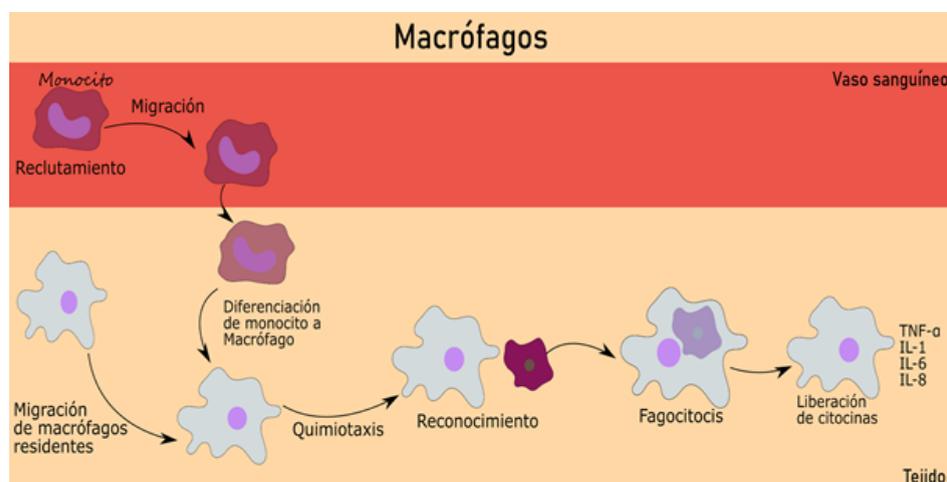


Figura 5 - Acción general de los macrófagos ante una amenaza.

Los macrófagos entonces se encargan de liberar especies reactivas de oxígeno y de fagocitar a un gran número de patógenos y restos celulares, a la vez que producen citocinas proinflamatorias, TNF-alfa, IL-1, IL-6 e IL-8, que mantendrán la actividad inmune y reclutarán neutrófilos, macrófagos/monocitos y células dendríticas (Hussein, 2006, Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Mcdonald & Levy, 2019).

Junto con su perfil proinflamatorio y la alta capacidad fagocítica, los macrófagos son células presentadoras de antígeno (APCs) lo que significa que presentan fragmentos peptídicos pertenecientes a las amenazas fagocitadas, acopladas al complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), a los linfocitos T CD4+ permitiendo así el inicio del desarrollo de respuestas inmunológicas adaptativas (Hussein, 2006, Hirayama *et al.*, 2018; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018).

### **3.1.3. Células dendríticas.**

Las células dendríticas son células presentadoras de antígeno, con la capacidad de reconocer, fagocitar y procesar patógenos y/o daño tisular, para luego presentar fragmentos antigénicos a través de MHC-I y MHC-II a los linfocitos T, principales células efectoras de la inmunidad (Cuéllar, 2018).

En la piel se encuentra un grupo especializado de células dendríticas denominadas células de Langerhans, que tienen su origen en precursores hematopoyéticos de la médula ósea (Díaz, 1998). Las células dendríticas que se originan en la médula ósea migran a la circulación periférica, posteriormente a órganos linfoides secundarios y epitelios, permaneciendo como células dendríticas inmaduras, en donde pueden reconocer patógenos y madurar (Solano *et al.*, 2018). Las células dendríticas circulantes y residentes en la piel son reclutadas por la acción de quimiocinas CC, PRRs y señales pro inflamatorias, TNF, IL-1 (Corado, 2005), producidas por otras células inmunes y queratinocitos.

Morfológicamente, las células dendríticas se caracterizan por presentar prolongaciones citoplásmicas que le otorgan una alta superficie de contacto

facilitando la detección de los patógenos y daño celular. Sus prolongaciones además expresan receptores para quimiocinas, receptores fagocíticos y de reconocimiento antigénico implicados en el procesamiento de antígenos, que permiten a las células dendríticas presentar péptidos antigénicos de los patógenos fagocitados, acoplándolos a MHC-I y MHC-II. Este proceso culmina con la maduración de las células dendríticas, que se caracteriza por el incremento en la expresión de MHC-II, moléculas coestimuladoras y la capacidad de estimular células T *naive* (Sallusto *et al.*, 1999).

### **3.1.3.1. Presentación de antígenos.**

La presentación de antígenos hace referencia al proceso en que los patógenos primero son reconocidos, fagocitados y procesados para su posterior presentación en la membrana plasmática por medio del MHC-I y MHC-II (Gutiérrez *et al.*, 2006; Antigen Processing and Presentation, 2014). En relación con la presentación por la vía del MHC-II, ésta comienza con la detección de patógenos o fragmentos de los antígenos, por medio de PRRs (Fig. 6-A-1, 2), lo que provocará que la célula modifique su citoesqueleto e inicie la formación de una vesícula denominada fagosoma con la que introducirá el antígeno a la célula (Fig. 6-A-3). La vesícula se acidifica y por acción enzimática el antígeno se degradará a un tamaño apropiado para la presentación (Fig. 6-A-4). Mientras el antígeno está siendo procesado, simultáneamente se ensamblan moléculas del MHC-II en el retículo endoplásmico rugoso (Fig. 6-A-5) que luego son transportados al Aparato de Golgi de donde salen por medio de vesículas (Fig. 6-A-6, 7). Durante la vía vesicular, el fagosoma, con los péptidos antigénicos, se fusiona con las vesículas que transportan al MHC-II para que los antígenos se acoplen a las moléculas de MHC-II (Fig. 6-A-8). Finalmente, las vesículas que contienen a las moléculas de MHC-II son acopladas a los péptidos antigénicos y serán transportadas hacia la membrana plasmática (Fig. 6-A-9, 10) (Gutiérrez *et al.*, 2006; Antigen Processing and Presentation, 2014).

Los antígenos que son presentados por medio de las moléculas del MHC-I, son generalmente endógenas al ser expresados por células tumorales o infectadas por

virus o bacterias. Por lo que estos antígenos son intracelularmente marcados con ubiquitinas y transportados a los proteosomas (Fig. 6-B-1, 2), donde se llevará a cabo su degradación proteolítica (Fig. 6-B-3). Los péptidos resultantes son posteriormente transportados para localizarse dentro del retículo endoplasmático rugoso por la proteína asociada a la presentación de antígenos (TAP) (Fig. 6-B-4), donde puede asociarse al MHC-I, o a proteínas chaperonas para ser recortados por la aminopeptidasa asociada a retículo endoplasmático tipo 1 (Fig. 6-B-5, 6). Así el péptido gana afinidad y se reduce al tamaño apropiado para la unión al MHC-I, el cual es sintetizado dentro del retículo endoplasmático. Una vez que se ha acoplado el antígeno a las moléculas del MHC-I (Fig. 6-B-7), el complejo se transporta al Aparato de Golgi donde se cargará posteriormente en una vesícula exocítica para presentarse en la membrana celular (Fig. 6-B-8, 9, 10, 11) (Antigen Processing and Presentation, 2014; Joffre *et al.*, 2012).

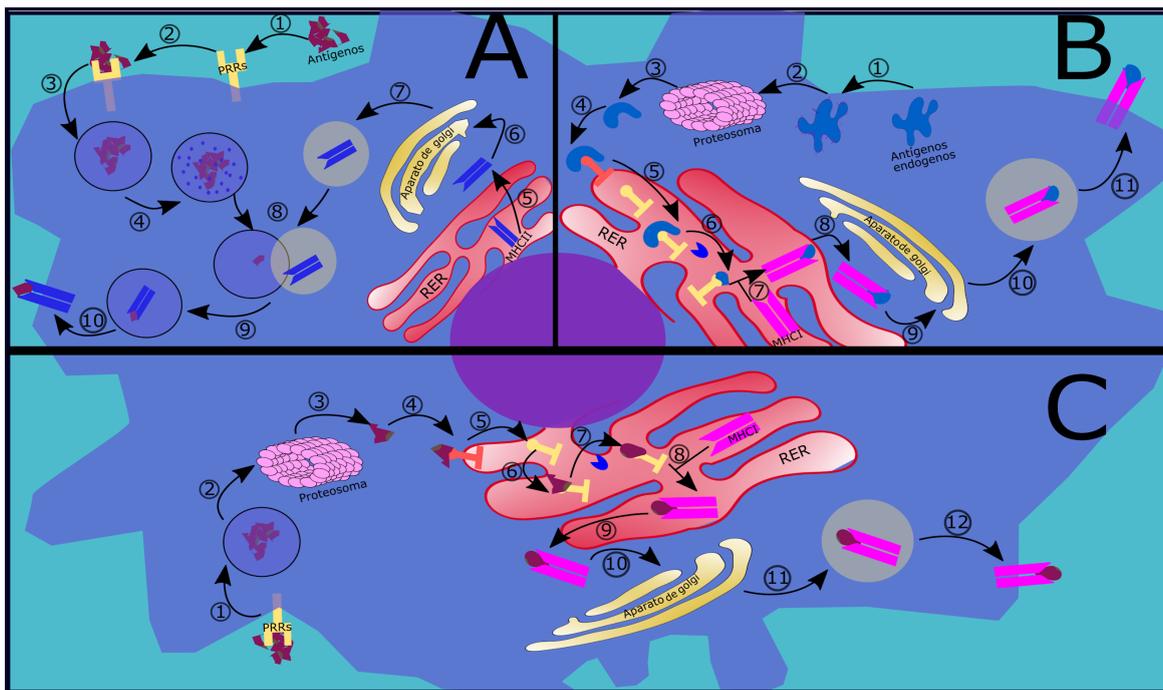


Figura 6 - A- Presentación por MHC-II. B- Presentación por MHC-I. C-Presentación cruzada.

También existe una ruta por la cual se presentan antígenos exógenos por medio de moléculas MHC-I, denominada presentación cruzada, donde las células dendríticas primero fagocitan el antígeno y lo transportan al proteosoma (Fig. 6-C-1, 2, 3).

Posteriormente, los residuos peptídicos se transportan al retículo endoplasmático rugoso, donde son procesados para su asociación con las moléculas de MHC-I (Fig. 6-C-4, 5, 6, 7). En este proceso el complejo MHC-I más el antígeno no se forma dentro del retículo endoplasmático sino en la vesícula exocítica (Gutiérrez *et al.*, 2006; Joffre *et al.*, 2012).

### 3.1.3.2. Maduración.

Después que las células dendríticas reconocen al antígeno, experimentan diversos cambios fenotípicos que confieren a las células la habilidad de activar al sistema inmune adaptativo mediante la producción de citocinas IL-12, IL-15 y la presentación de antígenos por medio de las moléculas de MHC-I y/o MHC-II a linfocitos T. A estos cambios en las células dendríticas se les denomina maduración (Fig. 7) (Sallusto *et al.*, 1999; Cuéllar, 2018).

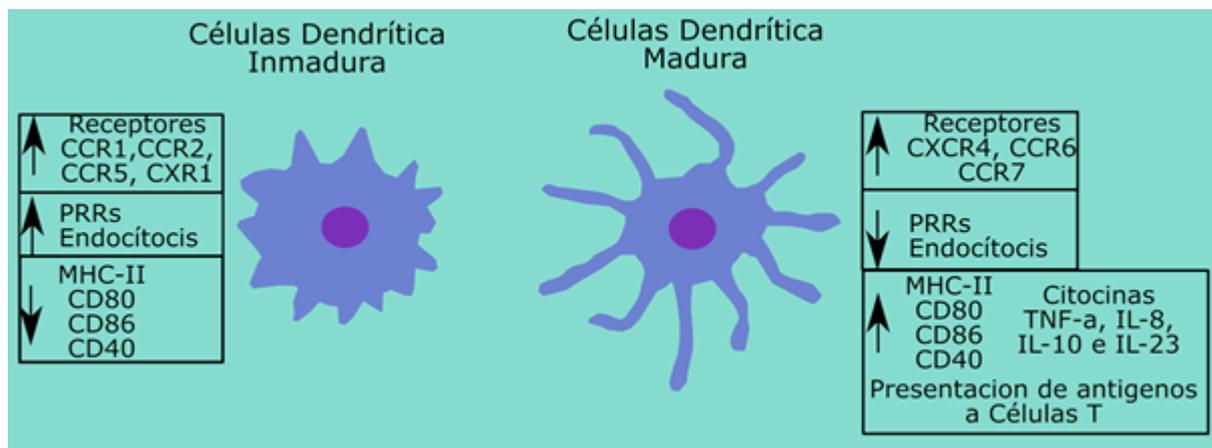


Figura 7 - Diferencias entre células dendríticas inmaduras y células dendríticas maduras.

Previo a la maduración, cuando las células dendríticas generalmente se localizan en la piel, se consideran inmaduras, caracterizándose por expresar los receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR5, CXR1; una alta expresión de PPRs que le confieren una alta capacidad endocítica; expresión baja de MHC-II y de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 (Sallusto *et al* 1999; Cuéllar 2018). Una vez que las células reconocen al patógeno y lo procesan, disminuyen la expresión de PPRs, aumentan sus prolongaciones tipo dendríticas, aumentan la expresión de

MHC-II junto con la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD40 y de receptores quimiotácticos CXCR4, CCR6 y CCR7, confiriendo a las células la capacidad de realizar la presentación antigénica, secretar citocinas proinflamatorias, TNF-alfa, IL-8, IL-10 e IL-23, y migrar de los tejido a los ganglios linfáticos, donde se localizan las células T (Sallusto *et al.*, 1999; Cuéllar, 2018).

### 3.1.3.3. Activación de las células T.

Una vez que las células dendríticas maduran, éstas migran a los ganglios linfáticos regionales, donde interactúan con las células T *naïve* para la inducción de una respuesta inmune (Solano, 2018). La activación de las células T se traduce a la activación del sistema inmune adaptativo, el cual se caracteriza por ejercer una acción específica mediada por los antígenos, que entrenan a las células T para reconocer y recordar a la amenaza de la cual provienen, de forma que puede detectar de forma específica al patógeno y destruirlo (Toche, 2012).

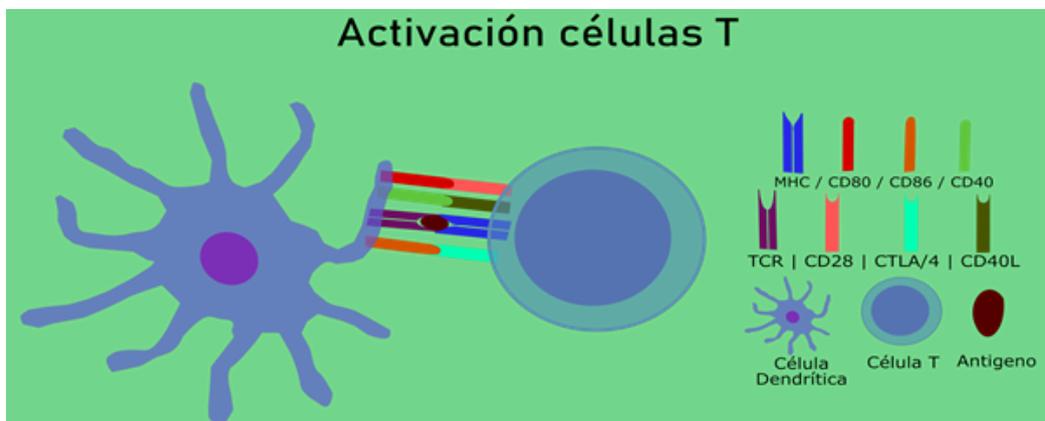


Figura 8 - Activación de las células T, interacción entre MHC - TCR moléculas coestimuladoras.

La activación de las células T *naïve* (Fig. 8) se lleva a cabo mediante la interacción del complejo MHC-II/I péptido antigénico con el receptor de células T (TCR). Cuando la célula T reconoce al antígeno, acopla su TCR al MHC de la célula dendrítica, al mismo tiempo reconoce las moléculas coestimuladoras CD80, CD86, CD40 acoplándose a los receptores CD28, CTLA-4, CD40L de la célula T, induciendo así la activación de la célula T (Solano, 2018; Tai, 2018). Las células T

activadas pueden ser del tipo CD4+ denominadas *helper* o CD8+ denominadas citotóxicas. Las células T *helper* se forman mediante la estimulación por MHC-II y CD4+, se caracterizan por liberar citocinas proinflamatorias como IFN-gamma y TNF-alfa que promueven la respuesta inmune. Las células T citotóxicas, en cambio, se forman por la estimulación de MHC-II y CD8+, encargándose de realizar una acción citotóxica a través de perforinas y granzimas, sobre células que presentan el antígeno para el cual fueron activadas (Seder & ahmed, 2003; Molnar & Gair, 2015; Immunopaedia 2020).

#### **4. Respuesta inmune contra el cáncer.**

##### **4.1. Inmunoedición.**

Se ha observado que el sistema inmune puede desarrollar diversas respuestas antitumorales en las que generalmente se eliminan las células más inmunogénicas, inhibiendo así el crecimiento tumoral. Sin embargo, existen ocasiones en que las respuestas inmunológicas promueven la selección de las células tumorales más agresivas, permitiendo la formación o crecimiento de un tumor. Por lo anterior, a la presión selectiva del sistema inmune que puede moldear el desarrollo de un tumor se le ha denominado inmunoedición, la cual cuenta con tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (Dunn *et al.*, 2002; Jacobo *et al.*, 2017; McCoach & Bivona, 2018; Cutuli, 2018; de León & Pareja, 2018).

##### **4.2. Fase de eliminación.**

En la fase de eliminación (Fig. 9), también llamada inmunovigilancia, las células del sistema inmune pueden detectar a las células neoplásicas a través de antígenos específicos de tumor y eliminarlas (Dunn *et al.*, 2002; Jacobo *et al.*, 2017; Cutuli, 2018; de León & Pareja, 2018). El reconocimiento del tumor inicia cuando éste ha crecido lo suficiente como para alterar el tejido circundante y generar proteínas angiogénicas aumentando el suministro de sangre. Ambos procesos generan señales de daño liberando DMAPs provenientes del tumor y la matriz extracelular,

como IFN-alfa, proteínas de choque térmico, fragmentos de la matriz y fragmentos del tumor. Estas señales reclutan macrófagos, células dendríticas y células T, que inician su respuesta contra las células neoplásicas junto con la producción de citocinas proinflamatorias IFN-gamma, TNF-alfa, IL-12 y quimiocinas CXCL10, CXCL9, CXCL11, promoviendo la muerte de las células tumorales y reclutando células del sistema inmune (Smyth *et al.*, 2001; Dunn *et al.*, 2002; Garg *et al.*, 2013). Los fragmentos de células neoplásicas muertas son fagocitados y procesados por macrófagos y células dendríticas, las cuales migran hacia los órganos linfoides secundarios para activar a linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos contra el tumor, que tendrán la capacidad de producir citocinas como IFN-gamma e inducir la muerte de células tumorales. Los linfocitos T son las principales células encargadas de eliminar al tumor, pero es posible que no puedan eliminarlo por completo logrando solo contener su crecimiento generando la fase denominada de equilibrio (Dunn *et al.*, 2002; Jacobo *et al.*, 2017; Cutuli, 2018).

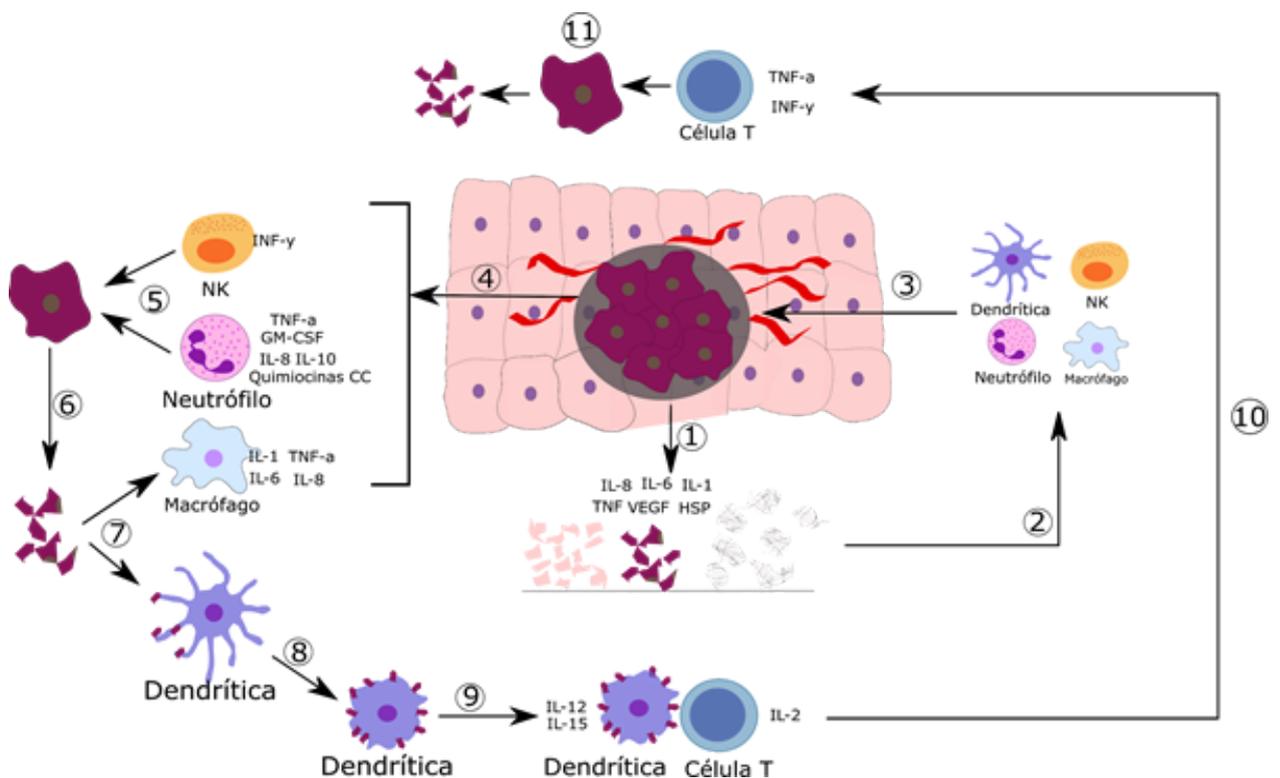


Figura 9 - Fase de eliminación. 1- El tumor genera señales por inflamatorias, 2- que son reconocidas por células del sistema inmune, 3- las cuales migran al sitio del tumor, 4-5- donde generarán un reconocimiento, producción de citocinas y destrucción de células tumorales, 6- los fragmentos del tumor generados 7- serán entonces reconocidos por macrófagos y células dendríticas, 8- estas últimas madurarán y 9- activarán células T, 10- las cuales migran al sitio del tumor, 11- para destruirlo.

### **4.3. Fase de equilibrio.**

Cuando el sistema inmune no es capaz de destruir a la totalidad de las células neoplásicas, éstas entran en un equilibrio con el sistema inmune, donde las células neoplásicas están contenidas pero siguen proliferando bajo un esquema de presión selectiva ejercido por el sistema inmune. Así se seleccionan variantes cada vez más resistentes las que eventualmente escapan al sistema inmune. Las células tumorales sobreviven gracias a su diversidad genética, generando y heredando mutaciones, produciendo clones con baja inmunogenicidad y resistentes al sistema inmune (Dunn *et al.*, 2002; Jacobo *et al.*, 2017; Cutuli, 2018; de León & Pareja, 2018).

### **4.4. Fase de escape.**

Las células seleccionadas por el sistema inmune eventualmente son capaces de evitarlo completamente ya sea por resistencia individual o por la generación de un microambiente tumoral inmunosupresor, con la capacidad de reclutar células del sistema inmune que promuevan su crecimiento (Dunn *et al.*, 2002; Jacobo *et al.*, 2017; Cutuli, 2018; McCoach & Bivona, 2018). Las células neoplásicas tienen distintas estrategias para evadir al sistema inmune (Fig. 10), como la secreción de citocinas inhibitorias del sistema inmune, mecanismos de resistencia, pérdida de receptores y reducción del reconocimiento por el sistema inmune (Dunn *et al.*, 2002; Cutuli, 2018; McCoach & Bivona, 2018).

Las células tumorales pueden reducir la expresión de antígenos específicos al surgir nuevas células que no los expresan, al mismo tiempo pueden reducir su expresión de MHC-I junto con su capacidad de presentar péptidos en él. Estos factores en conjunto reducen la capacidad del sistema inmune de reconocer, y eliminar las células tumorales. También generan resistencia a mecanismos citotóxicos, mediante la pérdida de receptores para IFN-gamma evadiendo su acción apoptótica, la producción de factor oncogénico Pro STAT3 evitando apoptosis y la sobre expresión de PD-1 y CTLA-4 que evita la acción de células T citotóxicas. A la vez que evaden la detección y acción del sistema inmune, las células tumorales producen citocinas

inhibitorias, como factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), biotina PEG2 amina (PEG2), indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa (IDO), factor estimulante de colonias macrófagos (M-CSF), IL-4, IL-6 e IL-10 que inhiben la acción efectora de macrófagos, dendríticas y T citotóxicas.

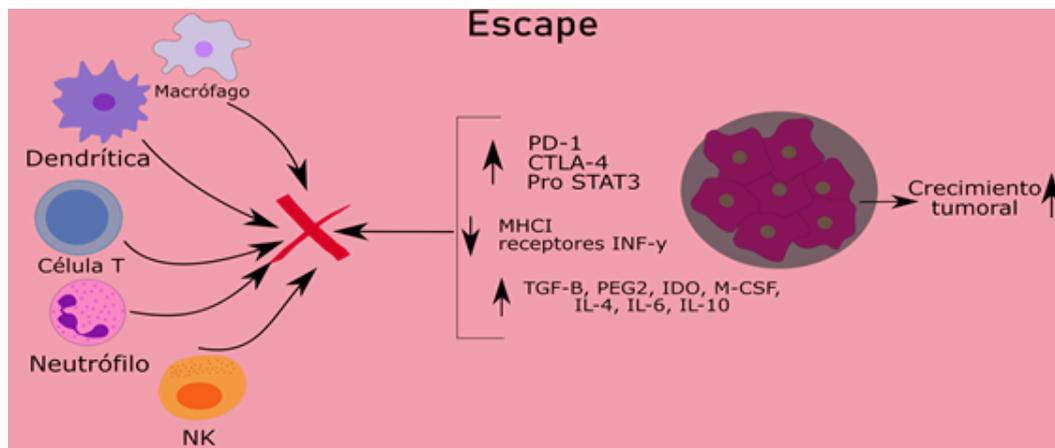


Figura 10- Fase de escape, la célula tumoral inhibe la acción de las células inmunes promoviendo su crecimiento.

Al mismo tiempo estos factores promueven fenotipos reguladores de las células inmunes, como lo son las células T reguladoras las cuales tienen la capacidad de inhibir a las células T citotóxicas y aumentar la producción de IL-10 y TGFs (Jacobó *et al.*, 2017; Cutuli, 2018). Todos estos mecanismos promueven la formación de un microambiente tumoral donde se producen citocinas angiogénicas e inmunosupresoras, cambiando el fenotipo de las células inmunes de efector a tolerogénico y promoviendo así la reparación de tejido y la proliferación de células tumorales (Dunn *et al.*, 2002; Jacobó *et al.*, 2017; Cutuli, 2018; McCoach & Bivona, 2018).

## 5. Tratamiento.

El diagnóstico temprano del melanoma, antes de que empiece a invadir los ganglios linfáticos (estadio 3), es importante para un tratamiento efectivo. La forma más efectiva de tratamiento es la escisión quirúrgica temprana de la lesión, con un margen de 0.5 a 2 cm dependiendo de la profundidad indicada por el índice de Breslow. Además, se realiza una biopsia del ganglio centinela para identificar

cualquier posible invasión y en su caso llevar a cabo una resección (Torrella & Noris, 2004). Desde el estadio 2 en adelante, de ser posible, el tumor es retirado, además se emplea una terapia adyuvante para prevenir un relapso de la enfermedad o evitar que se disemine a otros órganos. En la actualidad se emplean agentes adyuvantes inmunomoduladores como citocinas (IFN-alfa) y anticuerpos (Ipilimumab y Nivolumab). Para el estadio 4, no hay posibilidad de resección y sólo se emplean agentes adyuvantes inmunomoduladores y quimioterapia como la dacarbazina (Camacho *et al.*, 2017). Para estos tratamientos el relapso de la enfermedad resulta común al no ser capaces de destruir todas las células neoplásicas, por lo que se buscan alternativas de tratamiento. Una propuesta para tratar melanoma en estadios avanzados es la inmunoterapia, donde se busca modular el sistema inmune del paciente para generar una respuesta antitumoral efectiva (Jacobo *et al.*, 2017; Zhang & Cheng., 2018).

## **6. Inmunoterapia.**

Una estrategia propuesta para superar los efectos inmunosupresores del cáncer es la inmunoterapia, que consiste en la modulación del sistema inmune de un paciente, con el objetivo de aumentar su capacidad para detectar y destruir células tumorales (Pisconti, 2018). Se han generado estrategias inmunoterapéuticas (Cuéllar, 2018) que hacen uso de diversos inmunomoduladores capaces de activar y potenciar las respuestas inmunes antitumorales (Saroj *et al.*, 2012; Benitez, 2018).

La inmunoterapia puede dividirse ampliamente en inmunoterapia específica (Fig. 11) e inmunoterapia inespecífica (Fig. 12). La inmunoterapia específica busca generar una respuesta inmune específica para el tumor, aprovechando las características de memoria y especificidad del sistema inmune adaptativo, y se basa en el uso de antígenos tumorales, células T y células dendríticas modificadas o activadas *in vitro* para después ser inoculadas en el paciente. Por otro lado, la inmunoterapia inespecífica se concentra en la activación sobre todo de las células pertenecientes al sistema inmune innato, potenciando de forma indirecta la activación del sistema inmune adaptativo, que es estimulado por la producción de citocinas

proinflamatorias del sistema inmune innato y los antígenos generados por su acción (Monjazez *et al.*, 2013; Felipe, 2013; Chen *et al.*, 2018; Zhang & Cheng, 2018).

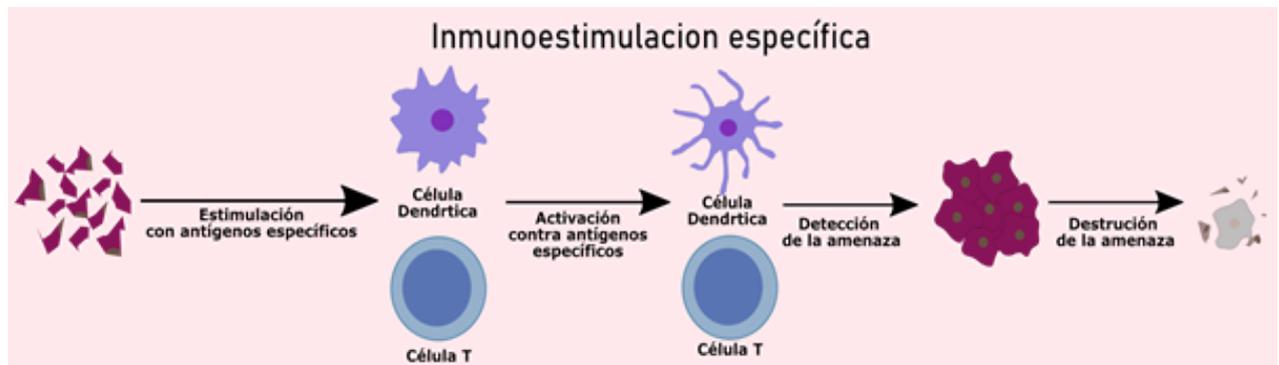


Figura 11 - Inmunoestimulación específica.

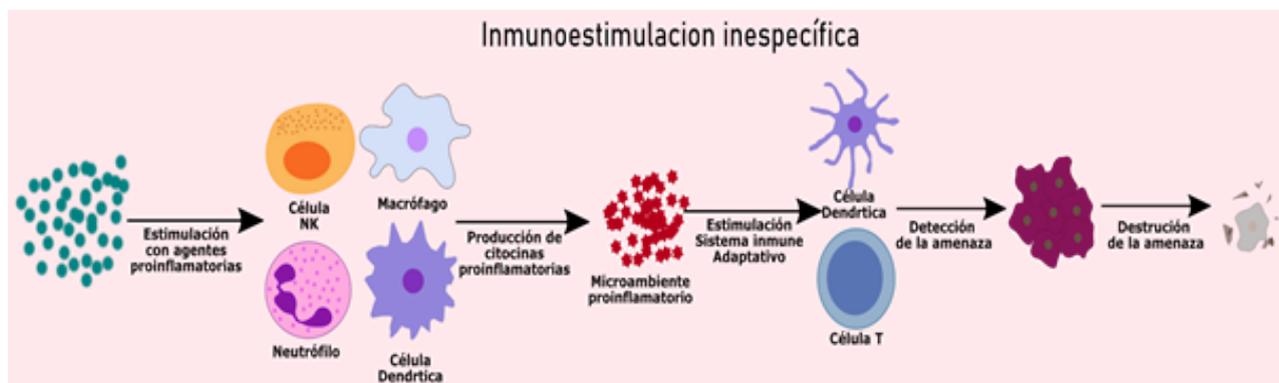


Figura 12 - Inmunoestimulación inespecífica.

La inmunoestimulación no específica tienen la capacidad de potenciar distintos pasos en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales, en teoría induciendo una respuesta inmune capaz de eliminar la totalidad del tumor, sin depender de uno o un grupo de antígenos (Rubinstein & Cole, 2001; Monjazez *et al.*, 2012; Saroj *et al.*, 2012; Kelly & Ginex, 2018; Zhang & Cheng, 2018). Para el tratamiento del melanoma se ha explorado el uso de las citocinas IL-2 e IFN-alfa, como terapia inmunoestimuladora, buscando generar un ambiente antitumoral. Ambas han presentado éxito en ensayos clínicos, sin embargo las altas dosis necesarias generan toxicidad secundaria llevando a la suspensión temprana del tratamiento (Torrella & Noris, 2004).

### **6.1. Retos de la inmunoterapia.**

Los retos a los que se enfrenta la inmunoterapia para cáncer son variados, entre ellos, tener la capacidad de inducir la activación de células del sistema inmune con un determinado fenotipo necesario para mediar la muerte de células tumorales; diseñar terapias sinérgicas no tóxicas; que la función efectora de las células del sistema inmune se mantenga durante un periodo de tiempo necesario para la eliminación de las células tumorales, entre otras (Gammon *et al.*, 2016; Wang & Mooney, 2018). Así, desde hace algunos años, se ha investigado las propiedades de los biomateriales para ser empleados en terapias. Utilizando biomateriales cuyas características permiten fabricar dispositivos que pueden actuar como reservorio de citocinas, antígenos, células o fármacos, y liberarlos de manera controlada y sostenida sobre el tiempo (Gammon *et al.*, 2016). Un ejemplo es el caso de un hidrogel fabricado a partir de ácido hialurónico y cargado con antagonistas para los receptores TLR-7/8 o estimulador de genes de interferón (STING), implantados en el sitio de resección de tumor en ratones inoculados con un modelo de cáncer de mama. La liberación prolongada por el hidrogel en los sitios de resección de tumor generó un mayor porcentaje de respuesta en comparación a la aplicación local o sistémica de los mismos componentes terapéuticos en solución (Park *et al.*, 2018). Este tipo de propiedades han permitido que el uso de biomateriales en la inmunoterapia aumente el crecimiento de la supervivencia en ensayos preclínicos, por lo que es importante investigar diversos biomateriales que puedan ser empleados en la inmunoterapia (Gammon *et al.*, 2016; Wang & Mooney, 2018).

### **7. Biomateriales.**

Los biomateriales pueden ser definidos como una sustancia otra que una droga, o combinación de sub-sustancias, sintéticas o naturales en origen, las cuales pueden ser usadas por un periodo de tiempo, como la totalidad o parte de un sistema el cual cura, aumenta la función o reemplaza cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, mejorando la calidad de vida del paciente (Patel & Gohil, 2012; Hollinge, 2012; Marin *et al.*, 2020).

La principal característica que define a un biomaterial es la biocompatibilidad, es decir que al momento de su implantación y subsecuente contacto con fluidos y tejidos biológicos, el biomaterial no debe causar reacciones adversas como lo son, grandes cantidades de daño al tejido circundante, toxicidad y efectos cancerígenos (Kiradzhyska & Mantcheva, 2019; Gobbi *et al.*, 2020). Adicionalmente, los biomateriales presentan características mecánicas, químicas, físicas y biológicas, particulares a cada material. Entre las cuales destacan la rigidez, fuerza, dureza, ductilidad, la carga eléctrica, la composición química, el arreglo atómico, la biodegradabilidad y la interacción biológica con el cuerpo humano (Abdullaeva, 2017; Dziki & Badylak, 2018; Kiradzhyska & Mantcheva, 2019; Mariani *et al.*, 2019). Estas características deben variar y responder a las necesidades de las aplicaciones requeridas (Gobbi *et al.*, 2020). De forma que el conjunto y combinaciones de estos factores permiten diversas aplicaciones para los biomateriales como, implantes óseos, válvulas de corazón artificiales, implantes ortodónticos, *stents* para uso arterial, implantes estéticos, entre otras (Raghavendra & Jayaramudu, 2015; Gobbi *et al.*, 2020). Muchas de estas características provienen de la composición del biomaterial, los cuales de acuerdo a ello pueden ser clasificados en metales, cerámicas, polímeros o compositos (Fig. 13).

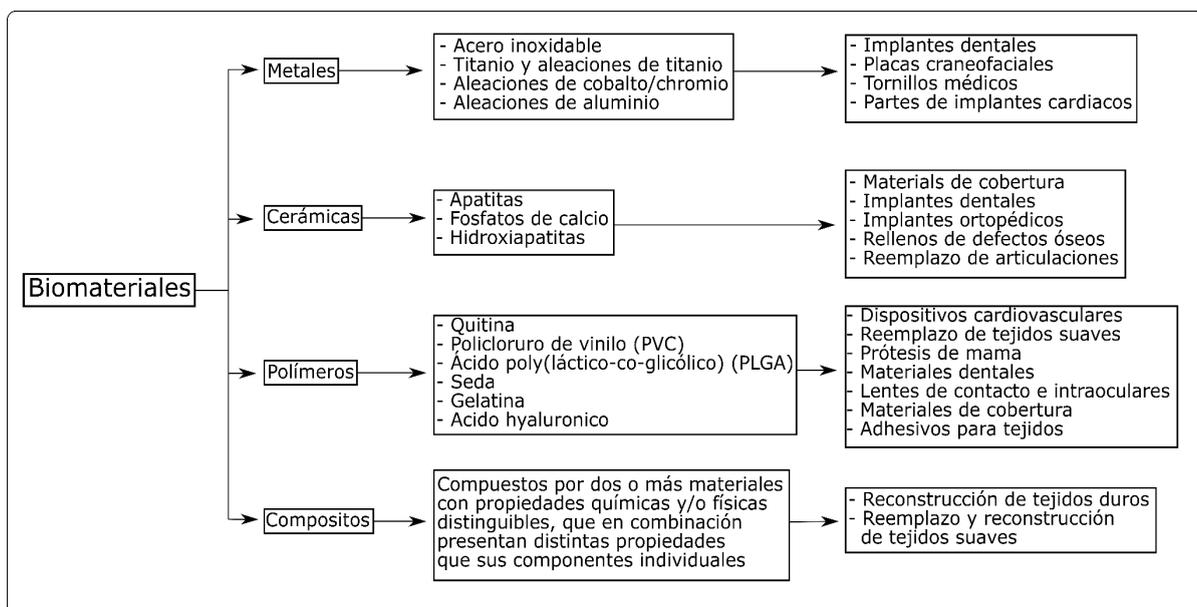


Figura 13 - Biomateriales clasificación por composición, ejemplos y aplicaciones.

Los polímeros son de particular importancia e interés al ser biomateriales cuyas características como, biodegradabilidad, elasticidad, resistencia y capacidad de absorber agua, permiten su compatibilidad con una gran variedad de tejidos y órganos, de forma que son usados en la ingeniería de tejidos para el reemplazo de tejidos blandos y la regeneración de tejidos (Raghavendra & Jayaramudu, 2015; Osorio *et al.*, 2017; Teo *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2017; Mariani *et al.*, 2019).

### **7.1. Biomateriales poliméricos.**

Los polímeros son macromoléculas compuestas por repeticiones de unidades monoméricas. Son materiales altamente versátiles, los cuales son relativamente fáciles de procesar y fabricar. Existen una gran variedad de polímeros los cuales comparten características mecánicas que permiten su aplicación en la medicina, al mismo tiempo que presentan una diversidad de composiciones y propiedades (Teo *et al.*, 2016; Osorio *et al.*, 2017). Los polímeros pueden ser modificados al momento de su fabricación o procesamiento, cambiando características como su humedad, degradabilidad, fuerza, composición química, entre otras, llevando a la adaptación de un polímero a una función específica (Osorio *et al.*, 2017; Liang *et al.*, 2017).

Los polímeros pueden dividirse de acuerdo a su origen en polímeros sintéticos y polímeros naturales. Los sintéticos son generados o sintetizados artificialmente, frecuentemente mediante derivados de petróleo, mientras que los naturales son aquellos que se obtienen de organismos vivos como algas, vertebrados y artrópodos (Khan & Ahmad, 2015; Raghavendra & Jayaramudu, 2015; Mariani *et al.*, 2019). Los polímeros sintéticos pueden ser biodegradables facilitando su aplicación en ingeniería de tejidos y presentación de fármacos. Se distinguen por su fabricación a través de métodos de polimerización química, lo que permite una facilidad de manufactura al mismo tiempo que facilita la modificación de sus características morfológicas y mecánicas, sin embargo carecen de señales químicas, lo que puede llevar a su rechazo, en su caso las señales químicas sólo pueden ser agregadas mediante modificaciones secundarias durante su fabricación (Osorio *et al.*, 2017;

Teo *et al.*, 2016; 2010; Khan & Ahmad, 2015). Por otro lado los polímeros naturales al ser originarios de sistemas biológicos pueden presentar señales químicas reconocibles en ambientes fisiológicos, son biodegradables, con baja citotoxicidad y dependiendo de su origen pueden fácilmente mimetizar la matriz extracelular. Estas características les confieren mayor biocompatibilidad sobre los sintéticos facilitando su aplicación en la biomedicina (Khan & Ahmad, 2015; Mariani *et al.*, 2019).

## **7.2. Biomateriales e inmunoterapia.**

Los biomateriales poliméricos son empleados en el diseño de dispositivos médicos denominados andamios los cuales son matrices tridimensionales con poros interconectados y señales químicas que permiten el reconocimiento y adhesión celular dentro de su estructura. Los andamios permiten la regeneración o reemplazo de tejidos y la presentación de fármacos entre otras funciones. La construcción de andamios se apoya en la capacidad de los polímeros de formar estructuras que permiten la entrada y adhesión de células en su estructura, mediada por sus características morfológicas, químicas y mecánicas (Khan & Ahmad, 2015; Mariani *et al.*, 2019). La morfología y topología de la matriz dependerá principalmente del método de fabricación, mientras que las señales químicas, como sitios de reconocimiento celular, pueden ser inherentes a los monómeros que componen el polímero o agregadas en modificaciones secundarias al material.

Los andamios son usados para tratar de mimetizar, reemplazar o reparar un tejido, órgano o función. Originalmente, se buscaba que un biomaterial fuera completamente inerte, para evitar un rechazo por parte del sistema inmune, sin embargo, ahora se sabe que la implantación de un biomaterial siempre genera una respuesta inmune implicada en la inducción de cicatrización o la síntesis de matriz extracelular (Dziki & Badylak, 2018; Mariani *et al.*, 2019). Esta respuesta inmune puede ser aprovechada usando los andamios como mecanismos para la liberación de fármacos o biomoléculas, tales como citocinas, antígenos, anticuerpos e incluso

células, para inducir o modelar una respuesta inmunológica cuando son implantados en un individuo.

Incorporar sustancias activas a un andamio (Fig. 14), permite que estas puedan ser liberadas poco a poco en el tejido conjuntivo circundante y a la circulación, de manera que los andamios permiten una liberación prolongada de las moléculas, permitiendo que se generen mejores respuestas inmunoterapéuticas (Jhunjunwala, 2018; Wang & Mooney, 2018; Mariani *et al.*, 2019). Estrategias de este tipo se han llevado a cabo por distintos investigadores con el objetivo de potenciar terapias existentes, como la construcción de un andamio de ácido poly(láctico-co-glicólico) (PLGA) cargado con lisado tumoral y la capacidad de liberar GM-CSF que efectivamente recluta células dendríticas, resultando en 90% de supervivencia en un modelo murino a 25 días (Ali *et al.*, 2009). La formulación de un andamio inyectable compuesto de varas microscópicas mesoporosas hechas de sílice que al inyectarse se auto ensamblan en una matriz la cual puede cargar y liberar antígenos y GM-CSF (Kim *et al.*, 2015).

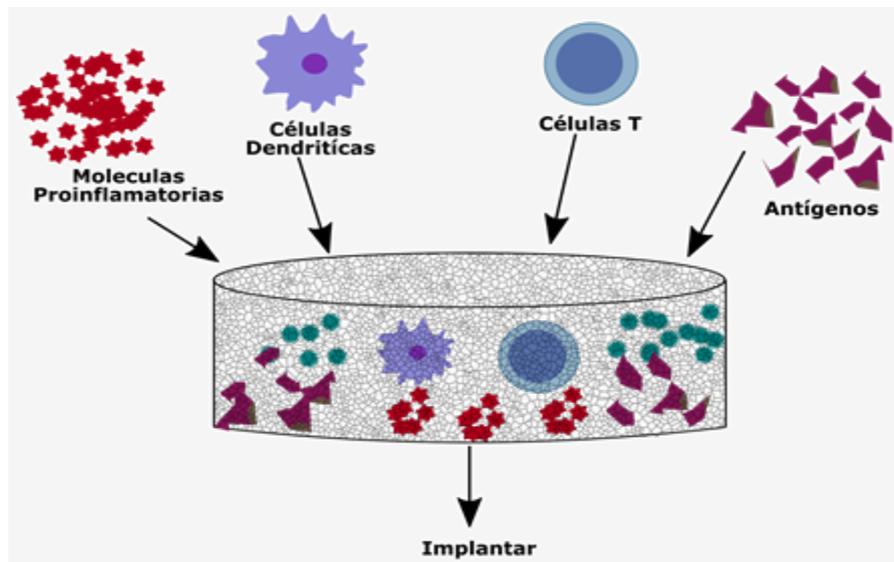


Figura 14 - Biomaterial incorporado con componentes inmunoreactivos para su posterior implantación.

El efecto de moléculas cargadas en un andamio, puede ser potenciado mediante el uso de biomateriales derivados de la matriz extracelular del organismo, pues además de activar el sistema inmune, pueden inducir la migración de diversos tipos

celulares desde fibroblastos hasta linfocitos manteniendo la estimulación durante cierto tiempo hasta su degradación (Dziki & Badylak, 2018; Wang & Mooney, 2018). Dos biomateriales de interés propios de la matriz extracelular que pueden ser reconocidos por el sistema inmune son la gelatina y el ácido hialurónico.

### 7.3. Ácido hialurónico.

El ácido hialurónico es un polímero compuesto por repeticiones de ácido  $\beta(1-4)$ -D-glucurónico y  $\beta(1-3)$ -N-acetil-D-glucosamina (Fig. 15), caracterizado por tener cargas negativa que atrae moléculas de agua, se encuentra presente en la matriz extracelular de vertebrados, su producción está mediada por fibroblastos y células mesoteliales, estimuladas por la influencia de procesos inflamatorios o factores de crecimiento. La producción y degradación de este polímero puede regular procesos como la migración celular, la angiogénesis, inflamación y diferenciación celular (Zhu *et al.*, 2017; Mariani *et al.*, 2019).

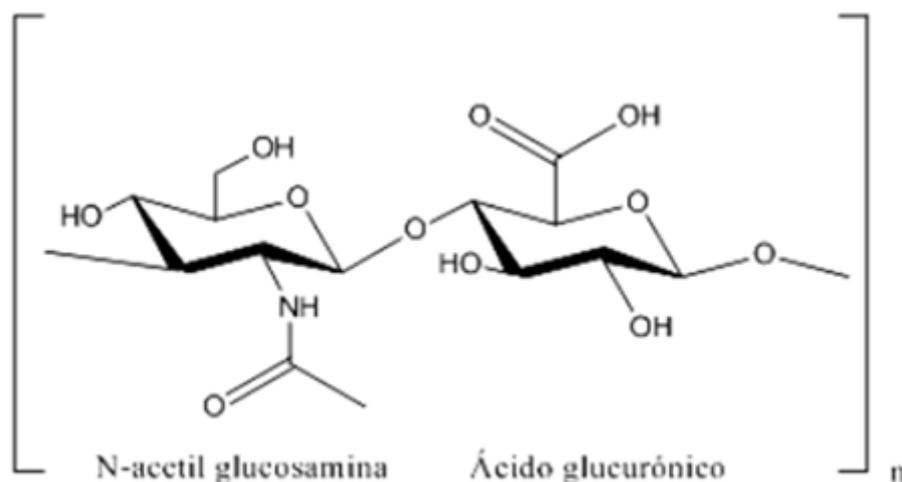


Figura 15 - Estructura del ácido hialurónico (Sanmartín, 2016).

Mediante la transducción de señales, el ácido hialurónico afecta distintas actividades celulares esenciales, como la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación. Las células son capaces de reconocer el ácido hialurónico a través

de distintos receptores como CD44, TLR y CD168. El receptor principal es CD44 y está presente en casi todas las células humanas y de ratón, permitiendo la unión e internalización del ácido hialurónico. Esta internalización atiende a la regulación de procesos inflamatorios. Durante una lesión, el ácido hialurónico se fragmenta, estos fragmentos pequeños tienen un efecto proinflamatorio al ser reconocidos por las células a través de CD44, adicionalmente también pueden ser reconocidos como DAMPs por medio de TLRs, particularmente TLR4 y TLR2, lo que lleva a la activación de células del sistema inmune como, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, lo que induce la migración de más fagocitos y la producción de citocinas proinflamatorias (Jiang *et al.*, 2011; Jounai *et al.*, 2013; Litwiniuk *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017, Abatangelo *et al.*, 2020).

El ácido hialurónico al usarse como biomaterial, puede ser reconocido por el organismo. Su alta concentración de grupos hidroxilo y carboxilo le confiere una alta capacidad de interactuar con el agua, permitiendo que esta ocupe un espacio dentro de él. Además puede formar estructuras porosas que permiten la entrada de células, no es citotóxico y es degradado naturalmente en vertebrados a través de enzimas hialuronidasas sin producir subproductos tóxicos (Zhu *et al.*, 2017 Mariani *et al.*, 2019). El ácido hialurónico se ha utilizado como biomaterial para terapia, Thambi *et al.*, 2019 generó un andamio inyectable de ácido hialurónico y poly(B- amino uretano) con la capacidad de almacenar y liberar gradualmente un agente quimioterapéutico, obteniendo una liberación prolongada y una infiltración efectiva dentro de tumores sólidos generando una respuesta antitumoral en un modelo B16/OVA en ratas.

#### **7.4. Gelatina.**

El componente más abundante de la matriz extracelular es la colágena, de la cual se puede obtener la gelatina a través de su desnaturalización. La colágena es una proteína conformada por una triple hélice de unidades de tropocolágeno que al ser desnaturalizada por acción de calor produce cadenas lineales de gelatina

compuestas por repeticiones de Glicina-X-Y, donde X y Y pueden ser cualquier aminoácido (Fig. 16) (Gorgieva & Kokol, 2011; Bello *et al.*, 2020).

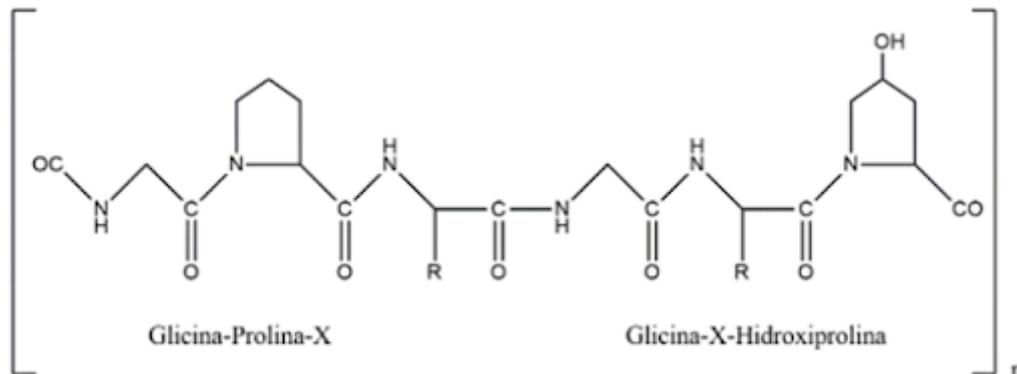


Figura 16 - Estructura de gelatina (Sanmartín, 2016).

La gelatina conserva propiedades de la colágena, permitiendo una alta biocompatibilidad junto con la presencia de una secuencia de reconocimiento conformada por los aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato (RGD) (Gorgieva & Kokol, 2011; Bello *et al.*, 2020). La secuencia RGD es un sitio de unión a proteínas, facilitando la unión, migración y supervivencia celular, y es considerada como uno de los mayores sistemas de reconocimiento de adhesión celular, al cual se unen proteínas pertenecientes a la superficie celular, a la matriz extracelular y a componentes sanguíneos. Las células se acoplan al sitio RGD a través de moléculas de adhesión denominadas integrinas, de las cuales la mayoría pueden acoplarse a esta secuencia (Ruoslahti, 1996). Las propiedades que conserva hacen que la gelatina como biomaterial promueva la infiltración celular, su adhesión y proliferación dentro del andamio (Gorgieva & Kokol, 2011; Chato *et al.*, 2018). Adicionalmente, la gelatina es soluble en agua lo que facilita su manejo en la construcción de andamios, por lo que ha sido utilizada en distintos estudios. Lee *et al.*, 2003 fabricó un equivalente de piel compuesto por gelatina y betaglucano.

Einerson *et al.*, 2002 generó un andamio de gelatina modificado con la capacidad de contener y liberar fármacos durante periodos prolongados de tiempo.

## **8. Entrecruzante.**

Ambos, la gelatina y el ácido hialurónico son altamente hidrofílicos y se degradan a en cuestión de minutos (Yang *et al.*, 2018; Chantre *et al.*, 2019), lo que limita su tiempo medio de vida y por tanto su aplicación, esto puede prevenirse mediante una modificación en su estructura, una técnica para ello es el entrecruzamiento (Hu *et al.*, 2019). El proceso de entrecruzamiento es la inducción de enlaces químicos o físicos entre las cadenas poliméricas que comprenden un material, con el objetivo de modificar sus características biomecánicas, otorgando resistencia a la degradación y mejores características mecánicas, las cuales a su vez pueden ser ajustadas mediante la concentración del entrecruzante y el protocolo aplicado. El entrecruzamiento puede dividirse ampliamente en químico y físico, donde el químico genera enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas poliméricas, mientras que el físico enlaza las cadenas mediante supramoleculares como los son los puentes de hidrógeno (Gorgieva & Kokol, 2011; Oryan *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2019).

Ambos, el ácido hialurónico y la gelatina mejoran su resistencia al ser entrecruzados ya sea individual o conjuntamente, extendiendo su tiempo funcional en un ambiente fisiológico (Borzacchiello *et al.*, 2015; Chato *et al.*, 2018). Un entrecruzante químico ampliamente usado que fortalece los materiales sin generar citotoxicidad es el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) (Hu *et al.*, 2019).

### **8.1. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida.**

El EDC es un entrecruzante químico, el cual es una carbodiimida soluble en agua con la capacidad de formar enlaces amida entre los grupos carboxilo y amida de las cadenas poliméricas (Fig. 17), formado en el proceso urea como subproducto, que aunque presenta propiedades citotóxicas, es soluble en agua y puede ser retirada

con facilidad mediante lavados con agua destilada (Gorgieva & Kokol, 2011; Oryan *et al.*, 2018).

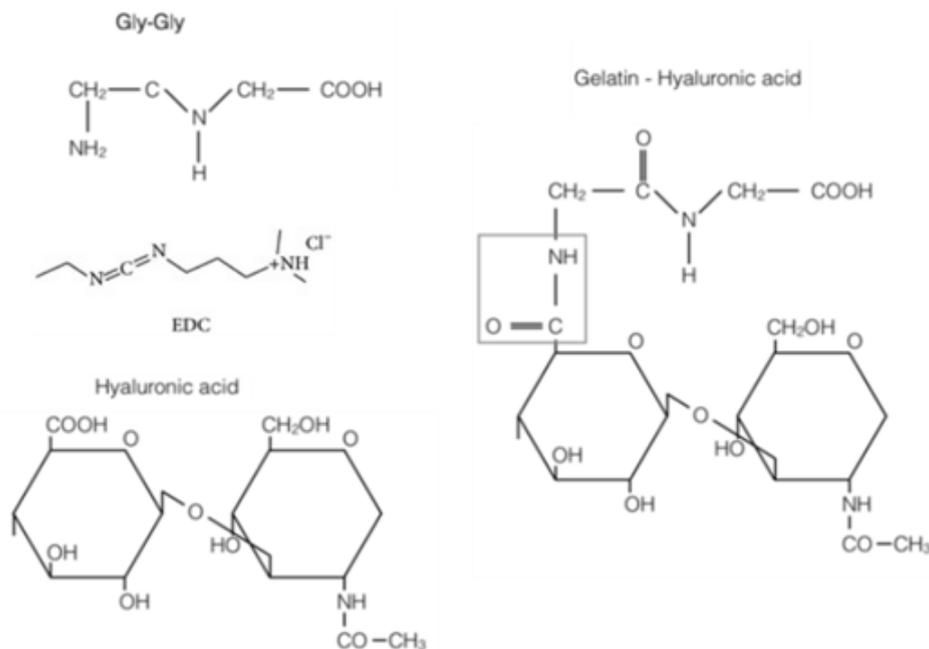


Figura 17 - Entrecruzamiento de gelatina y ácido hialurónico mediado por EDC ( Modificado de: Jarquin, 2016 y Entrecruzador EDC PierceTM, 2020).

El EDC ha sido ampliamente usado para mejorar la estabilidad de distintos materiales, incluidos compuestos de gelatina y ácido hialurónico donde se ha observado que con distintas concentraciones de EDC es posible modular la forma y concentración de los poros, así como la capacidad del andamio de absorber agua y aumentar su resistencia mecánica. La densidad de poros y la cantidad de agua atraída por el andamio disminuyen con el aumento del entrecruzante mientras que la resistencia mecánica aumenta (Zhang *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2013).

### Antecedentes.

En 2004 Hong *et al.*, observó la biocompatibilidad de esponjas tridimensionales formadas por gelatina y ácido hialurónico entrecruzadas con EDC en el tejido subcutáneo de ratas, estudiando la respuesta inmune e histológica generada por el

andamio encontrando que este tenía la capacidad de reclutar el sistema inmune formando una respuesta inflamatoria prolongada no crónica.

En 2011 Zhang *et al.*, generó andamios porosos tridimensionales de gelatina-ácido hialurónico, a distintas concentraciones, liofilizados y entrecruzados con EDC, estudiando su degradación, citotoxicidad y capacidad de absorber agua. Demostrando que la capacidad de absorber agua y su resistencia a la degradación aumentaban con la concentración de ácido hialurónico, la resistencia a la degradación ambos *in vitro* e *in vivo* era mayor cuando el andamio se encontraba entrecruzado, lo cual no generaba ninguna citotoxicidad extra, permitiendo el crecimiento celular.

En 2014, Arellano caracterizó el efecto de distintas concentraciones de EDC sobre andamios porosos tridimensionales de gelatina-ácido hialurónico liofilizados, sugiriendo que una concentración de 50mM de EDC era ideal para la construcción de los andamios.

En 2017, Jarquín identificó la capacidad de un andamio poroso tridimensional de gelatina-ácido hialurónico liofilizado de ser cargado con microesferas conteniendo BMP-2 y VEGF como moduladores de la respuesta del organismo al material.

### **Justificación.**

El melanoma es un tipo de cáncer cutáneo que presenta una alta mortalidad en estadios avanzados así como una creciente incidencia global. El tratamiento estándar actual no es 100% efectivo y frecuentemente presenta reincidencias. Para mejorar la expectativa de vida de los pacientes afectados, se han explorado otras alternativas de tratamiento. Una de ellas es la inmunoterapia que se centra en estimular el sistema inmunológico del paciente para que ataque al tumor, este tipo de terapia se puede llevar a cabo mediante el uso de biomateriales. El uso de la gelatina y el ácido hialurónico, puede permitir la construcción de un andamio entrecruzado, que estimule el sistema inmunológico, donde el ácido hialurónico

puede ser reconocido como DAMP, mientras que la gelatina proporciona sitios de adhesión RGD. Así las células del sistema inmune podrían reconocer y colonizar el andamio, generando un microambiente proinflamatorio el cual estimulara á una mayora cantidad de células del sistema inmune que de esta manera podrían atacar a tumores y disminuir su crecimiento.

### **Hipótesis.**

Si al implantar un andamio de Ge/HA en ratones con melanoma inducido, este puede ser reconocido, reclutar y activar células inmunes, estas generan un microambiente el cual disminuirá el crecimiento tumoral.

### **Objetivo.**

Evaluar el efecto terapéutico de la implantación subdérmica de un andamio de Ge/HA en ratones C57BL/6 con melanoma inducido.

### **Objetivos particulares.**

En andamios de Ge/HA:

- Evaluar la citotoxicidad del andamio de Ge/HA en cultivos *in vitro*.
- Evaluar la capacidad del andamio de Ge/HA de liberar una carga proteica.
- Implantar el andamio Gel/Ha subcutáneamente en ratones C57BL/6 y evaluar las poblaciones celulares de linfocitos dentro del andamio implantado a distintos tiempos (12h, 3 días, 7 días y 14 días).
- Evaluar la degradación del andamio de Ge/HA *in vivo*.
- Implantar el andamio Gel/Ha subcutáneamente en ratones C57BL/6 con melanoma inducido.
- Comparar la tasa de crecimiento tumoral en presencia o ausencia del andamio.

## Método.

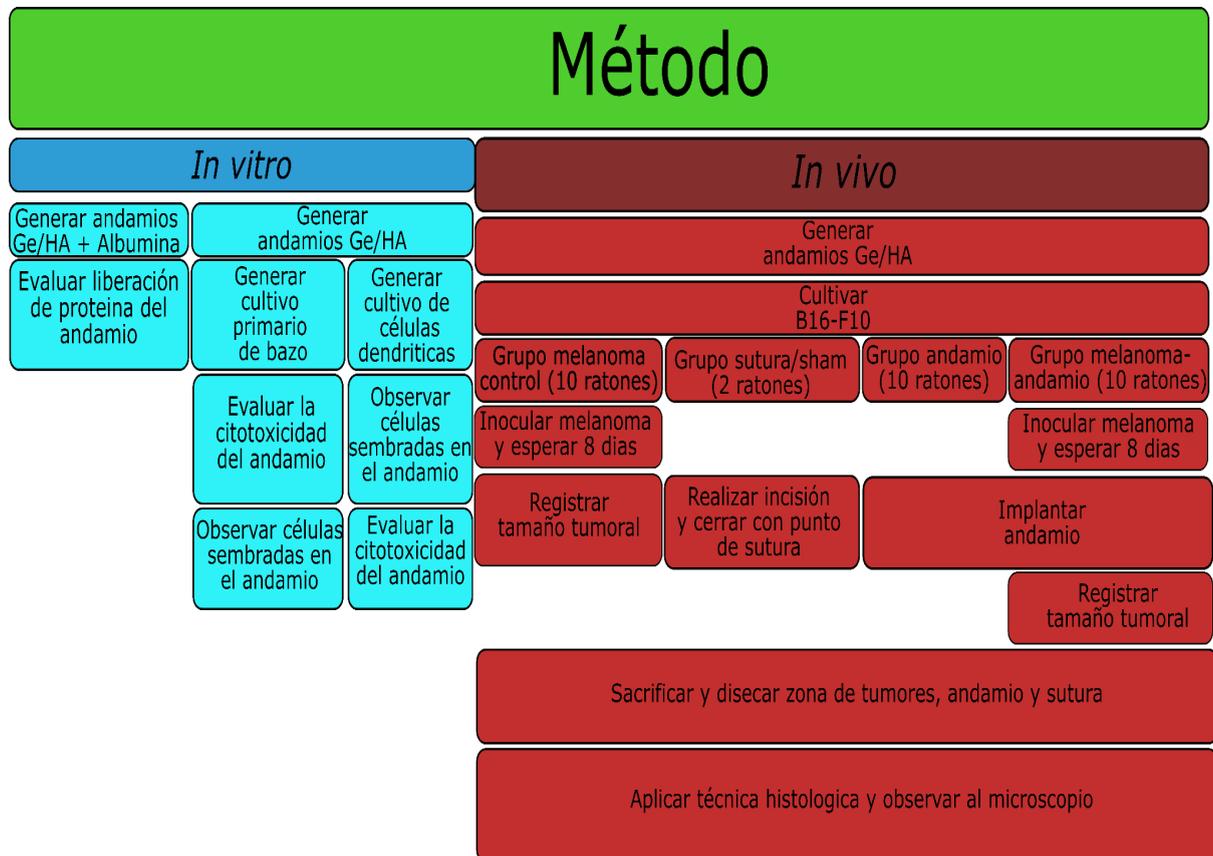


Figura 18: Diagrama del método.

## Material biológico.

Se utilizaron 32 ratones adultos macho de la línea C57BL/6, con los cuales se formaron cuatro grupos: (A) grupo sham, a los cuales se les realizó una incisión y sutura (2 ratones); (B) grupo control/melanoma, que se inocularon con 60,000 células de la línea de melanoma B16-F10 (10 ratones); (C) grupo Ge/HA (andamio gelatina/ácido hialurónico), a los cuales se les colocó de forma subdérmica un andamio de Ge/HA estéril de 0.005g (10 ratones) y (D) grupo melanoma Ge/HA, que se inocularon con 60,000 células de la línea de melanoma B16-F10 (The American Type Culture Collection, USA) y posterior a ocho días se trataron con los andamios

de Ge/HA (10 ratones). Registrando el crecimiento tumoral, sobrevida y análisis histopatológico para todos los grupos.

### **Fabricación del andamio.**

Se generaron andamios tridimensionales esponjosos, de Ge/HA, andamios de Ge/HA suplementados con 1.25 ug de albúmina (Ge/HA/alb), y andamios de Ge/HA con 1.25 µg de albúmina añadido en un volumen extra de 200 µl de agua (Ge/HA/alb/H<sub>2</sub>O). Los andamios con albúmina se utilizaron para determinar la capacidad del andamio de liberar proteínas.

Los andamios de Ge/HA se fabricaron modificando el método de Arellano, 2014. En agua bidestilada se generó una solución de gelatina al 4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y de ácido hialurónico al 1% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), en agitación constante durante 30 minutos a 56°C, hasta que la gelatina y ácido hialurónico estuvieron disueltos. En tubos de microcentrífuga se colocaron 800µl de la solución, los que fueron centrifugados en la microcentrífuga para retirar burbujas y a continuación fueron congelados a -20°C durante 24 horas. Los tubos entonces se liofilizaron durante 10 horas a -91°C y a 0.036 mBar de presión atmosférica generando el andamio sólido. Posteriormente, para entrecruzar los componentes del andamio estos fueron sumergidos en una disolución 50 mM de EDC (N-(3-dimetilaminopropil))-N-etilcarbodiimida (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) en etanol al 96%, durante 24 horas a 4°C. Los andamios se lavaron 6 veces con agua bidestilada para retirar el subproducto de la reacción, iso-urea, finalizando con una nueva liofilización bajo las condiciones previamente establecidas, durante 12 horas.

En el caso de los andamios Ge/HA/alb, durante la agitación de la solución de gelatina y ácido hialurónico se añadió 1.25 ug de albúmina. Mientras que para los andamios Ge/HA/alb/H<sub>2</sub>O un volumen adicional de 200 µl de agua bidestilada conteniendo 1.25 µg de albúmina se colocó en cada tubo de microcentrífuga, mezclando en la solución de Ge/HA con apoyo de la jeringa.

### **Cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea.**

La obtención de células dendríticas se llevó a cabo siguiendo el método de Bucio, 2017. Se sacrificaron ratones C5BL/6 mediante dislocación cervical, del ratón se removieron las extremidades inferiores, de estas se retiraron los tejidos suaves para obtener los fémures y tibias, que se colocaron en solución estéril balanceada de Hank. En condiciones estériles, los huesos fueron desinfectados mediante cuatro lavados de tres minutos en alcohol al 70% y dos lavados de dos minutos en PBS estéril. Posteriormente en condiciones estériles, los huesos se colocaron en cajas petri de 10 cm conteniendo medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (Biowest, P0860-N10L) suplementado con 10% suero fetal bovino y 1% de antibiótico (estreptomicina, penicilina, anfotericina beta). Las epífisis de los huesos fueron removidas y el interior de la diáfisis fue perfundida, con medio RPMI suplementado de la caja petri. Las células de médula ósea obtenidas se lavaron tres veces con PBS a 4°C y resuspendidas en 1 ml de medio RPMI suplementado. Se determinó el número de células obtenidas usando una cámara de Neubauer y azul tripano. Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI suplementado + 20% de sobrenadante rico en GM-CSF, en botellas de cultivo de 75cm<sup>3</sup>. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% humedad. Cada tercer día el medio 80% RPMI suplementado, 20% sobrenadante rico en GM-CSF fue reemplazado. Las células se recolectaron el día 10.

### **Obtención de células de bazo.**

Para la obtención de las células de bazo, ratones C57BL/6 fueron sacrificados por dislocación cervical, inmediatamente el bazo se disecó y lavó con PBS a 5°C. Posteriormente, el bazo se colocó entre dos mallas de nylon con poros de 200 micras junto con PBS a 5°C. Con ayuda de un émbolo el bazo se disgregó para separar los linfocitos del tejido conjuntivo y obtener una solución rica en leucocitos,

los cuales se lavaron con PBS a 5°C, se contaron y verificó su viabilidad mediante el empleo de azul tripano.

### **Adhesión celular *in vitro*.**

Para analizar si las células pueden reconocer el andamio y poblarlo, se seccionaron los andamios en fragmentos de aproximadamente 300 - 500 micras de grosor y aproximadamente 7 mm de diámetro, con el objetivo de poder observarlos en un microscopio óptico. Después, los fragmentos se esterilizaron durante toda la noche con la luz UV equipada de la campana de flujo laminar (CLB-201S-04) y se hidrataron con PBS estéril a 37°C durante 24 horas antes de su uso. Posteriormente, en los andamios se sembraron  $1 \times 10^6$  células dendríticas derivadas de médula ósea en medio RPMI y se mantuvieron en incubación, a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, durante 24 horas. Pasado el periodo de incubación, los andamios se fijaron con PBS de fijación (Paraformaldehído amortiguado al 5%) y se tiñeron con hematoxilina para su observación con un microscopio fotónico Nikon Eclipse.

### **Evaluación de citotoxicidad *in vitro* del andamio.**

Se sembraron 1 millón de células de cultivo primario de bazo, en los fragmentos de los andamios de Ge/HA con 0.005g de peso, previamente hidratados en PBS y esterilizados con luz UV. Se mantuvieron en incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Después de 24 horas en cultivo, se retiraron las células del andamio, a continuación las células se tiñeron con el colorante vital Anexina V y 7AAD (ensayo Pacific Blue TM Annexin V Apoptosis Detection con 7-AAD). Adicionalmente otro grupo de células de cultivo primario de bazo, cultivadas en ausencia del andamio se tiñó con el colorante vital Anexina V y 7AAD. Ambos grupos fueron evaluados por citometría de flujo mediante el citómetro FACSCalibur, para determinar la citotoxicidad inducida por el andamio. Como control positivo de células apoptóticas

se emplearon los eritrocitos presentes en el cultivo de bazo y como control negativo un grupo de células sin tinción.

### **Cultivo de células de melanoma B16-F10.**

Las células B16-F10 de melanoma (The American Type Culture Collection, USA) se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos, a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

### **Inducción de melanoma.**

Los grupos de ratones B (grupo control melanoma) y D (grupo melanoma Ge/HA), se inocularon con 60,000 células B16-F10 de melanoma en la región inguinal, 8 días después el andamio se implantó vía subcutánea en los ratones del grupo D. Cada tercer día se evaluó el tamaño tumoral con la ayuda de un Vernier, midiendo las dimensiones de la masa tumoral protuberante en la piel de los ratones.

### **Implantación del andamio en ratones.**

Para la implantación subcutánea de los andamios de Ge/HA, los ratones se anestesiaron con cloroformo inhalado, posteriormente, se realizó una incisión en la piel de la región baja dorsal, insertando el andamio de Ge/HA de 0.005g previamente hidratado y esterilizado. A continuación, se cerró la herida con un punto de sutura de ácido poliglicólico del número 5.

### **Análisis histológico.**

Para el análisis histológico, se sacrificaron los ratones a distintos tiempos: 2, 4, 7 y 10 días después de la implantación del andamio de Ge/HA. Las regiones donde se colocó el andamio de Ge/HA y donde se inocularon las células de melanoma B16-F10, se disecaron y fijaron en una solución de PBS de fijación (PBS

paraformaldehído amortiguado al 5%) por 24 horas. Las muestras biológicas se procesaron con la técnica histológica convencional y se tiñeron con los colorantes hematoxilina y eosina para su subsecuente análisis a través de un microscopio fotónico Nikon Eclipse. En el microscopio a través del programa NIS-Elements F 4.60.00 se tomaron fotomicrografías de toda el área disectada a distintos aumentos (4x, 10x, 40x), que luego fueron procesadas en el programa de edición de gráficos vectoriales libres de código abierto Inkscape para su observación y análisis conjunto.

### **Ensayo de liberación de proteína y degradación del andamio *in vitro*.**

Se evaluó la capacidad del andamio de liberar una carga de proteína a través de Micro BCA Protein Assay Kit, empleando los andamios de Ge/HA, Ge/HA/alb y Ge/HA/alb/H<sub>2</sub>O.

En resumen, se colocaron cinco fragmentos de los tres tipos de andamio con un peso 0.005g, en placas de 96 pozos con 1ml de PBS, manteniéndolas en condiciones de cultivo, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. El PBS fue posteriormente retirado y almacenado a -70°C e inmediatamente reemplazado en el pozo a distintos tiempos: 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas. Entonces se evaluó la concentración de proteína en las muestras de PBS recolectadas a distintos tiempos. Para ello primero se generó una curva estándar de albúmina y se prepararon las cantidades necesarias de los reactivos del Micro BCA Protein Assay Kit. Debido a que la gelatina y ácido hialurónico son cuantificados como proteína, se emplearon muestras del grupo de andamios Ge/HA para fungir como blanco/concentración basal de proteína, determinando la concentración de albúmina por muestra al restar la absorbancia de los blancos a los experimentales.

Adicionalmente, la liberación de proteínas de los andamios Ge/HA permitió observar la degradación del andamio en PBS.

## Resultados.

### Fabricación del andamio.

Los andamios Ge/HA obtenidos de la disolución de gelatina al 4% y de ácido hialurónico al 1% entrecruzados con EDC 50 mM, presentaron una apariencia esponjosa, con una consistencia comprimible (Fig. 19) y abundantes poros, formados de fibras interconectadas gruesas y delgadas con conexión al exterior (Fig. 19-E).

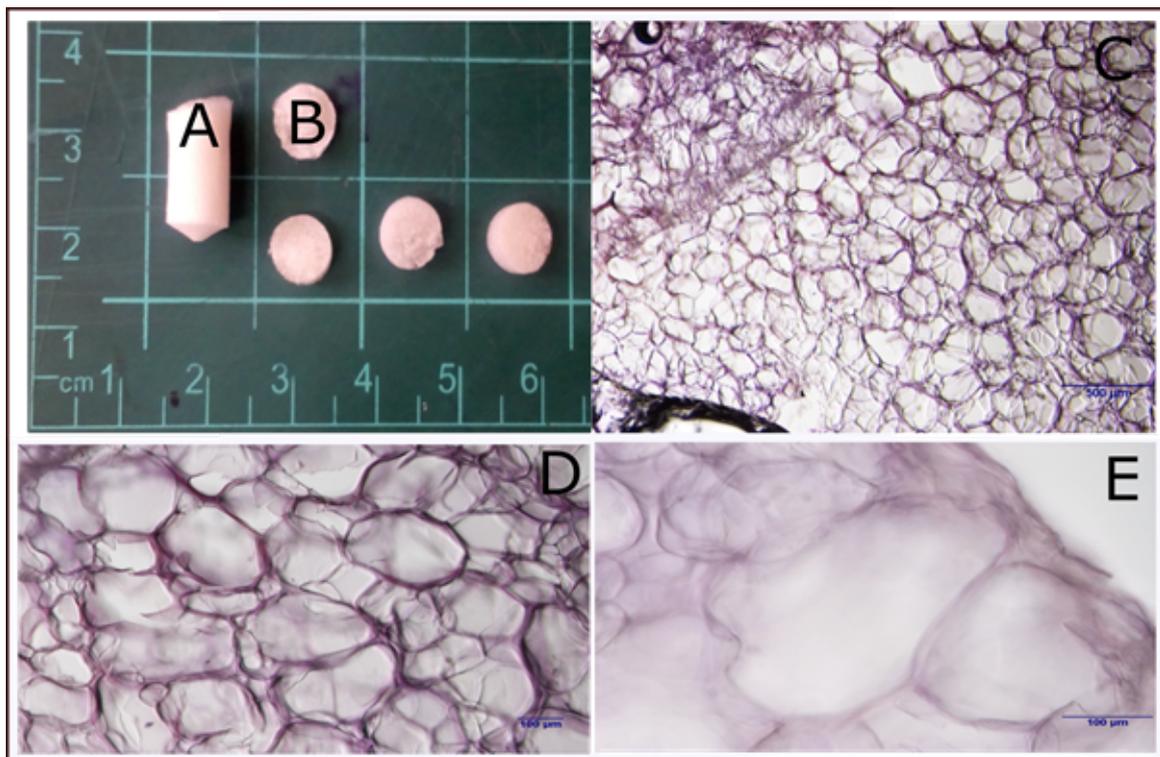


Figura 19: Foto de andamios Ge/HA producto completado y fotomicrografías del andamio teñido con hematoxilina. (A) andamio de Ge/HA completo, (B) fragmento del andamio de 0.005g de peso, (C) poros del andamio observados a 4x, (D) poros de la sección central del andamio observado a 10x, (E) poros de la sección periférica del andamio observado a 40x.

### Adhesión y viabilidad celular.

La adhesión celular en el andamio de Ge/HA, se estudió mediante el cultivo de células dendríticas derivadas de médula ósea, sobre el andamio durante 24 horas. Al observar los andamios en el microscopio fotónico, se corroboró la presencia de células dendríticas en la totalidad del andamio y generalmente siguiendo el contorno

del poro lo que se puede interpretar como que están adheridas a las paredes del andamio (Fig. 20).

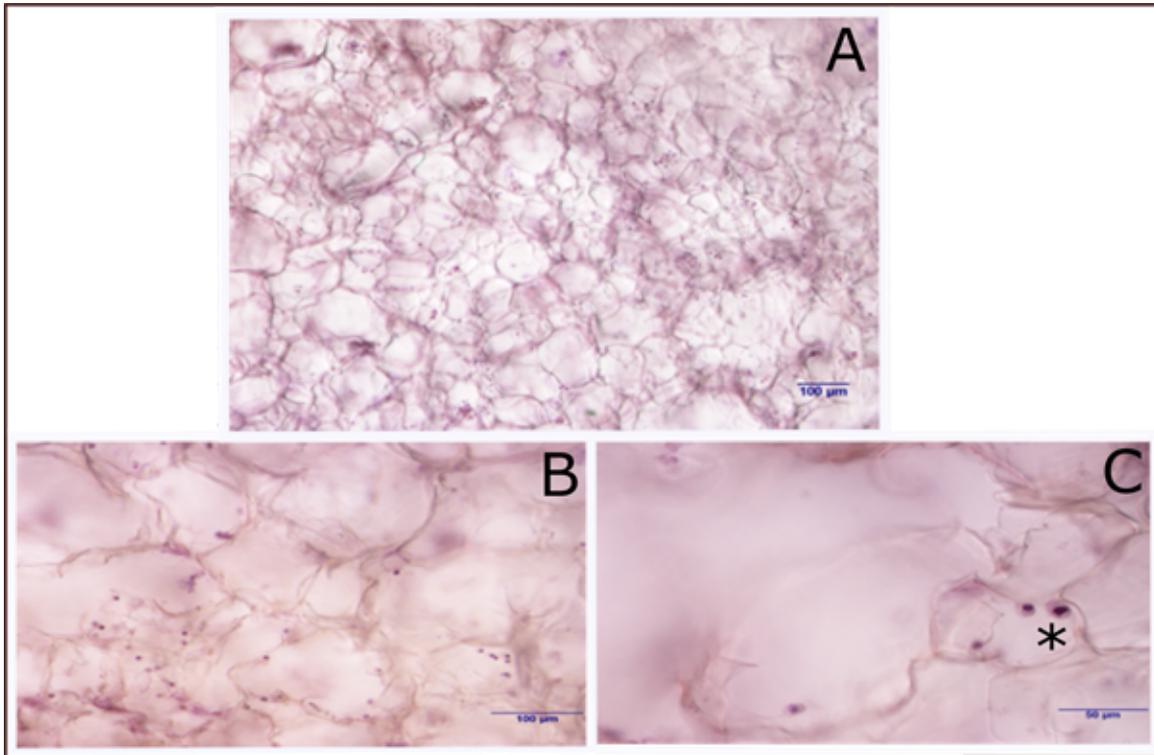


Figura 20: Poros del andamio de Ge/Ha después de 24 horas de ser cargado con células dendríticas, teñidas con hematoxilina y observado a distintos aumentos. (A) poros del andamio observado a 4x donde es posible apreciar células, (B) poros del andamio observados a 10x con células adheridas dentro de los poros, (C) poros del andamio observado a 40x, (\*) células dendríticas dentro y adheridas a la pared del poro.

Con el objetivo de evaluar si el andamio es citotóxico se realizó el ensayo de 7-AAD y Anexina V, el cual se basa en el uso de un colorante (7AAD), para verificar la integridad de la membrana plasmática, y una molécula relacionada con la detección de apoptosis (Anexina V). Para el estudio, se cultivaron esplenocitos en el andamio de Ge/HA durante 24 horas. Los resultados representativos del ensayo, se observan en la figura 21. En 21-A se muestra el control negativo, donde las células no fueron marcadas con 7-AAD ni con Anexina V. En la figura 20-B, se observa el control positivo de muerte celular formada por el cultivo de esplenocitos en medio de cultivo durante 24 horas, se observan cuatro poblaciones de células: viables (Fig. 21-B+) negativas para Anexina V y 7AAD; apoptóticas tempranas (Fig. 21-B-a) positivas a Anexina V y negativas a 7AAD; necróticas (Fig. 21-B-n) positivas para 7AAD y

negativas a Anexina V; y con franca apoptosis y necrosis (Fig. 21-B-na), las células positivas para la Anexina V y 7AAD. Se puede constatar cómo las células viables y las células apoptóticas son las más abundantes. Dado que se trata de una muestra de cultivo primario de bazo, la población de células apoptóticas corresponde a eritrocitos.

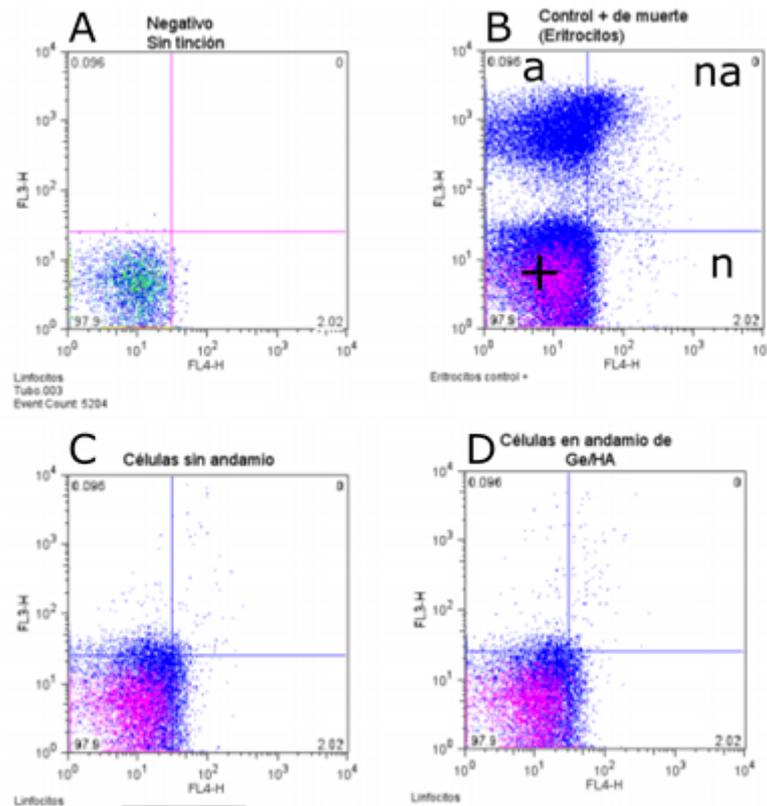


Figura 21: Ensayo de citotoxicidad. (A) control negativo sin 7ADD ni Anexina V., (B) Control positivo de muerte empleando cultivo primario de bazo, (+) población viable representada por linfocitos, (a) población apoptótica representada por eritrocitos, (na) células con franca apoptosis, (n) células necróticas., (C) Población de linfocitos cultivados en medio de cultivo. (D) Población de linfocitos cultivados con el andamio de Ge/HA.

En la figura 21-C, se muestra el control positivo de células viables, en donde se sembraron linfocitos de bazo en medio de cultivo durante 24 horas. En rosa se muestra el control negativo y en azul las células cultivadas durante 24 horas. Se observa que la población más abundante es la de células viables y sólo unas cuantas células son apoptóticas y necróticas. En la figura 21-D se observan las células de bazo sembrados en el andamio de Ge/HA durante 24 horas, se muestra un comportamiento muy similar a la figura 21-C donde la mayoría de las células son

viables y muy pocas son células apoptóticas, indicando que el andamio no produce citotoxicidad.

### Ensayo de liberación de proteína y degradación del andamio.

El ensayo de liberación de proteína permitió observar que los andamios Ge/HA/alb y Ge/HA/alb/H<sub>2</sub>O son capaces de liberar su carga de albúmina al ambiente durante su proceso de degradación (Fig. 22).

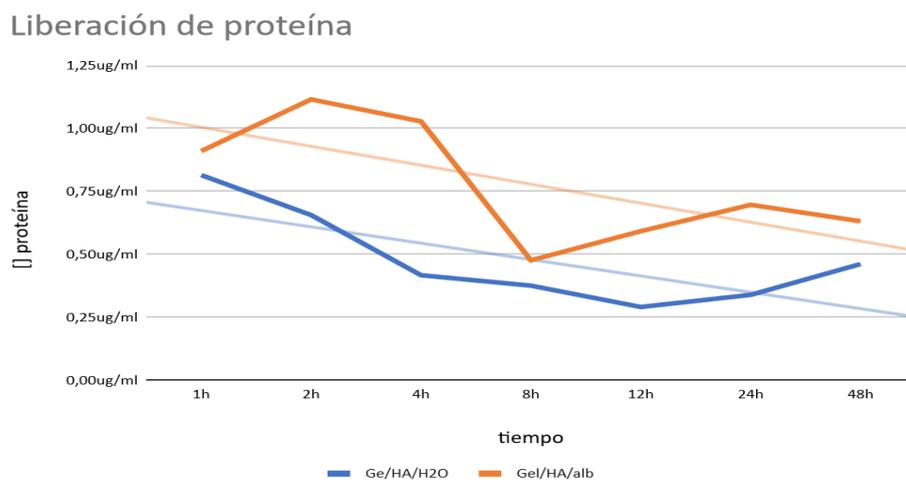


Figura 22: Liberación de proteína por los andamios Ge/HA/alb y Ge/HA/H<sub>2</sub>O sin graficar la liberación basal de gelatina y ácido hialurónico.

Los datos también nos permitieron observar el comportamiento de degradación del andamio Ge/HA en PBS, el cual se degradó de manera constante durante las 48 horas del ensayo (Fig. 23).

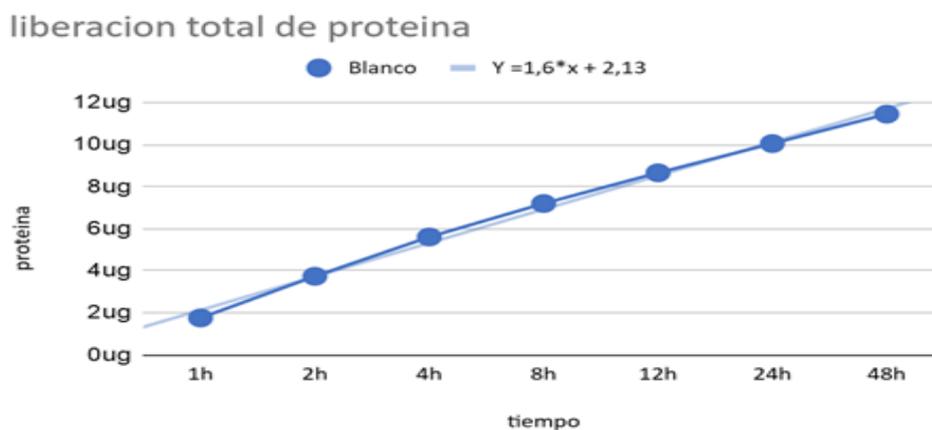


Figura 23: Liberación de proteína por andamios Ge/HA en el tiempo.

### Análisis histológico.

La degradación del andamio y la respuesta del organismo al andamio se observó hasta los 10 días después de su implantación en los ratones (grupo C), y se evaluó a distintos tiempos: 2, 4, 7 y 10 días, en el transcurso de este tiempo se apreció una respuesta inmune representada por la presencia de neutrófilos y macrófagos en el andamio desde el día 2, la cual persistió hasta el día 10, modificando la apariencia del andamio y el sitio de implantación (Fig. 25 a 32).

El grupo control o sham (grupo A) consistió en colocar una pequeña sutura en la piel dorsal de ratones C57BL/6. Se observó un ligero infiltrado alrededor de la sutura al segundo día después de haber aplicado la sutura (Fig. 24-A-B) y desapareció 4 días después (Fig. 24-C-D).

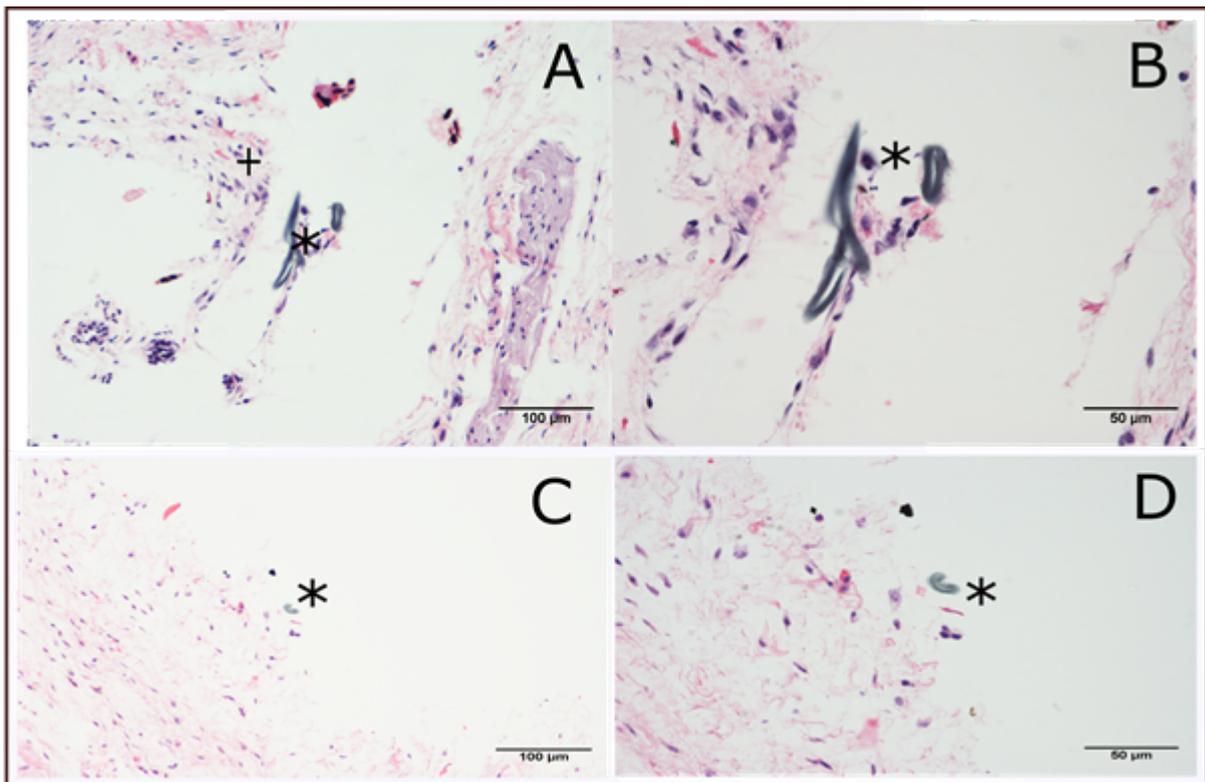


Figura 24: Sitio de sutura, día 2 y 4 después de aplicarla en la piel de ratones C57BL/6. Sitio de la sutura al día 2 observado a 10x (A) y 40x (B), (\*) fragmento de sutura e (+) infiltrado inflamatorio. Sitio de la sutura al día 4 observado a 10x (C) y 40x (D), (\*) fragmento de sutura.



Figura 25: Corte del tejido correspondiente al lugar de implantación del andamio, 2 días después de su implantación, conjunto de fotomicrografías a distintos aumentos 4x, 10x y 40x. (A) Zona que ocupa el andamio implantado en el tejido. (B) Fibras de andamio colonizadas por células. (C) Epidermis y dermis. (D) Hipodermis, panniculus carnosus. (E) Tejido conjuntivo, capa de tejido muerto y la formación de una cápsula que rodea a la cavidad en donde se localizó el andamio.

Desde el segundo día después de la implantación, se observó infiltrado inflamatorio en el espacio que ocupaba el andamio (Fig. 25-A), particularmente entre las fibras que lo formaban (Fig. 25-B). La epidermis y dermis (Fig. 25-C) no mostraron daños. En la hipodermis (Fig. 25-D) se encontró infiltrado inflamatorio, así como en la capa de tejido conjuntivo, donde es más abundante (Fig. 25-E). También se encontró una zona con abundantes células necróticas y tejido conjuntivo que formaron una pseudocápsula alrededor de la cavidad que contenía al andamio (Fig. 26-F-G).

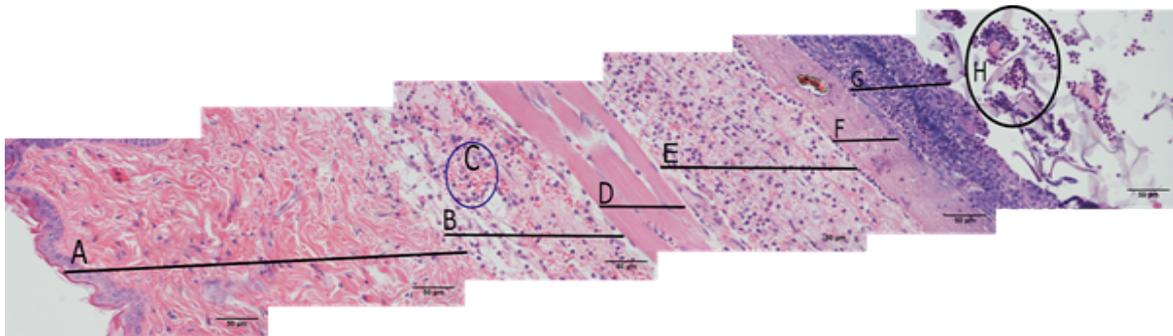


Figura 26: Sección de piel 2 días después de haberse implantado el andamio de Ge/HA, conjunto de fotomicrografías a 40x. (A) Epidermis y dermis. (B) Hipodermis. (C) Eritrocitos y leucocitos en la hipodermis. (D) Panniculus carnosus. (E) Tejido conjuntivo. (F) Sección de tejido muerto. (G) Pseudocápsula de tejido conjuntivo y (H) fibras del andamio pobladas por leucocitos.

En el caso de la epidermis y dermis (Fig. 25-C y Fig. 26-A), el epitelio se encontró normal, así como el tejido conjuntivo que forma la dermis. En la hipodermis (Fig. 26-B) se constató la presencia de múltiples neutrófilos y eritrocitos (Fig. 26-C), posiblemente resultado de la cirugía. Los ratones poseen una capa de músculo esquelético (Fig. 26-D) justo por debajo de la hipodermis llamada Panniculus carnosus, la cual no mostró cambios a este punto de la exposición al andamio. Enseguida, del músculo se encuentra tejido conjuntivo laxo con múltiples neutrófilos y algunos eritrocitos (Fig. 26-E), a continuación se puede ver una zona acidófila formada por tejido conjuntivo laxo (Fig. 26-F), junto con una región rica en neutrófilos y fibras de tejido conjuntivo posiblemente fibrina (Fig. 26-G) que en conjunto forman la pseudocápsula que rodea al andamio (Fig. 26-F-G). Finalmente, junto a la pseudocápsula de tejido conjuntivo, se distinguió la aglomeración de múltiples neutrófilos que están en contacto con los restos del andamio y fibras de apariencia basófila que posiblemente corresponda al andamio de Ge/HA (Fig. 26-H).

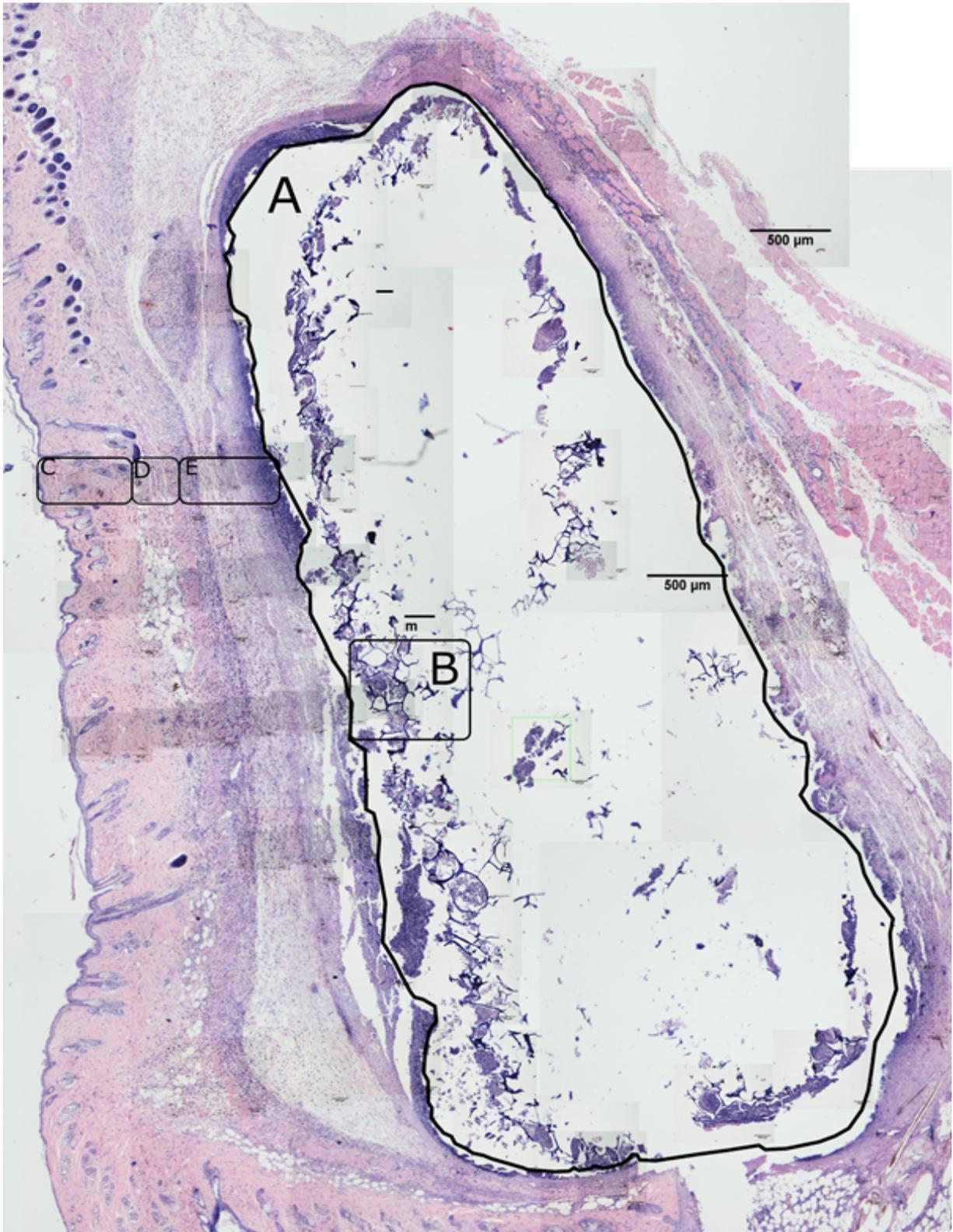


Figura 27: Extensión de tejido correspondiente al lugar de implantación del andamio, 4 días después de su implantación, conjunto de fotomicrografías a distintos aumentos 4x, 10x y 40x. (A) Zona que ocupa el andamio implantado en el tejido. (B) Fibras del andamio colonizadas por células. (C) Epidermis y dermis. (D) Hipodermis, panniculus carnosus. (E) Tejido conjuntivo, región de tejido necrótico y pseudocápsula que rodea a la cavidad en donde se encuentra el andamio.

Cuatro días después de la implantación del andamio, fue posible distinguir un mayor infiltrado inflamatorio en las fibras del andamio (Fig. 27-B), además la pseudocápsula que rodea la cavidad en donde se encuentra el andamio sufrió un engrosamiento (Fig. 27-E). La epidermis y la dermis no mostraron cambios aparentes (Fig. 28-A). Mientras que en las regiones, correspondiente a la hipodermis (Fig. 28-B), panniculus carnosus (Fig. 28-C) y tejido conjuntivo (Fig. 28-D), se pudo observar la persistencia y el incremento en la densidad celular, principalmente de neutrófilos y fibroblastos, junto con la desaparición de los signos de hemorragia apreciables en el día 2 (Fig. 26-C y E).

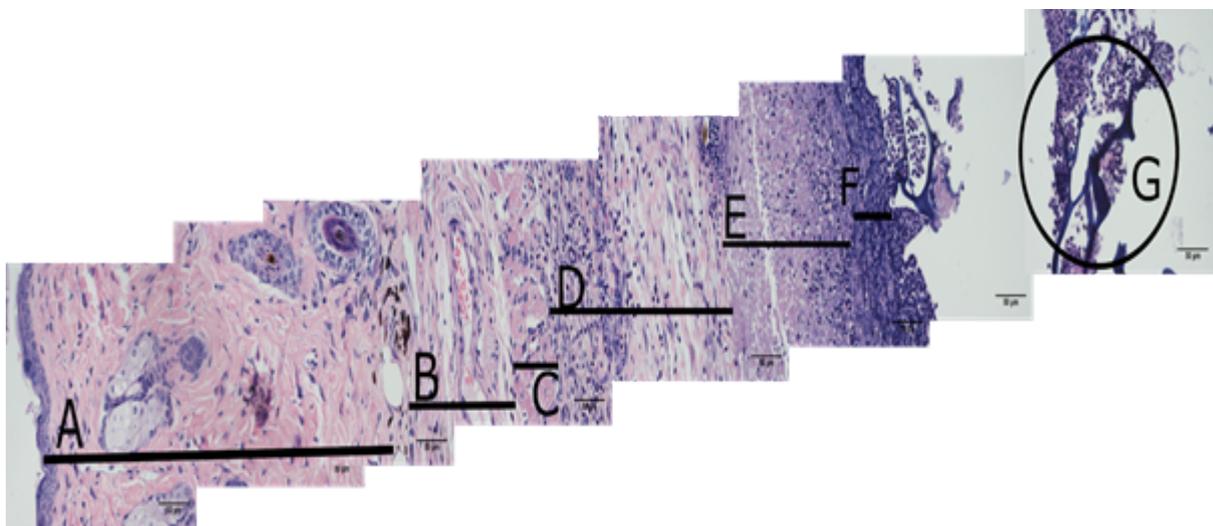


Figura 28: Sección de piel 4 días después de haberse implantado el andamio conjunto de fotomicrografías 40x. (A) Epidermis y dermis. (B) Hipodermis. (C) Panniculus carnosus. (D) Tejido conjuntivo. (E) Sección de tejido necrótico. (F) Pseudocápsula de tejido conjuntivo. (G) Fibras del andamio pobladas por leucocitos.

En esta etapa también es evidente la presencia de una pseudocápsula formada por tejido conjuntivo y células muertas (Fig. 28-E) junto a una aglomeración de neutrófilos y fibras de tejido conjuntivo (Fig. 28-F), más grande que la observada al día 2 después de haberse colocado el andamio (Fig. 26-F y G). Al igual que en el día 2, el andamio se observó completamente rodeado por la pseudocápsula de tejido conjuntivo (Fig. 27-A) y con una mayor cantidad de células fagocíticas, como neutrófilos y macrófagos asociadas a las fibras del andamio de Ge/HA (Fig. 28-G).

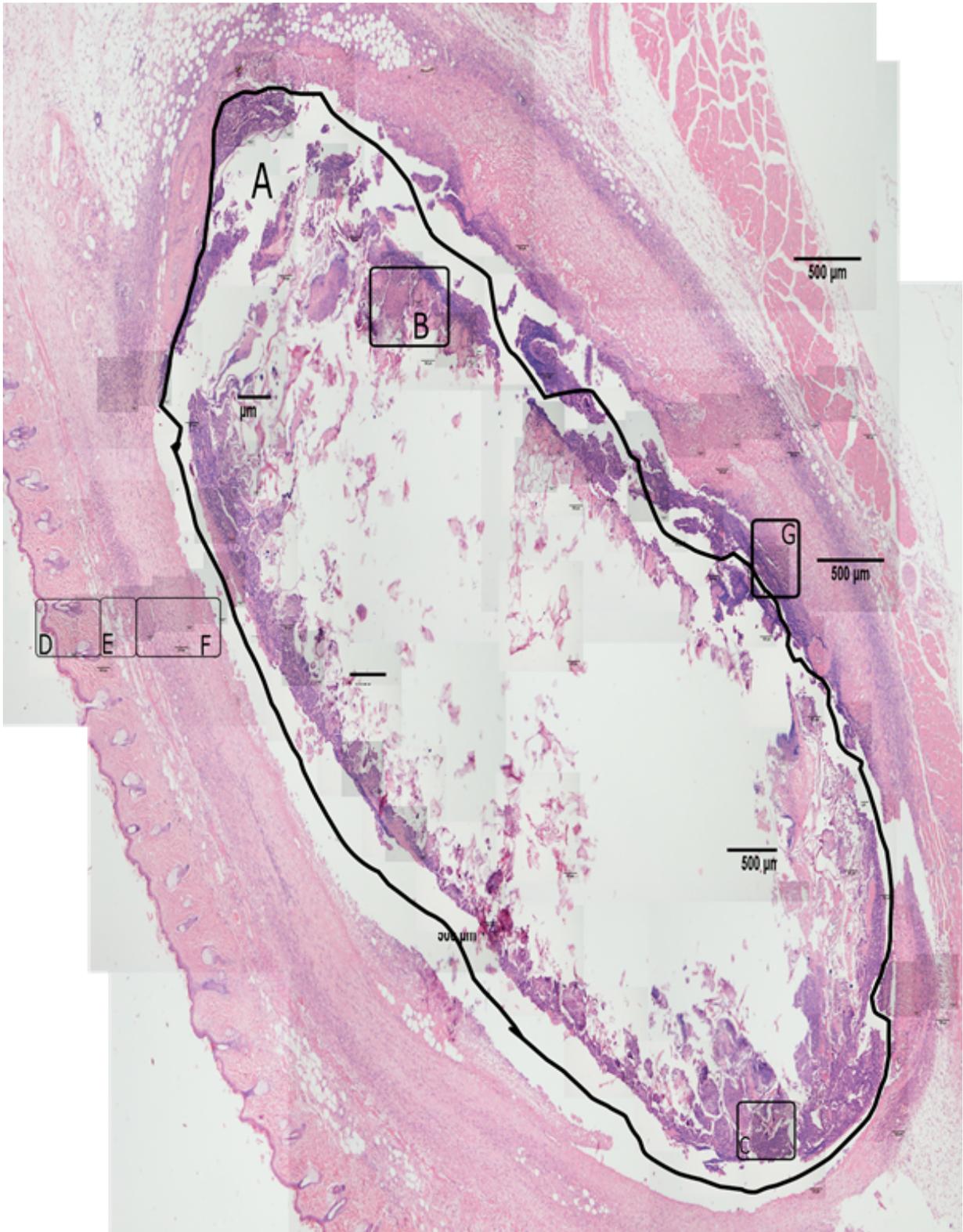


Figura 29: Extensión de tejido correspondiente al lugar de implantación del andamio, 7 días después de su implantación, conjunto de fotomicrografías a distintos aumentos 4x, 10x y 40x. (A) Zona que ocupa el andamio implantado en el tejido. (B) Área con células muertas dentro del andamio. (C) Fibras del andamio colonizadas por células. (D) Epidermis y dermis. (E) Hipodermis y panniculus carnosus. (F) Tejido conjuntivo y región de tejido necrótico y (G) pseudocápsula que rodea a la cavidad en donde se encontraba el andamio.

En el séptimo día después de la implantación del andamio se destaca la continua presencia de infiltrado celular (Fig. 29-C) así como crecientes áreas de muerte celular (Fig. 29-B). Al igual que los días 2 y 4, la epidermis y dermis (Fig. 30- A) se muestran sin cambios aparentes. Cabe señalar una menor presencia de infiltrado inflamatorio en la hipodermis, panniculus carnosus (Fig. 30-B) y tejido conjuntivo (Fig. 30-C) en comparación con los días 2 y 4 después de haber sido implantado el andamio.

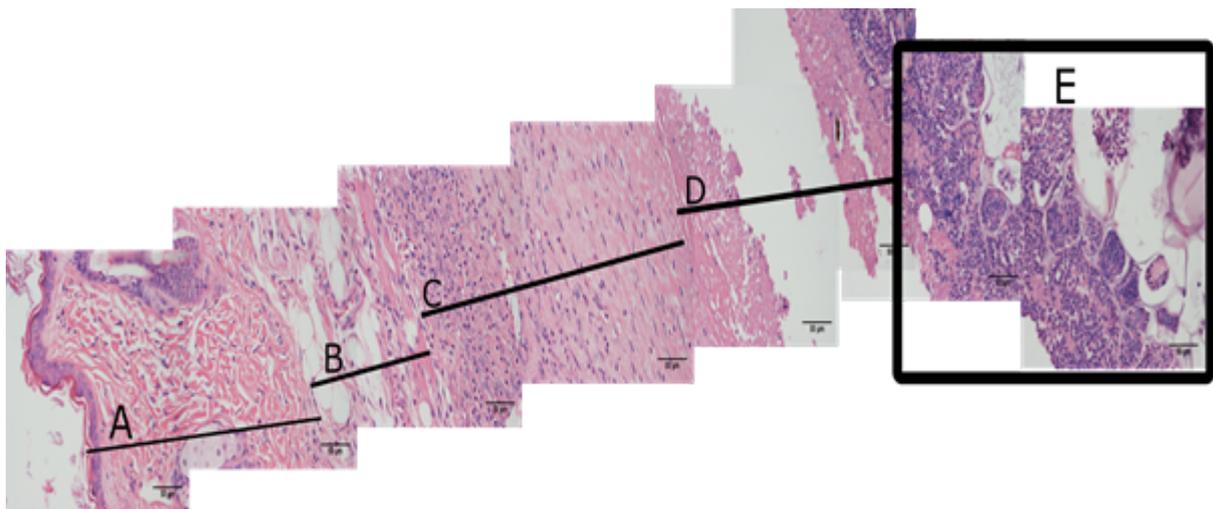


Figura 30: Sección de piel 7 días después de haberse implantado el andamio, conjunto de fotomicrografías a 40x. (A) Epidermis y dermis. (B) Hipodermis. (C) Tejido conjuntivo. (D) Sección de tejido necrótico y (E) fibras del andamio pobladas por leucocitos.

Asimismo, la región caracterizada por la presencia de células muertas es menor que la observada a los 2 y 4 días (Fig. 30-D), aunque sigue presente la pseudocápsula de tejido conjuntivo alrededor del andamio, no se observan los residuos de fibrina presentes en el día 4 después de haber sido colocado el andamio (Fig. 28-F y Fig. 30-D). En las fibras del andamio destaca la presencia de infiltrado inflamatorio, formado por neutrófilos y macrófagos, cada vez más abundante entre sus poros, junto con abundantes restos celulares (Fig. 30-E).

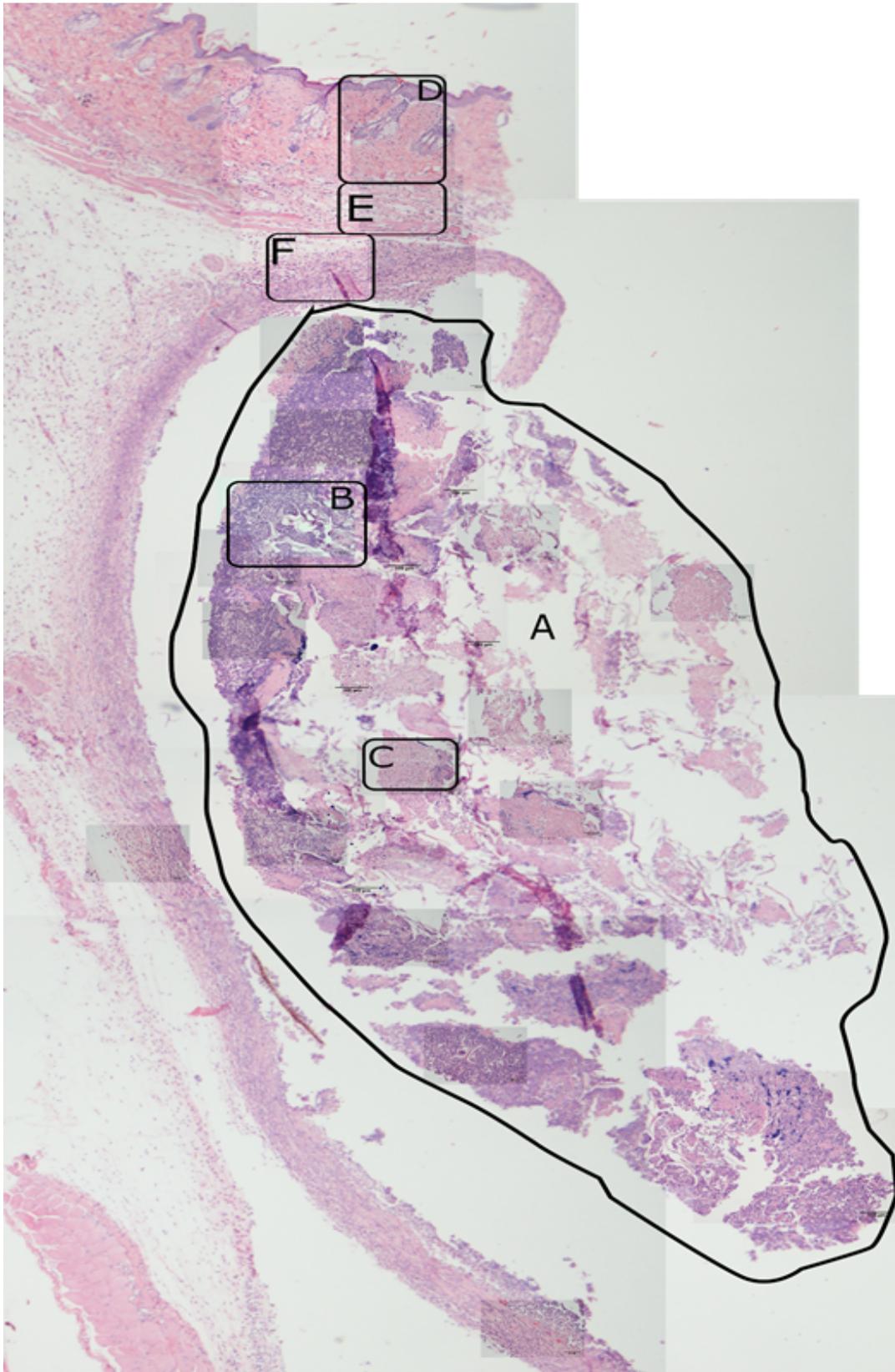


Figura 31: Extensión de tejido correspondiente al lugar de implantación del andamio, 10 días después de su implantación, conjunto de fotomicrografías a distintos aumentos 4x, 10x y 40x. (A) Zona que ocupa el andamio implantado en el tejido. (B) Fibras del andamio colonizadas por células. (C) Área con células muertas dentro del andamio. (D) Epidermis y dermis. (E) Hipodermis y panniculus carnosus. (F) tejido conjuntivo y pseudocápsula.

Para el décimo día después de la implantación, la epidermis y dermis (Fig. 31-D) persistieron sin afectaciones, las fibras del andamio eran visibles y se encontraban aún rodeadas por la pseudocápsula de tejido conjuntivo (Fig. 31-A), sin embargo ésta se encontraba considerablemente reducida (Fig. 31-F). También se observó un reducido infiltrado inflamatorio desde la epidermis hasta la pseudocápsula de tejido conjuntivo (Fig. 32-B y C). Tampoco fue posible apreciar las fibras de fibrina, ni una extensión considerable de tejido muerto (Fig. 32-C). Por otro lado, cabe destacar la presencia de cúmulos de células muertas en el interior del andamio (Fig. 31-C y Fig. 32-E), así como infiltrado inflamatorio compuesto por neutrófilos y macrófagos (Fig. 32-D). Parte del andamio desapareció, pero permanecieron remanentes, principalmente en la periferia junto a la pseudocápsula de tejido conjuntivo y en la región central del andamio.

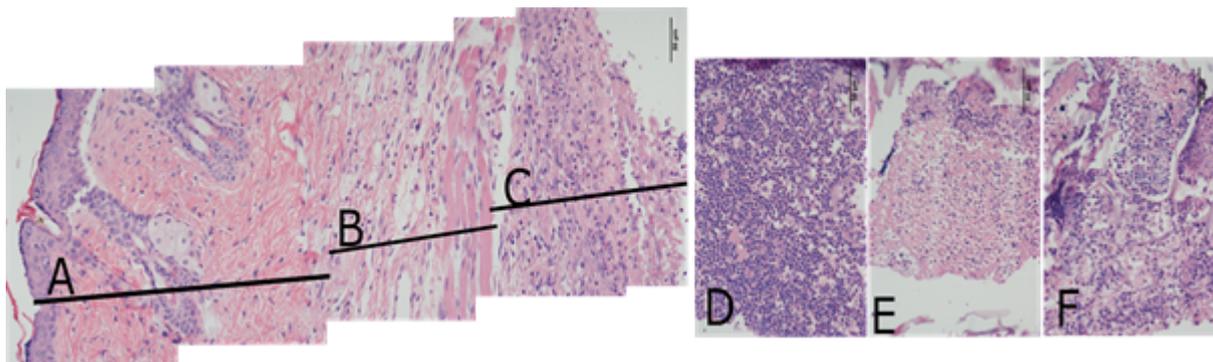


Figura 32: Sección de piel 10 días después de haberse implantado el andamio, conjunto de fotomicrografías a 40x. A) Epidermis y dermis. (B) Hipodermis. (C) Tejido conjuntivo. (D) Fibras del andamio colonizadas por células. (E) Área con células muertas dentro del andamio y (F) fibras del andamio.

### **Crecimiento tumoral y análisis histológico del estroma tumoral.**

El tamaño tumoral junto con su tasa de crecimiento (Fig. 33) se encontró considerablemente reducido en ratones tratados con el andamio de Ge/HA (grupo D), en comparación con ratones con melanoma sin tratamiento (grupo B).

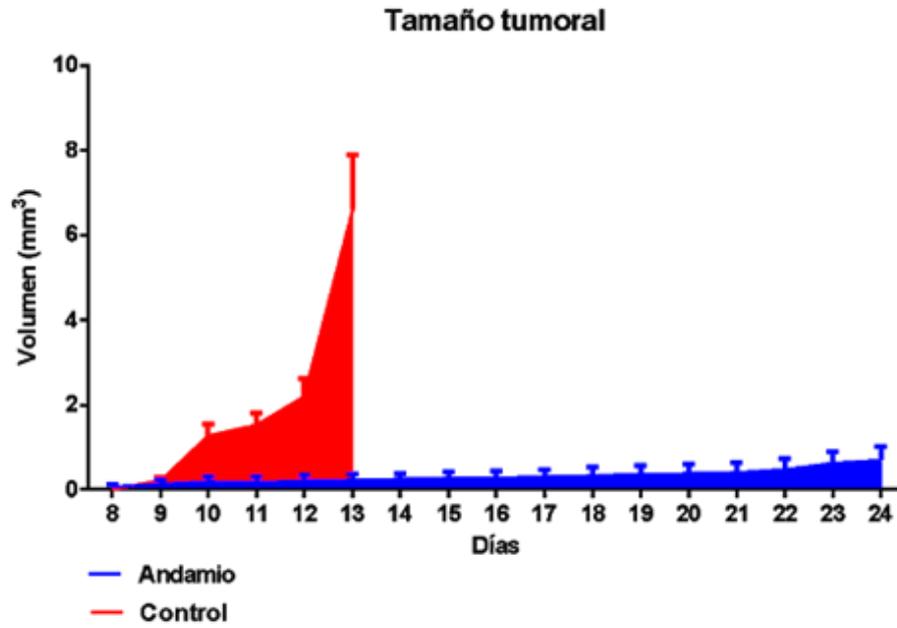


Figura 33: Gráfica de crecimiento tumoral de ratones con melanoma sin tratamiento o tratados con el andamio de Ge/HA.

En las preparaciones histológicas de tumores es clara la diferencia en el tamaño del estroma tumoral entre los ratones tratados con el andamio (Fig. 34) y los ratones con melanoma sin tratamiento (Fig. 35).

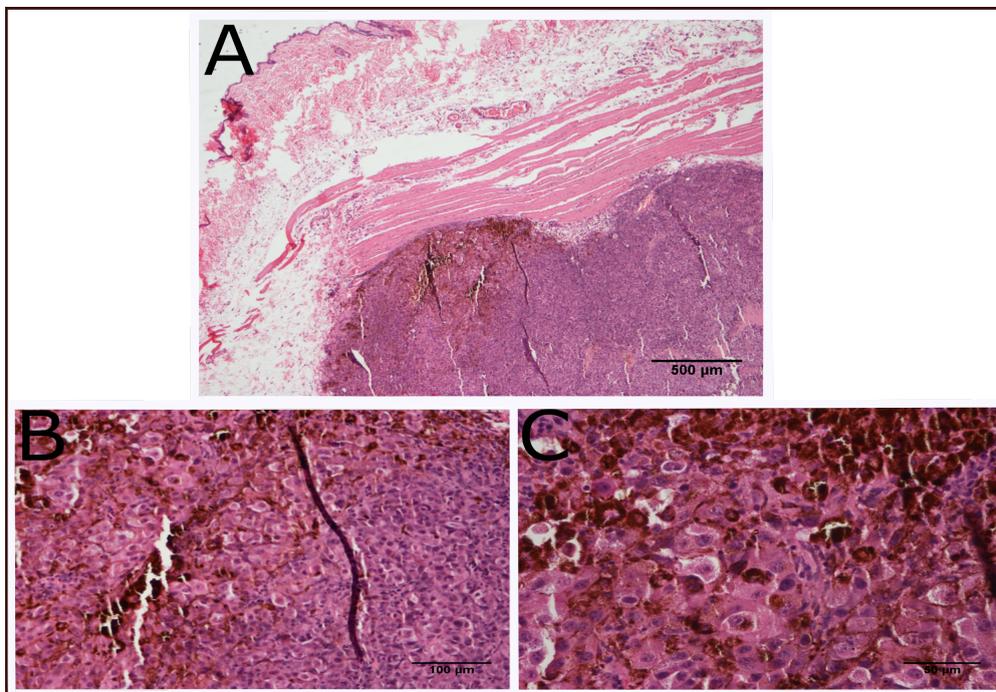


Figura 34: Fotomicrografías del estroma tumoral de ratones tratados con el andamio de Ge/HA. H y E. A- 4X , B- 10X y C- 40X.

Los ratones tratados con el andamio de Ge/HA mostraron tumores reducidos y limitados a la hipodermis (Fig. 34), mientras que ratones con melanoma que no recibieron un tratamiento, mostraron un estroma mucho más grande caracterizado por la presencia de abundantes células epiteliales basófilas rodeando múltiples vasos sanguíneos (Fig. 35).

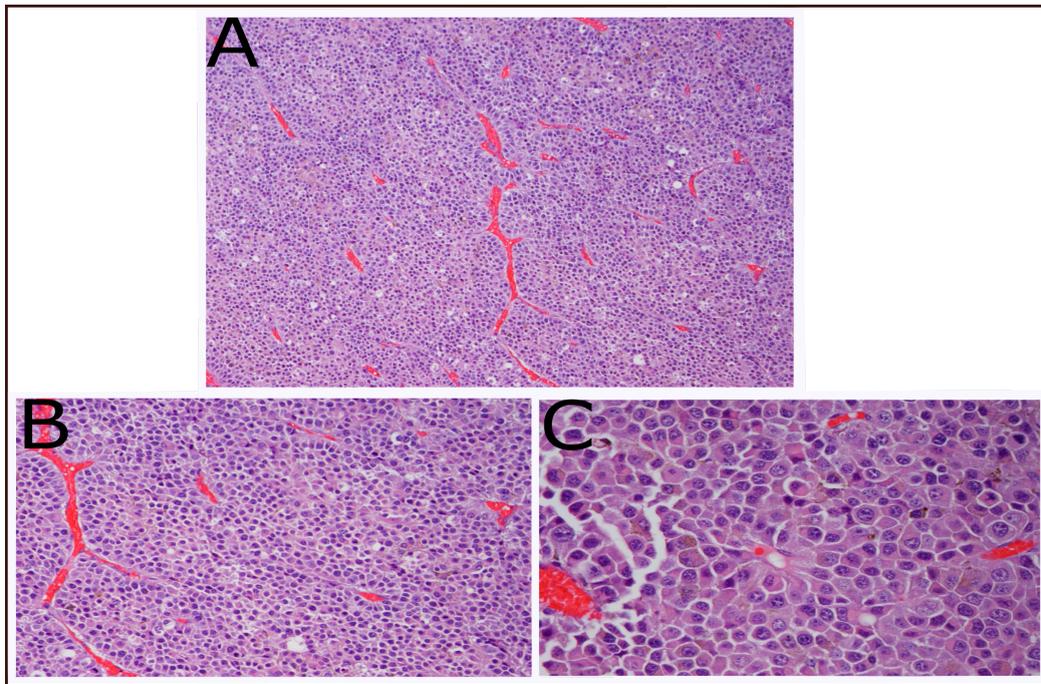


Figura 35: Fotomicrografías del estroma tumoral de ratones sin tratamiento. H y E. A- 4X, B 10X y C- 40X.

### Discusión.

En la presente investigación se propuso el uso de un andamio de Ge/HA para emplearse como tratamiento contra el melanoma murino. Se constató que el andamio no es tóxico en esplenocitos y puede degradarse de forma continua de acuerdo a estudios *in vivo* e *in vitro*. Es de notar que el andamio fue capaz de disminuir la tasa de crecimiento tumoral en ratones con melanoma. Es posible que la disminución del tamaño tumoral se haya debido a la migración de leucocitos, principalmente neutrófilos y macrófagos, atraídos por el andamio. El andamio de Ge/HA demostró la capacidad de generar una respuesta inmune sostenida, al menos durante los diez días observados, mediante el reclutamiento de células del

sistema inmune a su interior, sin presentar una respuesta citotóxica aparente. La respuesta inmune estimulada por el andamio parece disminuir el tamaño tumoral en el tiempo. La capacidad de estimular el sistema inmune puede estar relacionada con la liberación constante de las proteínas de gelatina y ácido hialurónico por parte del andamio, las cuales son las encargadas de reclutar células al interior del andamio. Las células a su vez producen moléculas proinflamatorias capaces de generar un microambiente proinflamatorio que modula positivamente el sistema inmune.

Los componentes del andamio, el ácido hialurónico y la gelatina, pueden individualmente fomentar la viabilidad celular al presentar señales de reconocimiento nativas de la matriz extracelular (Camci-Unal *et al.* 2013; Chato *et al.* 2018), sin embargo es de denotar que su uso conjunto genera un material con características superiores a sus componentes, ambos aumentando la cantidad de señales de reconocimiento junto con características mecánicas que lo adecuan a su implantación a un ambiente fisiológico. Así, en 2014 Shabafrooz *et al.*, encontró que la adición de ácido hialurónico en la construcción de andamios de gelatina-colágeno aumentó su biofuncionalidad, promoviendo el incremento en la migración de las células al interior del andamio y en la viabilidad celular. En el caso de nuestro andamio, sus componentes, particularmente el ácido hialurónico, facilitó la retención de líquidos y nutrientes que promovieron la migración, entrada y establecimiento de diversas poblaciones celulares (Vasilescu *et al.*, 2011; Arellano, 2014). El método de fabricación de nuestro andamio, por liofilización, también es relevante, dado que durante el proceso de congelación, la formación de cristales de agua generan poros interconectados, que por medio de la liofilización la cual retira el agua de los andamios manteniendo los poros en la estructura del andamio. Nuestro andamio se caracterizó por presentar abundantes poros, los cuales fomentaron el establecimiento celular junto con la circulación de oxígeno y nutrientes (Lien *et al.*, 2009; Vasilescu *et al.*, 2011), hecho que ha sido constatado por Lien *et al* en 2009, cuando observó que la cantidad y tamaño de los poros en un andamio de gelatina está íntimamente relacionado con la proliferación celular y la producción de la

matriz, además de incrementar la capacidad del andamio para contener agua dentro de su estructura.

La alta capacidad de ambos la gelatina y el ácido hialurónico de interactuar con el agua en combinación con su solubilidad en la misma, los hace susceptibles a la degradación, por ello es necesario el uso de agentes entrecruzantes como el EDC, el cual, promueve resistencia a la degradación, manteniendo en el andamio la capacidad de recibir el establecimiento celular y la carencia de citotoxicidad generada por el andamio (Choi *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2011; Arellano. 2014; Jarquín. 2016). En nuestro trabajo, se constató que el andamio de Ge/HA podía observarse diez días después de haberse insertado en la dermis de ratones con melanoma, por lo que el entrecruzamiento con EDC logró que los componentes del andamio se liberarán poco a poco. Con base en lo anterior, la gelatina y el ácido hialurónico, otorgaron al andamio una buena compatibilidad biológica, dado que en el caso de la gelatina, contiene sitios de unión RGD, que son secuencias de tripéptidos (arginina/glicina/ácido aspártico) que regulan la adhesión de las células a la matriz extracelular principalmente a través de integrinas (Lien *et al.*, 2009; Ruoslahti, 1996). Adicionalmente, las células son capaces de reconocer al ácido hialurónico mediante una variedad de receptores entre los cuales destacan CD44, TLR4 y RHAMM, que están presentes en la mayoría de las células murinas y humanas, promoviendo la activación de la respuesta inmune innata al interactuar con formas específicas del ácido hialurónico, particularmente fragmentos de peso bajo molecular, los cuales pueden formarse durante la degradación del ácido hialurónico (Jiang *et al.*, 2011; Litwiniuk *et al.* 2016); fenómeno que ha sido estudiado y reportado por diversos autores entre ellos, Alaniz *et al* en 2011 quien encontró que al exponer células dendríticas a fragmentos de bajo peso molecular de ácido hialurónico, se generaba la maduración y activación de estas células junto con el incremento de citocinas proinflamatorias como IL-12 e IL-11. Es a partir de esto, que podríamos asumir que el infiltrado inmune encontrado dos días después de haber colocado el andamio, está relacionado con una respuesta inflamatoria aguda generada por la incisión e implantación del andamio, lo cual también concuerda con lo encontrado por Hong *et al.* 2004, quien realizó estudios similares en ratas usando

andamios compuestos de gelatina y ácido hialurónico. Asimismo, podemos inferir que el subsecuente infiltrado inflamatorio y su prevalencia se debe a la liberación de moléculas por la degradación del andamio, ya que para el día cuatro post implantación, el infiltrado celular prevaleció y aumentó, observándose un continuo reclutamiento de leucocitos al andamio, por lo que también es posible que el andamio haya inducido la producción de citocinas proinflamatorias por estos leucocitos. En el caso del séptimo día post implantación del andamio, el infiltrado celular comenzó a disminuir, probablemente debido a la pérdida en concentración del ácido hialurónico. Además, junto con ello se observaron regiones de células necróticas formadas por los remanentes de leucocitos que migraron los primeros días después de implantado el andamio, junto con regiones de infiltrado inflamatorio viable compuesto principalmente de macrófagos y neutrófilos, indicativo de varios fenómenos: células previamente establecidas en combinación con la presencia de células vivas sugiriendo un recambio en el infiltrado celular, la prevalencia del reclutamiento celular y la continua producción de citocinas pro inflamatorias. Para el día diez post implantación, aún fue posible observar fragmentos del andamio, las secciones de muerte celular aumentaron, y el infiltrado celular que aunque persiste, disminuyó en concentración. Es de destacar que la persistencia del infiltrado y la presencia de fragmentos del andamio diez días después de haber sido implantado, señalan que el andamio fue capaz de estimular al sistema inmune hasta por 10 días sin concluir su efecto y degradación; manteniendo una respuesta inmunológica innata, y donde muy probablemente se liberaron múltiples citocinas proinflamatorias.

Los principales leucocitos reclutados por el andamio fueron neutrófilos, los cuales en contacto con fragmentos del andamio, particularmente de ácido hialurónico, es posible que lo hayan detectado como señal de daño mediante CD44 y TLR2 y 4, lo cual iniciaría la migración de neutrófilos al andamio (Jiang *et al.*, 2011), además de la producción de citocinas pro inflamatorias como IL-8, IFN-gamma, G-CSF, así como las quimiocinas CC, relacionando a los neutrófilos con el reclutamiento de células naturales asesinas, células dendríticas y principalmente macrófagos. Éstos últimos fueron el segundo grupo celular más abundante dentro del andamio y su presencia en un ambiente proinflamatorio, generado por las señales del andamio y

las moléculas proinflamatorias de los neutrófilos, los predispone a liberar TNF-alfa, G-CSF, GM-CSF, induciendo la activación de más neutrófilos, así como la inhibición en la apoptosis de los leucocitos (Selders *et al.*, 2017). Al mismo tiempo, los macrófagos al haber reconocido al andamio, es posible que generarán IL-1, IL-6, IL-12, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico aumentando al microambiente proinflamatorio en el andamio (Cruvinel *et al.*, 2010). Es este microambiente inflamatorio generado a partir del reconocimiento del ácido hialurónico como señales de daño, el cual inicia una respuesta inmune que fue capaz de reducir la progresión tumoral y aumentar la sobrevida en los ratones con melanoma tratados con el andamio, nuestro grupo experimental (grupo D). Este tipo de fenómeno, también fue observado en el trabajo de Ali *et al* en 2009, quien fabricó un material capaz de programar células dendríticas *in situ* mediante el uso de antígenos tumorales, GM-CSF y secuencias de DNA bacteriano, obteniendo resultados similares a los nuestros. La principal diferencia con el trabajo realizado por Alí, es que nuestro andamio no necesitó de ninguna molécula adicional para generar una respuesta inmune. Por otro lado, Alaniz *et al.* en 2011 estudió el efecto de células dendríticas cargadas con lisado tumoral y tratadas con ácido hialurónico de bajo peso molecular en cáncer colorrectal, encontrando que el ácido hialurónico aumentó las capacidades de migración y de inmunidad en células dendríticas y células T. El hecho de que en ese estudio se haya empleado ácido hialurónico es muy importante, dado que en el presente trabajo, el sitio en donde se implantó el andamio contiene células dendríticas residentes que bien pudieron madurar *in situ* al entrar en contacto el andamio, ya sea por el reconocimiento de los fragmentos de ácido hialurónico o su reclutamiento por señales proinflamatorias producidas por los leucocitos en el andamio. Por lo que es muy probable que además de los neutrófilos y macrófagos observados, también las células dendríticas residentes hayan sido estimuladas; lo que nos lleva a considerar una activación completa del sistema inmune, ya que las células dendríticas son las principales células implicadas en la activación de linfocitos T.

La respuesta inmune inducida por el andamio se reflejó en la tasa de crecimiento tumoral y en el análisis histológico de los tumores de los ratones con melanoma. En

el caso del crecimiento tumoral, este fue mucho menor en los ratones tratados con el andamio que los ratones con melanoma sin tratamiento, mientras que los cortes histológicos del estroma tumoral de los ratones tratados con el andamio presentaban características como una baja cantidad de células tumorales y vastas áreas de tejido necrótico, una tinción acidófila, indicativo de muerte celular, cosa que concuerda con el estudio de Thambi, *et al.* en 2019 quien generó un gel inyectable de ácido hialurónico cargado con sustancias activas capaces de eliminar cáncer y estudió el efecto en la histología de los tumores entre otras variables. Así, nuestros resultados indican que el andamio fabricado de gelatina y ácido hialurónico es capaz de generar un microambiente proinflamatorio que activa el sistema inmune generando una respuesta antitumoral, sin la necesidad de estar cargado con moléculas bioactivas adicionales.

## **Conclusión.**

El presente estudio demostró que un andamio liofilizado de gelatina y ácido hialurónico tiene la capacidad de reclutar leucocitos y activar el sistema inmune actuando como un inmunoestimulador no específico durante al menos diez días, evitando una reacción de rechazo citotóxica en el individuo y reduciendo el crecimiento tumoral. El andamio demuestra potencial para ser cargado con citocinas adyuvantes, fármacos o antígenos para mejorar su eficacia.

## **Bibliografía:**

1. -ABC.jpg (JPEG Imagen, 432 × 524 píxeles). (n.d.). Recuperado Oct 10, 2020, de: <https://3.bp.blogspot.com/-U7oPDt7SaBY/WDkiddHYs4I/AAAAAAAAA-SM/01OBERY7aEAqFNqtSYYbf-V5wXXZ4GZxgCLcB/s1600/ABC.jpg>.
2. -Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: *Redefining Its Role*. *Cells*, 9(7), 1743. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>.
3. -Abdullaeva, Z. (2017). Properties of Biomaterials. *In Nano- and Biomaterials*, 209–238. <https://doi.org/10.1002/9783527807024.ch8>.

4. -Acosta, A., Fierro, E & Velásquez, E. (2009). Melanoma: Patogénesis, clínica e histopatología. *Rev Asoc Col Dermatol.* 17, 87-108.  
<https://revistasocolderma.org/articulo-revista/melanoma-patogenesis-clinica-e-histopatologia>.
5. -Alaniz, L., Rizzo, M., Garcia, M., Piccioni, F., Aquino, B., Malvicini, M., Atorrasagasti, C., Bayo, J., Echeverria, I., Sarobe, P & Mazzolini, G. (2011). Low molecular weight hyaluronan preconditioning of tumor-pulsed dendritic cells increases their migratory ability and induces immunity against murine colorectal carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(10), 1383–1395. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1036-0>.
6. -Ali, A., Huebsch, N., Cao, L., Dranoff, G., & Mooney, J. (2009). Infection-mimicking materials to program dendritic cells in situ. *Nature Materials*, 8(2), 151–158. <https://doi.org/10.1038/nmat2357>.
7. -Antigen Processing and Presentation. (2014). In *Primer to the Immune Response*, 61–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385245-8.00007-8>.
8. -Arellano, R. M. (2014). Construcción de andamios de gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con distintas concentraciones de edc (n-(3-dimetilaminopropil)-n-etilcarbodiimida) (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
9. -Aris, M. (2009). Origen del melanocito normal y maligno. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 43(3), 333-337. <http://hdl.handle.net/11336/20625>.
10. -Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., & Lee, S.H. (2020). Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26(2), 164–180. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0256>.
11. -Benítez, D. (2018). Inmunoterapia celular para modular la respuesta inflamatoria. *CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd)*. 35-43.  
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwiK6fGqjKHwAhUFRqwKHRU5Br4QFjAAegQIAxAD&url=https%3A%2F%2Fwww.esteve.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2018%2F01%2F136930.pdf&usg=AOvVaw2GclF9kFIXnAkR6Xu8dezp..>
12. -Berraondo, P., Minute, L., Ajona, D., Corrales, L., Melero, I., & Pio, R. (2016). Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. *Immunological Reviews*, 274(1), 290–306. <https://doi.org/10.1111/imr.12464>.
13. -Borzacchiello, A., Russo, L., Malle, B. M., Schwach-Abdellaoui, K., & Ambrosio, L. (2015). Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *BioMed Research International*, 2015, 871218. <https://doi.org/10.1155/2015/871218>.
14. -Bucio, L. (2017). Caracterización de exosomas derivados de células dendríticas de médula ósea estimulada con antígenos de melanoma (tesis de

- Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- 15.-Camacho, C. P., Gerson, R., Góngora, M. D. Á., Villalobos, A., Blanco, Y. C., & López, O. (2017). Actualidades para el tratamiento del melanoma metastásico, estado del arte. *Trabajo de Revisión*, *62(3)*, 196–207. <https://biblat.unam.mx/es/revista/anales-medicos-mexico-d-f/articulo/actualidades-para-el-tratamiento-del-melanoma-metastastico-estado-del-arte>.
  - 16.-Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D., & Khademhosseini, A. (2013). Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*, *14(4)*, 1085–1092. <https://doi.org/10.1021/bm3019856>.
  - 17.-Castrillón, L., Palma, A., & Padilla, C. La función inmunológica de la piel. *Dermatología Rev Mex*. *2008;52(5):211-224*. [https://www.researchgate.net/publication/286655181\\_The\\_immune\\_function\\_of\\_skin](https://www.researchgate.net/publication/286655181_The_immune_function_of_skin).
  - 18.-Chato, A., Durand, D., García, O., Sánchez, D., Díaz, M., Albadalejo, V., Irastorza, A., Campos, F., & Garzón, I. (2018). Hidrogeles de gelatina entrecruzados para aplicaciones en Ingeniería Tisular. *Un estudio preliminar. Actualidad médica, ISSN 0365-7965*, 9-12. <https://doi.org/10.15568/am.2018.803.or02>.
  - 19.-Chantre, C. O., Gonzalez, G. M., Ahn, S., Cera, L., Campbell, P. H., Hoerstrup, S. P., & Parker, K. K. (2019). SUPPORTING INFORMATION Porous Biomimetic Hyaluronic Acid and Extracellular Matrix Protein Nanofiber Scaffolds for Accelerated Cutaneous Tissue Repair. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *11(49)*, 45498–45510. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b17322>.
  - 20.-Chen, G., Bodogai, M., Tamehiro, N., Shen, C., & Dou, J. (2018). Cancer immunotherapy: *Theory and application. Journal of Immunology Research*. <https://doi.org/10.1155/2018/7502161>.
  - 21.-Choi, Y. S., Hong, S. R., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Nam, Y. S. (1999). Studies on gelatin-containing artificial skin: II. Preparation and characterization of cross-linked gelatin-hyaluronate sponge. *Journal of Biomedical Materials Research*, *48(5)*, 631–639. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:5<631::AID-JBM6>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:5<631::AID-JBM6>3.0.CO;2-Y).
  22. -Clark, W. H. J., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, *15(12)*, 1147–1165. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(84\)80310-X](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(84)80310-X).
  23. -Clark, W. H. J., & Tucker, M. A. (1998). Problems with lesions related to the development of malignant melanoma: common nevi, dysplastic nevi,

- malignant melanoma in situ, and radial growth phase malignant melanoma. *Human Pathology*, 29(1), 8–14. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(98\)90384-7](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(98)90384-7).
- 24.-Corado, J. (2005). Células dendríticas, respuesta inmunitaria y señales de peligro. *Gaceta Médica de Caracas*, 113(4), 474–484. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0367-4762200500040004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-4762200500040004&lng=es&nrm=iso&tlng=es).
- 25.-Cruvinel, W. de M., Mesquita, D. J., Araujo, J. A. P., Catelan, T. T., de Souza, A. W. S., da Silva, N. P., & Andrade, L. E. C. (2010). Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(4), 434–461. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>.
- 26.-Cuéllar, S. (2018). Perspectivas de la inmunoterapia del cáncer. *Panorama Actual Med*, 42(412), 273–303. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6449050>..
- 27.-Cutuli, M, T. (2018). La compleja interacción entre el sistema inmunitario y células tumorales. *Anales de la Real Academia de Doctores, ISSN 1138-2414*, 3(3), 348-365. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6858375>.
- 28.-de León, J., & Pareja, A. (2018). Inmunología del cáncer I: bases moleculares y celulares de la respuesta inmune antitumoral. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(3), 80–89. <http://dx.doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n3.11>.
- 29.-Díaz, N., Ponce, L., Corado, J., & Tapia, F. (1998). Células de langerhans: los inmunocitos viajeros de la piel. *Dermatol. Dermatol. venez*; 36(3): 85-92. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-263227>.
- 30.-Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, Vol. 3, 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>.
- 31.-Duflo, S., Monestier, S., & Zanaret, M. (2008). Melanomas malignos cervicofaciales. *EMC - Otorrinolaringología*, 37(3), 1–17. [https://doi.org/10.1016/s1632-3475\(08\)70304-7](https://doi.org/10.1016/s1632-3475(08)70304-7).
- 32.-Dziki, J. L., & Badylak, S. F. (2018). Immunomodulatory biomaterials. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 6, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2018.02.005>.
- 33.-Elder, D. E. (2016). Melanoma progression. *Pathology*, 48(2), 147–154. <https://10.1016/j.pathol.2015.12.002>.
- 34.-Elsevier Connect. (2019). Sistema inmunitario cutáneo: cómo nos defiende la epidermis de la invasión microbiana. recuperado May 4, 2020, de <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/sistema-inmunitario-cutaneo-como-nos-defiende-la-epidermis-de-la-invasion-microbiana>.

- 35.-Einerson, N. J., Stevens, K. R., & Kao, W. J. (2003). Synthesis and physicochemical analysis of gelatin-based hydrogels for drug carrier matrices. *Biomaterials*, 24(3), 509–523. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00369-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00369-1).
- 36.-Entrecruzador EDC Pierce™. (n.d.). Recuperado Oct 19, 2020, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/77149#/77149>.
- 37.-Felippe, M. J. B. (2013). chapter 66-Immunotherapy. In *Equine Infectious Diseases: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00066-X>.
- 38.-Gammon, J. M., Dold, N. M., & Jewell, C. M. (2016). Improving the clinical impact of biomaterials in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, 7(13), 15421–15443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7304> .
- 39.-Gobbi, S.J., Reinke, G., Gobbi, V.J., Rocha, Y., Sousa, T.P. & Coutinho, M.M. (2020). Biomaterial: Concepts and Basics Properties. *European International Journal of Science and Technology*, 9(2), 23-42 [16] 24,25]. [https://www.researchgate.net/publication/339795792\\_Biomaterial\\_Concepts\\_and\\_Basics\\_Properties](https://www.researchgate.net/publication/339795792_Biomaterial_Concepts_and_Basics_Properties).
- 40.-Fuente, A., & Ocampo, J. (2010). Melanoma cutáneo. *Gaceta medica de Mexico*. 146: 126-135. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=24494>.
- 41.-Galateanu, Bianca & C, Vasilescu & Calderon-Moreno, Jose & Cimpean, Anisoara & Cojocaru, Vasile Danut & I, Cinca & Andronescu, Ecaterina & Grigore, Florentina & Si, Drob. (2011). Synthesis, mechanical and structural properties and biological activity of some nanostructured bone scaffolds. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6. 523 - 534. [https://www.researchgate.net/publication/253329061\\_Synthesis\\_mechanical\\_and\\_structural\\_properties\\_and\\_biological\\_activity\\_of\\_some\\_nanostructured\\_bone\\_scaffolds](https://www.researchgate.net/publication/253329061_Synthesis_mechanical_and_structural_properties_and_biological_activity_of_some_nanostructured_bone_scaffolds).
- 42.-Garg, A. D., Dudek, A. M., & Agostinis, P. (2013, July). Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when, and how? *BioFactors*, Vol. 39, pp. 355–367. <https://doi.org/10.1002/biof.1125>.
- 43.-Global Cancer Observatory. (n.d.). Recuperado Oct 14, 2020, de <https://gco.iarc.fr/>.
- 44.-Goldstein, B. G., & Goldstein, A. O. (2001). Diagnosis and management of malignant melanoma. *American Family Physician*, 63(7), 1359-1368. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11310650/>.
45. -Gorgieva, S., & Kokol, V. (2011). Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. <https://doi.org/10.5772/24118>.

- 46.-Gutiérrez, M. & Cortés, N. (2007). Confrontando al melanoma en el siglo XXI. *Med Cutan Iber Lat Am*, 35(1), 3-13. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11820>.
- 47.-Gutiérrez A, Yamazaki M. A & Huerta J. G. (2006), Presentación de antígeno. *alergia, asma e inmunología pediátrica*. 15(3), 90-93. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11990>.
- 48.-Hirayama, D., Iida, T., & Nakase, H. (2018). The phagocytic function of macrophage-enforcing innate immunity and tissue homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19010092>.
- 49.-Hollinger, J.O., An introduction to biomaterials. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2012.
- 50.-Hong, S. R., Chong, M. S., Lee, S. B., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Hong, S. H. (2004). Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid sponge in rat subcutaneous tissue. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(2), 201–214. <https://doi.org/10.1163/156856204322793584>.
- 51.-Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., & Wang, J. (2019). Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomaterials Science*, 7, 843–855. <https://doi.org/10.1039/c8bm01246f>.
- 52.-Huang, J., & Best, S. M. (2007). Ceramic biomaterials. In *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers* (pp. 3–31). <https://doi.org/10.1533/9781845693817.1.3>.
- 53.-Hussein, M. R. (2006, June). Tumour-associated macrophages and melanoma tumorigenesis: Integrating the complexity. *International Journal of Experimental Pathology*, Vol. 87, pp. 163–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00478.x>.
- 54.-Inkscape Project. (2020). Inkscape. Recuperado de <https://inkscape.org>.
- 55.-Jacobo, P. M., Huerta, J. G., & Cravioto, Q. P. (2017) Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Alerg Asma Inmunol Pediatr* 2017; 26 (2), 56-63. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=74336>.
- 56.-Jarquín, K. (2016) Construcción de un andamio de gelatina-ácido hialurónico y microesferas de BMP-2 y VEGF (tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- 57.-Jarquin Yanez, K., & Arenas Alatorre, J. (2016). Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin- Hyaluronic Acid Scaffolds. *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 06(02), 182. <https://doi.org/10.4172/2155-9538.1000182>.
- 58.-Jhunjhunwala, S. (2018). Biomaterials for Engineering Immune Responses. *Journal of the Indian Institute of Science*, 98, 49–68. <https://doi.org/10.1007/s41745-018-0063-7>.

- 59.-Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2011). Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews*, 91, 221–264. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009>.
- 60.-Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012, August 13). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12, 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>.
- 61.-Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F., & Ishii, K, J. (2013). Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00168>.
- 62.-Kiradzhiyska D & Mantcheva RD. Overview of Biocompatible Materials and Their Use in *Medicine*. *Folia Med (Plovdiv)*. 1;61(1):34-40. <https://doi.org/10.2478/foimed-2018-0038>.
- 63.-Kelly J., Brassil, K., & Ginex, P., (2018). Guide to Cancer Immunotherapy: Chapter 1 en: history of immunotherapy. *Oncology Nursing Society (1-18)*.
- 64.-Khan, F., Tanaka, M., & Ahmad, S. R. (2015). Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 8224–8249. <https://doi.org/10.1039/c5tb01370d>.
- 65.-Lee, S. B., Jeon, H. W., Lee, Y. W., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., Nam, Y S., & Ahn, H. C. (2003). Bio-artificial skin composed of gelatin and (1→3), (1→6)-β-glucan. *Biomaterials*, 24(14), 2503–2511. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00003-6).
- 66.-Liang, Y., Li, L., Scott, R. A., & Kiick, K. L. (2017). Polymeric Biomaterials: Diverse Functions Enabled by Advances in Macromolecular Chemistry. *Macromolecules*, 50(2), 483–502. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b02389>.
- 67.-Lien, S., Ko, L., & Huang, T. (2009). Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering . *Acta Biomater*; 5:670–679. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>.
68. -Litwiniuk, M., Krejner, A., Speyrer, M. S., Gauto, A. R., & Grzela, T. (2016). Hyaluronic Acid in Inflammation and Tissue Regeneration. *Wounds : a compendium of clinical research and practice*. 28. 78-88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26978861/>.
- 69.-Kim, J., Li, W. A., Choi, Y., Lewin, S. A., Verbeke, C. S., Dranoff, G., & Mooney, D. J. (2015). Injectable, spontaneously assembling, inorganic scaffolds modulate immune cells in vivo and increase vaccine efficacy. *Nature Biotechnology*, 33(1), 64–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.3071>.
- 70.-Marin, E, Boschetto, F, Pezzotti, G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *J Biomed Mater Res*. 2020; 108: 1617– 1633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>.

- 71.-Mariani, E., Lisignoli, G., Borzì, R. M., & Pulsatelli, L. (2019). Biomaterials: Foreign bodies or tuners for the immune response?. *International Journal of Molecular Sciences*, 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030636>.
- 72.-Masucci, M. T., Minopoli, M., & Carriero, M. V. (2019, November 15). Tumor Associated Neutrophils. Their Role in Tumorigenesis, Metastasis, Prognosis and Therapy. *Frontiers in Oncology*, Vol. 9, p. 1146. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01146>.
- 73.-McCoach, C. E., & Bivona, T. G. (2018). The evolving understanding of immunoediting and the clinical impact of immune escape. *Journal of Thoracic Disease*, 10, 1248–1252. <https://doi.org/10.21037/jtd.2018.03.60>.
- 74.-Mcdonald, D. R., & Levy, O. (2019). Innate Immunity. In *Clinical Immunology. Principles and Practice*, 39-53. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00003-X>.
- 75.-Molnar, C. & J. Gair. (2015). *Concepts of Biology: 1st Canadian Edition*. Victoria, B.C.: BCcampus. Unit 4: Animal Structure and Function, Chapter 23 23.2. Adaptive Immune Response. <https://opentextbc.ca/biology/>.
- 76.-Monjazez, A. M., Hsiao, H. H., Sckisel, G. D., & Murphy, W. J. (2012). The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *Journal of Immunotoxicology*, 9(3), 248–258. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2012.685527>.
- 77.-Monjazez, A. M., Zamora, A. E., Grossenbacher, S. K., Mirsoian, A., Sckisel, G. D., & Murphy, W. J. (2013). Immunoediting and Antigen Loss: Overcoming the Achilles Heel of Immunotherapy with Antigen Non-Specific Therapies. *Frontiers in Oncology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00197>.
- 78.-Nagoba, B., & Davane, M. (2018). Natural Immunomodulators. In *J Immunol Microbiol*. 2(12). <https://www.imedpub.com/articles/natural-immunomodulators.php?aid=22455>.
- 79.-Niinomi, M. (2008). Metallic biomaterials. *Journal of Artificial Organs*, 11, 105–110. <https://doi.org/10.1007/s10047-008-0422-7>.
- 80.-Oryan, A., Kamali, A., Moshiri, A., Baharvand, H., & Daemi, H. (2018). Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.184>.
- 81.-Overview of T Cell Subsets | Immunopaedia. Recuperado May 8, 2020, de <https://www.immunopaedia.org.za/immunology/basics/5-overview-of-t-cell-subsets/>.
- 82.-Osorio-Delgado, Marlon Andrés, Henao-Tamayo, Leydi Johanna, Velásquez-Cock, Jorge Andrés, Cañas-Gutierrez, Ana Isabel, Restrepo-Múnera, Luz Marina, Gañán-Rojo, Piedad Felisinda, Zuluaga-Gallego, Robín Octavio, Ortiz-Trujillo, Isabel Cristina, &

- Castro-Herazo, Cristina Isabel. (2017). Biomedical applications of polymeric biomaterials. *DYNA*, 84(201), 241-252. <https://doi.org/10.15446/dyna.v84n201.60466///>.
- 83.-Park, C. G., Christina A. Hartl, Daniela Schmid, Ellese M. Carmona, Hye-Jung Kim & Michael S. Goldberg. (2018). Extended release of perioperative immunotherapy prevents tumour recurrence and eliminates metastases. *Sci. Transl. Med.* 10, eaar1916. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aar1916>.
- 84.-Patel, N. R., & Gohil, P. P. (2012). A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2, 91–101. [https://www.researchgate.net/publication/292739494\\_A\\_Review\\_on\\_Biomaterials\\_Scope\\_Applications\\_Human\\_Anatomy\\_Significance](https://www.researchgate.net/publication/292739494_A_Review_on_Biomaterials_Scope_Applications_Human_Anatomy_Significance).
- 85.-Pisconti, S., Scarpati, G., Facchini, G., Cavaliere, C., D'Aniello C., Friscinni A., Melissano A., Bellini E & Perri F. (2018). The evolving landscape of immunotherapy against cancer. *WCRJ*. 5 (1): 1042. <https://www.wcrj.net/article/1042>.
- 86.-Prevención y diagnóstico precoz del melanoma - Palabra de enfermera. (n.d.). Recuperado Oct 10, 2020, de <http://www.palabraenfermera.enfermerianavarra.com/blog/2018/03/13/prevencion-diagnostico-precoz-melanoma/>
- 87.-Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., & Jayaramudu, T. (2015). Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications. *Applications for Tissue Engineering*, 21–44. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32889-0.00002-9>.
- 88.-Rajpara, S. M., Botello, A. P., Townend, J., & Ormerod, A. D. (2009). *Systematic review of dermoscopy and digital dermoscopy/ artificial intelligence for the diagnosis of melanoma*. *British Journal of Dermatology*, 161(3), 591–604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09093.x>.
- 89.-Rubinstein, M, P., & Cole, D, j,. (2001) Tumours: Immunotherapy. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*, *Nature Publishing Group*, 1-6. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001432>.
- 90.-Ruoslahti, E. (1996). RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, Vol. 12, pp. 697–715. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.697>.
- 91.-Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I. & Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *European Journal of Immunology*, 29(5), 1617–1625. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199905\)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3).

- 92.-Sanmartín Masiá, E. del R. (2016). Síntesis y caracterización de hidrogeles inyectables inspirados en la matriz extracelular para la regeneración de tejidos blandos. <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/72198>.
- 93.-Saroj, P., Verma, M., Jha, K. K., & Pal, M. (2012). Journal of Advanced Scientific Research AN OVERVIEW ON IMMUNOMODULATION. *In Journal of Advanced Scientific Research*. [https://www.researchgate.net/publication/267782410\\_An\\_overview\\_on\\_immunomodulation](https://www.researchgate.net/publication/267782410_An_overview_on_immunomodulation).
- 94.-Schadendorf, D., Fisher, D. E., Garbe, C., Gershenwald, J. E., Grob, J. J., Halpern, A., Herlyn, M., Marchetti, M. A., McArthur, G., Ribas, A., Roesch, A. & Hauschild, A. (2015). *Melanoma. Nature Rev Dis Primers*, 1, 1-20. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>.
- 95.-Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., & Ugurel, S. (2018). Melanoma. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9).
- 96.-Seder, R. A., & Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology*, Vol. 4, pp. 835–842. <https://doi.org/10.1038/ni969>.
- 97.-Selders, G. S., Fetz, A. E., Radic, M. Z., & Bowlin, G. L. (2017). An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regenerative Biomaterials*, 4(1), 55–68. <https://doi.org/10.1093/rb/rbw041>.
- 98.-Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001, April). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, Vol. 2, pp. 293–299. <https://doi.org/10.1038/86297>.
- 99.-Shabafrooz, V., Mozafari, M., Köhler, G. A., Assefa, S., Vashae, D., & Tayebi, L. (2014). The effect of hyaluronic acid on biofunctionality of gelatin-collagen intestine tissue engineering scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 102(9), 3130–3139. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34984>.
100. -Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 6425–6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>.
101. -Solano, S. G., Tovar, S. M., Tron, M. S., Weiser, A. E., Álvarez, H., Franyuti, D. A., & Vázquez, R. (2018). Human Dendritic Cells: Ontogeny and Their Subsets in Health and Disease. *Medical Sciences*, 6(4), 88. <https://doi.org/10.3390/medsci6040088>.

102. -Tai, Y., Wang, Q., Korner, H., Zhang, L., & Wei, W. (2018). Molecular Mechanisms of T Cells Activation by Dendritic Cells in Autoimmune Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 642. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00642>.
103. -Teo, A. J. T., Mishra, A., Park, I., Kim, Y. J., Park, W. T., & Yoon, Y. J. (2016, April 11). Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, Vol. 2, pp. 454–472. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00429>.
104. -Thambi, T., Giang Phan, V. H., Kim, S. H., Duy Le, T. M., Duong, H. T. T., & Lee, D. S. (2019). Smart injectable biogels based on hyaluronic acid bioconjugates finely substituted with poly( $\beta$ -amino ester urethane) for cancer therapy. *Biomaterials Science*, 7(12), 5424–5437. <https://doi.org/10.1039/c9bm01161g>.
105. -Toche P, P. (2012). Visión panorámica del sistema inmune. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 23(4), 446–457. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(12\)70335-8](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(12)70335-8).
106. -Torrella, A. & Noris, E. (2004). Inmunoterapia en melanoma. *Oncología*, 27(3): 102-107. <https://doi.org/10.4321/S0378-48352004000300002>.
107. -Turvey, S. E., & Broide, D. H. (2010). Innate immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.016>.
108. -Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of immunology research*, 2015, 983698. <https://doi.org/10.1155/2015/983698>.
109. -Wang, H., & Mooney, D. J. (2018). Biomaterial-assisted targeted modulation of immune cells in cancer treatment. *Nature Materials*, 17, 761–772. <https://doi.org/10.1038/s41563-018-0147-9>.
110. -Yang G, Xiao Z, Long H, Ma K, Zhang J, Ren X, Zhang J. Assessment of the characteristics and biocompatibility of gelatin sponge scaffolds prepared by various crosslinking methods. *Sci Rep*. 2018 Jan 25;8(1):1616. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-20006-y>.
111. -Zhang, F., He, C., Cao, L., Feng, W., Wang, H., Mo, X., & Wang, J. (2011). Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(3), 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.01.012>.
112. -Zhang, H., & Chen, J. (2018). Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*, 9, 773–1781. <https://doi.org/10.7150/jca.24577>.
113. -Zhou, Z., Yang, Z., Huang, T., Liu, L., Liu, Q., Zhao, Y., ... Cao, D. (2013). Effect of Chemical Cross-linking on Properties of Gelatin/Hyaluronic Acid

- Composite Hydrogels. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 52(1), 45–50. <https://doi.org/10.1080/03602559.2012.718400>.
114. -Zhu, Z., Wang, Y.-M., Yang, J., & Luo, X.-S. (2017). Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plastic and Aesthetic Research*, 4(12), 219. <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2017.71>.