



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**ESTUDIO DE LAS VÍAS INTRACELULARES IMPLICADAS EN LA
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS INDUCIDAS
POR LOS COMPONENTES DE LA VACUNA S3Pvac**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. EN C. LAURA MONTERO LEÓN

DIRECTOR DE TESIS
DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

CDMX. SEPTIEMBRE DE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido en la otorgación de la beca para realizar mis estudios (Número de becario: 226106).

Este trabajo se realizó con el apoyo de:

La Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA-UNAM PAPIIT número IN218822 e IN213219.

Al CONACyT FORDECYT-PRONACES número 302961.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABREVIATURAS	8
INTRODUCCIÓN	10
1.1 BILOGÍA DE LOS HELMINTOS.....	10
1.1.1 Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia crassiceps</i>	11
1.1.2 Regulación de la respuesta inmune por helmintos	11
1.2 LA RESPUESTA INMUNE DE MACRÓFAGOS ANTE INFECCIONES POR <i>T. CRASSICEPS</i>	12
1.3 EL MACRÓFAGO.....	14
1.3.1 Tipos de activación en macrófagos.....	15
1.4 MECANISMOS DE ACTIVACIÓN Y RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS EN MACRÓFAGOS	16
1.5 RECEPTORES TIPO TOLL	17
1.5.1 Clasificación de TLRs	18
1.6 CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK	20
1.7 EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B	22
1.7.1 NF- κ B	23
ANTECEDENTES.....	25
JUSTIFICACIÓN.....	28
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS PARTICULARES:	29
MÉTODOS	30
6.1 REACTIVOS.....	30
6.2 RATONES	30
6.3 LINEAMIENTOS ÉTICOS.....	31
6.4 OBTENCIÓN DEL FACTOR ESTIMULANTE DE COLONIAS DE MACRÓFAGOS (M-CSF)	31
6.5 MACRÓFAGOS DERIVADOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA.....	31
6.6 ESTIMULACIÓN CELULAR	32
a) Evaluación del estado de activación de los macrófagos en respuesta a los péptidos y la vacuna S3Pvac:	32
b) Evaluación de la activación de las vías de las MAP cinasas en macrófagos estimulados con GK-1:	33

c) <i>Evaluación de la activación del factor NF-κB en macrófagos estimulados con GK-1:</i>	33
6.7 DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO DE LOS MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	33
6.8 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEÍNICOS PARA WESTERN BLOT	34
6.8.1 <i>Extractos totales para evaluar la activación de las MAP cinasas:</i>	34
6.8.2 <i>Extractos nucleares para evaluar la translocación de NF-κB:</i>	34
6.9 WESTERN BLOT	35
6.10 IMMUNOLOGY MULTIPLEX ASSAY	36
6.11 CUANTIFICACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO MEDIANTE REACCIÓN DE GRIESS	37
6.12 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
RESULTADOS.....	38
7.1 LOS PÉPTIDOS GK-1 Y KETC-12 COMPONENTES DE LA VACUNA S3PVAC INDUCEN UN AUMENTO EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULADORAS EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA A PARTIR DE RATÓN	38
7.2 LOS PÉPTIDOS GK-1, KETC-1, KETC-12 Y LA VACUNA S3PVAC AUMENTAN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN MACRÓFAGOS.....	41
7.3 EFECTO DE GK-1 SOBRE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/C Y C57BL/6	42
7.4 EFECTO DE KETC-1 EN LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/cANn Y C57BL/6J	43
7.5 EFECTO DE KETC12 SOBRE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/cANn Y C57BL/6J.	45
7.6 EFECTO DE LA VACUNA S3PVAC SOBRE LA SECRECIÓN DE CITOCINAS Y QUIMIOCINAS POR MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA DE RATONES BALB/cANn Y C57BL/6J	46
7.7 EL PÉPTIDO GK-1 INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE LAS MAP CINASAS p38, ERK1/2 Y JNK EN MACRÓFAGOS DE LA CEPA C57BL/6J	48
7.8 ACTIVACIÓN DE NF- κ B EN RATONES SILVESTRES C57B6/J Y MUTANTES PARA LA MOLÉCULA MYD88	49
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS	69
1. DOT PLOTS E HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LAS MOLÉCULAS DE CO-ESTIMULACIÓN EN MACRÓFAGOS DERIVADOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA ESTIMULADOS CON LOS PÉPTIDOS GK-1, KETC-1, KETC- 12 Y LA VACUNA S3PVAC.	69
a) <i>Dot-plots de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86</i>	69

b) <i>Histogramas de la molécula co-estimuladora CD40</i>	70
2. ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL TRABAJO DE TESIS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MECANISMO GENERAL DE SEÑALIZACIÓN DE LOS TLRs	20
FIGURA 2. CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPK	21
FIGURA 3. LOS MACRÓFAGOS DERIVADOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA DE LA CEPA C57BL/6J EN PRESENCIA DE LOS PÉPTIDOS MUESTRAN UN AUMENTO SIGNIFICATIVO EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE EXPRESAN CD86	40
FIGURA 4. LOS PÉPTIDOS GK-1, KETc-1, KETc-12 ASÍ COMO LA VACUNA S3PVAC INDUCEN UN AUMENTO EN LA SECRECIÓN DE NO	42
FIGURA 5. NIVELES DE CITOCINAS LIBERADAS POR MACRÓFAGOS EN PRESENCIA DE GK-1	43
FIGURA 6. LOS MACRÓFAGOS DE LA CEPA BALB/CANN EN PRESENCIA DE KETc-1 NO MOSTRARON UN AUMENTO SIGNIFICATIVO EN LA SECRECIÓN DE LAS CITOCINAS	44
FIGURA 7. LOS MACRÓFAGOS DE LA CEPA BALB/C EN PRESENCIA DE KETc-12 MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA EN LA SECRECIÓN DE LAS CITOCINAS IL-10 Y MCP-1	46
FIGURA 8. LOS MACRÓFAGOS DE LA CEPA BALB/C EN PRESENCIA DE S3PVAC MOSTRARON UNA DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA EN LA SECRECIÓN DE LAS CITOCINAS IL-10, IL-6, IP-10 Y UN AUMENTO DE LA SECRECIÓN DE LA CITOCINA MIP-1α	47
FIGURA 9. LOS MACRÓFAGOS DE LA CEPA C57BL/6J EN PRESENCIA DE GK-1 INDUCE LA FOSFORILACIÓN DE LA MAP CINASA P38	49
FIGURA 10. LA ACTIVACIÓN DE NF-κB (p65) EN LOS MACRÓFAGOS DE LA CEPA C57BL/6J ES INDUCIDA POR GK-1	50
ANEXO 1. LOS MACRÓFAGOS DERIVADOS A PARTIR DE MÉDULA ÓSEA DE LA CEPA C57BL/6J EN PRESENCIA DE LOS PÉPTIDOS MUESTRAN UN AUMENTO SIGNIFICATIVO EN EL PORCENTAJE DE CÉLULAS QUE EXPRESAN CD86	70

Resumen

La vacuna denominada S3Pvac está constituida por tres péptidos denominados GK-1, KETc-1 y KETc-12 y fue diseñada para la prevención de la cisticercosis porcina. La vacuna ha demostrado capacidad para reducir el número de cerdos infectados, así como el número de cisticercos por cerdo en condiciones naturales de transmisión. La protección se acompaña por un incremento en la proliferación específica de linfocitos T y de anticuerpos IgG específicos. El componente GK-1 ha mostrado además propiedades inmunomoduladoras a través de la activación de células presentadoras de antígeno. En el presente proyecto de investigación se evaluó el papel de cada uno de los componentes de la vacuna S3Pvac de manera independiente y en conjunto, en su capacidad para activar a macrófagos a través de la expresión de moléculas de activación, óxido nítrico (NO) y la secreción de citocinas. Se observó que GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac promueven la activación de macrófagos derivados a partir de médula ósea. Particularmente, encontramos que GK-1 aumenta *in vitro* la expresión de CD86 y CD40, además de incrementar la secreción de NO. KETc-1 induce la secreción de NO mientras que KETc-12 aumenta *in vitro* la expresión de CD86 y NO. Finalmente, la vacuna S3Pvac logra aumentar la secreción de NO. Sin embargo, este estado de activación promovido por los péptidos y la vacuna no fue acompañado de la secreción de citocinas *in vitro*.

Debido a la mayor capacidad de inducir una respuesta pro-inflamatoria que presentó el péptido GK-1 se profundizó en las vías intracelulares implicadas en la activación de los macrófagos. Se observó que la activación de macrófagos se asocia a la fosforilación de las MAP cinasas p38, ERK1/2, JNK y a la fosforilación de I κ B con la subsecuente activación de NF- κ B de manera dependiente de MyD88.

En resumen, en este trabajo demostramos que los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac promueven la activación de macrófagos derivados a partir de médula ósea y particularmente GK-1 promueve esta activación a través de mecanismos dependientes de MyD88, probablemente involucrando a un receptor TLR.

Abreviaturas

AP-1: Activating protein-1
Arg1: Arginase-1
CLRs: C-type Lectin Receptor
CpG: C-phosphate_G
CTLA-4: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DC: Dendritic cells
ERK: Extracellular signal-regulated kinase
IFN: Interferon
IKK: IκB kinase
IκB: Inhibitor of NF-κB
IL: Interleucina
ILC2s: Innate lymphoid cells
IRAK: Interleukin-1 receptor associated kinases
IRF: Interferon regulatory factor
JNK: c-Jun NH2-terminal kinase
KLF: Kruppel-like factor
LPS: Lipopolysaccharide
LTA: Lipoteichoic acid
MAL: MyD88 adaptor-like
MAPK: Mitogen activated protein kinase
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MDP: Muramyl dipeptide
MGL-1: Macrophage galactose-type lectin-1
MHC: Major histocompatibility complex
MIP-1a: Macrophage Inflammatory Proteins alpha
MMR: Macrophage mannose receptor
MyD88: Myeloid differentiation primary response 88
NFκB: Nuclear Factor κB
NO: Nitric oxide
NOS2: Nitric oxide synthase 2
PAMP: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos

PD-L: Programmed death-ligand

PGN: Peptidoglycan

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

S3Pvac: Synthetic 3-peptide vaccine

STAT: Signal transducer and activator of transcription

TBK1: TANK-binding kinase 1

Th: Célula T cooperadora

TLR: Toll-like receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAM: TRIF-related adaptor molecule

TRIF: TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β

Introducción

1.1 Biología de los helmintos

Muchas especies de helmintos son organismos parasitarios multicelulares de importancia médica que pueden infectar tanto a humanos como a otros animales. Los helmintos son extremadamente diversos y se clasifican en tres grupos taxonómicos: nematodos, trematodos y cestodos. Los nematodos adultos se caracterizan por ser gusanos redondos; los trematodos adultos tienen forma de hoja aplanada y finalmente los cestodos adultos se caracterizan por ser gusanos planos, alargados, segmentados y en su estadio larvario tienen una forma quística o sólida (1). De acuerdo con el estadio en que se encuentre el parásito puede infectar diferentes tejidos y células de diferentes órganos, principalmente se pueden alojar en tejidos tales como intestino, hígado (parénquima y ductos biliares), pulmón, vasos linfáticos, entre otros (2).

Los helmintos generalmente causan en el hospedero infecciones asintomáticas o infecciones crónicas subclínicas, sin embargo, algunos individuos parasitados pueden sufrir de enfermedades severas que pueden ser fatales. El curso de la infección depende de factores del parásito, del hospedero y de factores ambientales. Con respecto a los factores del hospedero se ha observado que la respuesta inmune a la infección por helmintos tanto en humanos como en modelos murinos está polarizada hacia una respuesta tipo Th2, caracterizada por un aumento marcado en la producción de IL-4, IL-5 e IL-1 (3,4). Sin embargo, en algunas infecciones causadas por helmintos tales como filariasis linfática, cisticercosis y equinococosis la respuesta inmune inicial es de tipo Th1, la cual puede correlacionar con un control rápido de la infección o una baja carga parasitaria. Esta respuesta es generalmente transitoria con un cambio rápido hacia una respuesta inmune tipo Th2 que favorece la permanencia del helminto (5).

1.1.1 Ciclo de vida de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*

Un cestodo de gran relevancia para la salud humana y animal es *T. solium*. Es una de las principales causas de defunción por enfermedades de transmisión alimentaria y es la causa del 30% de los casos de epilepsia en zonas endémicas y en zonas de alto riesgo causa el 70% de los casos (6). Este parásito presenta en el ciclo de vida una fase de larva (cisticerco) que afecta a humanos y a cerdos que lo adquieren por la ingestión accidental de oncosferas a través de alimentos, aguas contaminadas o bien por autoinfección debido a mala higiene del portador del gusano adulto, en este caso el ser humano. Cuando el cisticerco se establece en el cerdo (hospedero intermediario) y este es consumido por el humano (hospedero definitivo) en carne mal cocida, el cisticerco puede desarrollarse en el gusano adulto en el intestino del hospedero definitivo. El adulto maduro es capaz de producir cientos de miles de huevos y estos huevos son liberados al medio ambiente a través de las heces. Finalmente, el cerdo ingiere los huevos presentes en las heces, completando así el ciclo de vida.

En el caso de la cisticercosis causada por el cestodo *T. crassiceps* el hospedero definitivo son los caninos y el hospedero intermediario son los roedores (7). Ésta *taenia* se ha usado como un modelo de la cisticercosis causada por *T. solium* considerando la similitud antigénica y la protección cruzada entre ambos cestodos (8,9).

1.1.2 Regulación de la respuesta inmune por helmintos

Los helmintos generan una inmunidad caracterizada por la producción de diferentes subclases de inmunoglobulinas (Ig) como lo son IgE, IgG1 e IgG4, además de las citocinas IL4, IL-13, IL-5 e IL-10, las cuales ayudan a la expansión de diversas subpoblaciones celulares como lo son eosinófilos, mastocitos, células T cooperadoras y macrófagos. Esta respuesta inmune se ha relacionado con el incremento en permeabilidad de la vasculatura, angiogénesis, reclutamiento celular, contracción del músculo liso, secreción de moco por las células de goblet y depósito de colágeno mecanismos que en conjunto son importantes en la defensa en contra

de infecciones por helmintos (10). Se ha visto que las células linfoides innatas (ILC2s), están relacionadas también a infecciones por helmintos y una vez activadas producen citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-13) en los sitios de infección, que promueve el reclutamiento de eosinófilos y macrófagos. Los macrófagos reclutados al sitio de infección incrementan la producción de IL-13, IL-15, e IL-9, la producción de moco por las células goblet, contracción muscular, el reclutamiento de mastocitos, la reparación de tejido y la homeóstasis metabólica (11).

Particularmente, se ha reportado que *T. crassiceps* induce una respuesta inmune tipo Th1 transitoria en las primeras semanas de infección, pero posteriormente se desarrolla una respuesta dominante tipo Th2 en la fase crónica de la infección (mayor a ocho semanas) que se asocia con un incremento en la carga parasitaria y con la susceptibilidad a la infección (12). Además, se demostró un papel protector de la respuesta tipo Th1 que es regulada por IL-12, TNF- α , IFN- γ y NO, así como la participación de los linfocitos y macrófagos durante la fase temprana de infección (13). Con respecto al papel de la respuesta inmune innata contra este parásito se han realizado diversos estudios en donde se ha visto una participación destacada del macrófago en las fases tempranas de la infección.

1.2 La respuesta inmune de macrófagos ante infecciones por *T. crassiceps*

Durante las infecciones por helmintos algunos de los productos secretados juegan un papel fundamental como moduladores de la activación de macrófagos, ya que regulan el microambiente en el cual los macrófagos participan en la inducción e instrucción de las respuestas inmune innata y adaptativa. Los productos de secreción (ES, del inglés, *excretory/secretory antigens*) se refiere a las moléculas que son liberadas en la interconexión entre el parásito y las células del sistema inmune y pueden ser liberadas por secreción activa o por difusión (14). Se ha observado que los antígenos de excreción/secreción de *T. crassiceps* (TcES, del inglés, *T. crassiceps excreted/secreted products*) bloquean la producción de IFN- γ a través de STAT-1, incrementan los niveles de IL-10 en macrófagos M2, contrarrestan

la respuesta inflamatoria ya que hay una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α e IL-6), sin embargo, no alteran la producción de NOS2 o Arg1 (15). Además de que los componentes TcES alteran el perfil transcripcional de microRNAs que regulan vías como la metabólica, de señalización e inflamatoria en macrófagos. Se encontró que cuatro microRNAs son inducidos por TcES en macrófagos, miR-125a-5p, miR-762, miR-155-5p y miR-484, los cuales están involucrados en la regulación de procesos inflamatorios. En particular, se sabe que miR-125a-5p es un microRNA que reduce la producción de las citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-12 y TNF- α , miR-762 regula la transcripción de *Irf7* y miR-484 regular la expresión de los genes *Nf-kb*, *Stat5a*, *Irf1*, *Myd88*, *Stat1* y *Il12a* (16). Por otro lado, la exposición a TcS (del inglés, *T. crassiceps soluble antigens*) favorece el reclutamiento de macrófagos M2 caracterizados por la expresión MMR, IL-4R α , PDL-1 y PDL-2 (17).

En la cisticercosis causada por *T. crassiceps* hembras de todas la cepas de ratones estudiadas sostienen una mayor intensidad de infección que los machos (18), acompañada por el incremento en el número de macrófagos reclutados. Estos macrófagos se caracterizan por un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, así como del MHC-II, PD-L1 y PD-L2 (19). Además, los macrófagos provenientes de hembras BALB/c son activados con un fenotipo M2 más rápidamente en una infección crónica por *T. crassiceps*, mientras que los macrófagos provenientes de machos de esta misma cepa tienen una activación tipo M2 incompleta (13). De esta forma la presencia y persistencia de macrófagos M2 promueve la susceptibilidad en ratones infectados con *T. crassiceps* (19).

Otro factor que influye en la resistencia o susceptibilidad a la infección generada por *T. crassiceps* es el estado de activación que presentan los macrófagos. Los macrófagos obtenidos durante una infección crónica con *T. crassiceps* mostraron una habilidad pobre en inducir una respuesta proliferativa de células T CD4⁺ y favorecen la producción de IL-4. Estos macrófagos expresan de manera dependiente de STAT-6 altos niveles de MHC-II, CD40, CD86, CD23 y CCR5,

mientras que hay una baja producción de IL-12 y NO (20). Sin embargo, secretan altos niveles de IL-6 y de prostaglandina E₂ de igual manera dependientes de STAT-6. Por otro lado, en macrófagos reclutados durante las etapas tempranas de infección (dos semanas) se ha observado que presentan bajos niveles de expresión de CD86, CD23, CCR5 y una alta proliferación de células T CD4⁺ que producen altos niveles de IFN- γ (13). Concordante con lo anterior, la infección intraperitoneal crónica con el cisticerco de *T. crassiceps*, además de polarizar la respuesta inmune hacia un perfil Th2, se acompaña de un aumento en la expresión de genes asociados con la activación M2 de los macrófagos (12,20), además de la expresión de marcadores de activación como lo son *Arg1*, *Chil3*, y *Retnla*, MGL-1, PD-L1 y PD-L2 (21,22). Estos estudios muestran la importancia de los macrófagos en iniciar, dirigir y regular una respuesta protectora en contra de las infecciones causadas por helmintos, particularmente para el cestodo *T. crassiceps*.

1.3 El Macrófago

Los macrófagos son células fagocíticas que están ampliamente distribuidas en el organismo y tienen un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos y patológicos como el mantenimiento de la homeóstasis, la defensa del hospedero y en la inflamación crónica y aguda (23). Los macrófagos son una población de células dinámica y heterogénea en las que mecanismos diferentes controlan su diferenciación, su distribución en los tejidos y su respuesta a estímulos. Una vez activados por productos microbianos, los macrófagos adquieren capacidad microbicida que lleva a una inmunidad efectiva. Sin embargo, varios patógenos han desarrollado distintas estrategias para interferir con la activación y así poder modular la respuesta del hospedero (24).

1.3.1 Tipos de activación en macrófagos

Los macrófagos pueden tener diferentes estados de activación durante la respuesta inmune, estos se han sido clasificada principalmente en dos grupos: macrófagos M1 y macrófagos M2 los cuales son extremos de diversos estados de activación. La activación clásica de los macrófagos (M1) es promovida por citocinas tales como IFN- γ , moléculas patogénicas tales como LPS o LTA, induciendo funciones efectoras que contribuyen a la eliminación de los patógenos, daño del tejido y a patologías inflamatorias. Dentro de las funciones efectoras inducidas en los macrófagos destacan la producción de mediadores inflamatorios tales como NO, TNF- α , IL-12 e IL-1 β (25). El fenotipo M2 en los macrófagos es promovido por las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13. Estos macrófagos tienen un fenotipo inmunosupresor, caracterizado por la disminución en la presentación antigénica a las células T y la producción de citocinas que estimulan una respuesta tipo Th2. Finalmente, los macrófagos M2 están involucrados en reparar los tejidos, la resolución de la inflamación, promover el crecimiento tumoral y ejercer un efecto anti parasítico (26,27).

A nivel metabólico, los macrófagos M1 emplean la enzima NOS2 para sintetizar a la L-citrulina a partir de la L-arginina produciendo como productos finales NO y ROS (del inglés, *reactive oxygen species*), ambos mediadores de la actividad citotóxica en contra de patógenos intracelulares. En contraste, los macrófagos M2 expresan Arg-1, la cual metaboliza la L-arginina en L-ornitina, que es el principal precursor de las poliaminas, las cuales son esenciales para la supervivencia celular. Además, la L-ornitina puede ser usada en la generación de la prolina y la hidroxiprolina, los cuales son aminoácidos esenciales en la producción de colágeno, una proteína crucial en la reparación del daño a los tejidos (28).

La polarización de los macrófagos está asociada a la expresión diferencial de distintas moléculas entre las que se encuentran factores de transcripción, moléculas co-estimuladoras, receptores, citocinas, quimiocinas, entre otras. Los macrófagos

M1 utilizan los factores de transcripción STAT1, KLF6 e IRF5 y expresan de forma importante las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86. En el caso de los macrófagos M2 los factores de transcripción asociados a este fenotipo son PU.1, STAT6, KLF4 e IRF4 (29). Particularmente, estos macrófagos pueden ser distinguidos por la expresión de diversos marcadores moleculares como lo son Arg-1, miembros de la familia quitinasa (YM-1, YM-2 y AMCCase), moléculas tipo resistina (FIZZ-1, Retnla/ Relm- α , FIZZ-2/Retnlb/Relm- β , FIZZ-3/Retn/resistin y FIZZ-2/Retnlg/Relm- γ), TGF- β y el receptor de manosa (MMR/CD206) (30).

1.4 Mecanismos de activación y reconocimiento de patógenos en macrófagos

Los macrófagos reconocen a los patógenos a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que detectan componentes microbianos altamente conservados, llamados patrones moleculares asociados a patógenos, PAMPs. Estos PAMPs representan moléculas vitales para la sobrevivencia de los microorganismos, tales como flagelina, estructuras únicas de los ácidos nucleicos de bacterias y virus (CpG, DNA, dsRNA), LPS, LTA, PGN, entre otros (31).

Los PRRs llevan a la activación de distintos factores de transcripción tales como NF- κ B, AP-1, IRF-3 e IRF-7. La activación de estos factores de transcripción lleva a la producción de péptidos antimicrobianos, citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y co-estimuladoras, además de la regulación positiva del MHC. De esta forma se logra que el sistema inmune monte la respuesta apropiada para combatir al microorganismo. Los PRRs se componen de cuatro grupos, los TLRs, CLRs, RLHs y NLRs (32–34).

Los receptores CLRs tienen un papel en la respuesta a infecciones por helmintos, algunos helmintos parasitarios son reconocidos por diferentes CLRs, tales como DC-SIGN (del inglés, *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing integrin*), MMR, MGL, y SIGNR1 (del inglés, *SIGN-related 1*) que se unen a diferentes glicanos presentes en huevos de *Schistosoma mansoni* (35,36). En el caso del nematodo *Trichuris muris*,

este es reconocido por el receptor MMR (37). Para *T. crassiceps* se ha observado que los glicoconjugados que contienen N-acetilgalactosamina y residuos de galactosa son reconocidos a través del receptor MGL-1 y este reconocimiento juega un papel importante en dirigir la respuesta *in vivo* de los macrófagos mediando la resistencia a la infección, ya que el MGL-1 participa en la producción de TNF- α y NO (38)

1.5 Receptores tipo toll

La familia de TLRs es un grupo importante de receptores ya que tienen un papel importante en la respuesta inmune en contra de helmintos. En este sentido, se ha demostrado que los productos derivados de *Schistosoma sp* se unen al TLR2 expresado en células presentadoras de antígeno (39,40) y los receptores TLR2 y/o el TLR3 reconocen fracciones lipídicas derivadas de *S. mansoni* (41). Los polimorfismos de TLR4 han sido asociados con un riesgo mayor en neurocisticercosis causada por el *Mesocestoide corti* (42). Otros estudios han demostrado que la señalización a través de TLR2 favorece una inmunidad protectora en contra de parásitos intracelulares como lo son *L. mexicana*, *T. gondii* y *T. cruzi*, ya que favorece el desarrollo de una respuesta tipo Th1 (43–45). Asimismo, se ha observado que TLR4 interactúa con carbohidratos de *T. crassiceps* resultando en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6 (46). *T. crassiceps* expresa también lisofosfatidil colina, la misma molécula que se ha demostrado que es reconocida por TLR2 en esquistosomiasis (47).

Por otro lado, en una infección por *T. crassiceps* se mostró que TLR2 participa en la resistencia a la infección, esto asociado a la producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-12 por parte de los macrófagos, regulando negativamente la producción de IgG1 e IL-4. Además en ratones carentes de TLR2 aumentó el número de macrófagos con un fenotipo M2 que expresan los marcadores Relm- α , Arg-1, PD-L1, PD-L2 y OX40L una molécula co-estimuladora involucrada en la polarización hacia un fenotipo Th2 (48). Mostrando un papel central de los TLRs en la respuesta a la infección causada por *T. crassiceps*.

1.5.1 Clasificación de TLRs

Los TLRs en mamíferos comprenden una amplia familia que consiste de 10 miembros en humanos y 13 en ratón (49), los TLR1-9 están conservados entre humanos y ratones (50). La familia de los TLRs se encuentra tanto en la membrana plasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11) como en la membrana de los endosomas (TLR3, 7, 8 y 9). Esta distribución celular influye en la naturaleza del ligando que los activa. Por ejemplo, los receptores TLRs asociados a la membrana plasmática responden a componentes de la superficie de microorganismos, mientras que los TLRs endosomales reconocen varios ácidos nucleicos que son endocitados por las células (51).

Los TLRs se caracterizan por tener un dominio extracelular LRR (del inglés, *leucine-rich repeat*) requerido para el reconocimiento del ligando y un dominio citoplasmático TIR, el cual es necesario para la señalización intracelular. La unión de agonistas a los TLRs promueve su dimerización o la alteración en la conformación de dímeros existentes. La asociación de los dominios TIR forma un andamio molecular que recluta a adaptadores moleculares a través de la asociación con los dominios TIR y el reclutamiento subsecuente de proteínas necesarias para la señalización (50).

La señalización de los TLRs ocurre a través de una serie de interacciones homo y heterotípicas entre proteínas que cuentan con un dominio TIR para promover la oligomerización con el adaptador apropiado: ya sea MyD88, MAL, TRIF o TRAM. Dependiendo del tipo de adaptador que es reclutado a través del dominio TIR, varias cinasas (IRAK4, IRAK1, IRAK2, TBK1 e IKK ϵ) y ligasas de ubiquitina (TRAF6 y pellino 1) son reclutados y activados, lo cual lleva a la activación río abajo de las MAP cinasas y varios factores de transcripción tales como NF- κ B e IRFs (52). Se han descrito variaciones en la formación y composición del complejo multifuncional de señalización entre los diferentes TLRs debido a que involucran la unión de diferentes combinaciones de los distintos adaptadores. Se han clasificado en TLRs

dependientes o independientes de MyD88, donde MyD88 es la proteína adaptadora reclutada por todos los TLRs, excepto el TLR3 (53). En los TLRs que se utiliza al la proteína adaptadora MyD88, ésta interacciona río abajo con la familia de proteínas IRAK y lleva a la formación de un complejo multiproteínico, el cual es regulado por las interacciones homotípicas de los dominios DD (del inglés, *Death Domain*) entre MyD88 e IRAK4 (51). En el caso de la señalización independiente de MyD88, el receptor TLR se une al adaptador TRIF, el cual se asocia posteriormente con la cinasa TBK1 e induce la fosforilación y translocación nuclear de IRF3 (54).

Existen particularidades entre los distintos TLRs en el ensamblaje de los adaptadores, por ejemplo, la señalización vía TLR4 involucra a los cuatro adaptadores, MyD88, MAL, TRIF y TRAM. El receptor TLR2 utiliza además al adaptador MAL, en general MAL es utilizado por los TLRs que se encuentran en la membrana plasmática. Los eventos de señalización independientes de MyD88 están controlados por TRIF tanto para TLR3 como para TLR4 (TRIF/TRAM). La proteína adaptadora TRAM se encuentra río arriba de TRIF y regula la producción de IFN- β de manera independiente de MyD88 (Figura 1) (55).

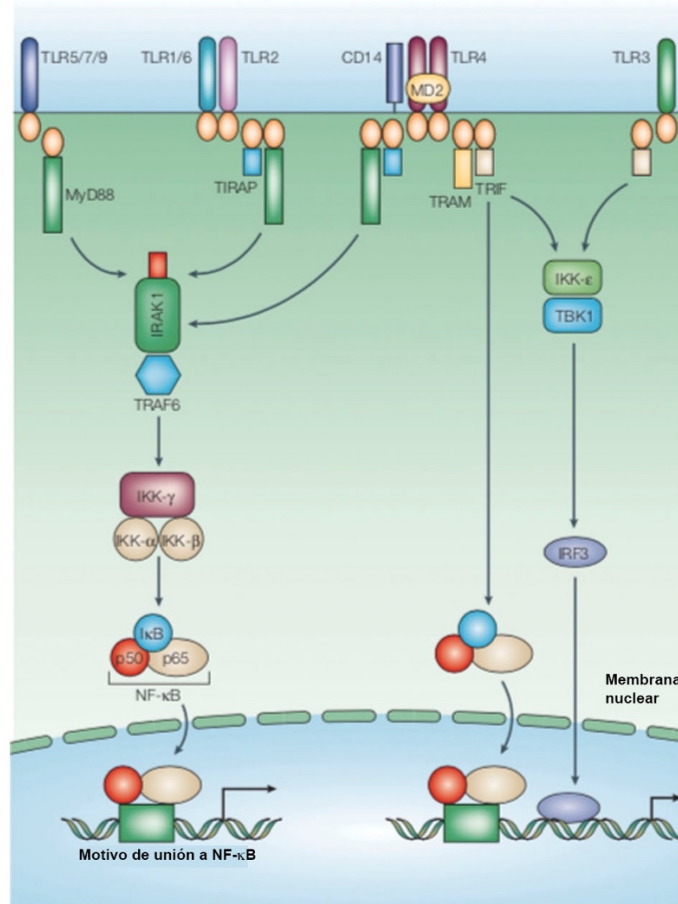


Figura 1. Mecanismo general de señalización de los TLRs. Los TLRs poseen dos vías de activación, MyD88 dependiente la cual activa y recluta a IRAKs y TRAF6, que lleva a la activación del complejo IKK. Esta vía es usada por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 y TLR9 y culmina en la liberación de NF-κB de su inhibidor y su subsecuente translocación al núcleo lo que lleva a la transcripción de citocinas proinflamatorias. El adaptador TIRAP también está involucrado en la señalización dependiente de MyD88 para los TLRs 2 y 4. Por otra parte, TLR3 y TLR4 la activación de IRF3 y como consecuencia la inducción de IFN-β está dada de manera independiente de MyD88, el adaptador TRIF es esencial para realizar esta activación. En este caso se activa la cinasa TBK1 e IKK ϵ llevando a la activación de IRF3. Un cuarto adaptador TRAM es específico en la activación vía TLR4 MyD88 independiente/TRIF dependiente (56).

1.6 Cascada de señalización de las MAPK

La vía de las MAP cinasas juega una función esencial en la regulación de la respuesta inflamatoria inmune y regulan procesos celulares que incluyen proliferación, sobrevivencia, muerte y motilidad celular, ya que responden a un amplio rango de cambios extracelulares e intracelulares cooperando con otras vías de transducción de señales, traduciendo estos cambios en alteraciones en la expresión de genes (57).

Los mamíferos expresan al menos cuatro grupos de MAP cinasas, la cinasa relacionada a señales extracelulares (ERK)-1/2, la cinasa c-Jun N-terminal (JNK1/2/3), las proteínas p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) y ERK5. La actividad de la vía de las MAPK cinasas está regulada a través de tres bloques, los cuales están compuestos de las MAP cinasa (MAPK), las MAPK cinasa (MAPKK, MKK o MEK) y por último de las MAPKK cinasas (MAPKKK, MKKK o MEKK) (58). Las MAP cinasas son activadas por MAPKK específicas: MAPKK1/2 activan a ERK1/2, MAPKK3/6 activan a p38, MAPKK4/7 activan a JNKs (JNK1/2) y MAPKK5 activa a ERK5. Las MAP cinasas contienen un motivo (Thr-X-Tyr) dentro de la región de activación; la fosforilación de estos aminoácidos treonina y tirosina por las MAPKK es esencial para su activación (59) (Figura 2).

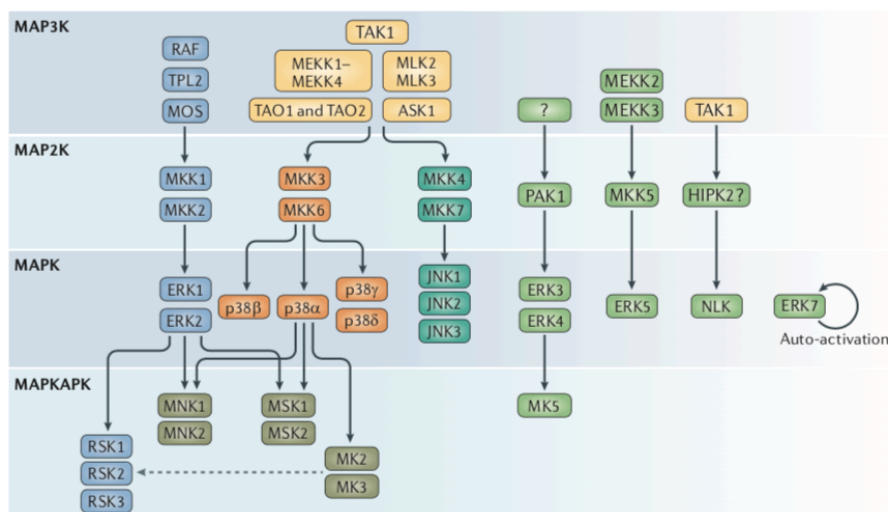


Figura 2. Cascada de señalización de las MAPK. La cascada de señalización de las MAP cinasas consiste en una serie de al menos tres cinasas: las MAPK cinasa cinasas (MAP3K) que activan a las MAPK cinasas (MAP2K), las cuales posteriormente activan mediante la fosforilación de los residuos Thr-X-Tyr (donde X representa cualquier aminoácido) en el motivo de activación Tomado y modificado de (60).

Las MAPKKKs son muy diversas en su estructura y pueden ser reguladas diferencialmente por una variedad de estímulos río arriba. Presumiblemente cada MAPKKK le confiere a la célula una sensibilidad a distintos estímulos, lo cual incrementa la complejidad y diversidad de la señalización de las MAP cinasas (57).

La activación de las MAP cinasas, la magnitud y la duración de su activación, así como la inhibición, son eventos críticos para mediar una respuesta inmune apropiada. Se sabe que la inhibición de las MAP cinasas recae en una familia de proteínas llamada MKP (del inglés, *MAP Kinase Phosphatases*) o DUSP (del inglés, *Dual Specificity Phosphatases*), donde MKP1, DUSP2, MKP5, MKP7 y VH5 tienen preferencia por p38/JNK y ERK es regulada por MKP3 (61).

Las señales generadas por estas cinasas promueven cambios en la expresión de genes que llevan al aumento de moléculas efectoras tales como citocinas y moléculas de adhesión (62,63). Este proceso depende de la activación de varios factores de transcripción, entre los cuales AP-1, STAT1 y NF- κ B juegan un papel crítico.

1. 7 El factor de transcripción NF- κ B

Los factores de transcripción son proteínas especializadas que pueden unirse al DNA y regular la expresión de genes. Muchos de los factores de transcripción tienen dominios de activación o represión, además de que pueden funcionar como proteínas que promueven la remodelación de la cromatina reclutando activadores adicionales o complejos de represión.

Los factores de transcripción inducidos por el LPS en macrófagos pueden ser divididos dentro de tres categorías de acuerdo en el modo de activación y su función. La primera categoría (clase I) consiste en factores de transcripción que son constitutivamente expresados por muchos tipos celulares y que son activados por señales dependientes de modificaciones post-traduccionales. En muchos casos estos factores de transcripción son retenidos en el citoplasma en un estado basal y su activación es dependiente de una señal que involucra su translocación nuclear. En esta clase se incluyen proteínas que son conocidas por su papel en la inflamación, como es el caso de NF- κ B, IRF, CREB1 (del inglés, *cAMP-responsive-element-binding protein 1*), los genes que son regulados por estos factores de transcripción son llamados también genes de respuesta primaria.

La segunda categoría de factores de transcripción (clase II) son sintetizados *de novo* después de la estimulación. Estos factores de transcripción regulan la subsecuente expresión génica a la respuesta primaria y estos factores pueden durar un periodo de tiempo prolongado. Un ejemplo de estos factores es C/EBP δ (del inglés, *CCAAT/enhancer-binding protein- δ*).

La tercera categoría de factores de transcripción (clase III) consiste en reguladores transcripcionales específicos de linaje su expresión ocurre durante la diferenciación de los macrófagos. Entre los miembros más notables de este grupo se encuentran los factores de transcripción PU.1 (también conocido como SPI1), C/EBP β , RUNX1 (del inglés, *runt-related transcription factor 1*) e IRF8. Estos factores se encuentran activos constitutivamente en los macrófagos y permiten la remodelación de la cromatina en genes inducibles y silencian genes que son asociados con destinos celulares alternativos. En macrófagos maduros estos factores de transcripción regulan las respuestas específicas en los distintos tipos celulares a señales de inflamación u otros estímulos, presumiblemente por conferir un estado permisivo de la cromatina.

Los factores de transcripción de estas tres categorías no actúan independientemente sino funcionan coordinadamente para controlar la respuesta de los macrófagos (64).

1.7.1 NF- κ B

NF- κ B representa un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas y evolutivamente conservadas que presenta cinco miembros en mamíferos: Rel (cRel), RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52), siendo la forma más abundante en las células el heterodímero p50:p65. Esta familia de proteínas posee un motivo conservado de 300 aminoácidos en el extremo N-terminal llamado dominio Rel que es responsable de la dimerización, la unión al ADN y la interacción con los I κ Bs (62,65).

Existe una variedad de estímulos que conlleva a la activación de NF- κ B, entre ellos se encuentran citocinas tales como TNF- α , IL-1, una variedad de PAMPs como LPS, LTA, MDP. Los eventos de señalización que llevan a la activación de NF- κ B ocurren cuando un agonista se une a su TLR (66,67), que lleva a la activación del complejo IKK a través de un complejo de cinasas. Este complejo IKK es responsable de la fosforilación de I κ B (inhibidor de NF- κ B) que promueve a través de la ubiquitinación su degradación. El factor transcripcional NF- κ B es entonces libre de translocar al núcleo y por lo tanto, de iniciar la transcripción de genes con la región promotora κ B ya sea solo o en combinación con otros factores de transcripción tales como AP-1, ETS y STAT, que pueden inducir la expresión de diversos genes (68,69).

El factor de transcripción NF- κ B regula una amplia variedad de genes entre los que se encuentran genes que codifican para quimiocinas (IL-8, MIP-1 α , MCP1 y RANTES), citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , LT α , LT β , y GM-CSF), moléculas de adhesión (ICAM, VCAM y E-selectina), moléculas co-estimuladoras, proteínas de fase aguda (SAA1 y SAA2,) y enzimas efectoras inducibles (NOS2 y COX2), así como genes que codifican para péptidos antimicrobianos como defensinas. Además, activa genes que codifican para proteínas que inhiben la apoptosis tales como cIAP1, cIAP2, A1 (Bfl1), BclXL, para proteínas apoptóticas tales como el ligando de Fas, y genes reguladores de la proliferación celular como ciclina D1 y c-myc (62,63,70).

Todos estos datos nos demuestran que cuando se diseña una molécula para tratar de contrarrestar o eliminar una parasitosis es conveniente conocer los mecanismos moleculares de la respuesta inmune asociada con la protección a la infección, así como identificar aquellos componentes del parásito que la promueven. Un ejemplo de este diseño racional es la vacuna S3Pvac, la cual es una vacuna en contra de la cisticercosis. En el caso de esta vacuna para su selección se utilizó la identificación de componentes del parásito asociados con protección. Una vez que se identificaron los componentes ha resultado de gran interés conocer su efecto sobre los macrófagos considerando la participación central de los mismos en la regulación de la respuesta inmune protectora en contra de la cisticercosis.

Antecedentes

El objetivo de la vacunación es inducir una respuesta inmune protectora en contra del patógeno deseado sin el riesgo de adquirir la enfermedad o sus potenciales complicaciones. Las vacunas, así como las infecciones naturales, actúan iniciando la respuesta inmune antígeno específica. Cada patógeno o vacuna expresa antígenos que inducen la inmunidad mediada por células (71). Así, la cisticercosis porcina causada por el cestodo *T. solium* es una parasitosis vulnerable a la respuesta inmune inducida por vacunación. Entre las vacunas que se han desarrollado figura la vacuna denominada S3Pvac constituida por tres péptidos (GK-1, KETc-1 y KETc-12, de 18, 10 y 8 aminoácidos, respectivamente) que fueron identificados originalmente en una librería de cDNA de *T. crassiceps* un parásito filogenéticamente relacionado (72). Estos componentes se expresan en diferentes estructuras anatómicas del gusano, del cisticerco y en la oncoesfera de *T. solium* (73,74). La vacuna S3Pvac ha demostrado protección en contra de la cisticercosis porcina (*T. solium*) (75), así como en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*. En el modelo murino experimental de *T. crassiceps* se observó que los componentes de la vacuna S3Pvac usados de forma separada protegen de la cisticercosis (GK-1 0-70%; KETc-1 14-55%; KETc-12 0-33%) o juntos (12-70%) (76).

La respuesta inmune inducida por la vacuna S3Pvac se ha estudiado particularmente en ratones y se ha observado que los distintos componentes de ésta promueven una respuesta inmune celular efectora y de memoria. Por ejemplo KETc-1 y KETc-12 promueven un aumento en la proliferación de los linfocitos T e incremento en la producción de IL-2 e INF- γ , en el caso de GK-1 se sabe que se promueve un incremento en la proliferación de linfocitos T y un aumento en la secreción de IL-2, IL-4 e IFN- γ (73,74). De los tres péptidos que conforman la vacuna S3Pvac, el péptido GK-1 ha recibido especial atención considerando su capacidad de inducir una respuesta protectora en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* en ausencia de adyuvante. De igual forma se ha demostrado en estudios *in vitro* que la re-estimulación antigénica indujo la producción de IFN- γ (77). Todo esto postuló la hipótesis de que podría poseer propiedades inmunomoduladoras y

específicamente se propuso su papel potencial como adyuvante. Al respecto, se diseñaron experimentos para evaluar las posibles funciones como adyuvante de GK-1, demostrando que cuando se co-administró con la vacuna de influenza aumento los niveles de anticuerpos respecto a los inducidos en ratones que solo recibieron la vacuna de influenza (78). En estudios *in vivo* e *in vitro* se observó un aumento en la activación de las células T CD4⁺ antígeno específico cuando células presentadoras de antígeno fueron estimuladas con la vacuna de influenza, específicamente con hemaglutinina del virus de la influenza en conjunto con GK-1. Por otra parte, la estimulación de células presentadoras de antígeno con LPS en conjunto con GK-1 indujo un aumento en los niveles de moléculas co-estimuladoras como lo son CD86 además de un aumento de la expresión de la molécula MHC clase II, este efecto fue más notable cuando GK-1 se usó en combinación con LPS que cuando sólo se estimularon con LPS. En este mismo estudio se encontró que GK-1 en conjunto con LPS tienen un efecto sinérgico en promover la secreción de la quimiocina CCL2 (MCP-1) en células dendríticas derivadas de médula ósea (79). En un trabajo reciente se estudió el papel del péptido GK-1 en macrófagos peritoneales como inmunomodulador. Se encontró que el péptido GK-1 tiene un impacto en el perfil de expresión génica, promoviendo un aumento en la expresión de genes que codifican para marcadores M1 de activación como IL1- β , TNF- α , IL-6, IL-12, CD38, Fpr2, CCL2 y CCL7. También se demostró la disminución en la expresión de genes que codifican para marcadores de un fenotipo M2, como lo son Arg1 a tiempos tempranos del estímulo. Además, concordante con la expresión génica se observó un incremento en la expresión de la enzima NOS2, NO, CD86, MHC-II, SOD2, así como un decremento en la expresión de los marcadores del fenotipo M2 como lo son CD206. Además, se identificó la sobreexpresión del mensajero que codifica a el receptor TLR2. En este estudio se encontró también que GK-1 estimula la fagocitosis, así como la expresión de los genes CD38, Rab11fip1 y H11-M11, que favorecen la presentación antigénica. Finalmente, se reportó un aumento en la secreción de las citocinas IL-6, TNF- α , IP-10 (CXCL10), Mip-1 α (CCL3) y MCP-1 (CCL2) (80). El conjunto de estos hallazgos posiciona a GK-1 como un inductor de macrófagos proinflamatorios probablemente a través de un mecanismo dependiente de un PRR.

Con base en esta información y considerando que no se conocen las vías intracelulares que se activan en macrófagos estimulados con los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac, estudiamos el estado de activación de los macrófagos a través de la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y CD40, así como la secreción de NO, citocinas, quimiocinas y las vías intracelulares implicadas en su producción, particularmente las MAP cinasas y el factor de transcripción NF- κ B, ya que estas dos vías son esenciales en la señalización río abajo de los TLRs para la activación de los macrófagos.

Justificación

Se sabe que la cisticercosis porcina generada por el cestodo *T. solium* es una parasitosis vulnerable a la respuesta inmune inducida por vacunación. Entre las vacunas que se han desarrollado figura la vacuna denominada S3Pvac, constituida por los péptidos GK-1, KETc-1 y KETc-12 (72). El cestodo *T. crassiceps* induce una respuesta inmune tipo Th1 transitoria en las primeras semanas de infección y este fenotipo tiene un papel protector. Esta protección está asociada con un incremento en el número de macrófagos reclutados con un fenotipo pro inflamatorio, en donde las citocinas IL-12, TNF- α , INF- γ , así como NO durante esta fase temprana de infección tiene papel central (13). Debido a que la capacidad de generar un fenotipo proinflamatorio resulta central para el diseño de una vacuna y en este sentido se demostró que en macrófagos peritoneales el péptido GK-1 actúa como un inmunomodulador. El péptido GK-1 tiene un impacto en el perfil de expresión génica aumentando la expresión de genes que codifican para marcadores clásicos de activación M1 y la disminución en la expresión de genes que codifican para marcadores de un fenotipo M2. Además, concordante con la expresión génica se observó un incremento en la expresión de marcadores de activación M1, así como un decremento en la expresión de los marcadores del fenotipo M2, además de estimular la fagocitosis y la expresión de genes que se sabe favorecen la presentación antigénica y un aumento en la secreción de las citocinas proinflamatorias. Sin embargo, no se conocen las vías intracelulares que se activan y participan en la activación de macrófagos estimulados con los péptidos de la vacuna S3Pvac y en la identificación de posibles receptores que intervienen en la activación de los macrófagos. Este conocimiento de los mecanismos resulta de gran importancia biotecnológica ya que nos permitiría poder utilizar estos péptidos basado en el uso racional de sus funciones.

Hipótesis

Los componentes de la vacuna sintética S3Pvac promueven la producción de mediadores inflamatorios en macrófagos de manera dependiente de la activación de las MAP cinasas y del factor NF- κ B (p65).

Objetivo general

Identificar los mecanismos involucrados en la activación de macrófagos derivados de médula ósea inducida por los péptidos que constituyen la vacuna S3Pvac, ya sea de forma individual o en conjunto.

Objetivos particulares:

- . Evaluar la activación de los macrófagos derivados de médula ósea de ratón mediante la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y CD40, así como de las citocinas y quimiocinas tanto pro –inflamatorias como anti –inflamatorias inducidas por los péptidos GK-1, KETc-1 y KETc-12 y la vacuna S3Pvac.
- . Medir la generación de NO en macrófagos derivados de médula ósea de ratón inducida por los péptidos GK-1, KETc-1 y KETc-12 y la vacuna S3Pvac.
- . Determinar la cinética de activación de las MAP cinasas p38, ERK1/2 y JNK inducida por el péptido GK-1 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón.
- . Determinar la cinética de activación del factor de transcripción NF- κ B inducida por el péptido GK-1 en macrófagos derivados de médula ósea de ratón.
- . Identificar la participación del adaptador MyD88 en la activación del factor de transcripción NF- κ B en macrófagos derivados de médula ósea de ratón y estimulados con el péptido GK-1.

Métodos

6.1 Reactivos

El péptido GK-1 (GYYYPSDPNTFYAPPYSA), el péptido KETc-1 (APMSTPSATSVR) y el péptido KETc-12 (GNLLLSCL) fueron sintetizados como un producto GMP (del inglés, *Good manufacturing practice*) (98% de pureza y libre de endotoxina) por USV, LTD, Mumbai, India (Lote RD0001, 1456980, 1456981, respectivamente). Los péptidos fueron solubilizados en 0.9% de solución salina en una concentración de 1mg/mL. Para la vacuna S3Pvac se combinaron los tres péptidos en la misma proporción. El LPS de *Escherichia coli* serotype O111:B4 fue adquirido de Sigma-Aldrich, San Luis Misuri, USA. Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron anti-fosfo p38 (p-p38) de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); los anticuerpos en contra de NF- κ B p65, β -actina, anti-MyD88 y laminina B1 de Abcam (Cambridge, MA, USA); anti-fosfo ERK1/2 (p-ERK1/2), anti-fosfo JNK1/2, anti-CD40-Allophycocyanin (APC), anti-CD86-Phycoerythrin (PE), anti-CD80-PECy5, anti-la/le-biotin, anti-CD11b-FITC, anti-F480-biotina, anti-CD16/32 y anti-CD11c-FITC de Biolegend (San Diego, CA).

6.2 Ratones

Se utilizaron ratones hembra de 4-6 semanas de edad BALB/cAnN, C57BL/6j (las cepas originales provienen de Harlan Tekland, Madison, WI) y ratones C57BL/6j deficientes en el adaptador MyD88 (JAX stock #009088; The Jackson Laboratory). Los ratones fueron criados en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Dichos animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos con un fotoperiodo de 12 horas y temperatura controlada. Adicionalmente, los ratones fueron mantenidos en cajas con ventilación, agua y alimento *ad libitum*.

6.3 Lineamientos éticos

Todos los procedimientos realizados en los animales en este estudio se llevaron a cabo de acuerdo con los lineamientos institucionales, siguiendo el protocolo aprobado por el Comité de Bioética Institucional CICUAL (número de folio ID 152).

6.4 Obtención del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)

Para obtener el factor estimulante de colonias de macrófagos, la línea celular L929 se cultivó de la siguiente manera: las células fueron cultivadas en una concentración de 1.2×10^6 células/mL en medio DMEM (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco, Grand Island, NY), 50 mM de 2-mercaptoetanol (Promega Corporation, Wisconsin, USA), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY) durante 7 días. Transcurrido el tiempo, el sobrenadante fue retirado y se centrifugó a $300 \times g$ durante 5 minutos a 4 °C para descartar los restos celulares, el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se almacenó a -70 °C para su uso posterior.

6.5 Macrófagos derivados a partir de médula ósea

Se obtuvieron macrófagos de médula ósea de dos distintos fondos genéticos, considerando que se han encontrado variaciones de respuesta a diversos antígenos entre distintas cepas de ratones (81,82). Para obtener macrófagos a partir de médula ósea se sacrificaron ratones de BALB/cAnN y C57BL/6J, además de ratones deficientes en el adaptador MyD88 en el fondo genético C57BL/6J por medio de dislocación cervical. Una vez realizado esto se obtuvieron la tibia y el fémur. Posteriormente se obtuvo la médula ósea de estos huesos pasando 1mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, KH₂PO₄ 1.4 mM, pH 7.3) a través de la cavidad medular y recuperándola en placa de cultivo celular. Las células obtenidas se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente, se

descartó el sobrenadante y se agregaron 3 mL de solución de lisis (NH_4Cl 155mM, KHCO_3 9 mM y EDTA 0.12 mM) por 3 minutos con la finalidad de eliminar los eritrocitos presentes. Se centrifugó a $300 \times g$ durante 5 minutos a 4°C y se cultivaron 10×10^6 células en RPMI (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY), 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY) con el 10% de sobrenadante de células L929 durante 3 días a 37°C con un 5% de CO_2 y 90% de humedad. Una vez transcurrido el tiempo, las células se lavaron con PBS y se agregó 4mL de RPMI completo con 10% del sobrenadante de la línea celular L929 hasta el día 7 para su posterior estimulación.

Al día 7 los macrófagos se lavaron con 1mL de PBS, posteriormente se agregó 1mL de PBS/EDTA 0.5 mM frío y las células se colectaron mediante pipeteo en un tubo cónico. Una vez hecho, las células se centrifugaron a $300 \times g$ por 5 minutos a 4°C y se cultivaron ya sea en placas de 3 cm o 6 cm con 1.5 o 3×10^6 células en 1mL o 2mL de medio RPMI completo, respectivamente. La población de células que presenta un fenotipo de macrófagos tiene una pureza $>90\%$, evaluada mediante la expresión de los marcadores $\text{F480}^+/\text{CD11b}^+$ por citometría de flujo.

6.6 Estimulación celular

a) Evaluación del estado de activación de los macrófagos en respuesta a los péptidos y la vacuna S3Pvac:

Las células con un fenotipo de macrófagos que se derivaron de médula ósea de ratones BALB/cAnN o C57BL/6j se estimularon en 2 ml de RPMI completo con los péptidos GK-1, KETc1, KETc12 o en conjunto en la formulación de la vacuna S3Pvac en una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ o $100 \mu\text{g/mL}$ o bien con LPS (como control positivo de estimulación, en una concentración de 100ng/mL) durante 48 horas. Después de los estímulos los macrófagos se lavaron con PBS frío y se recuperaron agregando PBS/EDTA (0.5 mM) frío durante 20 minutos, se centrifugaron a $300 \times g$ durante 5 minutos y se mezclaron en 1 ml de PBS,

posteriormente los macrófagos se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos. Posteriormente, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se congelaron a -70 °C hasta su uso.

b) Evaluación de la activación de las vías de las MAP cinasas en macrófagos estimulados con GK-1:

Las células con el fenotipo de macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratones C57BL/6j se estimularon en 1 mL de RPMI con el péptido GK-1 en una concentración de 10 µg/mL o 100 µg/mL, durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Como control positivo de estimulación se utilizó LPS en una concentración de 100ng/mL, durante 20 minutos. Una vez terminado el estímulo los macrófagos se pusieron en una cama de hielo y se lavaron con 1 mL de PBS.

c) Evaluación de la activación del factor NF-κB en macrófagos estimulados con GK-1:

Las células con el fenotipo de macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratones silvestres C57BL/6j o carentes de MyD88 se estimularon en 1 mL de RPMI con el péptido GK-1 en una concentración de 10 µg/mL o 100 µg/mL durante 0.5, 1, 2 y 3 horas, como control positivo de estimulación se utilizó LPS en una concentración de 100ng/mL durante 3 horas.

6.7 Determinación del fenotipo de los macrófagos derivados de médula ósea de ratón mediante citometría de flujo

Los niveles de expresión de F480, CD11b, CD80, CD86 y CD40 en macrófagos derivados de medula ósea se determinaron mediante citometría de flujo con los anticuerpos anti-F480 (acoplado a Biotina), anti-CD11b (acoplado a isotiocinato de fluoresceína, FITC), anti-CD86 (acoplado a ficoeritrina), anti-CD80 (acoplado a ficoeritrina-Cy5) y anti-CD40 (acoplado a alofocianina). Los macrófagos se colocaron en una cama de hielo y se lavaron con 1 mL de PBS. Posteriormente, se agregó 1 mL de PBS/EDTA 0.5 mM frío durante 20 minutos, una vez transcurrido el tiempo los macrófagos se desprendieron con una espátula para mantener su

integridad, se recuperaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 4 °C. Los macrófagos (0.5×10^6) se incubaron en presencia del anticuerpo anti-CD16/32 en una dilución 1:100 durante al menos 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se lavaron las células dos veces con solución de tinción (PBS con suero fetal bovino al 2% y NaN₃ al 0.02%), se adicionaron los anticuerpos a medir 30 minutos a 4 °C en 20 µl de solución de tinción a una dilución final de 1:100. Al terminar se lavaron dos veces con la solución de tinción, posteriormente sólo en el caso de los anticuerpos acoplados a biotina se agregó estreptavidina unida a ficoeritrina o aloficocianina durante 20 minutos a 4 °C en una dilución 1:200. Finalmente, las células se lavaron dos veces con solución de tinción y finalmente las células se fijaron con formaldehído al 2%. En todos los experimentos se incluyeron los controles de isotipo correspondientes. Los niveles de fluorescencia se determinaron por medio del citómetro de flujo Attune Nxt cytometer (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Los datos se analizaron con el programa Flow Jo (v.8.7).

6.8 Obtención de extractos proteínicos para Western blot

6.8.1 Extractos totales para evaluar la activación de las MAP cinasas:

A los macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratón una vez estimuladas se les agregaron 100 µL de amortiguador de lisis (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 250mM, EDTA 2mM pH 7.4, Tritón X100 1% y glicerol 10%) con inhibidores de fosfatasa y proteasas (NaF 25mM, NaPPi 1mM, NaVO₄ 1mM, PMSF 1mM, pepstatina A 0.1mg/mL, leupeptina 0.1mg/mL, antipaina 0.1mg/mL, aprotinina 0.1mg/mL y DTT 25mM) (todos de Sigma Aldrich, San Luis Misuri, USA), las células se lisaron, se pasaron a un tubo eppendorf y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Transcurrido el tiempo se centrifugaron durante 10 minutos a 15,600 x g. el sobrenadante se recuperó y se guardó a -70 °C hasta su uso posterior.

6.8.2 Extractos nucleares para evaluar la translocación de NF-κB:

Los extractos nucleares se prepararon de acuerdo con el protocolo previamente reportado por (83). Una vez terminado el estímulo, los macrófagos se colocaron en

una cama de hielo y se lavaron con 1 mL de PBS. Posteriormente se agregó 1 mL de PBS/EDTA 0.5 mM frío durante 20 minutos, los macrófagos se desprendieron con una espátula para mantener su integridad, se recuperaron en un tubo eppendorf y se centrifugaron a 300 x g durante 5 minutos a 4 °C. Transcurrido el tiempo se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de PBS, se centrifugaron a 10,000 x g durante 20 segundos a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los macrófagos se mezclaron en 200 µl de amortiguador de lisis hipotónico (Hepes 10 mM pH 7.6, KCL 10mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM) suplementado con inhibidores (PMSF 1mM, aprotinina 0.1mg/mL, leupeptina 0.1mg/mL, pepstantina A 0.1mg/mL, NaVO₄ 1mM, DTT 1 mM) (todos de Sigma Aldrich, San Luis Misuri, USA) y se incubaron durante 15 minutos en hielo. Las células se lisaron añadiendo 25 µl de NP40 al 10% agitando vigorosamente durante 10 segundos. Se centrifugaron a 13,000 x g durante 40 segundos, los núcleos se extrajeron incubando en un amortiguador de extracción nuclear (Hepes 20 mM pH 7.6, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) suplementado con inhibidores (PMSF 1 mM, aprotinina 0.1mg/mL, leupeptina 0.1mg/mL, pepstantina A 0.1mg/mL, NaVO₄ 1mM, DTT 1 mM), se agitaron vigorosamente durante 15 minutos a 4 °C y posteriormente se centrifugaron a 13,000 x g durante 5 minutos, los sobrenadantes se recuperaron y se congelaron a -70 °C para su posterior análisis.

6.9 Western blot

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Lowry (84) y se separaron electroforéticamente 40 µg de proteína de extractos totales y 10 µg para extractos nucleares por SDS-PAGE a 30 mA durante 75 minutos. Se transfirieron a una membrana de polivinilideno (PVDF) de 0.45 µm en amortiguador de transferencia (Tris 25 mM, glicina 200 mM y metanol al 20%) a 100 Volts durante 90 minutos. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS-T (Tris/HCl 20 mM ph 7.5, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%) o BSA (albumina sérica bovina) al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Subsecuentemente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario en BSA al 5% o leche al 5% en TBS-T durante toda la noche a 4 °C con agitación suave.

Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 minutos con TBS-T y se agregó el anticuerpo secundario diluido 1:5,000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T durante 5 minutos. La unión del anticuerpo fue detectada mediante la solución SuperSignal™ West Dura (Thermo Fisher, Massachusetts, USA). En todos los casos, las bandas se escanearon y analizaron con el software ImageJ. Los valores se normalizaron con respecto a las bandas del control de carga (actina o laminina)

6.10 Immunology Multiplex Assay

Las concentraciones de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento se determinaron en los sobrenadantes de los macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratón previamente estimulados. Se utilizó un panel comercial de 20 analitos (Mouse Cytokine Magnetic 20-Plex panel: FGF Basic, IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-6, IL-12, IL-17, MIP-1 α , GM-CSF, MCP-1, IL-5, VEGF, IL-1 α , INF- γ , TNF- α , IL-2, IP-10, MIG, KC, IL-4). El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA). Primero se añadieron 200 μ l de solución de lavado a cada pozo de una placa de 96 pozos. La placa se selló y se mezcló en un agitador por 10 minutos a temperatura ambiente (20-15 °C). Una vez terminado el tiempo se decantó la solución de lavado y los residuos se eliminaron de los pozos invirtiendo la placa. Posteriormente a los pozos correspondientes se añadieron 25 μ l de estándares, controles y muestras diluidos en “solución de ensayo”. Una vez hecho esto se añadió 25 μ l de la mezcla de perlas a cada pozo. La placa se cubrió y se incubó en agitación durante toda la noche de 2-8°C. Una vez transcurrido el tiempo se removió el contenido de los pozos con la ayuda de un magneto y se lavó dos veces la placa utilizando la solución de lavado. Posteriormente, se añadieron 25 μ l de anticuerpos de detección a cada pozo, la placa se cubrió con papel aluminio y se puso en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 25 μ l de estreptavidina-ficoeritrina a cada pozo. La placa se cubrió con papel aluminio y se incubó en agitación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se removió el contenido de los pozos con la ayuda de un magneto y se lavó dos veces con la solución de lavado. Una vez realizado, se

le agregaron a la placa 150 μl de la “solución trabajo” a todos los pozos. Las perlas se mezclaron durante 5 minutos. La placa se leyó utilizando el sistema MagPix Luminex (Xponent Software).

6.11 Cuantificación de óxido nítrico mediante Reacción de Griess

La cantidad de nitrito (NO_2^-) presente en el sobrenadante celular se evaluó mediante la reacción de Griess, el cual es uno de los dos principales productos de NO, el cual es estable y no volátil. Para ello se preparó una curva estándar en el medio RPMI completo en el cual los macrófagos se cultivaron. En el caso de la curva se agregaron 50 μl de RPMI completo y posteriormente se añadió la solución de nitrito estándar y realizaron las diluciones correspondientes (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 y 1.56 μM), para el caso del blanco sólo se agregaron 50 μl de medio RPMI completo. En el caso de las muestras se añadieron por duplicado 50 μl al pozo correspondiente, posteriormente se añadieron 50 μl de la solución de sulfanilamida a todos los pozos, así como a la curva. Se incubó durante 5-10 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez transcurrido el tiempo se agregaron 50 μl de solución de NED a todos los pozos incluyendo la curva y se incubaron durante 5-10 minutos protegidos de la luz. Posteriormente se leyó la placa en un rango de 520 a 550nm.

6.12 Análisis de resultados.

Se utilizó una prueba de normalidad (D'Agostino-Pearson) para determinar la distribución normal de los grupos experimentales. Los datos fueron comparados con una ANOVA de una vía seguido por una prueba de comparación múltiple o un student's t no paramétrico usando el software GraphPad versión 6 para Mac. Los datos se reportan en promedio \pm SEM y la significancia estadística fue aceptada con una $p < 0.05$.

Resultados

7.1 Los péptidos GK-1 y KETc-12 componentes de la vacuna S3Pvac inducen un aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos derivados de médula ósea a partir de ratón

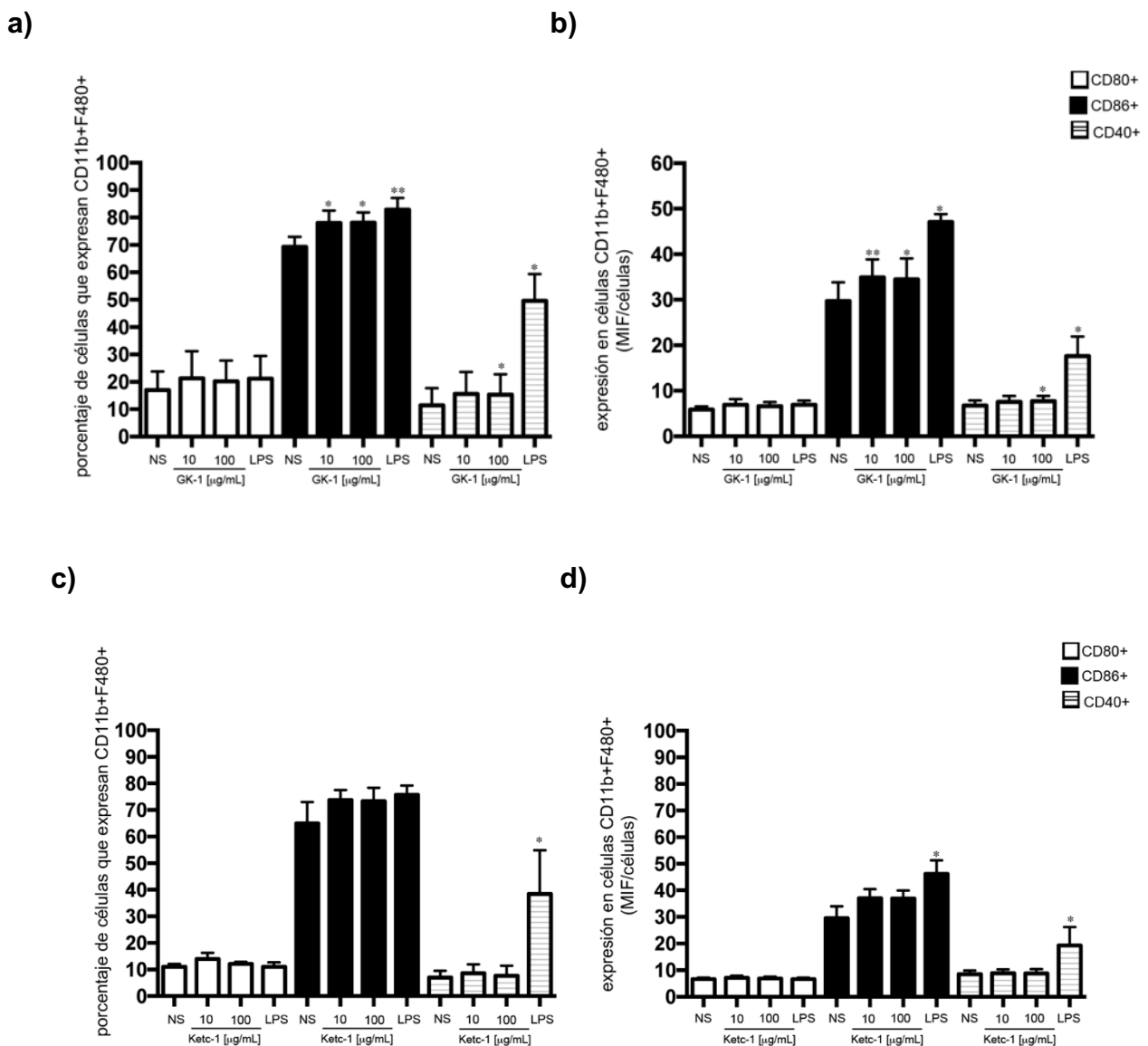
El estado de activación de los macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL6J se analizó mediante la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y CD40 utilizando citometría de flujo. Los macrófagos estimulados con el péptido GK-1 en concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 48 horas mostraron un aumento significativo con respecto al control en el porcentaje de células que expresan de CD86, así como en la expresión de CD40 con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3a). Se observó también un aumento significativo en la expresión de CD86 (Intensidad Media de Fluorescencia) tanto en la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como en la 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de GK-1, así como en la expresión de CD40 cuando fueron estimulados con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido GK-1 (Figura 3b). Como se aprecia en la Figura 3, el LPS (control positivo) indujo el incremento de células que expresaron CD40 y CD86 (Figura 3a) así como un aumento en los niveles de expresión de CD40 y CD86 (Figura 3b), pero no de CD80, de manera muy similar a como lo hizo GK-1.

En el caso de la estimulación de los macrófagos con el péptido KETc-1 no se observó un aumento significativo con respecto al control en el porcentaje de células (Figura 3c) o en la expresión (Figura 3d) de ninguna de las moléculas co-estimuladoras evaluadas en ambas dosis. Sin embargo, cuando los macrófagos fueron estimulados con LPS se observó un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan las moléculas co-estimuladoras así como en el nivel de expresión de éstas.

Con respecto al efecto de la estimulación con el péptido KETc-12 los macrófagos no mostraron un aumento significativo con respecto al control en el porcentaje de células que expresan las moléculas co-estimuladoras (Figura 3e). Sin embargo, los macrófagos al ser estimulados con KETc-12 mostraron un aumento significativo en la expresión de CD86 en la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 3f). Finalmente, los

macrófagos al ser estimulados con la vacuna S3Pvac no mostraron un aumento significativo en el porcentaje de expresión (Figura 3g) o en la expresión de las moléculas co-estimuladoras (Figura 3h).

Es relevante señalar que en todos los casos se observó que los macrófagos expresan mayores niveles de CD86 que de las otras moléculas co-estimuladoras sin importar la condición experimental a la que fueron sujetos.



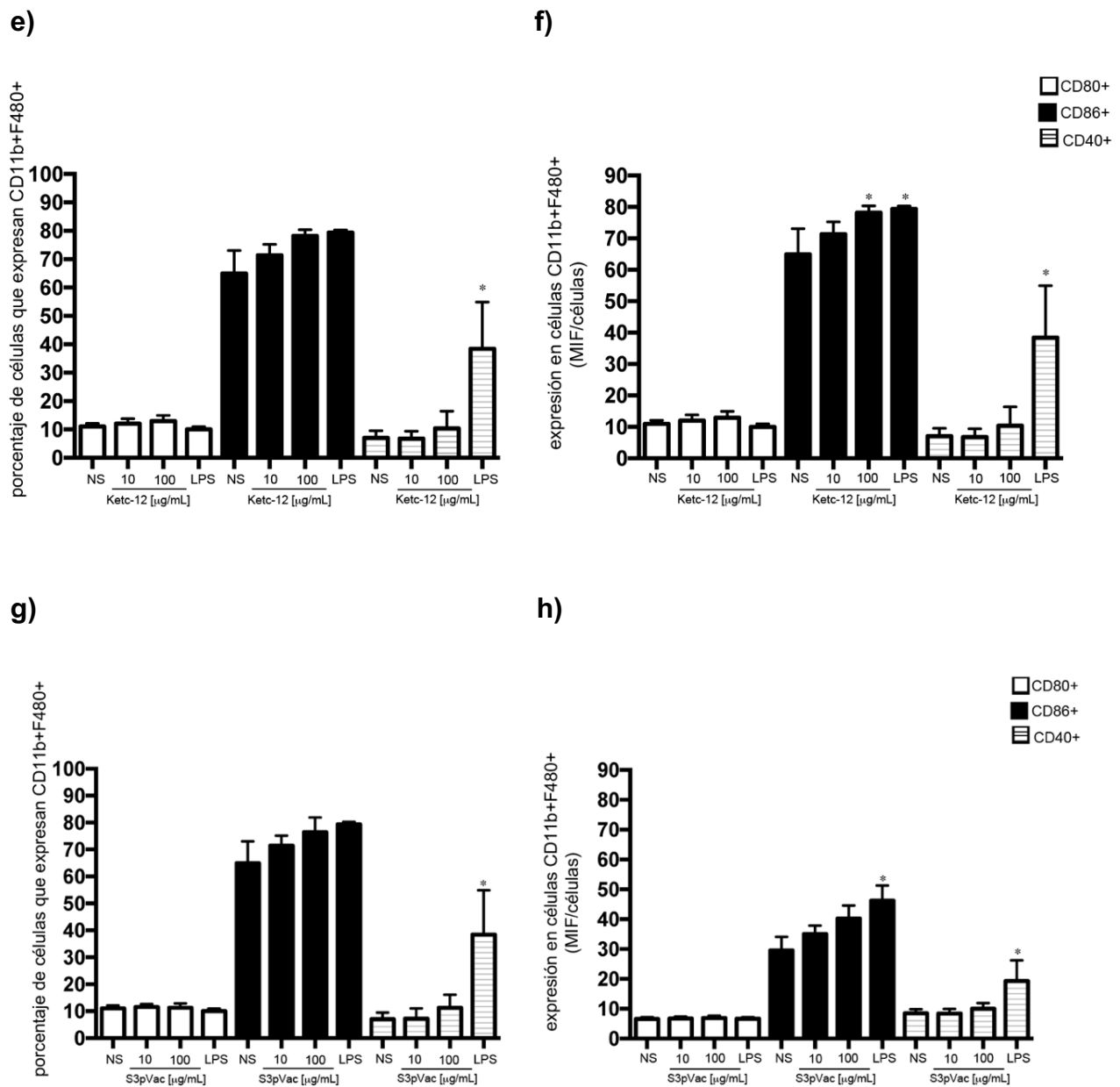
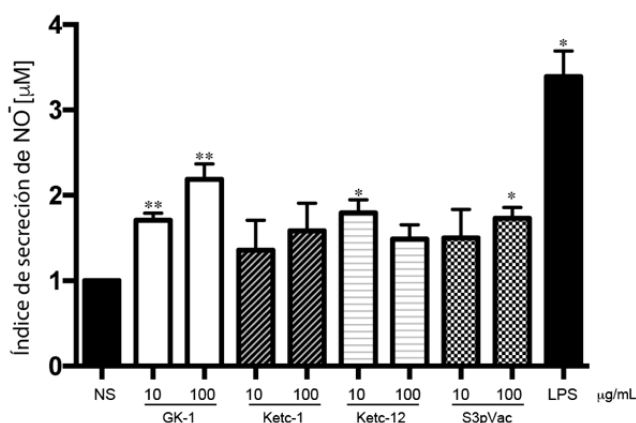


Figura 3. Los macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J en presencia de los péptidos muestran un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan CD86. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J fueron estimulados por 48 horas con los péptidos **a,b)** GK-1; **c,d)** KETc-1; **e,f)** KETc-12 y **g,h)** la vacuna S3Pvac en las dosis de 10μg/mL y 100μg/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el porcentaje de células que expresan CD80, CD86 y CD40 mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a GK-1 (n=4); KETc-1 (n=3); KETc-12 (n=3); S3Pvac (n=3) experimentos independientes. Los datos fueron comparados mediante un ANOVA de una vía y posteriormente una prueba T-test. *p < 0.05, **p<0.01 o ***p<0.001 con respecto a las células no estimuladas (NS). Anexo 1: Dot plots representativos de las graficas.

7.2 Los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac aumentan la producción de óxido nítrico en macrófagos

El NO es un compuesto altamente reactivo y un radical libre en forma de gas que es producido por la oxidación de la L-arginina a citrulina mediado por la enzima NOS2 el cual es tóxico para muchos patógenos, incluidos patógenos intracelulares y extracelulares (85). Con el fin de caracterizar si los componentes de la vacuna (GK-1, KETc-1 y KETc-12) y la vacuna S3Pvac inducen la producción de NO como parte de sus propiedades inmunoestimuladoras, se estimularon macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa BALB/cAnN y C57BL/6J con cada uno de los péptidos o con la vacuna S3Pvac por 48 horas. Una vez realizado el estímulo se observó mediante la reacción de Griess la liberación del NO. Como se observa en la Figura 4, el péptido GK-1 induce un aumento significativo en la producción de óxido nítrico tanto en la dosis de 10 μ g/mL como en la dosis de 100 μ g/mL en los macrófagos de la cepa BALB/c (Figura 4a) y de la cepa C57BL6J (Figura 4b), mientras que KETc-12 indujo la expresión de NO en la dosis de 10 μ g /mL en BALB/c y en la dosis de 100 μ g /mL en C57BL/6J. Para el caso de KETc1, éste sólo indujo la producción de NO a dosis de 100 μ g /mL en la cepa C57BL/6J. Finalmente para el caso de la vacuna S3Pvac se puede observar que solo tuvo una tendencia en la producción de NO al ser administrada a una dosis de 100 μ g /mL y solo en la cepa C57BL/6J. Estos resultados señalan que los péptidos, así como la vacuna son capaces de inducir la activación de los macrófagos promoviendo un posible fenotipo M1.

a)



b)

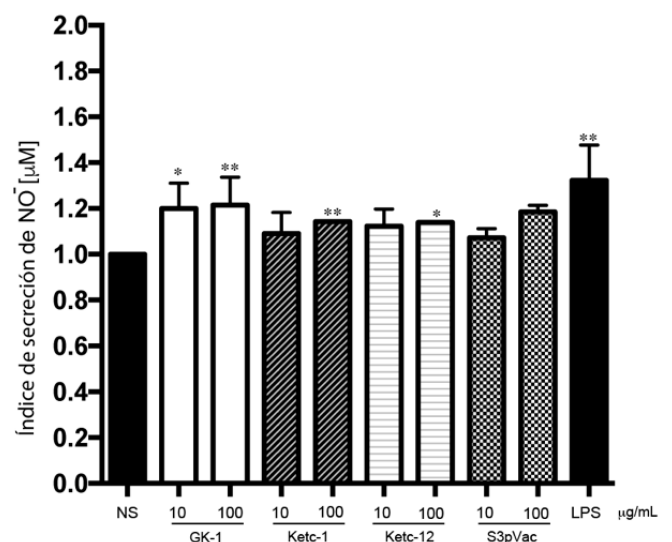
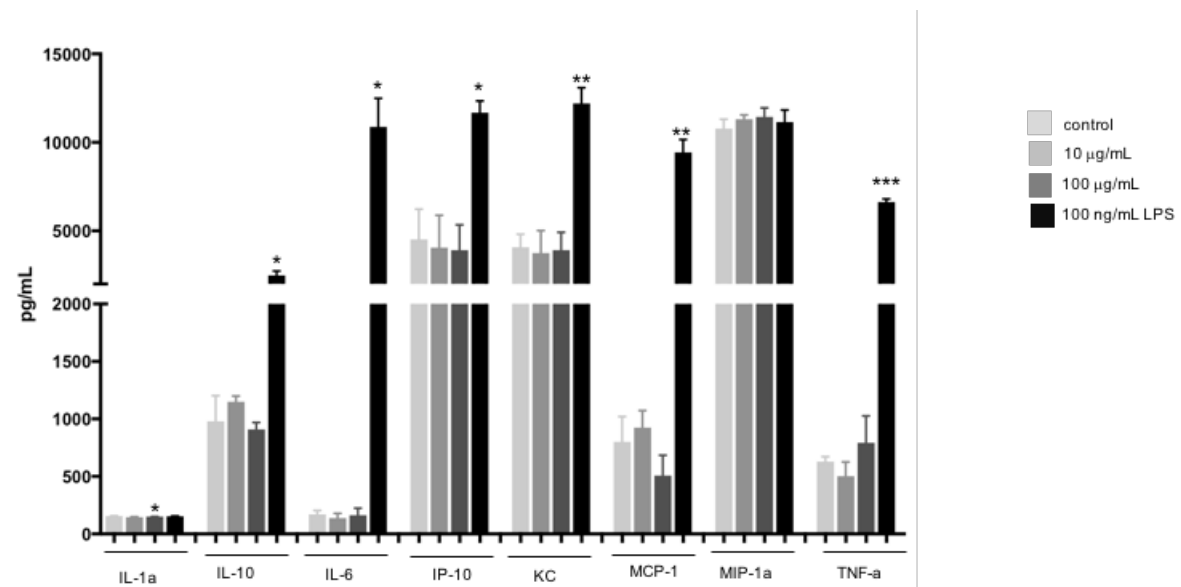


Figura 4. Los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 así como la vacuna S3Pvac inducen un aumento en la secreción de NO. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa **a) BALB/cAnN o b) C57BL/6J** fueron estimulados por 48 horas con los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac en las dosis de 10µg/mL y 100µg/mL, como control positivo se empleó LPS en la dosis de 100ng/mL. Posteriormente se analizó la presencia de NO⁻ en el sobrenadante celular mediante la reacción de Griess. Los datos corresponden a BALB/c n=4; C57Bl/6, n=7 experimentos independientes. Los datos fueron comparados mediante un ANOVA y posteriormente una prueba t-test *p < 0.05, **p<0.01 o ***p<0.001 con respecto a las células no estimuladas (NS).

7.3 Efecto de GK-1 sobre la secreción de citocinas y quimiocinas por macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/c y C57BL/6

Como se observa en la Figura 5, los macrófagos derivados de la médula ósea de ratones BALB/cAnN al ser estimulados con el péptido GK-1 no aumentaron de forma significativa la producción de citocinas. Para las citocinas IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1 y TNF- α sólo los macrófagos estimulados con LPS muestran un incremento de su expresión (Figura 5a). De igual manera los macrófagos de la cepa C57BL/6J al ser estimulados con GK-1 no mostraron un aumento significativo en la expresión de ninguna de las citocinas evaluadas en este estudio en ninguna de la dosis, mientras que el control positivo de LPS logró un aumento significativo con respecto al control de las citocinas IL-6, KC, MCP-1, MIP-1 α y TNF- α (Figura 5b).

a)



b)

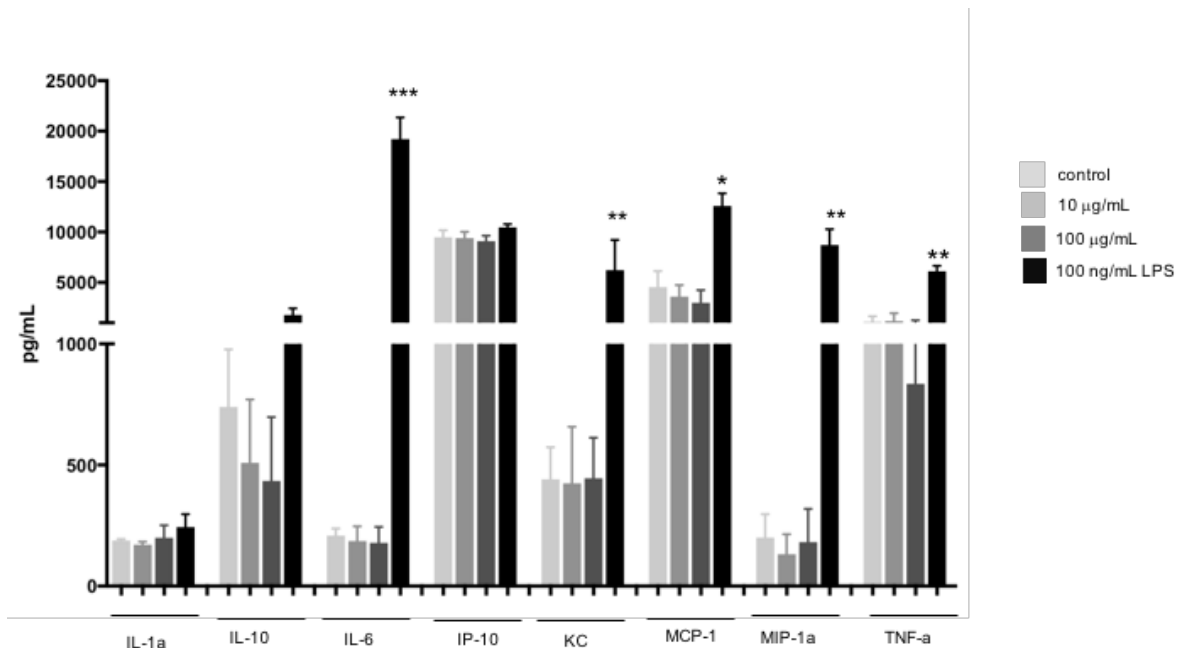
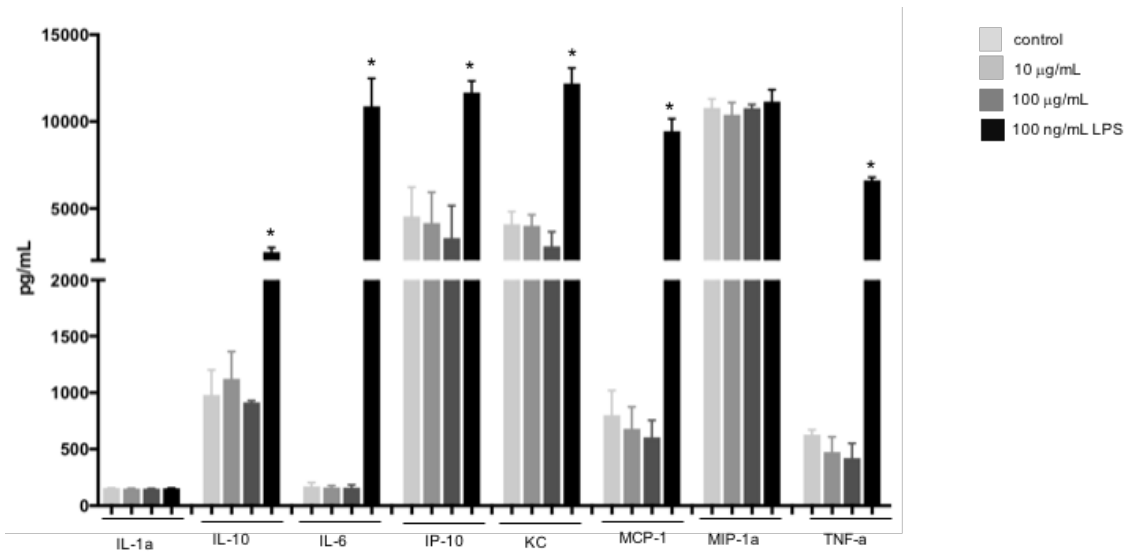


Figura 5. Niveles de citocinas liberadas por macrófagos en presencia de GK-1. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa **a)** BALB/cAnN y **b)** C57BL/6J fueron estimulados durante 48 horas con el péptido GK-1 en las dosis de 10µg/mL y 100µg/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el aumento de la secreción de IL-1α, IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1, MIP1-α y TNF-α mediante MAX PIX. Promedio ± EE de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba T-test. *p < 0.05, **p<0.01 o ***p<0.001 con respecto a las células no estimuladas.

7.4 Efecto de KETc-1 en la secreción de citocinas y quimiocinas por macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/cAnN y C57BL/6j

Los macrófagos de la cepa BALB/cAnN al ser estimulados con el péptido KETc-1 no mostraron un aumento significativo en la expresión de las citocinas evaluadas con respecto al control. El control positivo con LPS aumentó significativamente la secreción de las citocinas IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1 y TNF-α (Figura 6a). Resultados similares se observaron en los macrófagos de la cepa C57BL/6J que al ser estimulados con KETc-1 no mostraron un aumento significativo en la expresión de ninguna de las citocinas evaluadas en ninguna de la dosis, mientras que el control positivo de LPS logró un aumento significativo con respecto al control de las citocinas IL-6, KC, MCP-1, MIP-1α y TNF-α (Figura 6b).

a)



b)

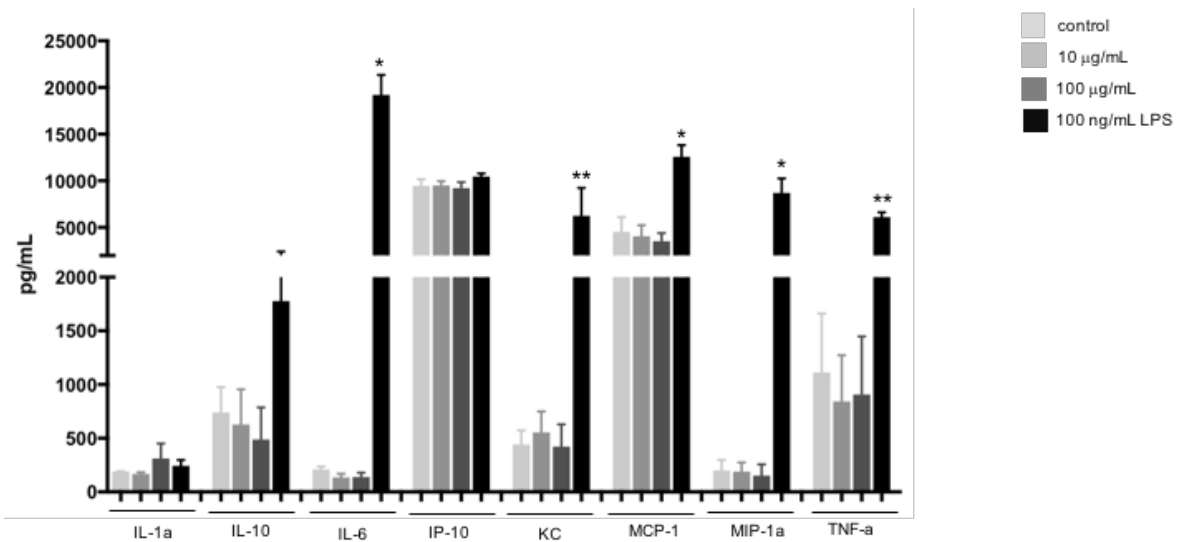
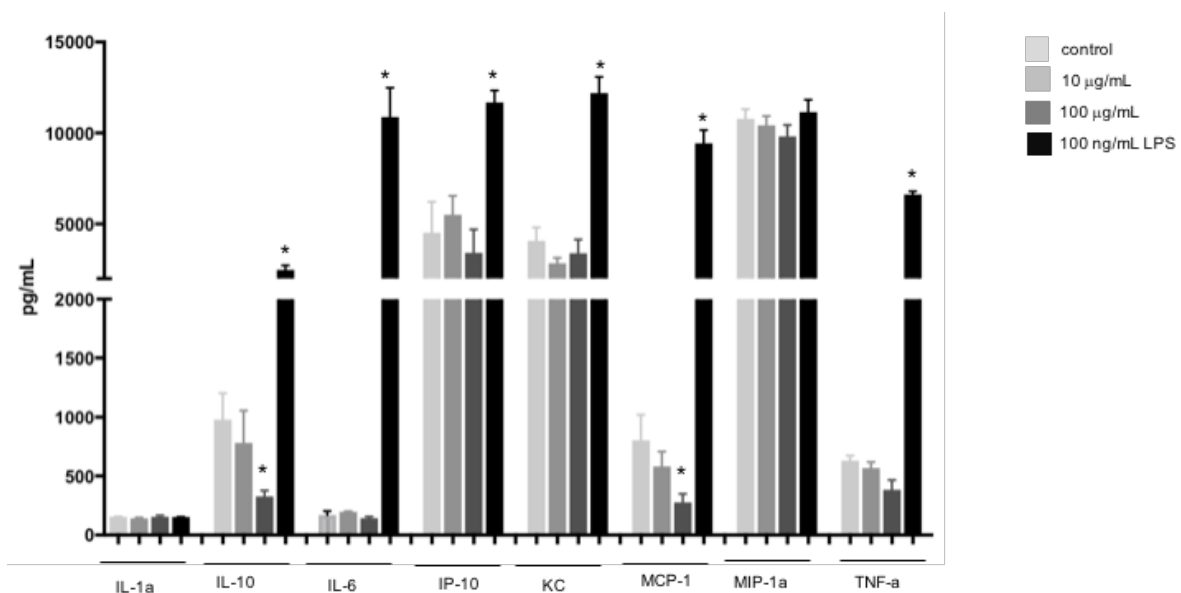


Figura 6. Los macrófagos de la cepa BALB/cAnN en presencia de KETc-1 no mostraron un aumento significativo en la secreción de las citocinas. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa **a)** BALB/cAnN y **b)** C57BL/6J fueron estimulados por 48 horas con el péptido KETc-1 en las dosis de 10µg/mL y 100µg/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el aumento de la secreción de IL-1α, IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1, MIP1-α y TNF-α mediante MAX PIX. Promedio ± EE de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba T-test. *p < 0.05, **p<0.01 o ***p<0.001 con respecto a las células no estimuladas.

7.5 Efecto de KETc12 sobre la secreción de citocinas y quimiocinas por macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J.

Los macrófagos de la cepa BALB/cAnN al ser estimulados con el péptido KETc-12 mostraron una disminución significativa con respecto al control de las citocinas IL-10 y MCP-1 en la dosis de 100µg/mL, el control positivo de LPS logró incrementar significativamente la secreción de las citocinas IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1 y TNF- α con respecto a los macrófagos incubados con RPMI (control negativo) (Figura 7a). Los macrófagos obtenidos a partir de médula ósea de ratones de la cepa C57BL/6J al ser estimulados con KETc-12 tanto en la dosis de 10µg/mL como de 100µg/mL no aumentaron significativamente la expresión de las citocinas. Para el caso de los macrófagos estimulados con LPS se observó un aumento significativo en la expresión de las citocinas IL-1 α , IL-6, KC, MCP-1, MIP-1 α y TNF- α con respecto al control (Figura 7b).

a)



b)

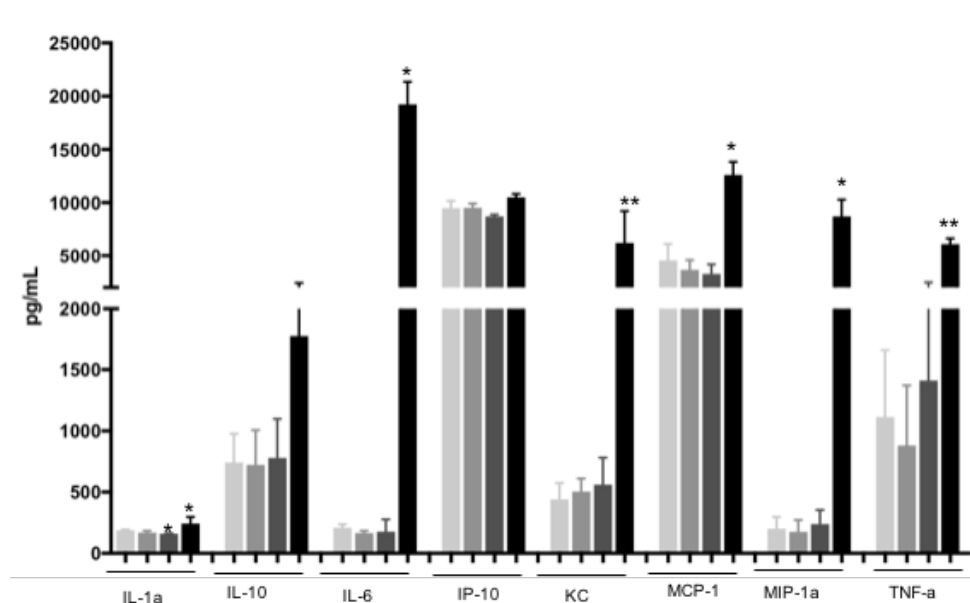


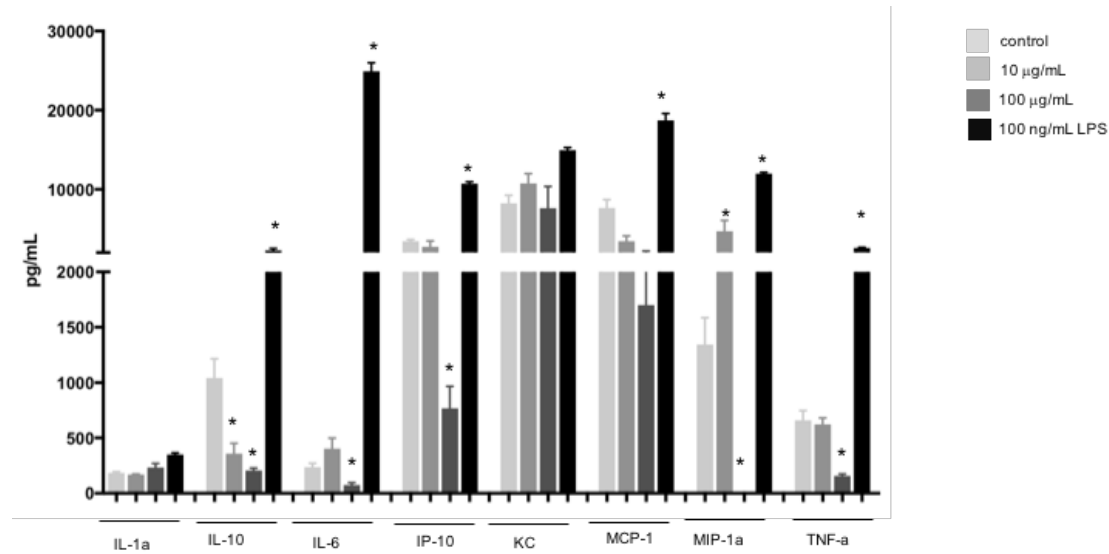
Figura 7. Los macrófagos de la cepa BALB/c en presencia de KETc-12 mostraron una disminución significativa en la secreción de las citocinas IL-10 y MCP-1. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa **a)** BALB/cAnN y **b)** C57BL/6J fueron estimulados por 48 horas con el péptido KETc-12 en las dosis de 10μg/mL y 100μg/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el aumento de la secreción de IL-1α, IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1, MIP1-α y TNF-α mediante MAX PIX. Promedio ± EE de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba T-test. *p < 0.05, **p<0.01 o ***p<0.001 con respecto a las células no estimuladas.

7.6 Efecto de la vacuna S3Pvac sobre la secreción de citocinas y quimiocinas por macrófagos derivados de médula ósea de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J

Los macrófagos de la cepa BALB/cAnN al ser estimulados con la vacuna S3Pvac mostraron una disminución significativa en la secreción de la citocina IL-10 en las dosis de 10μg/mL y 100μg/mL, de igual manera las citocinas IL-6, IP-10, MIP-1α y TNF-α en la dosis de 100μg/mL disminuyeron significativamente con respecto al control. Sin embargo, observamos un aumento en la secreción de MIP-1-α en la dosis de 10μg/mL con respecto al control, finalmente macrófagos estimulados con LPS aumentaron significativamente la secreción de las citocinas IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1 y TNF-α (Figura 8a). Para los macrófagos de la cepa C57BL/6J se observa que al ser estimulados con la vacuna S3Pvac no mostraron un aumento significativo en la expresión de las citocinas mientras que el control positivo de LPS

logró un aumento significativo de las citocinas IL-6, KC, MCP-1, MIP-1 α y TNF- α con respecto al control (Figura 8b).

a)



b)

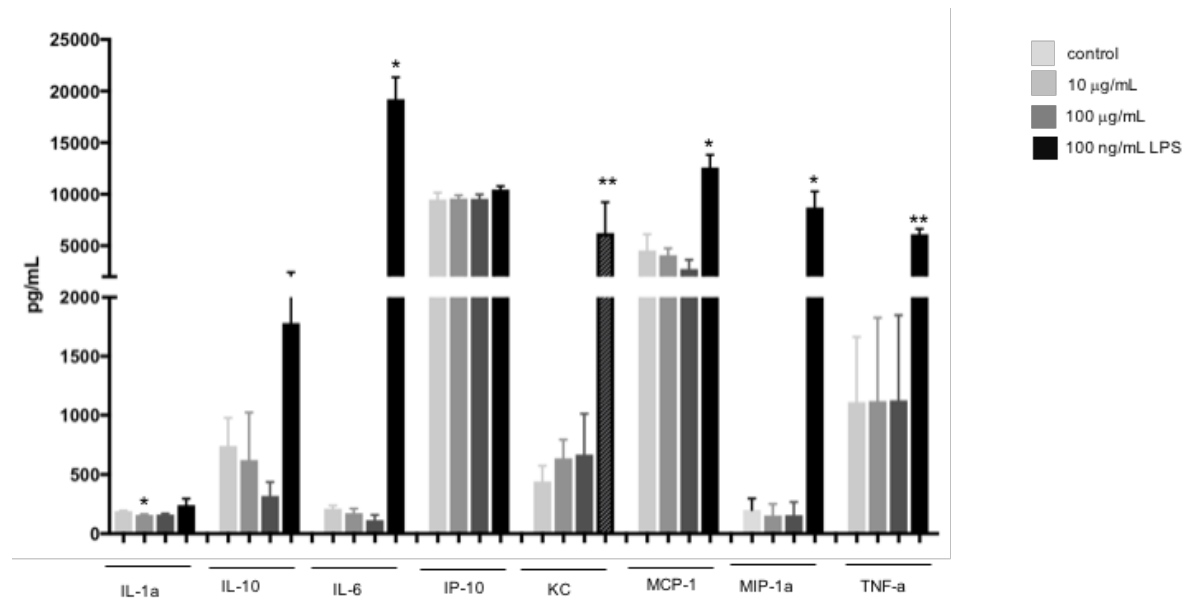
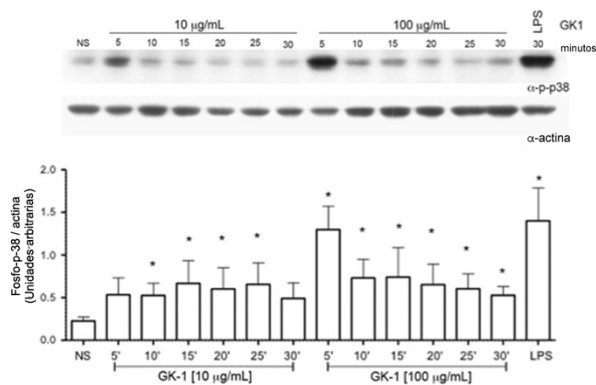


Figura 8. Los macrófagos de la cepa BALB/c en presencia de S3Pvac mostraron una disminución significativa en la secreción de las citocinas IL-10, IL-6, IP-10 y un aumento de la secreción de la citocina MIP-1 α . Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa a) BALB/cAnN y b) C57BL/6J fueron estimulados por 48 horas con el péptido KETc-12 en las dosis de 10 μ g/mL y 100 μ g/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el aumento de la secreción de IL-1 α , IL-10, IL-6, IP-10, KC, MCP-1, MIP-1 α y TNF- α mediante MAX PIX. Promedio \pm EE de 3 experimentos independientes. Los datos fueron analizados mediante una prueba t-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ o *** $p < 0.001$ con respecto a las células no estimuladas

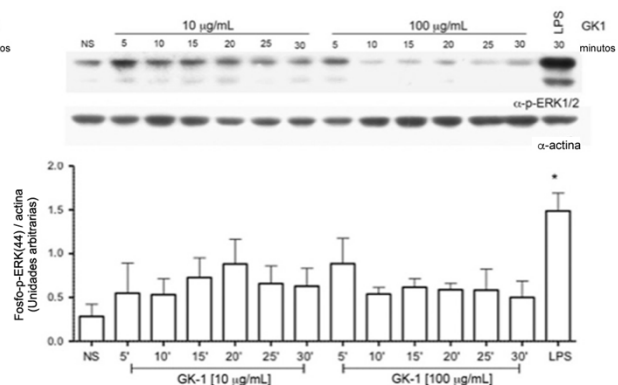
7.7 El péptido GK-1 induce la fosforilación de las MAP cinasas p38, ERK1/2 y JNK en macrófagos de la cepa C57BL/6J

Considerando que los principales hallazgos previos entre estos el aumento en la secreción de NO, el aumento en la expresión de CD86 y CD40 se observaron con el péptido GK-1 se decidió continuar la caracterización de las vías intracelulares implicadas en la activación de los macrófagos sólo con este péptido, aunado a que se han demostrado propiedades inmunomoduladoras y antitumorales (80,86). Lo primero que evaluamos fue la activación de las MAP cinasas, ya que se sabe que la vía de las MAP cinasas tiene un papel esencial en la regulación de la respuesta inmune. Con el fin de determinar si las MAP cinasas se encontraban activadas por la acción del péptido GK-1 nos propusimos evaluar la posible fosforilación de las MAP cinasas p38, ERK1/2 y JNK1/2 como medida indirecta de su activación mediante western blot. Como se aprecia en la Figura 8a, los macrófagos de la cepa C57BL/6J al ser estimulados con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido GK-1 mostraron un aumento en la fosforilación de la MAP cinasa p38 desde los 10 minutos hasta los 30 minutos, mientras que la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ indujo un aumento en la fosforilación a los 5 y hasta los 30 minutos de ser estimulados. En el caso de ERK1/2 no se observó un aumento significativo en la fosforilación de ERK1/2 (Figura 9b). Finalmente, GK-1 promueve la activación de la MAP cinasa JNK a los 25 minutos de estímulo con la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 9c).

a)



b)



c)

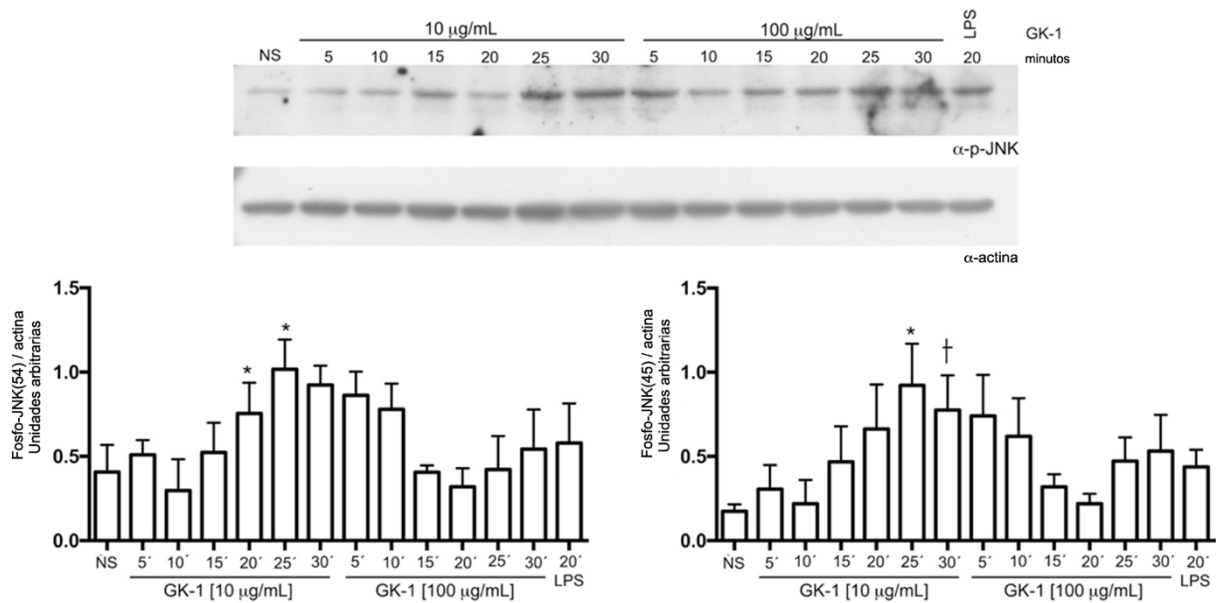


Figura 9. Los macrófagos de la cepa C57BL/6J en presencia de GK-1 induce la fosforilación de la MAP cinasa p38. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J fueron estimulados por 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos con el péptido GK-1 en las dosis de 10 μ g/mL y 100 μ g/mL, y como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL por 20 o 30 minutos, posteriormente se analizó la fosforilación de las MAP cinasas **a)** p38, **b)** ERK1/2 y **c)** JNK, así como la expresión de actina mediante western blot. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante una prueba T-test *p<0.05, **p<0.01 o ***p<0.001, † p=0.006 con respecto a las células no estimuladas (NS).

7.8 Activación de NF- κ B en ratones silvestres C57B6/J y mutantes para la molécula MyD88

Con el fin de continuar caracterizando las propiedades inmoduladoras del péptido GK-1 evaluamos la activación de la vía del factor de transcripción NF- κ B. Primero caracterizamos la fosforilación del inhibidor I κ B, el cual una vez fosforilado es ubiquitinado y degradado permitiendo la translocación de p65 al núcleo (87). En este caso encontramos que GK1 induce la fosforilación de I κ B a los 15 minutos de estímulo con la dosis de 10 μ g/mL (Fig. 10a). Por otra parte, evaluamos la translocación al núcleo de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B y encontramos que la dosis de 10 μ g/mL y 100 μ g/mL del péptido GK-1 inducen un aumento significativo en la translocación al núcleo de NF- κ B (p65) a 1, 2 y 3 horas de estimulación. Finalmente, evaluamos la posibilidad de que el péptido GK-1 señalizara a través de un receptor TLR utilizando macrófagos provenientes de ratones carentes del adaptador MyD88 ya que este adaptador es utilizado por todos

los TLRs con excepción de TLR3 para señalar río abajo y activar tanto a MAP cinasas como al factor de transcripción NF- κ B. En este caso encontramos que la translocación al núcleo inducida por el péptido GK-1 se pierde en ratones KO para el adaptador MyD88 (Figura 10b)

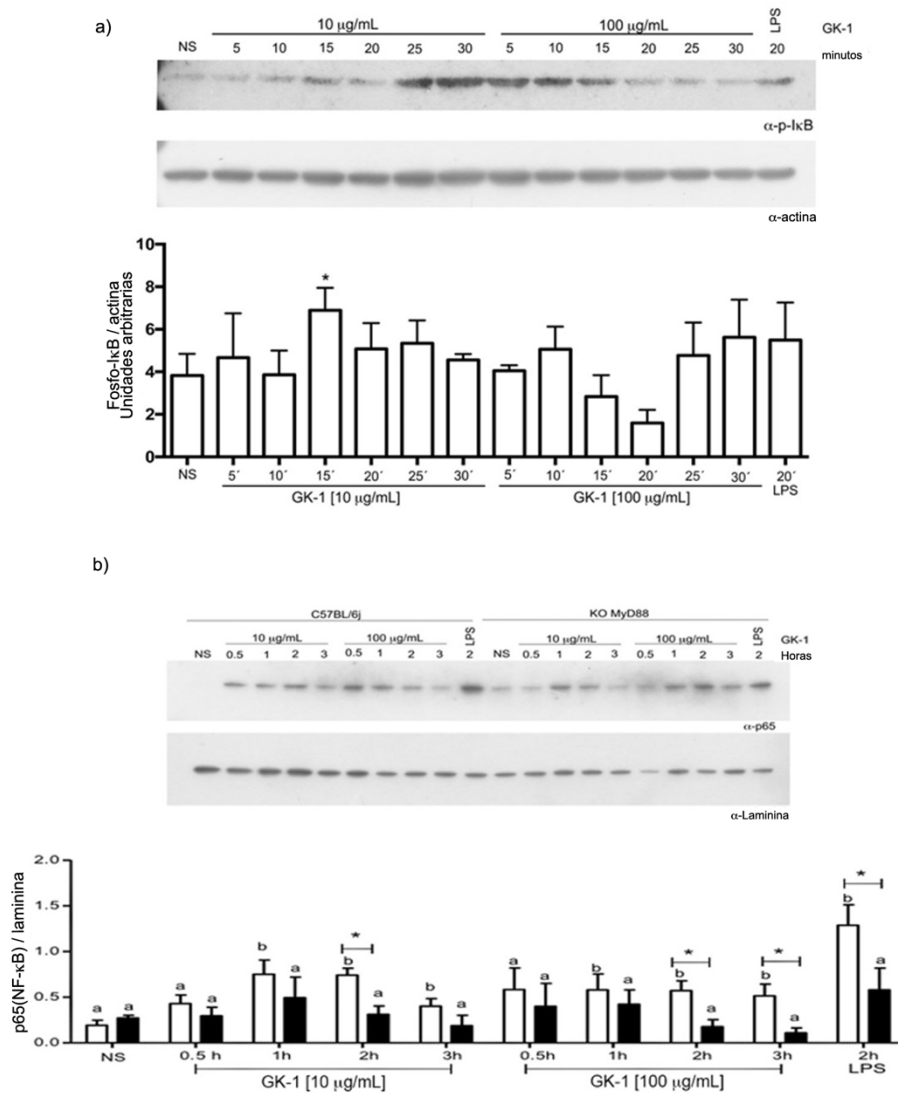


Figura 10. La activación de NF- κ B (p65) en los macrófagos de la cepa C57BL/6J es inducida por GK-1. **a)** Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J fueron estimulados por 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos con el péptido GK-1 en las dosis de 10 μ g/mL y 100 μ g/mL, como control positivo LPS en la concentración de 100 ng/mL durante 20 minutos. Posteriormente en extractos totales se analizó la fosforilación de κ B, así como la expresión de actina mediante Western blot. **b)** Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J \square y Knock out \blacklozenge para MyD88 fueron estimulados por 0.5, 1, 2, y 3 horas con el péptido GK-1 en las dosis de 10 μ g/mL y 100 μ g/mL, como control positivo en la concentración de 100 ng/mL por 2 horas, posteriormente en extractos nucleares se analizó la translocación de p65, así como la expresión de laminina mediante Western blot. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes analizado mediante la prueba de t-test pareada. **a** $p \geq 0.05$, **b** $p < 0.05$ con respecto a las células no estimuladas (NS). * $p < 0.05$ entre los grupos wt y KO en el mismo periodo de estimulación.

Discusión

En estudios previos se observó que la vacuna S3Pvac, así como sus componentes (GK-1, KETc-1 y KETc-12) promueven la activación de los linfocitos T. En particular, esta activación se caracteriza en el caso de los péptidos KETc-1 y KETc-12 por un incremento en la producción de IL-2 e INF- γ mientras que el péptido GK-1 favorece la secreción de IL-2, IL-4 e INF- γ (73,74). Sin embargo, no se ha descrito la respuesta inicial mediada por los macrófagos hacia esta vacuna y sus componentes, que llevaría a la activación de los linfocitos T.

En este trabajo evaluamos la activación de macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratones mediada por los diferentes péptidos, así como por la vacuna S3Pvac a través de la expresión de las moléculas de co-estimulación CD80, CD86 y CD40, la secreción de NO, la secreción de citocinas y quimiocinas. Adicionalmente, evaluamos la activación de las MAP cinasas y el factor de transcripción NF- κ B medida por GK-1.

Los macrófagos en presencia de cada uno de los péptidos, así como de la vacuna S3Pvac expresaron un aumento en la secreción de NO, sugiriendo una polarización hacia un fenotipo M1 clásico. La producción de NO se ha asociado a la habilidad de los macrófagos para eliminar patógenos intracelulares y extracelulares (88) permitiéndoles contender contra infecciones, además de regular la actividad de muchos tipos celulares como los linfocitos T, mastocitos, células presentadoras de antígeno, neutrófilos y células NK (89). Así, el aumento en la expresión de NO plantea la posibilidad de que los macrófagos tengan capacidad antiparasitaria y puede estar relacionada con la protección inducida por la vacuna S3Pvac contra la cisticercosis (73,74,90). Otra característica que puede mediar la actividad de NO, es su capacidad citotóxicas a través de diferentes mecanismos. Una vez producido el NO puede reaccionar con el superóxido llevando a la formación de peroxinitrito el cual es altamente reactivo. El peroxinitrito puede causar varios tipos de daño al ADN como por ejemplo la desaminación de las bases nitrogenadas que lleva a mutaciones y a rupturas de la hebra del ADN (91) además de activar vías de muerte celular, mientras que los niveles bajos de peroxinitrito están involucrados en la

nitricación de residuos de tirosina que produce pérdida de función o ganancia de función en las proteínas (92,93).

El efecto antiparasitario del NO ha sido demostrado con los trematodos del género *Schistosoma*, como lo es *S. mansoni*, en donde el NO limita el daño hepático inducido por TNF- α que induce apoptosis (94), además de tener efectos anti-fibroticos y así reducir la patología que provoca *S. mansoni* (95). En el caso del nematodo *Trichinella spiralis* la producción de NO se asoció con el desarrollo de daño al intestino y este daño se consideró necesario para la protección ya que se postula que favorece la expulsión del gusano. Para la filariasis linfática causada por los nematodos del género *Brugia* o *Wuchereria* el NO secretado por los macrófagos protege al hospedero eliminando al parásito (96,97). Como ya se ha mencionado, se sabe que el NO es importante para restringir el crecimiento de *T. crassiceps*, debido a la capacidad de nitrosilación de proteínas que contienen cisteínas, ya que se ha demostrado que tanto *T. solium* como *T. crassiceps* liberan a las cisteína proteasas que favorecen la sobrevivencia del parásito por lo cual la producción de NO de los macrófagos podría ayudar a la protección en contra de la cisticercosis (98). Estas observaciones nos permiten considerar que el NO tendría un papel importante en inhibir la actividad de estas cisteína-proteasas, que se sumarían a las propiedades citotóxicas contra del parásito.

Además de la secreción del NO, el fenotipo M1 en los macrófagos se caracteriza por la expresión de los marcadores de superficie CD86, CD80 y CD40 (27). En este estudio encontramos que los macrófagos aumentan la expresión del marcador CD86 y CD40 en presencia de los péptidos. El aumento en la expresión de las moléculas CD86 y CD40 inducido por el péptido GK-1 y CD86 por el péptido KETc-12, nos sugiere que los péptidos al activar a los macrófagos podrían promover la activación de las células T a través de la unión a CD28 (CD80 y CD86), CD40L (CD40). Se sabe que los receptores CD80, CD86 y CD40 son moléculas co-estimuladoras de la activación de los linfocitos T, que lleva a un aumento en la proliferación, la producción de IL-2 y un aumento en la sobrevivencia (99,100). Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación han mostrado que la inmunización con

los componentes de la vacuna S3Pvac induce un incremento en la proliferación y la activación de los linfocitos T (73,74), activación que podría ser promovida por el aumento en la expresión de estas moléculas co-estimuladoras que se inducen en las células presentadoras de antígeno como por ejemplo los macrófagos. Sin embargo, en este trabajo no encontramos en los macrófagos un aumento en la expresión de CD80, una molécula que junto con CD86 participa en la activación de las células T, pero cuando las células presentadoras de antígeno no expresan estos receptores las células T entran en un estado de anergia (101). No obstante, se describió que CD80 y CD86 tienen efectos diferentes en la respuesta inmune tanto *in vitro* como en modelos *in vivo* (99,102). En un estudio se encontró que las propiedades de señalización de CD28 y CTLA-4 consisten en: primero CD86 se une 13 veces más débilmente a CTLA-4 que CD80 y segundo CD86 se une a CD28 de dos a tres veces más eficientemente que CD80 (103). Esto correlaciona con un modelo murino de alotransplante en donde CD80 y CTLA-4 son necesarios para inducir la tolerancia mientras que CD86 es necesario para la activación de las células T aloreactivas (104). De igual manera en un modelo de alergia al cacahuate se mostró que CD86 pero no CD80 es más importante para inducir la respuesta de IgE (105). Nuestros estudios plantean que el aumento en la expresión de CD86 en los macrófagos derivados a partir de médula ósea inducido por los péptidos es probablemente suficiente para promover una adecuada activación del linfocito T y además poder disminuir o retrasar la inhibición del linfocito T al no estar CD80 presente y no unirse al receptor CTLA-4.

Al igual que las moléculas co-estimuladoras, las citocinas son un componente crítico en la unión del sistema inmune innato y adaptativo. Las citocinas proinflamatorias que son producidas por los macrófagos M1 son componentes importantes de la defensa del hospedero. Los macrófagos M1 producen altos niveles de IL-12, IL-1, IL-6 e IL-23 y han sido asociados con el desarrollo y expansión de células T (106). En contraste, los macrófagos M2 producen altos niveles de IL-10 y bajos niveles de IL-12 (107). En este sentido un estudio previo encontró que macrófagos peritoneales estimulados con GK-1 aumentaban la expresión de diversos mARN, entre los que se destacan *il1b*, *Tnf*, *Il6*, *Il1a*, *Ccl3*, *Ccl2* (80). Sin embargo, en este estudio encontramos que en macrófagos derivados a partir de médula ósea de ratón

tratados con los péptidos o con la vacuna S3Pvac hay una disminución en la secreción de las citocinas IL-6, MCP-1 (CCL2), MIP1- α (Ccl3) y TNF- α , IP-10 (Cxcl-10) e IL-10 y sólo para el caso de la vacuna S3Pvac hay un aumento en la expresión de MIP-1 α , una citocina que participa en la quimiotaxis celular la cual promueve la respuesta inflamatoria. Estas diferencias entre los macrófagos peritoneales y los macrófagos derivados a partir de médula ósea podrían deberse al estado en el que los macrófagos son expuestos a los antígenos vacúnales, ya que los macrófagos peritoneales llevan a cabo su diferenciación *in vivo*, mientras que los macrófagos derivados de médula ósea se diferencian *in vitro* con la ayuda de los factores de crecimiento M-CSF o GM-CSF y dependiendo del tipo que se utilice puede haber cambios en el fenotipo de los macrófagos. (108). En el caso del factor de crecimiento M-CSF, el cual se utilizó para realizar este estudio, se ha reportado que M-CSF promueve la formación de un fenotipo M2 en los macrófagos diferenciados en su presencia (109). Por lo que postulamos que los péptidos y la vacuna logran revertir parcialmente el fenotipo M2 del cual parten los macrófagos, ya que a pesar de la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias logran promover la expresión de CD86, CD40 y la liberación de NO. Cabe considerar la capacidad versátil de los macrófagos en intercambiar la expresión de su fenotipo. Mientras que el intercambio del fenotipo M1 a M2 protege al organismo de una inflamación excesiva, el intercambio entre un fenotipo M2 a M1 protege al organismo de reacciones alérgicas y asmáticas, además de la disminución en sus propiedades bactericidas. El concepto actual propone que el fenotipo M1 puede ser reprogramado a un fenotipo M2 y viceversa, proponiendo incluso nuevos fenotipos de activación como lo son el fenotipo M3 e incluso un fenotipo M4 (110).

El fenotipo M3 se define como un estado de intercambio que se divide en dos subtipos, el subtipo M1/2 que intercambia su fenotipo M1 a M2 y el subtipo M2/1 el cual cambia su fenotipo M2 a M1. Los datos experimentales indican la existencia *in vivo* del fenotipo M3, estos estudios han mostrado que siete vías de señalización están involucradas en la reprogramación de los macrófagos específicamente las vías de JNK, PI3K/Akt, Notch, JAK/STAT, TGF β /SMAD/no-SMAD, TLR/NF- κ B y las vías de hipoxia (111).

De igual manera el fenotipo M4 muestra similitudes con los fenotipos M1 y M2, ya que se encontraron marcadores relacionados a ambos fenotipos, pero en el fenotipo M4 están sobre expresados *CCL18* y *TNFSF10*. En particular este fenotipo se encontró asociado a lesiones ateroscleróticas en humanos y parecen tener relevancia pato fisiológica en la aterosclerosis (112). Así nuestros resultados sugieren que los péptidos y/o la vacuna podrían estar induciendo uno de estos estados intermedios de activación en los macrófagos, por lo cual es importante explorar la posible participación de un fenotipo intermedio en la respuesta de los macrófagos hacia los péptidos y la vacuna S3Pvac.

De los tres péptidos que conforman la vacuna S3Pvac, el péptido GK-1 ha mostrado actuar como un péptido inmunomodulador, teniendo efectos directos en células del sistema inmune incrementando moléculas de activación en células dendríticas (79) y en macrófagos peritoneales (80), además de poseer propiedades anti-tumorales (78,86,113). Por consiguiente, consideramos relevante ahondar en las vías intracelulares que se activan en macrófagos estimulados con GK-1 que podrían estar asociadas con la producción de las moléculas efectoras. Para ello evaluamos la activación de las MAP cinasa p38, ERK y JNK mediante su fosforilación en macrófagos tratados con GK-1, considerando su relevancia en la activación de los macrófagos. En este estudio encontramos que GK-1 fue capaz de activar a la MAP cinasa p38 y a la MAP cinasa JNK. Se ha reportado que la MAP cinasa p38 y JNK están involucrados en el aumento de la expresión de los mensajeros de NOS2 e IL-1 β y la producción de NO después de la estimulación de TLR4 o TLR5 (114). Ya que en nuestro trabajo encontramos que GK-1 induce la activación de las vías de p38 y JNK posiblemente la producción de NO sea consecuencia de esta activación, sin embargo, GK-1 no inducen la secreción de citocinas. Un fenómeno similar se ha descrito en la activación del receptor Dectina-1 (un CLR) y el adaptador CARD9 en DCs y macrófagos derivados a partir de médula ósea. La unión del ligando a Dectina-1 lleva a la activación de la MAP cinasa p38 MAPK, pero es acompañada por una reducción en la producción de TNF- α , siendo este fenómeno dependiente de CARD9 (115). La activación de las MAP cinasas a través de CARD9 no sólo ocurre por medio de Dectina-1 ya que CARD9 también funciona como adaptador en la vía

de los TLRs (116), por lo que GK-1 podría utilizar a un receptor CLR o TLR y al adaptador CARD9 para llevar a cabo sus funciones.

Se sabe que una vez que el ligando se une a un TLRs inicia una cascada de señalización compleja que resulta en la activación de las MAP cinasas además de la activación del factor de transcripción NF- κ B a través de la proteína TAK1 de una forma dependiente de MyD88 con excepción de TLR3 (114,117). La translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B depende de que el complejo fosforile a I κ B, lo que lleva a la ubiquitinación y subsecuente degradación de I κ B y esto libera a NF- κ B permitiendo su translocación al núcleo. En nuestro trabajo, demostramos la fosforilación del inhibidor I κ B inducido por el péptido GK-1 en los macrófagos derivados a partir de médula ósea. Además, este hecho correlacionó con que el péptido GK-1 induce la translocación al núcleo de NF- κ B (p65). Interesantemente, la translocación de NF- κ B al núcleo es de manera dependiente del adaptador MyD88, lo que sugiere que el péptido GK-1 podría utilizar a un receptor TLR para inducir la activación de los macrófagos. En estudios previos en nuestro laboratorio se observó que GK-1 induce en macrófagos peritoneales el aumento de la expresión del gen que codifica para TLR2 (80), aunado a que el péptido se internaliza a las células mediante un mecanismo dependiente de energía y mediado por un receptor (118) observaciones que respaldan la propuesta del posible papel de algún miembro de la familia de los TLR como receptor para GK-1.

De igual manera a lo que encontramos en este estudio, se han descrito diversos péptidos que inducen la activación de células presentadoras de antígeno. Un ejemplo es un péptido de 18 aminoácidos de longitud llamado Hp91, cuya secuencia corresponde a una porción de la proteína HMGB1 (del inglés, *High Mobility Group 1*). Este péptido potencia la respuesta inmune humoral y celular específica al antígeno Hp91 *in vivo* (119). Esto debido a que la proteína HMGB1 es un potente estimulador de DCs de origen humano y tiene la habilidad de generar una respuesta inmune tipo Th1 *in vitro*, mientras que el péptido Hp91 muestra esos mismos efectos inmunoestimuladores en las células dendríticas y macrófagos mediante la activación de la MAP cinasa p38 y el factor de transcripción NF- κ B. La activación de las DC y

macrófagos por el péptido Hp91 lleva a la producción *in vitro* de IL-6, de manera dependiente de TLR4, IFN $\alpha\beta$ R y MyD88, sin embargo, *in vivo* se ha reportado que no se necesita del adaptador MyD88 para la activación de la respuesta de las células CD8⁺ citotóxicas (120).

Existen otros péptidos de diversas longitudes que al igual que GK-1 y Hp91 despiertan la respuesta inmune en células presentadoras de antígeno, como es el caso del péptido CATCH2 que puede activar la expresión de quimiocinas y citocinas tales como MCP-1, TNF- α , IL-6 e IL-1 β en monocitos, macrófagos y DCs, de igual manera con el péptido TP5 un pentapéptido correspondiente a la posición 32-36 de la timopoyetina que tiene actividad biológica sobre la diferenciación de los linfocitos T y se ha visto que se une al receptor TLR2 (121). Otro caso es el péptido Nap- $\text{D}^{\text{D}}\text{F}^{\text{D}}\text{F}^{\text{D}}\text{F}^{\text{D}}\text{Yp}$ que estimula la expresión de CD80 y CD86 además de promover la muerte en células cancerígenas (122,123) o el péptido DP7 que combinado con CpG promueve la producción de MCP-1 y la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 en PBMCs y BMDCs, respectivamente. El péptido DP7 activa las vías de señalización ERK1/2 y NF- κ B además este péptido comparte la característica junto con los otros péptidos de suprimir el crecimiento tumoral (124).

Finalmente, como se mencionó anteriormente el péptido GK-1 posee propiedades anti-tumorales (78,86,113) y es capaz de inducir la expresión de NO. Se sabe que el NO tiene múltiples papeles como antiparasitario, pero otra función importante radica en su capacidad de eliminar células tumorales o inhibir el crecimiento tumoral (125). Muchas de estas acciones se deben a la capacidad de NO de unirse directamente al hierro de la hemoglobina que posee la guanilato ciclasa en su forma soluble (126). Se ha visto que el co-cultivo de macrófagos activados inhibe la síntesis de ADN en las células tumorales y promueve la pérdida de hierro lo cual induce citotoxicidad celular (127).

Aunado a esto, en este estudio no encontramos que los macrófagos secreten citocinas proinflamatorias características de un macrófago M1, como lo son IL-12, IL-6, IL-1 o TNF- α . Sin embargo, se sabe que la activación de TLRs no sólo lleva a la

activación de NF- κ B sino también a la activación del factor de transcripción IRF dando como resultado la producción de interferones tipo I, en el caso de algunos TLRs esta activación es dependiente de MyD88 (128). Los interferones de tipo I han sido usados ampliamente en el tratamiento de varios tipos de cáncer, provocando disminución en la tumorigénesis y en la capacidad metastásica de los tumores. Estos estudios sugieren que los interferones de tipo I inhiben la angiogénesis y actúa sobre las células dendríticas para aumentar su habilidad en la presentación cruzada de antígenos hacia las células CD8⁺ para promover la respuesta citotóxica de los linfocitos (129). Por lo que es importante evaluar en estudios posteriores el posible papel de INF tipo I secretado por los macrófagos en regular la capacidad anti-tumoral de GK-1.

Así todos estos datos nos muestran que los inmunoestimuladores o las vacunas basadas en péptidos han demostrado tener la habilidad de inducir la repuesta del sistema inmune en contra de enfermedades infecciosas o tener capacidad anti-tumorales, esto a través de la activación de receptores PRR.

Conclusión

Los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac activan a macrófagos derivados a partir de médula ósea promoviendo la secreción de NO, MIP-1 α y un aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD40. Mientras que GK-1 induce la activación de las MAP cinasas p38, JNK y la activación del factor de transcripción NF- κ B de manera dependiente de MyD88.

Referencias

1. Castro GA. Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. En: Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [citado 31 de julio de 2021]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/>
2. Gaba S, Ginot V, Cabaret J. Modelling macroparasite aggregation using a nematode-sheep system: the Weibull distribution as an alternative to the negative binomial distribution? *Parasitology*. septiembre de 2005;131(Pt 3):393-401.
3. Anthony RM, Rutitzky LI, Urban JF, Stadecker MJ, Gause WC. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. diciembre de 2007;7(12):975-87.
4. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev*. octubre de 2004;201:89-116.
5. Becerra-Díaz M, Valderrama-Carvajal H, Terrazas LI. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *Int J Biol Sci*. 2011;7(9):1371-81.
6. Teniasis y cisticercosis [Internet]. [citado 8 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
7. Maillard H, Marionneau J, Prophette B, Boyer E, Célerier P. *Taenia crassiceps* cysticercosis and AIDS. *AIDS*. 20 de agosto de 1998;12(12):1551-2.
8. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med*. septiembre de 1990;114(9):926-8.
9. Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Diaz ML, et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol*. noviembre de 1990;12(6):687-96.
10. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 28 de mayo de 2010;32(5):593-604.
11. Huang Y, Paul WE. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *Int Immunol*. enero de 2016;28(1):23-8.
12. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*. febrero de 1998;84(1):74-81.
13. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-García L, Saavedra R, Bojalil R, et al. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun*. julio de

2002;70(7):3656-64.

14. Motran CC, Silvane L, Chiapello LS, Theumer MG, Ambrosio LF, Volpini X, et al. Helminth Infections: Recognition and Modulation of the Immune Response by Innate Immune Cells. *Front Immunol.* 2018;9:664.
15. Becerra-Díaz M, Terrazas LI. Taenia crassiceps infection and its excreted/secreted products inhibit STAT1 activation in response to IFN- γ . *Int J Parasitol.* agosto de 2014;44(9):613-23.
16. Martínez-Saucedo D, Ruíz-Rosado J de D, Terrazas C, Callejas BE, Satoskar AR, Partida-Sánchez S, et al. Taenia crassiceps-Excreted/Secreted Products Induce a Defined MicroRNA Profile that Modulates Inflammatory Properties of Macrophages. *J Immunol Res.* 2019;2019:2946713.
17. Espinoza-Jiménez A, De Haro R, Terrazas LI. Taenia crassiceps Antigens Control Experimental Type 1 Diabetes by Inducing Alternatively Activated Macrophages. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8074329.
18. Fragoso G, Meneses G, Sciutto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of Taenia crassiceps cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol.* abril de 2008;94(2):551-3.
19. Togno-Peirce C, Nava-Castro K, Terrazas LI, Morales-Montor J. Sex-associated expression of co-stimulatory molecules CD80, CD86, and accessory molecules, PDL-1, PDL-2 and MHC-II, in F480+ macrophages during murine cysticercosis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:570158.
20. Rodríguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol.* 1 de abril de 2002;168(7):3135-9.
21. Raes G, Brys L, Dahal BK, Brandt J, Grooten J, Brombacher F, et al. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol.* marzo de 2005;77(3):321-7.
22. Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol.* noviembre de 2005;35(13):1349-58.
23. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 14 de octubre de 2011;11(11):723-37.
24. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol.* 15 de septiembre de 2008;181(6):3733-9.
25. Bhattacharya P, Dey R, Dagur PK, Kruhlak M, Ismail N, Debrabant A, et al. Genetically Modified Live Attenuated Leishmania donovani Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice. *Infect Immun.* octubre de 2015;83(10):3800-15.
26. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in

diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* diciembre de 2004;25(12):677-86.

27. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6:13.

28. Ruytinx P, Proost P, Van Damme J, Struyf S. Chemokine-Induced Macrophage Polarization in Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 2018;9:1930.

29. Date D, Das R, Narla G, Simon DI, Jain MK, Mahabeleshwar GH. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. *J Biol Chem.* 11 de abril de 2014;289(15):10318-29.

30. Nair MG, Gallagher IJ, Taylor MD, Loke P, Coulson PS, Wilson RA, et al. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun.* enero de 2005;73(1):385-94.

31. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 24 de febrero de 2006;124(4):783-801.

32. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ.* mayo de 2006;13(5):816-25.

33. Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2009;22(2):240-73, Table of Contents.

34. O'Neill LAJ, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* mayo de 2007;7(5):353-64.

35. Paveley RA, Aynsley SA, Turner JD, Bourke CD, Jenkins SJ, Cook PC, et al. The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN γ production. *Int J Parasitol.* noviembre de 2011;41(13-14):1335-45.

36. Prasanphanich NS, Mickum ML, Heimbürg-Molinario J, Cummings RD. Glycoconjugates in host-helminth interactions. *Front Immunol.* 2013;4:240.

37. deSchoolmeester ML, Martínez-Pomares L, Gordon S, Else KJ. The mannose receptor binds *Trichuris muris* excretory/secretory proteins but is not essential for protective immunity. *Immunology.* febrero de 2009;126(2):246-55.

38. Montero-Barrera D, Valderrama-Carvajal H, Terrazas CA, Rojas-Hernández S, Ledesma-Soto Y, Vera-Arias L, et al. The macrophage galactose-type lectin-1 (MGL1) recognizes *Taenia crassiceps* antigens, triggers intracellular signaling, and is critical for resistance to this infection. *Biomed Res Int.* 2015;2015:615865.

39. Goh F, Irvine KM, Lovelace E, Donnelly S, Jones MK, Brion K, et al. Selective induction of the Notch ligand Jagged-1 in macrophages by soluble egg antigen from *Schistosoma mansoni* involves ERK signalling. *Immunology.* julio de 2009;127(3):326-37.

40. van Riet E, Everts B, Retra K, Phylipsen M, van Hellemond JJ, Tielens AGM, et al. Combined

TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization. *BMC Immunol.* 4 de febrero de 2009;10:9.

41. Vanhoutte F, Breuilh L, Fontaine J, Zouain CS, Mallevaey T, Vasseur V, et al. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR3 sensing is required for dendritic cell activation, but dispensable to control *Schistosoma mansoni* infection and pathology. *Microbes Infect.* diciembre de 2007;9(14-15):1606-13.

42. Verma A, Prasad KN, Gupta RK, Singh AK, Nyati KK, Rizwan A, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and its association with symptomatic neurocysticercosis. *J Infect Dis.* 15 de octubre de 2010;202(8):1219-25.

43. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol.* 31 de agosto de 2003;130(2):65-74.

44. Debierre-Grockiego F, Campos MA, Azzouz N, Schmidt J, Bieker U, Resende MG, et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 15 de julio de 2007;179(2):1129-37.

45. Ropert C, Gazzinelli RT. Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Endotoxin Res.* 2004;10(6):425-30.

46. Dissanayake S, Shahin A. Induction of interferon-gamma by *Taenia crassiceps* glycans and Lewis sugars in naive BALB/c spleen and peritoneal exudate cells. *Mol Immunol.* marzo de 2007;44(7):1623-30.

47. Magalhães KG, Almeida PE, Atella GC, Maya-Monteiro CM, Castro-Faria-Neto HC, Pelajo-Machado M, et al. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis.* 1 de noviembre de 2010;202(9):1369-79.

48. Reyes JL, González MI, Ledesma-Soto Y, Satoskar AR, Terrazas LI. TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *Int J Biol Sci.* 2011;7(9):1323-33.

49. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.

50. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 5 de marzo de 2004;303(5663):1522-6.

51. Monie TP, Bryant CE, Gay NJ. Activating immunity: lessons from the TLRs and NLRs. *Trends Biochem Sci.* noviembre de 2009;34(11):553-61.

52. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* junio de 2013;13(6):453-60.

53. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* enero de 2005;17(1):1-14.

54. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*. 15 de octubre de 2003;171(8):4304-10.
55. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med*. 31 de agosto de 2007;39(4):421-38.
56. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. julio de 2004;4(7):499-511.
57. Zhang YL, Dong C. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*. febrero de 2005;2(1):20-7.
58. Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:55-72.
59. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 1 de marzo de 2001;410(6824):37-40.
60. Arthur JSC, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. septiembre de 2013;13(9):679-92.
61. Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J*. enero de 2000;14(1):6-16.
62. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.
63. Zhang G, Ghosh S. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest*. enero de 2001;107(1):13-9.
64. Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nat Rev Immunol*. octubre de 2009;9(10):692-703.
65. Kang SM, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*. 5 de junio de 1992;256(5062):1452-6.
66. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. diciembre de 1997;7(6):837-47.
67. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*. 6 de septiembre de 2001;413(6851):78-83.
68. Dunne A, O'Neill LAJ. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett*. 13 de junio de 2005;579(15):3330-5.
69. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1 de mayo de 2006;117(5):979-87.

70. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol.* marzo de 2002;3(3):221-7.
71. Vetter V, Denizer G, Friedland LR, Krishnan J, Shapiro M. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Annals of Medicine.* 17 de febrero de 2018;50(2):110-20.
72. Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol.* abril de 1996;82(2):250-4.
73. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* mayo de 1999;67(5):2522-30.
74. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun.* marzo de 2001;69(3):1766-73.
75. Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 12 de octubre de 2001;20(1-2):262-6.
76. Sciutto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3Pvac vaccine against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: a historical review. *J Parasitol.* agosto de 2013;99(4):693-702.
77. Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, et al. Heterologous Prime-Boost Oral Immunization with GK-1 Peptide from *Taenia crassiceps* Cysticerci Induces Protective Immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 1 de julio de 2011;18(7):1067-76.
78. Segura-Velázquez R, Pérez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine.* 20 de febrero de 2006;24(8):1073-80.
79. Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol.* septiembre de 2009;16(9):1338-43.
80. Sánchez-Hernández L, Montero L, Mojica-Espinosa R, Reyes-Grajeda JP, Cervantes-Torres J, Parkhouse RM, et al. Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. *Immunol Lett.* septiembre de 2018;201:20-30.
81. Myers-Morales T, Bussell KM, D'Orazio SE. Fecal transplantation does not transfer either susceptibility or resistance to food borne listeriosis in C57BL/6 and BALB/c/By mice. *F1000Res.* 2013;2:177.
82. Chiodini RJ, Buergelt CD. Susceptibility of Balb/c, C57/B6 and C57/B10 mice to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Comp Pathol.* noviembre de 1993;109(4):309-19.

83. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with «mini-extracts», prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 11 de agosto de 1989;17(15):6419.
84. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* noviembre de 1951;193(1):265-75.
85. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, Venturini G, et al. Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med.* febrero de 2002;9(2):131-4.
86. Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, Orbe U, Servín-Blanco R, Frago G, et al. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine.* 9 de octubre de 2017;35(42):5653-61.
87. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol.* 2019;10:705.
88. Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 15 de agosto de 2008;112(4):935-45.
89. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* agosto de 2001;1(8):1397-406.
90. Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, et al. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol.* 20 de junio de 2003;93(3-4):81-90.
91. Brunet LR. Nitric oxide in parasitic infections. *Int Immunopharmacol.* agosto de 2001;1(8):1457-67.
92. Ahmad R, Rasheed Z, Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2009;31(3):388-96.
93. Liaudet L, Vassalli G, Pacher P. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front Biosci (Landmark Ed).* 1 de enero de 2009;14:4809-14.
94. Brunet LR, Beall M, Dunne DW, Pearce EJ. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. *J Immunol.* 1 de noviembre de 1999;163(9):4976-84.
95. Hesse M, Cheever AW, Jankovic D, Wynn TA. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol.* septiembre de 2000;157(3):945-55.
96. Rajan TV, Porte P, Yates JA, Keefer L, Shultz LD. Role of nitric oxide in host defense against an extracellular, metazoan parasite, *Brugia malayi*. *Infect Immun.* agosto de 1996;64(8):3351-3.
97. Taylor MJ, Cross HF, Mohammed AA, Trees AJ, Bianco AE. Susceptibility of *Brugia malayi*

and *Onchocerca lienalis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN gamma-activated macrophages. *Parasitology*. marzo de 1996;112 (Pt 3):315-22.

98. Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res*. mayo de 2007;100(6):1341-50.

99. Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:225-52.

100. Schweitzer AN, Sharpe AH. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J Immunol*. 15 de septiembre de 1998;161(6):2762-71.

101. Jenkins MK. The ups and downs of T cell costimulation. *Immunity*. septiembre de 1994;1(6):443-6.

102. Lenschow DJ, Ho SC, Sattar H, Rhee L, Gray G, Nabavi N, et al. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med*. 1 de marzo de 1995;181(3):1145-55.

103. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJC, Iaboni A, Manso-Sancho R, Walse B, et al. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*. agosto de 2002;17(2):201-10.

104. Judge TA, Wu Z, Zheng XG, Sharpe AH, Sayegh MH, Turka LA. The role of CD80, CD86, and CTLA4 in alloimmune responses and the induction of long-term allograft survival. *J Immunol*. 15 de febrero de 1999;162(4):1947-51.

105. van Wijk F, Nierkens S, de Jong W, Wehrens EJM, Boon L, van Kooten P, et al. The CD28/CTLA-4-B7 signaling pathway is involved in both allergic sensitization and tolerance induction to orally administered peanut proteins. *J Immunol*. 1 de junio de 2007;178(11):6894-900.

106. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. diciembre de 2008;8(12):958-69.

107. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. diciembre de 2006;80(6):1298-307.

108. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol*. agosto de 2009;86(2):411-21.

109. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecreur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol*. enero de 2013;281(1):51-61.

110. Thiriot JD, Martinez-Martinez YB, Endsley JJ, Torres AG. Hacking the host: exploitation of

macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathog Dis.* 1 de febrero de 2020;78(1):ftaa009.

111. Malyshev I, Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage «Switch» Phenotype. *Biomed Res Int.* 2015;2015:341308.

112. Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol.* 1 de mayo de 2010;184(9):4810-8.

113. Rodríguez-Rodríguez N, Madera-Salcedo IK, Bugarin-Estrada E, Sánchez-Miranda E, Torres-García D, Cervantes-Torres J, et al. The helminth-derived peptide GK-1 induces an anti-tumoral CD8 T cell response associated with downregulation of the PD-1/PD-L1 pathway. *Clin Immunol.* marzo de 2020;212:108240.

114. Peroval MY, Boyd AC, Young JR, Smith AL. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One.* 2013;8(2):e51243.

115. Goodridge HS, Shimada T, Wolf AJ, Hsu YMS, Becker CA, Lin X, et al. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J Immunol.* 15 de enero de 2009;182(2):1146-54.

116. Wang Y, Zhang D, Hou Y, Shen S, Wang T. The adaptor protein CARD9, from fungal immunity to tumorigenesis. *Am J Cancer Res.* 2020;10(8):2203-25.

117. Banerjee A, Gerondakis S. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol Cell Biol.* septiembre de 2007;85(6):420-4.

118. Cervantes Torres JB, Fragoso González G del C, Sciutto Conde EL, López Macías CIR, Universidad NA de M, Universidad NA de M, et al. Desarrollo de un nuevo inmunopotenciador para uso humano: estudio preclínico y dilucidación de sus mecanismos de acción. 2020.

119. Saenz R, Souza C da S, Huang CT, Larsson M, Esener S, Messmer D. HMGB1-derived peptide acts as adjuvant inducing immune responses to peptide and protein antigen. *Vaccine.* 3 de noviembre de 2010;28(47):7556-62.

120. Saenz R, Futralan D, Leutenez L, Eekhout F, Fecteau JF, Sundelius S, et al. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Transl Med.* 14 de agosto de 2014;12:211.

121. Wei X, Zhang L, Zhang R, Wu R, Petite JN, Hou Y, et al. Targeting the TLR2 Receptor With a Novel Thymopentin-Derived Peptide Modulates Immune Responses. *Front Immunol.* 2021;12:620494.

122. Zhou J, Du X, Chen X, Wang J, Zhou N, Wu D, et al. Enzymatic Self-Assembly Confers Exceptionally Strong Synergism with NF- κ B Targeting for Selective Necroptosis of Cancer Cells. *J Am Chem Soc.* 14 de febrero de 2018;140(6):2301-8.

123. Xu Y, Wang Y, Yang Q, Liu Z, Xiao Z, Le Z, et al. A versatile supramolecular nanoadjuvant

that activates NF- κ B for cancer immunotherapy. *Theranostics*. 2019;9(11):3388-97.

124. Tian Y, Hu Q, Zhang R, Zhou B, Xie D, Wang Y, et al. Rational design of innate defense regulator peptides as tumor vaccine adjuvants. *NPJ Vaccines*. 20 de mayo de 2021;6(1):75.

125. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 de noviembre de 1988;157(1):87-94.

126. Kovacevic Z, Sahni S, Lok H, Davies MJ, Wink DA, Richardson DR. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the «professional killer cell» from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. mayo de 2017;1861(5 Pt A):995-9.

127. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. Iron depletion: possible cause of tumor cell cytotoxicity induced by activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 17 de septiembre de 1984;123(2):716-23.

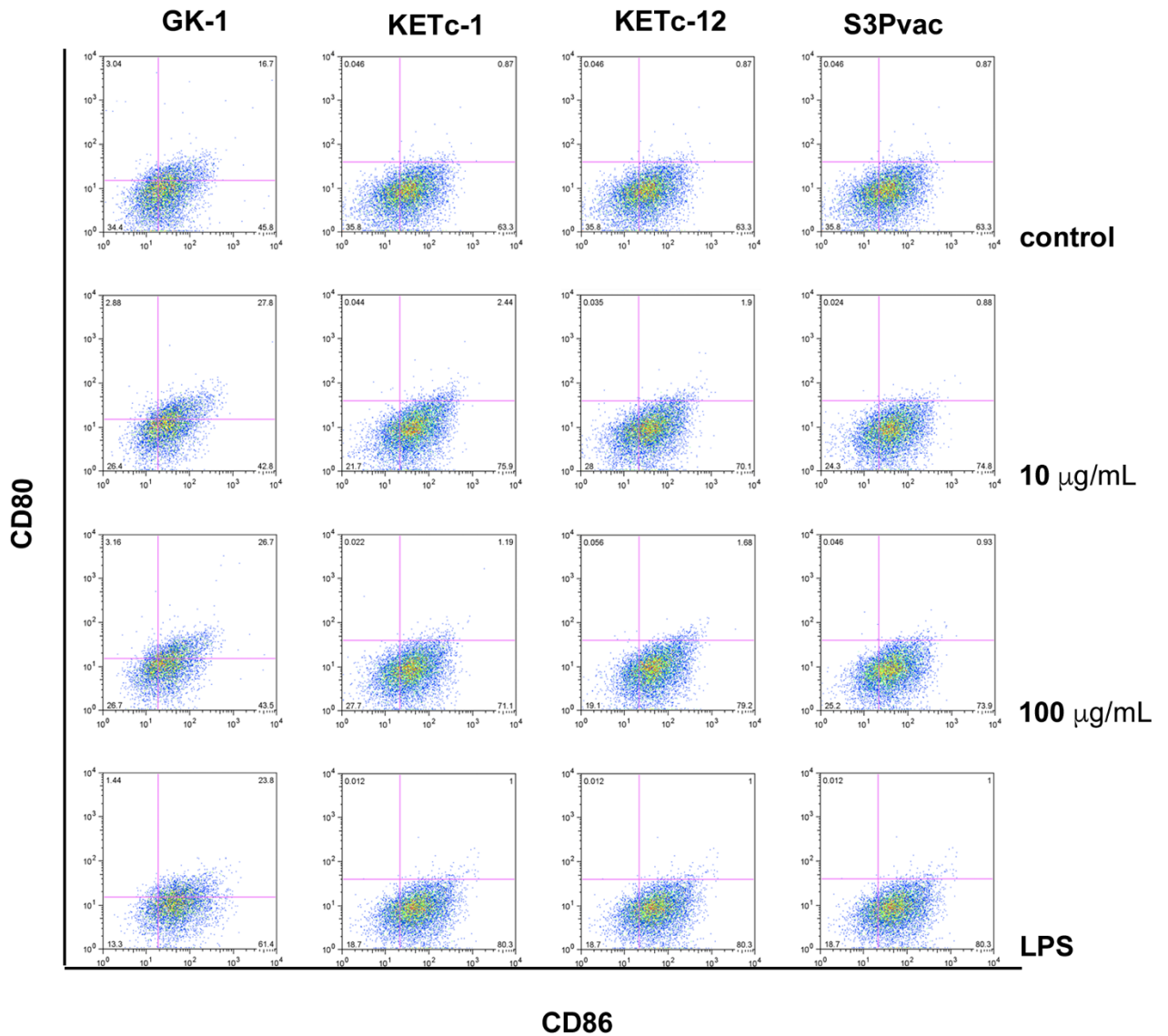
128. Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- κ B pathway. *Trends Immunol*. septiembre de 2005;26(9):469-76.

129. González-Navajas JM, Lee J, David M, Raz E. Immunomodulatory functions of type I interferons. *Nat Rev Immunol*. febrero de 2012;12(2):125-35.

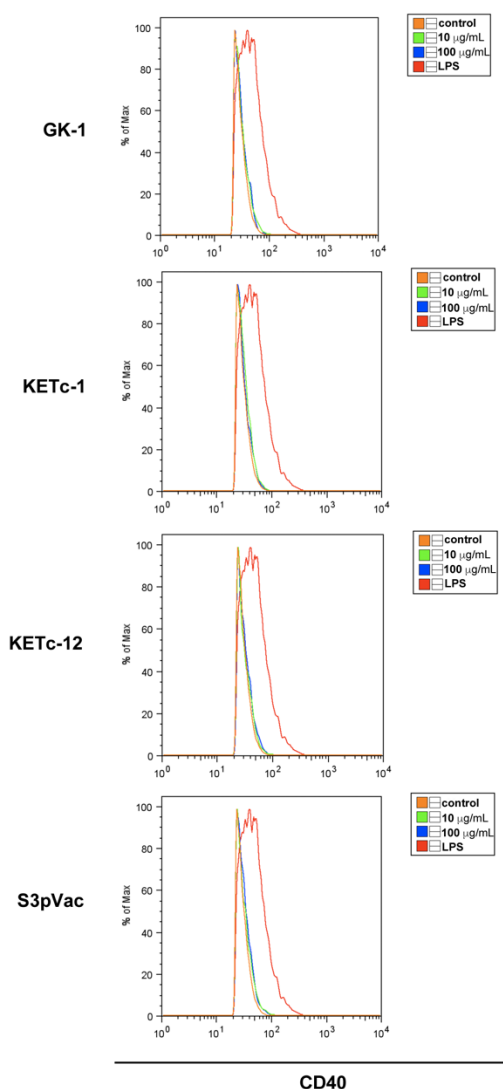
Anexos

1. Dot plots e histogramas representativos de las moléculas de co-estimulación en macrófagos derivados a partir de médula ósea estimulados con los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac.

a) Dot-plots de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86



b) Histogramas de la molécula co-estimuladora CD40



Anexo 1. Los macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J en presencia de los péptidos muestran un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan CD86. Macrófagos derivados a partir de médula ósea de la cepa C57BL/6J fueron estimulados por 48 horas con los péptidos GK-1, KETc-1, KETc-12 y la vacuna S3Pvac en las dosis de 10µg/mL y 100µg/mL o como control positivo LPS en la concentración de 100ng/mL, posteriormente se analizó el porcentaje de células que expresan **a)** CD80, CD86 y **b)** CD40 mediante citometría de flujo. Los datos corresponden a GK-1 (n=4); KETc-1 (n=3); KETc-12 (n=3); S3Pvac (n=3) experimentos independientes.

2. Artículos publicados durante el trabajo de tesis

- Derivado de los resultados presentados en este trabajo se publicó el siguiente artículo que muestra la participación del péptido GK-1 en la activación de macrófagos y células dendríticas derivados a partir de médula ósea de manera dependiente del adaptador MyD88.

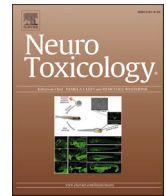
Laura Montero, Jacquelynne Cervantes-Torres, Edda Sciutto, Gladis Fragoso. Helminth-derived peptide GK-1 induces Myd88-dependent pro-inflammatory signaling events in bone marrow derived antigen-presenting cells. 2020. *Molecular Immunology*. 128: 22-32. doi.org/10.1016/j.molimm.2020.09.015

- Este capítulo es una revisión de las propiedades anti-tumorales del péptido GK-1

Jacquelynne Cervantes-Torres, **Laura Montero León**, Noé Rodríguez, Edda Sciutto, Gladis Fragoso, Diana Torres García. Understanding the anti-tumor properties mediated by synthetic peptide GK-1. Chapter 4, *Cancer Suricorship*. IntechOpen January 2019. ISBN: 978-1-78984-907-3. DOI: 10.5772/intechopen.79833

- En este artículo se demostró la capacidad del péptido GK-1 en activar a macrófagos peritoneales induciendo un fenotipo M1.

Sánchez-Hernández L, **Montero L**, Mojica-Espinosa R, Reyes-Grajeada JP, Cervantes-Torres J, Parkhouse RM, Fragoso G, Sciutto E. Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. 2018. *Immunol Lett*. 201:20-30. DOI: 10.1016/j.imlet.2018.10.010



Helminth-derived peptide GK-1 induces Myd88-dependent pro-inflammatory signaling events in bone marrow-derived antigen-presenting cells

Laura Montero¹, Jacquelyne Cervantes-Torres¹, Edda Sciutto, Gladis Fragoso*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

GK-1 peptide
Macrophages
Dendritic cells
MAPKs
NF- κ B

ABSTRACT

GK-1 is an immunomodulatory, 18-aa-long peptide that has been proved to promote the activation of mouse peritoneal macrophages and LPS-pulsed mouse bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs). This study is aimed to explore the mechanisms underlying the activation of these antigen-presenting cells (APCs) by GK-1. In our study, GK-1 up-regulated *in vitro* the expression of CD86 and CD40, and it increased the secretion of NO in bone marrow-derived macrophages (BMDMs). In BM-DCs, GK-1 upregulated the expression of MHC class II and CD86. Additionally, GK-1 was found to be involved in the phosphorylation of MAPK p38, JNK and ERK 1/2 and in Myd88-dependent activation of NF- κ B in both antigen-presenting cell types. *In vivo*, GK-1 increased the secretion of IL-15, CCL2, and IL-6 through a Myd88-dependent mechanism. This study demonstrated that GK-1 promotes the activation and effector activity of APCs through a mechanism dependent on Myd88, probably involving a Toll-like receptor as a target.

1. Introduction

The innate immune system plays a crucial role in the host defense against several pathogens, by recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) through a restricted repertoire of receptors [Janeway and Medzhitov, 2002]. The differential expression of these pattern recognition receptors (PRRs), including Toll-like receptors (TLRs) in various cell types, especially antigen-presenting cells (APCs), allows the host to show a differential response against pathogens [Akira, 2001; Medzhitov, 2001]. Macrophages (Mas) exert multiple functional activities depending on environmental stimuli; phagocytosis, one of their main functions, plays a central role in killing invading microorganisms and tumor cells, but also in favoring antigen presentation to lymphoid cells. Macrophages also act indirectly, by releasing soluble mediators which can activate other cells, or by repairing damaged tissues [Botelho and Grinstein, 2011; Classen et al., 2009; Xaus et al., 2001].

On the other hand, dendritic cells (DCs), another specialized antigen-presenting cell type, undergo transcriptional changes that lead to their maturation, increasing the expression of chemokine receptors and co-

stimulatory molecules that will favor their migration for an efficient presentation of antigens in lymphoid organs [Buckwalter and Albert, 2009; Mortellaro et al., 2009].

After pathogen recognition through TLR recognition, both Mas and DCs modulate the arrival and activation of other cells of the innate system such as neutrophils, monocytes, NK cells and eosinophils by producing cytokines, chemokines, or other inflammatory mediators that according to their repertoire may activate several signaling pathways [Buckwalter and Albert, 2009; Mosser and Edwards, 2008; Schlitzer and Ginhoux, 2014]. Thus, TLR ligands and agonists have been progressively exploited to develop new adjuvants. Among them, TLR4 and TLR5 agonists favor the production of IL-12p70 through the MAPK p38 and JNK signaling pathways, while TLR2 agonists favor the activation of ERK1/2, triggering the induction of Th2 cytokines [Bell, 2004]. The characterization of the mechanisms involved in T cell polarization could lead to develop new formulations to synergize TLR signaling towards the required immune response.

The 18-aa-length peptide GK-1 significantly improved the immune protection when co-administered as an adjuvant with the human influenza vaccine, by increasing anti-influenza IgG levels and mononuclear

* Corresponding author.

E-mail addresses: lau_mlcr1@yahoo.com (L. Montero), jcervantes@iibiomedicas.unam.mx (J. Cervantes-Torres), edda@unam.mx (E. Sciutto), gladis@unam.mx (G. Fragoso).

¹ Joint first authorship.

cell infiltration into the lung parenchyma [Segura et al., 2006]. A higher expression of MHC-II and co-stimulatory molecules on DCs, along with increased activation and proliferation levels of anti-influenza specific CD4 + T cells and the secretion of pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- α and CCL2) were associated with GK-1 administration [Segura et al., 2009]. Additionally, GK-1 was found to promote the activation of peritoneal macrophages (PMas) along with an increased expression of the chemokines CCL3 and CCL2, the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α , and the levels of nitric oxide (NO) [Sánchez et al., 2018]. All these features may explain the adjuvant properties of GK-1 when co-administered with other antigens.

This panorama highlights the relevance of determining the mechanisms that underlie the activation of antigen-presenting cells by GK-1. The activation state of both bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and dendritic cells (BM-DCs) treated with GK-1 was herein evaluated. The possible participation of the MAPK and NF- κ B pathways, as well as the potential role of TLR signaling in mediating this response in Myd88-deficient mice were also explored.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Female C57BL/6 J mice, 6–8 weeks-old, were used in all experiments. Mice were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) and subsequently bred at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Myeloid differentiation factor 88- (Myd88-) KO mice (JAX stock #009088) were purchased from the Jackson Laboratory. All procedures performed on animals in this study were conducted in accordance with institutional guidelines, following a protocol approved by the Institutional Bioethical Committee (approval number ID 95).

2.2. Reagents

The GK-1 peptide (GYYPSPDNTFYAPPYSA) was synthesized under cGMP (98 % purity, endotoxin-free) by USV, LTD, Mumbai, India (batch RD0001). The peptide was dissolved in 0.9 % saline solution (ISS) at the concentration required for each test. Recombinant murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was purchased from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* serotype O111:B4 was purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Anti-phospho-p38 (p-p38) and anti-phospho JNK (p-JNK) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); antibodies against NF- κ B p65, β -actin, anti Myd88, and laminin B1 were purchased from Abcam (Cambridge, MA, USA); anti-phospho I κ B was purchased from Cell Signaling Technology; anti-phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2), anti-CD40-allophycocyanin (APC), anti-CD86-phycoerythrin (PE), anti-CD80-PECy5, anti-Ia/Ie–biotin, anti-CD11b-FITC, anti-F4/80-biotin, anti-CD11c-FITC, anti-IL-6, anti-TNF- α , and anti-IL-12(p40) antibodies were obtained from Biolegend (San Diego, CA, USA).

2.3. Cell line

The L929 fibroblast cell line, used as a source of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [Genovesi et al., 1989], was cultured in DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL) and 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco). Supernatants were recovered every week and kept at -70° C until used.

2.4. Bone marrow cell generation

Single bone marrow cell suspensions were obtained from mouse femurs and tibias and depleted of erythrocytes by incubating with an

NH₄Cl/KHCO₃/EDTA solution (erythrocyte lysis solution). For BMDMs, cells were re-suspended at a concentration of 2.5×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), 10 % (v/v) FBS (Gibco), and 10 % of supernatant of the murine cell line L929 (previously titrated). Fresh complete medium containing M-CSF was added on the day 3 of culture. The cells were collected for the experiments on day 7 and re-plated at a concentration of 2×10^6 cells/well. For BM-DCs, the cells were re-suspended at a concentration of 10^6 cell/mL in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 50 μ M 2-mercaptoethanol (Gibco), 10 mM HEPES (Promega, Madison, WI, USA), gentamicin (20 μ g/mL), 5% (v/v) FBS (Gibco), and 20 ng/mL of recombinant GM-CSF. The medium was replaced with fresh complete medium containing the recombinant GM-CSF on day 3 of culture, and the cells were harvested for the experiments on day 6.

2.5. In vitro treatment of bone marrow-derived cells

On day 8 of culture, BMDMs (purity > 80 %, as assessed by CD11b+/F480+ expression determined by flow cytometry) were either left untreated or stimulated with GK-1 (10 or 100 μ g/mL) or LPS (100 ng/mL) for 48 h.

On day 7, BM-DCs (purity > 70 % as assessed by CD11c+/IaIe+ expression, determined by flow cytometry) were either left untreated or stimulated as mentioned above for BMDMs. Additionally, BM-DCs were treated with LPS for 4 h, washed and then stimulated with GK-1 at both doses for a further period of 10 and 24 h, respectively.

For MAPK activation analysis, BM-derived cells were stimulated with either GK-1 (10 or 100 μ g/mL) or LPS for 5, 10, 15, 20, 25, or 30 min, and total protein extracts were obtained. For NF- κ B activation analysis, BM-derived cells were treated with GK-1 (10 or 100 μ g/mL) or LPS for 0.5, 1, 2, or 3 h, and cell nuclei lysates were obtained.

2.6. Flow cytometry

BMDMs and BM-DCs (5×10^5 each) were blocked with anti-FcR antibody (CD16/32) for at least 20 min at 4° C in 20 μ L of PBS with 5% FBS and 0.02 % sodium azide (staining buffer); then they were stained with any of the following antibodies: anti-CD40-allophycocyanin (APC), anti-CD86-phycoerythrin (PE), anti-CD80-PECy5, anti-Ia/Ie–biotin, anti-CD11b-FITC, anti-F4/80-biotin, or anti-CD11c-FITC. Isotype controls were included in all experiments. The cells were then washed with staining buffer and fixed in 1% formaldehyde in PBS. Data were acquired in an Attune Nxt cytometer (Thermo Fisher Scientific) and analyzed with the FlowJo software (v.8.7, Ashland, OR, USA).

2.7. Measurement of NO release in BMDMs

Macrophages were stimulated with either GK-1 or LPS for 24 or 48 h. Nitrite concentration, an indirect measure of NO production, was determined by the Griess reaction. Briefly, 50 μ L of supernatant were mixed with an equal volume of Griess reagent (1 % sulfanilamide, 5 % phosphoric acid, and 0.1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamine); the mixture was incubated at room temperature for 10 min. Absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA). Nitrite concentration was then calculated from a sodium nitrite standard curve.

2.8. Protein extracts

For total protein extracts, BMDMs or BM-DC plates were lysed by incubating with ice-cold RIPA lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.4; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4; 0.5 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.5 % sodium deoxycholate), using a phosphatase and protease inhibitor cocktail (25 mM sodium fluoride (NaF), 1 mM sodium pyrophosphate (NaPPi), 1 mM

sodium vanadate (NaVPO₄), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.1 mg/mL pepstatin A, 0.1 mg/mL leupeptin, 0.1 mg/mL antipain, 0.1 mg/mL aprotinin) (Sigma-Aldrich) for 15 min.

For nuclear proteins, BMDMs or BM-DC plates were incubated with ice-cold PBS-0.05 mM EDTA for 20 min. The cells were scraped off the plates and centrifuged at $134 \times g$ for 5 min at 4 °C. The pellet was resuspended in lysis buffer A (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT), using a phosphatase and protease inhibitor cocktail for 15 min on ice. Thereafter, a 10 % Nonidet P40 solution was added, vortexed for 10 s and centrifuged at $15,600 \times g$ for 1 min. The nuclei pellet was resuspended in nuclear lysis buffer (20 mM HEPES, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) using a phosphatase and protease inhibitor cocktail, vortexed for 15 min at 4 °C, and finally centrifuged at $15,600 \times g$ for 5 min.

The proteins in the supernatant were quantified by the Lowry's method [Lowry et al., 1951].

2.9. Immunoblotting

Ten-micrograms of total protein were separated by SDS-PAGE in 10 % acrylamide gels, and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck, Darmstadt, Germany). For MAPK analysis, the membranes were blocked for 1 h in blocking buffer TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.05 % of Tween-20) with 2 % BSA or 5 % milk. Blotting was performed with phospho-p38 MAP kinase Ab, phospho-ERK1/2 MAP kinase Ab, phospho-JNK MAP kinase Ab or β -actin Ab. NF- κ B activation in BM-cells was assessed through I κ B phosphorylation using a phospho-I κ B Ab. Bands were visualized with secondary HRP conjugated goat anti-mouse (Thermo Scientific), anti-rabbit (Abcam), or donkey anti-goat (Santa Cruz) antibodies, respectively and the Super Signal West Dura Extended Duration Substrate solution (Thermo Scientific). The bands were analyzed using the ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) using the anti-actin signal for data normalization.

NF- κ B activation in BM-cells was assessed through the early translocation to the nucleus of NF- κ B p65. Ten-micrograms of nuclear protein were separated by SDS-PAGE in 10 % acrylamide gels, and electro-transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Merck, Darmstadt, Germany). The membranes were blocked for 1 h in blocking buffer TBS-T with 2 % milk. Thereafter, the membranes were incubated overnight at 4 °C with NF- κ B p65 Ab or HRP laminin B1 Ab, and bands were visualized with secondary HRP anti-rabbit IgG (Abcam). Antibody binding was detected with the Super Signal West Dura Extended Duration Substrate solution. The bands were analyzed using the ImageJ software, using the laminin B1 signal for data normalization.

2.10. Cytokine analysis

The production of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12 (p40 or p70), IL-18 and TNF- α was measured in BM-DC or BMDMs cell culture supernatants 24 or 48 h after the stimulus, respectively, by ELISA (Biolegend).

Wild-type (WT) C57BL/6 or Myd88-KO mice were injected intravenously (i.v.) with 0, 10, or 100 μ g of GK-1 dissolved in ISS in the tail vein. Blood samples were obtained after 6, 10, and 24 h by retroorbital puncture. Serum was separated by centrifugation at $3500 \times g$ for 10 min and stored at -70 °C until used. The levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-15, TNF- α) and chemokines (CCL2, CCL4, and CXCL10) were measured by the Magpix system (Luminex Corp., Austin, TX, USA) and analyzed with the Xponent software following the manufacturer's instructions. On the other hand, spleens were excised 24 h later and homogenized in a high-pressure homogenizer (Polytron, Elkhart, IN, USA) for 15 s in ice-cold lysis buffer containing 1 mM PMSF in a 1:5 (w/v) ratio. The homogenates were centrifuged at $15,600 \times g$ at 4 °C for 10 min and the supernatants were recovered to measure cytokine levels by ELISA (Biolegend).

2.11. Statistical analysis

A normality test (D'Agostino-Pearson) was performed to determine the normal distribution in our experimental groups. Data were compared either by one-way ANOVA followed by a Dunn's multiple-comparison test or unpaired Student's *t*-test using GraphPad Prism version 5.03 for Windows. Data are reported as mean \pm SEM and the statistical significance was accepted at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. In vitro activation of bone marrow-derived macrophages (BMDMs) by GK-1

It was previously reported that treatment with GK-1 increased the expression of CD86 and MHC-II in peritoneal macrophages [Sánchez et al., 2018]. In this study, the up-regulation of CD86 expression in BMDMs were confirmed at the two doses of GK-1 tested (10 and 100 μ g/mL). GK-1 increased the percentage of CD86+ (Fig. 1A) and up-regulated CD86 expression (Fig. 1B) at both doses tested. A slight significant increase in the levels of BMDMs/CD40+ and the expression of CD40 was found when macrophages were stimulated with 100 μ g/mL of GK-1 (Fig. 1A and B), despite there was a tendency $p = 0.0945$ (Fig. 1A) and $p = 0.1190$ (Fig. 1B) on CD40 expression for the lower dose used. However, the expression levels of CD80 and MHC class II were not modified after incubation with GK-1 (Fig. S1).

To evaluate the production of the inflammatory mediator NO in BMDMs, the stable product of NO (nitrite) was measured in culture supernatants of cells treated with different doses of GK-1 at 24 and 48 h post-stimulus. As shown in Fig. 1C, the lower dose of GK-1 induced a significant increase in the production of NO at both time-points studied, whereas the dose of 100 μ g/mL induced a clear increase in NO production 48 h after the stimulus. Fig. 1C also shows that NO production is more efficient 24 h after GK-1 stimulus than at 48 h.

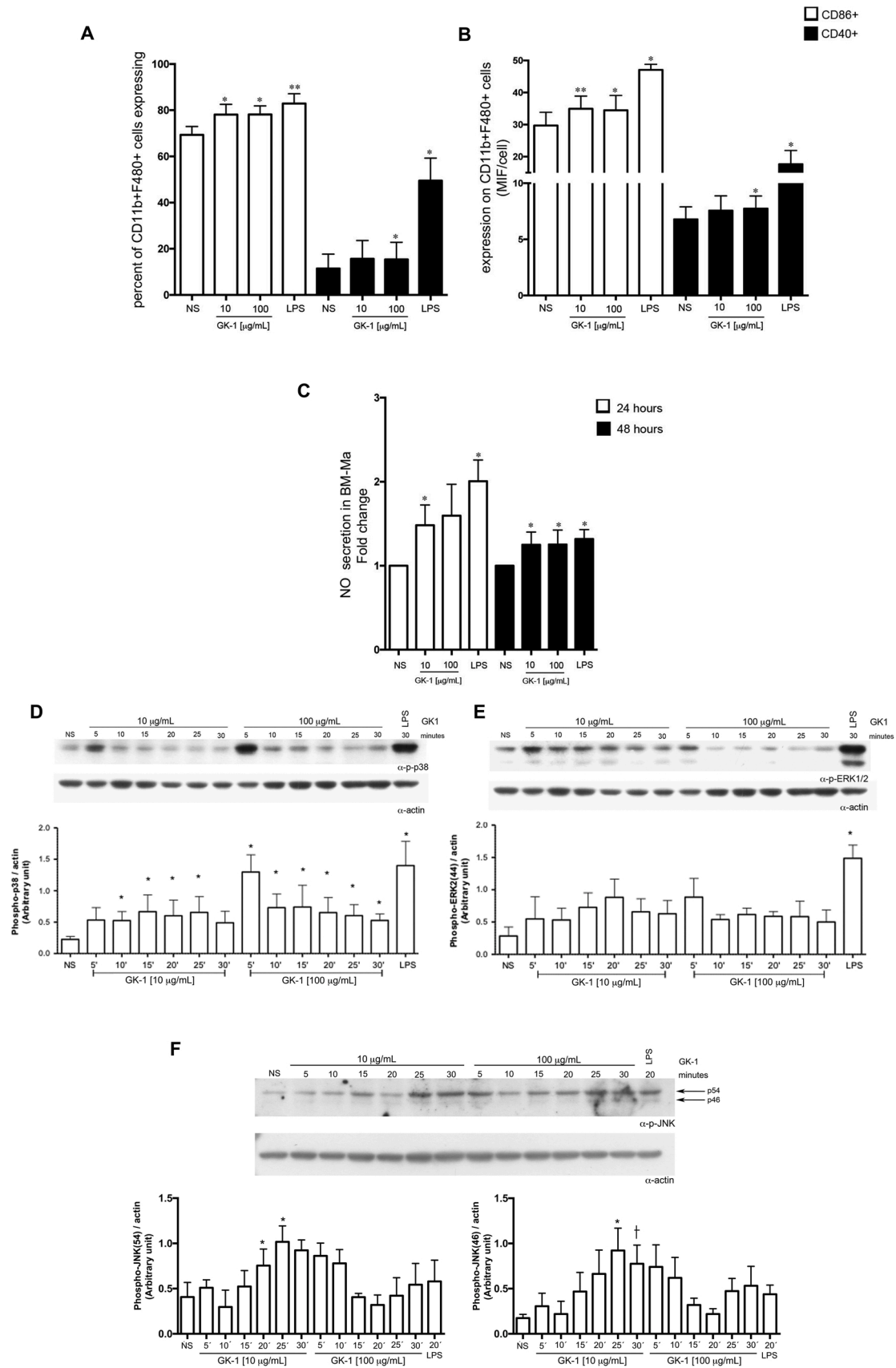
To gain insight into the mechanism of action of GK-1, we investigated the role of the MAP kinase and NF- κ B pathways, two common downstream pathways for TLR signaling [Kawai and Akira, 2006], since they are key regulators in several immune cell functions, including the production of inflammatory mediators [Jeffrey et al., 2007].

GK-1-stimulated BMDMs significantly increased the phosphorylation of MAPK p38 at both doses employed (Fig. 1D) and MAPK JNK at the lower dose used (10 μ g/mL) (Fig. 1F). Meanwhile, no increases were obtained for ERK1/2 phosphorylation at Thr202/Tyr204 (Fig. 1E).

We also evaluated the involvement of NF- κ B (the transcription factor directly linked to its canonical activation mediated by the TLR signaling) in two different ways. We evaluated if I κ B become phosphorylated, showing that GK-1 stimuli significantly increased the I κ B phosphorylation after 15 min only when the low dose was used (Fig. 2A). Besides, NF- κ B activation was evaluated in both WT and Myd88-KO BM-derived cells. After treating WT BMDMs with the GK-1 peptide there was a time-dependent increase in the accumulation of the NF- κ B p65 subunit in the nucleus, reaching a maximum 1–2 h after treatment at the lower GK-1 dose used (10 μ g/mL) and at 1–3 h after treatment at the higher dose (Fig. 2B). Interestingly, in BMDMs from Myd88-KO mice treated with GK-1, LPS, or medium alone (NS), no significant nuclear accumulation of p65 was observed (Fig. 2B), indicating the involvement of this mediator in the translocation of NF- κ B into the nuclei.

3.2. GK-1 enhances the in vitro activation of BM-DCs

To evaluate the effect of GK-1 on BM-DC activation, three analysis were conducted using two stimulation schemes: The effect on the level of MHC-II expression in CD11c+ cells, the percentage of CD11c+/MHC-II+ cells that express CD86, and its level of expression when stimulated with either GK-1 alone or with GK-1 plus a 4h LPS pulse for 10 or 24 h. As shown in Fig. 3, GK-1 at a dose of 100 μ g/mL induced CD86 (Fig. 3C)



(caption on next page)

Fig. 1. Stimulation with GK-1 induced an efficient activation in BMDMs. BMDMs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$, or LPS (100 ng/mL) for 48 h. The cells were stained for CD86 and CD40 and the percentage of expression (A) and MIF (B) was analyzed with the FlowJo software v.8.7. Data are expressed as mean \pm SEM of 4 independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ compared with cells incubated with NS. (C) BMDMs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$, or LPS (100 ng/mL) for 24 or 48 h. Nitrite concentration was determined by the Griess reaction. Data are expressed as mean \pm SEM of 5 and 9 independent experiments, respectively. * $p < 0.05$ compared with cells incubated with NS. BMDMs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$, or LPS (100 ng/mL) for the periods indicated. The cells were lysed in sample buffer, analyzed by SDS-PAGE and then blotted onto PVDF membranes and probed with anti-phospho-p38 (D), anti-phospho-ERK1/2 (E) and anti-phospho-JNK (F). The spots were analyzed by densitometry after staining of p-p38, p-ERK1/2 and p-JNK. The ratio of MAPK with respect to α -actin was determined, and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ or † tendency ($p > 0.05$) with respect to NS group.

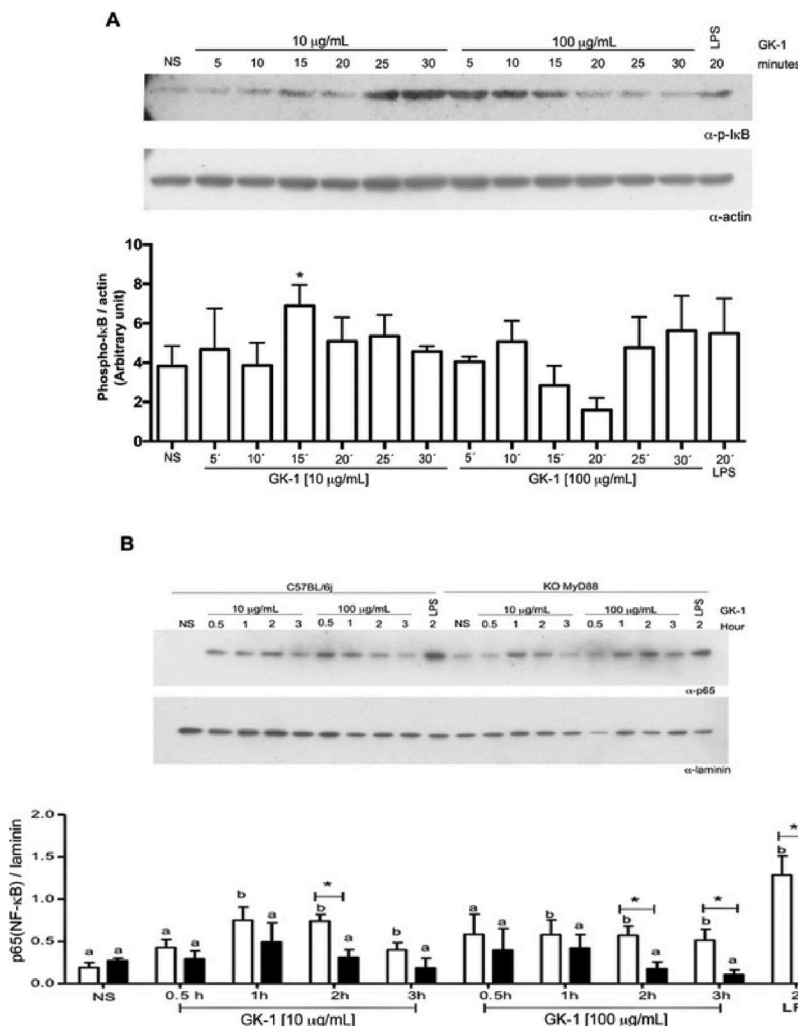


Fig. 2. Stimulation with GK-1 induced an efficient activation of NF- κ B pathway in BMDMs. (A) BMDMs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$, or LPS (100 ng/mL) for the periods indicated. The cells were lysed in sample buffer, analyzed by SDS-PAGE and then blotted onto PVDF membranes and probed with anti-phospho-I κ B. The spots were analyzed by densitometry after staining of p-I κ B. The ratio of p-I κ B with respect to α -actin was determined, and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ with respect to cells incubated with NS group. (B) BMDMs from wild-type (WT, \square) or Myd88-knockout (\blacksquare) mice were exposed for the time indicated to 10 or 100 $\mu\text{g/mL}$ of GK-1, and cell nuclei lysates were obtained. The blots were probed with anti-NF- κ B (p65) and laminin control antibodies. The ratio of p65 with respect to laminin was calculated, and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments. The letters (a,b) indicate significant differences with respect to cells incubated with culture medium (NS). * $p < 0.05$ between WT and KO groups after the same period post-stimulus.

upregulation at 24 h after stimulus meanwhile, a slightly increase ($p = 0.09$) for MHC class II (Fig. 3A) and percentage of CD86 (Fig. 3B) was obtained. A significant increase in cell surface levels of both molecules was observed at both doses tested when BM-DCs were treated with GK-1 plus a LPS pulse for 4 h (Fig. 3A-C).

With regard to the MAPK pathway, GK-1 stimulus resulted in a markedly enhanced phosphorylation of MAPK p38 with respect NS cells ($p < 0.05$) at both doses employed (Fig. 3D). A clear decrease in p38 phosphorylation was observed 20 min after the stimulus, which tend to be restored at later times. As shown in Fig. 3E, GK-1 stimulus led to a slight activation of MAPK ERK1 (p44) at earlier times (5 min) post-stimulation with the higher dose, an increase that tends to remain at later times. Respect with the JNK phosphorylation, Fig. 3F shows that this MAPK was significantly phosphorylated when both doses of the GK-1 stimuli were used.

Regarding the effect of GK-1 upon the NF- κ B pathway in BM-DCs, as

observed in Fig. 4A, I κ B was preferentially phosphorylated at the lower dose used. Furthermore, when used at both doses, GK-1 induced the nuclear translocation of the p65 subunit in WT BM-DCs 30 min after treatment, and it remained increased until 3 h after stimulus (Fig. 4B). Interestingly, in Myd88-KO BM-DC cells treated with GK-1 peptide or LPS, a significantly reduced accumulation of p65 was observed (Fig. 4B). The diminished on the nuclear translocation was more significant for the lower dose used (10 μg).

3.3. Myd88-dependent production of pro-inflammatory mediators in GK-1-treated mice

Wild-type BM-DCs and BMDMs were incubated with different doses of the GK-1 peptide for 24 or 48 h, respectively, and the secretion of pro-inflammatory cytokines in the supernatants was quantified. No secretion of the cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12 (p40 or p70), IL-18, nor TNF- α was

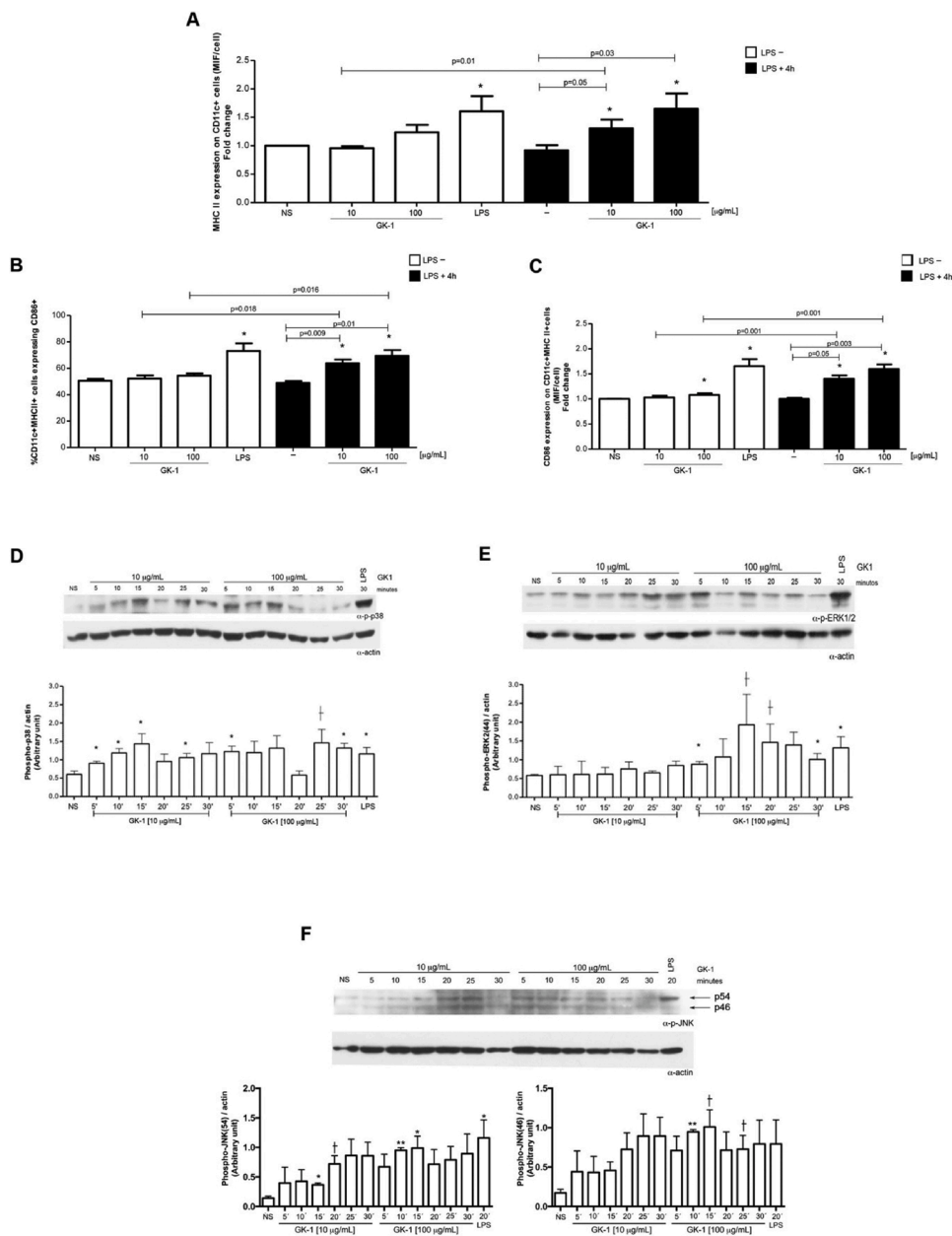


Fig. 3. GK-1 stimulation induced an efficient activation in BM-DCs. BM-DCs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 µg/mL, LPS (100 ng/mL), or LPS for 4 h plus GK-1 at both doses, for 10 or 24 h. (A) The expression of MHC class II on the surface of CD11c + cells was determined in an Attune Nxt cytometer and expressed as the mean intensity fluorescence per cell (MIF/cell). Data are expressed as mean ± SEM of 5 independent experiments. **p* < 0.05 with respect to NS cells or *p* value between groups indicated. The expression rate of CD86 in CD11c + MHC^{high} cells (B) or MIF (C) of CD86 on CD11c + MHC^{high} cells are expressed as mean (± SEM) after analysis with the FlowJo software. Data are representative of 4 to 5 independent experiments. **p* < 0.05 with respect to NS or between groups. For MAPK analysis, BM-DCs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 µg/mL, or LPS (100 ng/mL) for the periods indicated. The cells were lysed in sample buffer, analyzed by SDS-PAGE and then blotted onto PVDF membranes and probed with anti-phospho-p38 and anti-phospho-ERK1/2. The spots were analyzed by densitometry after staining of p-p38 (D), p-ERK1/2 (E) and anti-phospho-JNK (F). The ratio of MAPK with respect α-actin was calculated, and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. **p* < 0.05 with respect to cells incubated with NS; † tendency (*p* > 0.05) with respect to the NS group.

observed in both BM cells stimulated *in vitro* with GK-1 (Fig. S2).

Wild-type mice were intravenously inoculated with GK-1 at two doses, and the levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines in serum were determined after 6, 10, or 24 h. As shown in Fig. 5, increased levels of IL-6 and CCL2 were found in mice at 10 h post-stimulus at both GK-1 doses tested. GK-1 also enhanced the levels of the chemokine CCL2 at early times at the higher dose, as well as the levels of IL-15 24 h after stimulus.

To assess the possible Myd88-dependent pro-inflammatory properties of GK-1 *in vivo*, the levels of the cytokines IL-6, TNF-α, IL-12 (p40), and IL-12 (p70) were measured in spleen supernatants after intravenous injection of GK-1 to C57BL/6 J (WT) and Myd88-KO mice. A significantly decreased secretion of IL-6 was observed in Myd88-KO mice with respect to WT mice at both GK-1 doses tested (10 and 100 µg/mL) (Fig. 6). TNF-α and IL-12 (p40) were not detected in the spleen of WT nor Myd88-KO mice (Fig. S3).

4. Discussion

GK-1 has been proved to act as an immunomodulatory peptide, exerting a direct effect on innate immune cells by increasing the expression of activation molecules on dendritic cells [Segura et al., 2009] and peritoneal macrophages [Sánchez et al., 2018]. Herein, the effects of GK-1 on bone marrow-derived Mas and DCs using the doses which have demonstrated an effective adjuvant and antitumoral responses and the involvement of the MAPK and NF-κB pathways in their activation were studied.

We found clear evidences that GK-1 induces phenotypic maturation on BM-DCs and BMDMs. In BMDMs, the peptide increased the expression of CD86 and CD40, as well as NO production, resembling a classical M1 phenotype [Mantovani et al., 2004; Quero et al., 2017], as previously reported in PMas [Sánchez et al., 2018]. With respect to NO production, higher nitrite levels were observed at early times (24 h) after GK-1 stimulation than at 48 h. This may be related with the controlled inflammatory stimulus induced by this peptide.

In dendritic cells, GK-1 at a dose of 100 µg/mL induced changes in

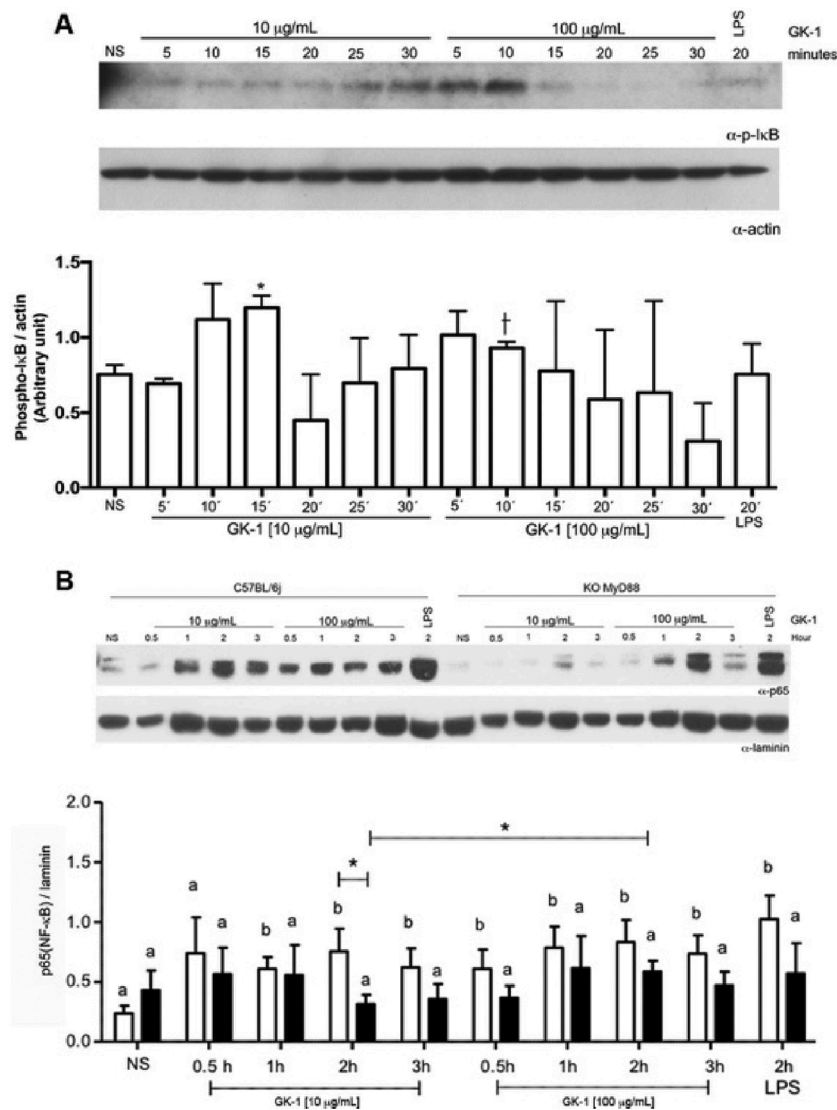


Fig. 4. Stimulation with GK-1 induced an efficient activation of NF-κB pathway in BMDCs. **(A)** BMDCs were incubated with culture medium (NS), the GK-1 peptide at a dose of 10 or 100 μg/mL, or LPS (100 ng/mL) for the periods indicated. The cells were lysed in sample buffer, analyzed by SDS-PAGE and then blotted onto PVDF membranes and probed with anti-phospho-IκB. The spots were analyzed by densitometry after staining of p-IκB. The ratio of p-IκB with respect to α-actin was determined, and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. *p < 0.05 with respect to cells incubated with NS group. **(B)** BMDC— from wild-type (WT, □) or Myd88-knockout (■) mice were exposed for the time indicated to 10 or 100 μg/mL of GK-1, and cell nuclei lysates were obtained. Blots were probed with anti-NF-κB (p65) and laminin control antibodies. The ratio of p65 with respect to laminin was calculated and the values were expressed in arbitrary units. Data are expressed as mean ± SEM of 3 independent experiments. Letters (a,b) indicate significative differences with respect to cells incubated with culture medium (NS). *p < 0.05 between WT and KO groups in the same stimulus period.

the expression of CD86. An increased at both doses in MHC and CD86 molecules were evident when BM-DCs were exposed to LPS as a previous pulse for DC maturation. It was previously reported that GK-1 partially enhanced these surface markers in BM-DCs at dose of 10 μg/mL, although this effect was statistically significant only when GK-1 was used in combination with LPS or TNFα [Segura et al., 2009; Piñon et al., 2015]. Other molecules have been used to promote the activation of innate immune cells in order to improve immunity against infections or overcome tumoral suppression [Dong and Kobinger, 2013; Ohadian and Nowroozi, 2019]. Such is the case of Transferon®, an immunomodulator composed by a mixture of low-molecular-weight peptides. It has shown to increase CD80 and CD86 expression, but only when THP-1 cells are exposed to Transferon® and LPS together [Jiménez et al., 2019]. This increase indicates a clear switch from a steady state to a mature state, probably due to a synergy or priming between TLR agonists, where DCs are more efficient in antigen presentation [Bagchi et al., 2007; Hémond et al., 2013; Pérez et al., 2017]. This in accordance to previous reports where BM-DC treated *in vitro* with GK-1 increased the proliferative response of HA-specific CD4 T cells [Segura et al., 2009]. On the other hand, it has been described that DC undergo a complex maturation process that changes across the time, being the molecules of the major histocompatibility complex the first to be expressed on the surface of an APC, followed by costimulatory molecules expression (CD80-CD86-CD40) and cytokines production [Banchereau and

Steinman, 1998; Macagno et al., 2007], findings that are in accordance with our results.

It is well known that the binding of specific ligands to TLRs initiate complex signaling cascades which result in the activation of NF-κB and MAPKs through the TAK1 adaptor in a Myd88-dependent manner [Banerjee and Gerondakis, 2007; Peroval et al., 2013].

In concordance with this, we found that GK-1 phosphorylates ERK, JNK and p38 MAPK, albeit in distinct ways, being more sustained in BM-DCs than in BMDMs, depending on the dose and time of stimulus as well. The differential response between BM-DCs and BMDMs with the same receptor stimulation has been previously observed [Goodridge et al., 2009]. The authors found a differential response induced by Dectin-1 signals via CARD9 in BMDMs and BM-DCs, in which BMDMs CARD9 recruitment contributes to p38 MAPK activation accompanied by a reduced production of TNF-α, whilst in BM-DCs it promotes NF-κB activation, favoring TNF-α expression, a response that is associated to different levels of CD37 expression among macrophage/DC populations. Thus, it is possible that different regulatory mechanisms may account for the observed differences between BM-DC and BMDMs upon stimulation with GK-1. Respect to the differences observed in MAPK activation in macrophages after stimulation, it has been reported that TLR2 and TLR4 agonists (Pam3CSK4 and LPS, respectively) activate ERK1/2 and p38 in a similar manner, but the activation of these MAPKs is slightly stronger in M2 than in M1 macrophages [Quero et al., 2017], highlighting the

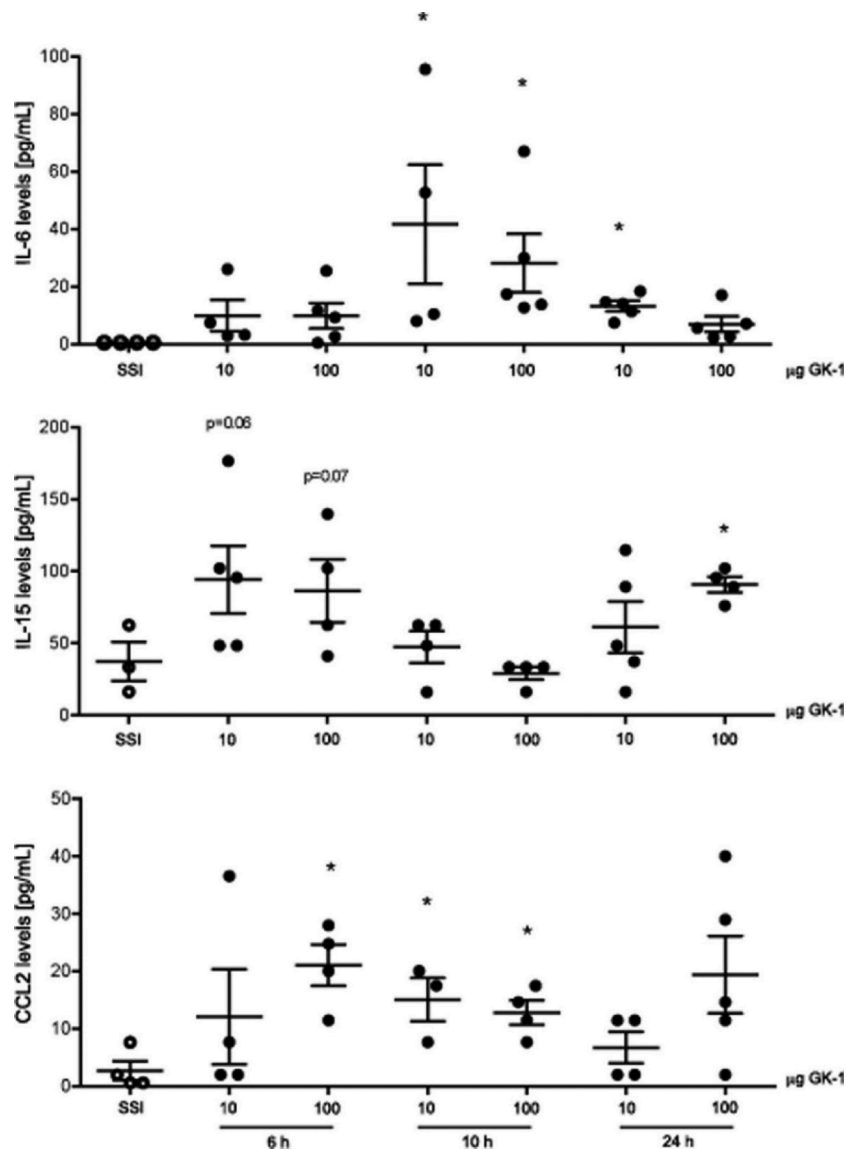


Fig. 5. GK-1 induced the production of IL-6, IL-15, and CCL2 *in vivo*. C57BL/6 J mice were injected i.v. in the tail vein with GK-1 (● 10 or 100 µg) or ISS (○) as vehicle. Blood samples were taken after 6, 10, and 24 h after stimulus and serum was obtained for further analysis by Luminex Magpix. Data are expressed as representative individual mice per group (mean and SEM are plotted). *p < 0.05 respect to ISS group.

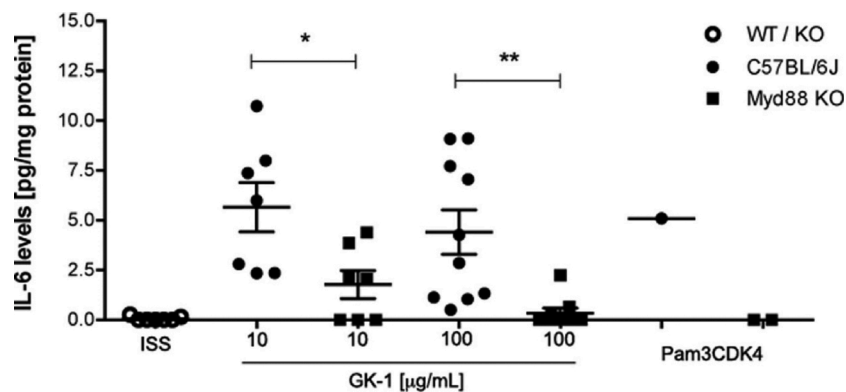


Fig. 6. GK-1 induced IL-6 secretion *in vivo*. C57BL/6 J (●) or Myd88-knockout (■) mice were injected i.v. in the tail vein with GK-1 (10 or 100 µg), ISS (○) as a vehicle, or the TLR agonist Pam3CSK4 (10 µg). Spleen protein extracts were obtained 24 h after stimulus and IL-6 was quantified by ELISA. Data are expressed as individual mice per group (mean and SEM are plotted). *p < 0.05 between groups.

link between GK-1 stimulation and a M1 phenotype. Peroval et al. (2013) reported the role of MAPK in the upregulation of pro-inflammatory mediators upon exposing macrophages to TLR agonists; the authors of this study found that p38 and JNK were involved in the upregulation of iNOS and IL-1 β mRNAs and in NO production after TLR4 or TLR5 stimulation. Moreover it has been reported that p38 and JNK in response to TLR activation promotes the expression of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, and IL-12; consistent with this idea, myeloid cell-specific deletion of JNK also decreased the expression of several M1 macrophages-specific genes in BMDMs that have been stimulated with INF- γ or LPS (the classical stimuli to induce an M1 macrophage phenotype *in vitro* [Dong et al., 2002; Martínez et al., 2009]. In our study, we found that GK-1 efficiently induced NO production upon stimulation, activating the p38, JNK and ERK signaling pathways, suggesting the possible participation of a TLR receptor in GK-1 recognition.

We have previously shown that exposing APCs to GK-1 *in vitro* results in the secretion of inflammatory cytokines [Sánchez et al., 2018; Segura et al., 2009]. To examine the immunomodulatory properties of GK-1 *in vivo*, the cytokine response was measured in serum samples and spleen supernatants after i.v. administering the peptide to mice. We found that GK-1 induced the production of IL-6, IL-15, and CCL2 but no induction of IL-12 nor TNF- α was observed (Fig. S4). The production of IL-6 may be related with the activation of the MAPK and NF- κ B pathways, as it has been observed with other immunostimulatory peptides, like Hp91 and IDR-1002 [Nijnik et al., 2010; Saenz et al., 2014], a finding associated to neutrophil recruitment. In previous studies, we also found that the administration of GK-1 increases neutrophil levels, therefore favoring the recruitment of inflammatory cells; this effect may underly, among other actions, its immunomodulatory properties [Cervantes et al., 2019; Pérez et al., 2013].

With regard to IL-15 and CCL-2, both are known to be key mediators of inflammatory processes. IL-15 is a cytokine produced by many cell types, like monocytes, macrophages, DCs, fibroblasts, epithelial cells, and skeletal muscle cells. It acts as a growth factor and promotes the survival of T, B, and NK cells by preventing apoptosis through the upregulation of anti-apoptotic and the downregulation of pro-apoptotic factors. It transforms monocytes into DCs and activates DCs and macrophages. IL-15 is not only cytokine involved in the maintenance of nave, effector, and memory T cells, but it also plays a dominant role in the generation and reactivation of these cells and modulates T-cell migration, which is a critical requirement to fight infection. IL-15 promotes the survival of naïve and memory CD8 + T cells and enhances the cross-priming of CD4+ and CD8+ T cells, as well as the proliferation of TEM cells and CD44hi or CD122hi memory CD8 T cells. In addition, over-expression of IL-15 or the administration of rIL-15 protects mice from various infections [Guo et al., 2017]. Thus, GK-1 promotes *in vivo* the production of a potential master regulator in the immune response. With respect to CCL2, it is produced by a wide array of cell types, including monocytes, macrophages, endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, epithelial cells, mesangial cells, astrocytic cells and microglial cells [Bianconi et al., 2018]. It is known as a key mediator of circulating blood monocyte chemotaxis into sites of inflammation and T-lymphocyte differentiation, in addition to its monocyte chemotactic activity, MCP-1/MCAF was shown to activate monocytes for tumor cell killing which would explain the antitumor properties that we find in the peptide [Torres et al., 2017].

IL-12 is an important cytokine secreted by DCs and tissue-resident macrophages in response to either endogenous or exogenous stimuli to promote the development of Th1 cells [Hedhli et al., 2009; Teng et al., 2015]. However, it has been reported that ERK1/2 activation by Pam3CSK4 leads to a negative regulation of IL-12(p70) production [Dillon et al., 2004]. Thus, the slight failure to induce IL-12 could be associated to the ERK1 phosphorylation induced by GK-1, particularly in BM-DCs. On the other hand, in a particular microenvironment, we have found that GK-1 increases intratumor levels of IL-12 [Pérez et al., 2015;

Torres et al., 2017]. Thus, the effect of GK-1 on the induction of this Th1 cytokine may depend on several signals imposed by the inflammatory and tumoral recruited cells. Considering that IL-18 increases the production of IFN- γ along with IL-12 to promote an antitumor response [Mak and Saunders, 2006; Telusma et al., 2006], we evaluated whether GK-1 could induce IL-18 production in BM-derived cell culture supernatants. No increase in IL-18 levels was detected, showing that the immunomodulatory activity of GK-1 is not associated to inflammasome activation, since it also failed to increase IL-1 β .

With respect to the lack of TNF- α production in both BM-derived Mas and DCs upon *in vitro* stimulation with GK-1, it may be due do the activation of p38; a recent study reported that the increase in p38 or MK2 activation abolishes TNF- α production in a stimulus-dependent manner [Menon and Gaestel, 2018]. TNF- α is an inflammatory cytokine that is well known to promote necrosis, apoptosis, and high levels of ROS production. Thus, its expression must tightly controlled. In this sense, it should be noted that GK-1 exerts an effective immunomodulatory response without triggering an exacerbated production of pro-inflammatory cytokines [Sánchez et al., 2018; Segura et al., 2009], which may lead to uncontrolled inflammation, with severe consequences for the host.

On the other hand, we showed that stimulation with GK-1 induced the translocation of NF- κ B p65 into nuclei from both WT BM-derived Mas and DCs. This transcription factor plays a central role in the inflammatory response [Peroval et al., 2013]. In non-stimulated cells, proteins of the NF- κ B family are found as inactive complexes in the cytoplasm, until certain proinflammatory events or pathogen products promote their translocation into the nucleus, where it regulates the transcription of proinflammatory mediators, leading to inflammation [Kawai and Akira, 2011; Vora et al., 2010]. Thus, the production of inflammatory products such as IL-6 and NO may depend on the translocation of NF- κ B into the nucleus. The IKK complex phosphorylates I κ B, which leads to its ubiquitylation and subsequent degradation, this allows NF- κ B to translocate to the nucleus. In our study, we demonstrated the translocation of p65 as a consequence of activation of I κ B.

Except for TLR3, the pathway universally involved in NF- κ B activation by all TLR/IL-1R members depends on Myd88 [Kaisho and Akira, 2001]. Thus, the possible role of TLR signaling in mediating the response to GK-1 was evaluated in this study by using Myd88-KO mice. As observed, the translocation of NF- κ B p65 was reduced in both BMDMs and BM-DC antigen presenting cells, suggesting a Myd88-dependent activation. Furthermore, Myd88-deficient cells also failed to produce the modulatory IL-6 cytokine upon stimulation with GK-1.

The observed dependence on the Myd88 adaptor for the induction of pro-inflammatory events reinforces the notion of the role of a TLR family member as a receptor for GK-1; this could explain the observed effects, as well as the increased expression of the transcript for TLR2 induced in peritoneal macrophages stimulated with GK-1 [Sánchez et al., 2018].

5. Conclusions

In conclusion, this study demonstrates that GK-1 activates antigen presenting cells through a Myd88 dependent mechanism, involving the activation of the MAPK and NF- κ B signaling pathways. These findings, along with the feasibility of synthesizing GK-1 under cGMP and its safety demonstrated in preclinical studies [Cervantes et al., 2019], support its potential use to modulate both the innate and acquired immunity, improving antitumor and/or anti-infectious immunity.

Author contributions

The author contributed to the work as follows, conceptualization, G. F., L.M and J.C.; formal analysis, L.M. and J.C.; resources, J.C., G.F. and E.S.; writing—original draft preparation, L.M. and J.C.; writing—review and editing, G.F. and E.S.; supervision, G.F. and E.S.

Funding

This research was funded by CONACyT under grant 253891, PAPIIT (IN213219) and the Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial assistance of CONACyT to the doctoral students Laura Montero-León and Jacquelynne Cervantes-Torres from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who received the fellowships 226106 and 25243, respectively. This manuscript is part of the doctoral thesis of the students from the Instituto de Investigaciones Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

We are grateful to MVZ Georgina Díaz, MVZ Jorge Omar Garcia Rebollar and MVZ Monica Martínez Marcial for their technical assistance in the reproduction, handling, and care of laboratory animals, to the Unidad de Modelos Biológicos for animal facilities, to Dr. Rene Segura Velázquez from the Unidad de Investigación at Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, for his support and advice in the use of cytofluorometry equipment, to Dr. Diana Torres, Biol. Exp. Gonzalo Acero, and QFB Juan Alberto Hernández for their assistance in mice inoculation, and to Juan Francisco Rodriguez for copyediting the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.09.015>.

References

- Akira, S., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Adv. Immunol.* 78, 1–56. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(01\)78001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(01)78001-7) [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(01\)78001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(01)78001-7).
- Bagchi, A., Herrup, E.A., Warren, H.S., Trigilio, J., Shin, H.S., Valentine, C., Hellman, J., 2007. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J. Immunol.* 178, 1164–1171. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1164>.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>.
- Banerjee, A., Gerondakis, S., 2007. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol. Cell Biol.* 85, 420–424. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100098> <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100098>.
- Bell, E., 2004. Differential TLR signaling. *Nat. Rev.* 4, 3. <https://doi.org/10.1038/nri1279>.
- Bianconi, V., Sahebkar, A., Atkin, S.L., Pirro, M., 2018. The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1. *Curr. Opin. Hematol.* 25, 44–51. <https://doi.org/10.1097/moh.0000000000000389>.
- Botelho, R.J., Grinstein, S., 2011. Phagocytosis. *Curr. Biol.* 21, R533–R538. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.053>.
- Buckwalter, M.R., Albert, M.L., 2009. Orchestration of the immune response by dendritic cells. *Curr. Biol.* 19, R355–R361. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.03.012>.
- Cervantes, J., Gracia, I., Segura, R., Montero, R., Espinosa, J., Gonshebb, M., Camacho, R., Rivera, M., Sanchez, F., Tinoco, M., Ostrosky, P., Fragoso, G., Sciotto, E., 2019. Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41, 140–149. <https://doi.org/10.1080/08923973.2019.1566359>.
- Classen, A., Lloberas, J., Celada, A., 2009. Macrophage activation: classical Vs. Alternative. In: Reiner, N. (Ed.), *Macrophages and Dendritic Cells*. Humana Press, Vancouver, pp. 29–43. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_3.
- Dillon, S., Agrawal, A., Van Dyke, T., Landreth, G., McCauley, L., Koh, A., Maliszewski, C., Akira, S., Pulendran, B., 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* 172, 4733–4743. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4733>.
- Dong, J.C., Kobinger, G.P., 2013. Hypothesis driven development of new adjuvants: short peptides as immunomodulators. *Hum. Vaccin. Immunother.* 9, 808–811. <https://doi.org/10.4161/hv.22972>.
- Dong, C., Davis, R.J., Flavell, R.A., 2002. MAP Kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 55–72. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.091301.131133>.
- Genovesi, E.V., Knudsen, R.C., Gerstner, D.J., Card, D.M., Martins, C.L., Quintero, J.C., Whyard, T.C., 1989. In vitro induction of swine peripheral blood monocyte proliferation by the fibroblast-derived murine hematopoietic growth factor CSF-1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 23, 223–244. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(89\)90137-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(89)90137-2).
- Goodridge, H.S., Shimada, T., Wolf, A.J., Hsu, Y.M., Becker, C.A., Lin, X., Underhill, D.M., 2009. Differential use of CARD9 by dectin-1 in macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 182, 1146–1154. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1146>.
- Guo, Y., Luan, L., Patil, N.K., Sherwood, E.R., 2017. Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine Growth Factor Rev.* 38, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.08.002>.
- Hedhli, D., Dimier, I., Judge, J.W., Rosenberg, B., Mévélec, M.N., 2009. Protective immunity against Toxoplasma challenge in mice by coadministration of T. Gondii antigens and Eimeria profilin-like protein as an adjuvant. *Vaccine* 27, 2274–2281. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.100>.
- Hémont, C., Neel, A., Heslan, M., Braudeau, C., Josien, R., 2013. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J. Leukoc. Biol.* 93, 599–609. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912452>.
- Janevay Jr., C.A., Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.
- Jeffrey, K.L., Camps, M., Rommel, C., Mackay, C.R., 2007. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 391–403. <https://doi.org/10.1038/nrd2899>.
- Jiménez, A., Valencia, H., Carballo, G., Vallejo, L., Medina, E., Chacón, R., Pavón, L., Velasco, M.A., Mellado, G., Estrada, S., Pérez, S.M., 2019. CD80 expression correlates with IL-6 production in THP-1-Like macrophages costimulated with LPS and dialyzable leukocyte extract (Transferrin®). *J. Immunol. Res.* 2019, 2198508. <https://doi.org/10.1155/2019/2198508>.
- Kaisho, T., Akira, S., 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 22, 78–83. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(00\)01811-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01811-1).
- Kawai, T., Akira, S., 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ.* 13, 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>.
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Macagno, A., Napolitano, G., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2007. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* 28, 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.03.008>.
- Mak, T.W., Saunders, M.E., 2006. T cell differentiation and effector function. In: Lebedeva, V. (Ed.), *The Immune Response*. Academic Press, California, pp. 403–432.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M., 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015>.
- Martínez, F.O., Helming, L., Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451–483. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132532>.
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>.
- Menon, M.B., Gaestel, M., 2018. MK2-TNF-signaling comes full circle. *Trends Biochem. Sci.* 43, 170–179. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.12.002>.
- Mortellaro, A., Urbano, M., Citterio, S., Foti, M., Granucci, F., Ricciardi, P., 2009. Generation of murine growth factor-dependent long-term dendritic cell lines to investigate host-parasite interaction. In: Reiner, N. (Ed.), *In Macrophages and Dendritic Cells*. Humana Press, Vancouver, pp. 17–28. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-396-7_2.
- Mosser, D.M., Edwards, J.P., 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Nijnik, A., Madera, L., Ma, S., Waldbrook, M., Elliott, M.R., Easton, D.M., Mayer, M.L., Mullaly, S.C., Kindrachuk, J., Jensen, H., Hancock, R.E., 2010. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *J. Immunol.* 184, 2539–2550. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901813>.
- Ohadian, S., Nowroozi, M.R., 2019. Toll-like receptors: the role in bladder cancer development, progression and immunotherapy. *Scand. J. Immunol.*, e12818. <https://doi.org/10.1111/sji.12818>.
- Pérez, A., Vera, J., Hernaiz, J.C., Moreno, E., Monteverde, D., Vera, C., Estrada, D., 2013. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biother. Radiopharm.* 28, 682–690. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1438>.
- Pérez, A., Vera, J., Sahaza, J.H., Vera, C., Moreno, E., Pulido, E., Nuñez, L., Jeganathan, P., 2015. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biother. Radiopharm.* 30, 247–254. <https://doi.org/10.1089/cbr.2015.1835>.
- Pérez, G., López, O., Piedra, J., Bonifaz, L.C., Moreno, J., 2017. Dynamic changes in the intracellular association of selected rab small GTPases with MHC class II and DM

- during dendritic cell maturation. *Front. Immunol.* 8, 340. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00340>.
- Peroval, M.Y., Boyd, A.C., Young, J.R., Smith, A.L., 2013. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. *PLoS One* 8, e51243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051243>.
- Quero, L., Hanser, E., Manigold, T., Tiaden, A.N., Kyburz, D., 2017. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages, generating a chimeric M1/M2 phenotype. *Arthritis Res. Ther.* 19, 245. <https://doi.org/10.1186/s13075-017-1447-1>.
- Saenz, R., Futralan, D., Leutenez, L., Eekhout, F., Fecteau, J.F., Sundelius, S., Sundqvist, S., Larsson, M., Hayashi, T., Minev, B., Carson, D., Esener, S., Messmer, B., Messmer, D., 2014. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J. Transl. Med.* 12, 211. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-211>.
- Sánchez, L., Montero, L., Mojica, R., Reyes, J.P., Cervantes, J., Parkhouse, R.M., Fragoso, G., Scituito, E., 2018. Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis. *Immunol. Lett.* 201, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.010>.
- Schlitzer, A., Ginhoux, F., 2014. Organization of the mouse and human DC network. *Curr. Opin. Immunol.* 26, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.11.002>.
- Segura, R., Pérez, A., Rosas, G., Toledo, A., Restelli, M., Acosta, E., Corral, R., Rossetti, F., Fragoso, G., Grinstein, S., Scituito, E., 2006. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 24, 1073–1080. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.014>.
- Segura, R., Fragoso, G., Scituito, E., Sarukhan, A., 2009. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1338–1343. <https://doi.org/10.1128/cvi.00106-09>.
- Telusma, G., Datta, S., Mihajlov, I., Ma, W., Li, J., Yang, H., Newman, W., Messmer, B.T., Miev, B., Schmidt, I.G., Tracey, K.J., Chiorazzi, N., Messmer, D., 2006. Dendritic cell activating peptides induce distinct cytokine profiles. *Int. Immunol.* 18, 1563–1573. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl089>.
- Teng, M.W., Bowman, E.P., McElwee, J.J., Smyth, M.J., Casanova, J.L., Cooper, A.M., Cua, D.J., 2015. IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* 21, 719–729. <https://doi.org/10.1038/nm.3895>.
- Torres, D., Pérez, A., Manoutcharian, K., Orbe, U., Servín, R., Fragoso, G., Scituito, E., 2017. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine* 35, 5653–5661. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.060>.
- Vora, S., Abbas, A., Kim, C.J., Summerfield, T.L., Kusanovic, J.P., Iams, J.D., Romero, R., Kniss, D.A., Ackerman 4th, W.E., 2010. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-8>.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A.F., Cardó, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J., Celada, A., 2001. Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology* 204, 543–550. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00091>.

Glossary

- PAMPs*: Pathogen-associated molecular patterns
PRRs: Pattern Recognition Receptor
TLRs: Toll-Like Receptor
APC: Antigen Presenting Cells
Mas: Macrophages
DCs: Dendritic Cells
NK: Natural Killer
MAPK: Mitogen-activated Protein Kinase
IL·: Interleukin
JNK: c-Jun N-terminal kinases
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
Th·: T helper cells
IgG: Immunoglobulin
MHC-II: Major histocompatibility complex II
TNF-α: Tumor Necrosis Factor α
CCL2: Chemokine (C-C motif) ligand 2
PMas: Peritoneal Macrophages
NO: Nitric Oxide
BMDMs: Bone marrow

We are IntechOpen, the world's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists

4,400

Open access books available

117,000

International authors and editors

130M

Downloads

Our authors are among the

154

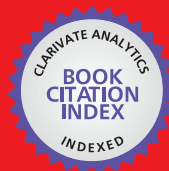
Countries delivered to

TOP 1%

most cited scientists

12.2%

Contributors from top 500 universities



WEB OF SCIENCE™

Selection of our books indexed in the Book Citation Index
in Web of Science™ Core Collection (BKCI)

Interested in publishing with us?
Contact book.department@intechopen.com

Numbers displayed above are based on latest data collected.
For more information visit www.intechopen.com



Understanding the Anti-Tumor Properties Mediated by the Synthetic Peptide GK-1

Jacquelynne Cervantes-Torres, Laura Montero,
Noé Rodríguez-Rodríguez, Edda Sciutto,
Gladis Fragoso and Diana Torres-García

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79833>

Abstract

Cancer exhibits adaptive features typical of complex systems, like resilience and robustness to environmental challenges through the emergent co-evolution of its components. These events promote carcinogenesis through dynamic interactions among numerous components and subsystems, including the immune system. During the past decade, our research group has provided substantial evidence that the peptide GK-1 has important immunomodulatory properties. In elderly mice, GK-1 acts as a potent adjuvant of the influenza vaccine through a mechanism that involves the activation of antigen-presenting cells (APCs) and an increased production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (IFN- γ , TNF α , CCL2). To date, there is solid evidence supporting the antitumoral properties of GK-1 in murine cancer models. First, a lower occurrence and smaller size of spontaneous bronchiolar adenomas were found in elderly GK-1-treated mice compared to paired untreated mice. In two independent studies, GK-1 treatment reduced tumor growth and increased mouse survival in a murine model of melanoma and breast tumor. In the former model, a synergy between GK-1 and anti-PD-L1 treatment was observed, while in the latter, GK-1 alone controlled the metastatic burden. The effective activation of APCs induced by GK-1, restoring the antitumor-specific immunity, may underlie some of its antineoplastic effects.

Keywords: GK-1 peptide, melanoma, breast cancer, immunomodulator, antitumor

1. Introduction

1.1. Immunomodulation

Immunosurveillance comprises interactions between the immune system and cancer cells that take place even before the tumor formation [1, 2]. This process includes the recognition and control of transformed cells through antitumor immune responses, with three related outcomes: elimination, equilibrium, and escape [1–5]. In this regard, stimulating the innate immune system by immunogenic cells plays a role in the removal of incipient tumors, activating cells from the adaptive response like T and B cells, as well as promoting acute inflammation due to the concomitant production of immunostimulatory cytokines. Nevertheless, some transformed cells may not be eliminated. This escape phase of immunosurveillance is characterized by tumor growth promotion through a phenomenon called tumor-induced tolerance, which involves an increased expression of immunosuppressive components such as myeloid-derived suppressor cells (MDSC), regulatory T cells (Tregs), as well as T cell exhaustion and the production of immunosuppressive soluble factors [6, 7]. Indeed, some of these cells could be used as prognosis factors, since increased numbers of Treg and MDSC cells are related to a poorer outcome in cancer patients [8–13]; by contrast, a Th1 response is associated with a good prognosis in melanoma, breast, head, neck, colorectal, prostatic, and renal cancer [14–16].

The immune response can be modulated by compounds capable of enhancing (immunopotential) or diminishing (immunosuppression) the immune response, either in an antigen-specific or in a nonspecific manner; the latter implies that the immune system requires to be stimulated to restore the patient's immunocompetence. Immunomodulators are biological or nonbiological substances that can modify one or more components of the immunoregulatory network to achieve a specific antitumor immunity, such as inducing effector tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs), activating macrophages and natural killer (NK) cells, and/or promoting the production of inflammation mediators [17–21].

Immunomodulators include adjuvants, vaccines, and immunoglobulins used to prevent or treat infectious diseases. They are characterized by their ability to activate cells of the innate immune system, mainly dendritic cells (DCs) and macrophages. Some examples of this type of agents are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and molecules like squalene, aluminum salts, and peptides, which are often used as adjuvants in vaccines [21, 22].

1.2. Peptide-based therapies

Anticancer strategies based on peptides have several advantages over other chemotherapeutic approaches, like being nongenotoxic or possessing adjuvant properties; they also have a strong specificity, high affinity, good tissue penetration, and low toxicity with respect to small-molecule drugs and monoclonal antibodies [23–26]. Examples of anticancer peptides are (1) necrotic peptides (some of them are expressed in a wide diversity of species, including insects, fish, amphibians, and mammals, e.g., cecropins A and B found in mammals and various insects) [27]; (2) apoptotic peptides, cationic peptides known as host defense peptides (HDP) such as the bovine lactoferricin, magainin 2, hCAP109-135 (comprising the C-terminal

domain of human CAP18), and BMAP-28 from bovine myeloid cathelicidin [28–31]; (3) blocking peptides; (4) receptor-interacting peptides; (5) peptides that bind to cell-adhesion proteins; (6) protein kinase inhibitors; (7) protease inhibitors; (8) peptides with antiangiogenic properties; and (9) peptides with immunostimulatory activity [27].

With regard to receptor-interacting peptides, compounds like CpG, imiquimod, poly I:C (toll-like receptor (TLR) agonists), α -GalCer (glycolipid ligands), GM-CSF, IL-2, and IFN α/β have antitumoral activity, as well as adjuvant properties [32–34]. These compounds are capable of directly or indirectly enhancing APC functions and T effector activity. In this sense, some of the most employed immunotherapeutic agents in polytherapy induce the effector function of tumor microenvironment (TM)-associated T cells and macrophages [35–38]. For instance, CpG was a promising cancer immunotherapy adjuvant due to its capacity to induce a Th1 immune response and activate APCs through TLR9 signaling [35–38]; however, it failed to stimulate the immune response in clinical trials [39]. The identification of new adjuvants showing low toxicity and capable of stimulating a cellular Th1 response in humans would be a great advancement in the development of vaccines for infectious and noninfectious diseases such as cancer [40].

Unfortunately, several immunostimulators have failed to revert the immunosuppressive conditions in TM. For example, IL-2, IL-12, GM-CSF [41–44], and immunological adjuvants administered with highly immunogenic antigens like incomplete Freund's adjuvant, bacillus Calmette-Guerin [BCG], and MF59 have shown disappointing results [43, 44]. Moreover, these compounds have been associated with toxic effects [45–47].

2. Identification of the GK-1 peptide

Based on the nonspecific reactivity and immunopotentiator properties of GK-1, our group has been studying it as a promising adjuvant for cancer immunotherapy. This 18-amino acid peptide was first derived from the KETc7 protein, isolated from a *Taenia crassiceps* cysticercus cDNA library [48]; KETc7 is part of a broad family of proteins associated with membrane processes [49]. When searching for T cell epitopes *in silico*, GK-1 exhibited a strong association with MHC-I and, to a lesser extent, with MHC-II [49]. The immunomodulatory properties of GK-1 are associated with an efficient activation of cells involved in antigen presentation (such as DCs) by promoting the expression of the costimulatory molecules CD86 and MHC-II, as well as the secretion of soluble pro-inflammatory factors like IFN- γ , TNF- α , and CCL2 [50]. GK-1-treated DCs enhanced the proliferative response of antigen-specific CD4⁺ T cells both *in vivo* and *in vitro* [50]. GK-1 also induced the proliferation of CD8⁺ T cells and higher IFN- γ levels [51] even in the absence of adjuvant [52]. Considering that this peptide can promote APC function and enhance Th1 cell effector pathways, its capacity as an adjuvant of the influenza vaccine was evaluated. GK-1 increased the levels of specific IgG antibodies *in vivo*, before and after infection, in a murine model of influenza in elderly mice [53], favoring virus clearance after infection in both young and aged mice, which could be associated with an early infiltrate of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages) to the lung parenchyma following the GK-1 peptide co-administration. Furthermore, lung histological examination showed better preserved alveolar spaces and less congested alveolar walls with respect to the vaccine-only animals [53].

3. GK-1 as an anticancer immunotherapy

In neoplasms, the host is often immunocompromised due to the presence of immunosuppressive cells and molecules in the TM, to prevent the removal of cancer cells [2]. This highlights the relevance of stimulating the host immune response against cancer antigens by administering immunoadjuvants along with chemotherapy, radiotherapy, or surgery [54]. In this regard, small peptides with a nonspecific immunostimulatory response like GK-1, long known to act as vaccine adjuvants, are potentially useful in cancer therapy. The antitumor effect of GK-1 has been studied in melanoma and breast cancer murine models.

3.1. GK-1 in a mouse melanoma model

Melanoma is the most malignant form of skin cancer, mainly affecting the Caucasian population [55, 56]. Until recently, systemic therapy for metastatic melanoma had been inefficient, with a 5-year survival rate for patients (<30%) [57, 58]. However, new therapies were recently approved to treat melanoma, such as pegylated-interferon- α 2b (IFN- α 2b) in the adjuvant setting; ipilimumab, an anti-CTLA4 monoclonal antibody, for metastatic disease; vemurafenib, an oral BRAF inhibitor indicated for patients with metastatic melanoma harboring BRAFV600 mutations, and more recently antibodies against PD-1 like pembrolizumab [59–61] and antibodies blocking PD-L1 pathways, as well as inhibitors of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Additionally, nonspecific immunomodulation by several cytokines (IL-2, IL-12, TNF- α , and IFN- γ) and TLR ligands [62–64] in addition to adoptive transfer approaches have been widely used [65]. For over a decade, DCs have also been used in immunotherapy against various types of cancer [66–68] as an alternative to chemotherapy, by vaccination with DCs loaded with tumor peptides (i.e., MAGE-AX [69–72] and/or with necrotic or apoptotic tumor cells to induce effector tumor-specific T cells [73, 74]). The efficacy of this immunotherapeutic approach was also evaluated against murine melanoma, using GK-1 as an immunostimulant.

GK-1 has been reported to increase the mean survival and significantly delays tumor growth in a melanoma model with B16-F10 cells, showing more necrotic areas along with the presence of numerous neutrophils (**Figure 1**). Neutrophilia inside pulmonary blood vessels was also observed, without evidence of macroscopic or microscopic metastasis. In a melanoma lung metastatic model, GK-1 decreased lymphocyte count, while increased the number of neutrophils and decreased the serum levels of IFN- γ ; on the other hand, an increase in the levels of IFN- γ and IL-12 in the intratumor (lung metastases) environment, along with a decrease in IL-17, IL-4, IL-22, and IL-23 was also observed [75, 76]. The antitumor activities of IL-12 have been established in preclinical studies against various tumor cell lines; the increased concentration of the antitumor cytokine IL-12 found in primary tumors may enhance the damage to tumor cells, limiting the number of cancer cells detaching from the primary tumor [77–79]. Its antitumor activity is also mediated by the induction of IFN- γ [67, 78, 80], which upregulated the expression of MHC-I and -II by B16 cells *in vitro*, favoring a cytolytic response in MHC-I-restricted CTL (**Figure 1**) [81]. There is a consensus that the induction of a Th1 profile or the release of cytokines like IFN- γ and TNF- α by T cells is essential for an effective antitumor immune response in

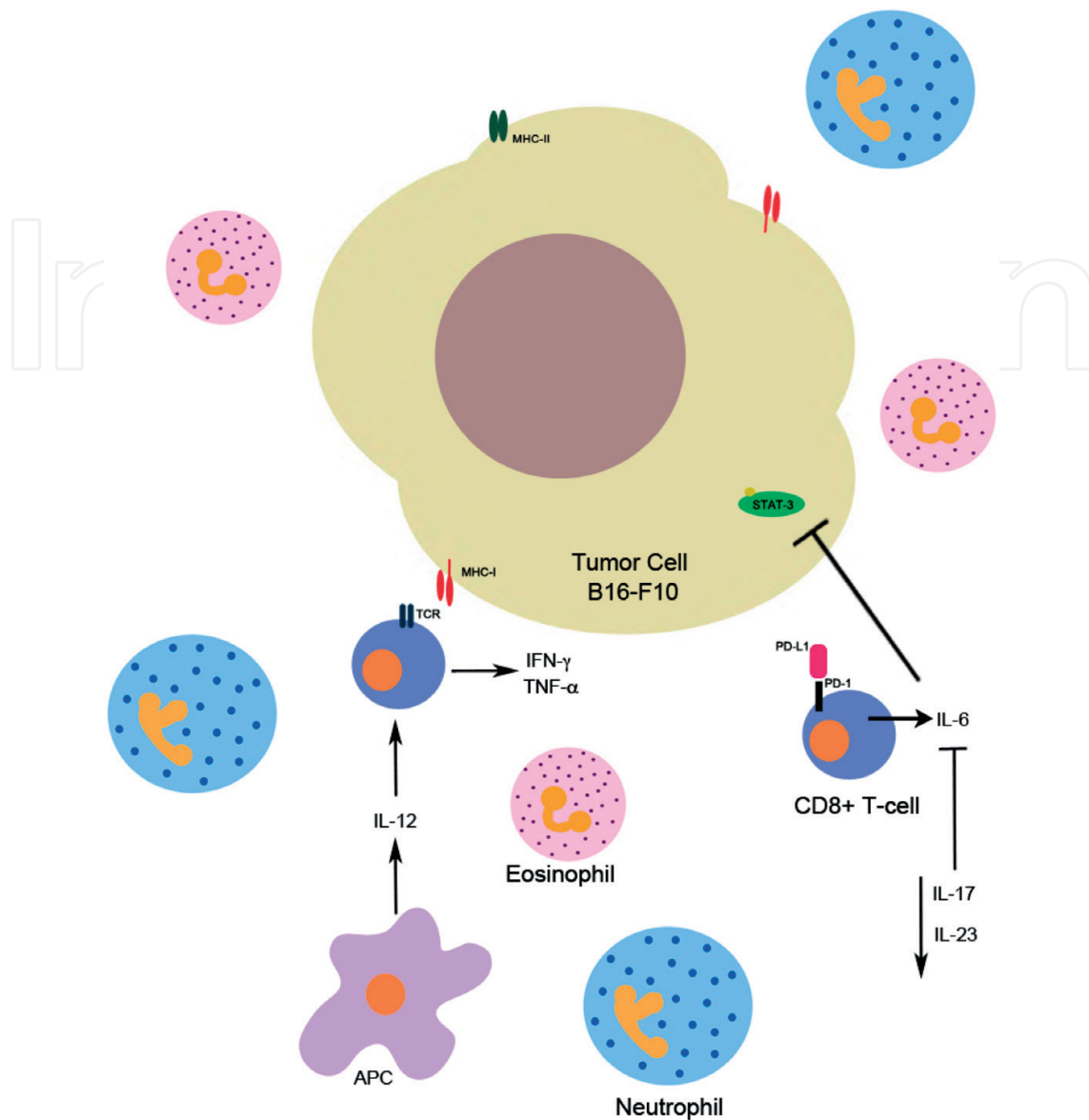


Figure 1. GK-1 in a preclinical mouse melanoma model. In a melanoma murine model with B16-F10 cells, GK-1 led to an increase in neutrophils with the increase of IFN- γ and IL-12 cytokines, along with a decrease in IL-17 and IL-23. On the other hand, the MAGE-AX/GK-1 treatment showed an increase in areas of cell death, characterized by eosinophilic regions and production of IFN- γ by CD8+ T-cells.

melanoma [82–84]. In fact, IFN- γ released from CTLs has been considered as a potent mediator of the antitumor response in bulky melanoma tumors [17, 85]. In contrast, IL-17 was proved to directly promote tumor growth and angiogenesis [86–88]. Indeed, it has been shown that IL-17 can promote tumor growth by a direct effect on IL-6 induction, which in turn activates STAT3 in both tumor and nontransformed cells in the TM [89]. Finally, IL-23 is an important molecular driver of Th17 cells in humans; IL-23 is increased in several tumors, and the expression of this cytokine antagonistically regulates local inflammatory responses in the TM, as well as the infiltration of epithelial lymphocytes [80]. Thus, the intratumoral subexpression of IL-17 and IL-23 in GK-1-treated mice could explain the reduced tumor progression (**Figure 1**).

Considering the capacity of GK-1 to enhance DC activation [50], BMDCs matured with TNF- α and stimulated with GK-1 and MAGE-AX were administered to tumor-bearing mice in the melanoma model with B16-F10 cells; the treatment with MAGE-AX/GK-1 increased survival rates, while mice receiving GK-1 alone had a smaller increase in survival. Moreover, the combination MAGE-AX/GK-1 significantly delayed tumor growth and increased cell death areas, characterized by eosinophilic regions within melanomas. Similarly, both GK-1 alone and MAGE-AX/GK-1 increased the production of IFN- γ -producing CD8 cells, while GK-1 increased the percentage of IL-10 producing CD8+ T-cells [90]. The effect of MAGE-AX/GK-1 could be associated with higher levels of CD8+ lymphocytes in peritumoral lymph nodes, which have been correlated with the survival of patients suffering from melanoma and other cancer types [67, 91, 92].

Vera-Aguilera et al. [79] hypothesized that a combined GK1/anti-PD-L1 therapy could synergize and maximize the individual antitumor effect and extend survival. An increased survival was observed in mice treated with GK1/anti-PD-L1, as well as in mice treated with GK-1 or PD-L1 alone. Animals treated with GK1/anti-PD-L1 had smaller tumor masses. Additionally, GK1/anti-PD-L1 decreased the serum levels of IL-4, IL-5, IL-6, and IL-10. The mechanism by which the combined GK1/anti-PD-L1 treatment improved survival rates remains to be determined; however, the expression of PD-1 on T cells has been proved to be upregulated by IL-6 through the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [93], a point of convergence for several oncogenic signaling pathways leading to the expression of immunosuppressing molecules [94]. Similarly, the expression of PD-L1 and PD-L2 is also upregulated by numerous mechanisms, including the production of IL-4 and GM-CSF [93]. All these findings point to a possible synergistic mechanism associated with the reversion from an exhausted phenotype.

3.2. GK-1 in a breast cancer model

Considering the evidence described above, it is now clear that changes in the microenvironment could induce an antitumor response against the primary tumor and reduce the metastatic disease, which could allow us to control cancer progression. In this regard, immunomodulators like GK-1 can be used as anticancer therapies. In 2017, GK-1 was evaluated in a murine model of invasive breast adenocarcinoma, which spontaneously metastasizes to the lungs, liver, brain, and bone, similarly to breast cancer in humans [95–98]. GK-1 was associated with an increased survival in 4T1 tumor-bearing mice and a reduction in the primary tumor volume rate, which was accompanied by an increase of tumor cell death areas with morphologic features associated with necrosis (pyknosis, karyorrhexis, and karyolysis) and apoptosis (apoptotic bodies) at the primary tumors. These findings, along with an increase in IL-12 concentration in the primary tumor, denote deep changes in the TM induced by GK-1 [98], which could involve the infiltration of TCD8+, NK, and NKT cells in the primary tumor [77, 99, 100] (**Figure 2**). As described in the previous section, IL-12 has been associated with antitumor and antiangiogenic activities [100, 101], due to its capacity of inducing the infiltration of TCD8+ cells within tumor tissues [100]. In fact, it has been reported that a combined treatment with tamoxifen and IL-12 enhanced tumor inhibition due to an increase in apoptosis, and reduced tumor growth in a 4T1 cancer murine model [100].

Those changes suppose a TM that could reduce the tumor growth rate, and the concomitant reduction of cancer cell egress by detachment from the primary tumor, which allows them to invade the stroma and break the basement membrane. These changes could explain the reduction of pulmonary metastasis associated with the GK-1 treatment [98]. Additionally, changes in lung microenvironment associated with the GK-1 treatment have been reported. In this sense, a reduction in the concentration of b-FGF, CCL-3, GM-CSF, CCL-2, TNF- α , and CXCL-9, along with an increased concentration of IL-6 has been found [98] (**Figure 2**). These changes could reduce metastasis development, possibly by inhibiting the proliferation of cells that are essential for the growth of secondary tumors, such as macrophage-associated metastasis (MAM) and MDSC [102, 103]. Considering these results, GK-1 could change the tumor microenvironment, inducing an active antitumoral immune response that could lead to a decrease in cancer burden.

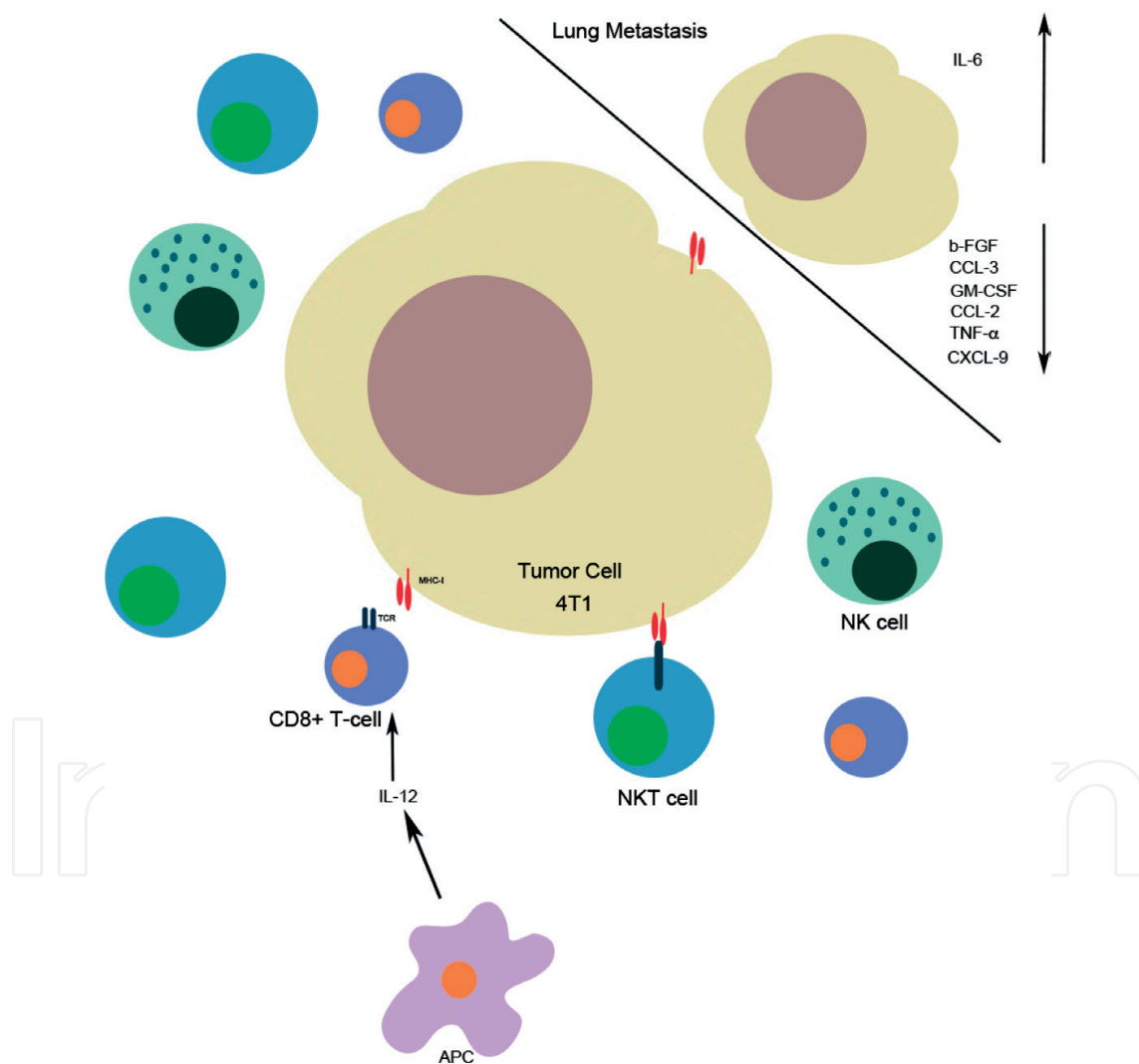


Figure 2. GK-1 in a breast cancer model. GK-1 was associated with an increased IL-12 concentration in the primary tumor, which could involve the infiltration of CD8+ T-cells, NK, and NKT cells. IL-12 is a cytokine produced principally by APC, such as monocytes, macrophages, and dendritic cells. This cytokine can induce specific CD8+ T-cells that are primed against tumor antigens and could serve as a tumor-specific CTL. Additionally, in the lungs, the GK-1-treatment induces a reduction in the concentration of b-FGF, CCL-3, GM-CSF, CCL-2, TNF- α , and CXCL-9, along with an increased concentration of IL-6, which correlates with a minor lung-metastatic burden.

4. Discussion

The ability of the GK-1 peptide to increase survival, significantly to delay tumor growth, and to reduce metastasis is discussed in this review. Considering that the immune system plays a crucial role in the outcome of cancer, orchestrating the response that may lead either to the control or dissemination of tumors [8, 78, 104], understanding the mechanisms that underlie the efficient response to the peptide is imperative.

It has been reported that the production of pro-inflammatory cytokines both by tumor and surrounding cells, along with the production of growth factors and chemokines, can promote the development of neoplasia by facilitating carcinogenesis programs, inducing a sustained cellular proliferative rate, inhibiting apoptosis and stimulating angiogenesis [105, 106]. As described above, GK-1 therapy contributed to decrease the levels of IL-4, IL-10, b-FGF, and GM-CSF; these chemoattractants, along with hypoxia, promote macrophage shift from a M1 to a M2 phenotype. M2-like tumor-associated macrophages (TAM) stimulate immunosuppression and increase blood vessel density, favoring angiogenesis. In a breast cancer model, lower CCL2 and CCL3 levels in the lungs of mice treated with GK-1 could be decreasing the migration of inflammatory monocytes such as MAM and MDSC, which promote metastasis [8, 13, 102, 107]. These changes in the microenvironment seem to contribute to control tumor burden and metastasis.

On the other hand, M1-like macrophages can contribute to tumor regression by recruiting cytotoxic CD8⁺ T (CTL) and NK cells [108–110]. In this regard, IL-12 induction by APCs could be contributing to the increase in the proliferation of CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes and the induction of a Th1 response, as previously reported [51, 52, 111]. Several studies have suggested a correlation of higher density levels of cytotoxic (CTL) and memory T lymphocytes (CD3⁺ CD45RO⁺) infiltrated in the primary tumor with increased survival rates of patients with different types of neoplasms [91, 112–116].

According to recent findings, the GK-1 peptide can induce a M1 phenotype and promote the efficient activation of DCs, which could be leading to the maintenance of an effector response against tumor growth, capable of counteracting the immunosuppressive response due to T cell exhaustion or DC dysfunction.

5. Conclusions

Considering the possible mechanisms of action of GK-1 and the information available, we propose that this peptide can decrease tumor growth and metastasis by changing the tumor microenvironment. GK-1 appears to reactivate the immune system affected by the tumor-associated suppressive microenvironment, thereby allowing immune cells to become activated. Although more studies focusing on the anticancer effect of GK-1 are required, this research gives new evidence on the possible clinical uses of GK-1 beyond its well-established adjuvant effect.

These results have also provided us with the rationale to evaluate the effectiveness of the GK-1 immunotherapy to revert the exhaustion of peripheral T-cells in several types of cancer.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT (253891), Fundación Miguel Alemán, and the Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

The authors acknowledge the financial assistance of CONACyT to the doctoral students Jacquelynne Cervantes-Torres, Laura Montero-León, and Diana Torres-García from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), who received the fellowships 25243, 29951, and 245638, respectively. This manuscript is part of the doctoral thesis of the students from the Instituto de Investigaciones Biomédicas at the Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflict of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

Abbreviations

APC	antigen-presenting cell
CCL-22	chemokine ligand-22
CTL	cytotoxic T lymphocytes
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC	dendritic cell
HDP	host defense peptides
LAG-3	lymphocyte-activation gene 3
MDSC	myeloid-derived suppressor cells
NK	natural killer cells
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PD-1	programmed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
Treg	regulatory T cell
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TM	tumor microenvironment
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2

Author details

Jacquelynn Cervantes-Torres[†], Laura Montero[†], Noé Rodríguez-Rodríguez, Edda Sciutto, Gladis Frago and Diana Torres-García*

*Address all correspondence to: dianatg@comunidad.unam.mx

Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Ciudad de México, Mexico

[†] First joined authors

References

- [1] Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;**21**(2):137-148. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
- [2] Swann JB, Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;**117**(5):1137-1146. DOI: 10.1172/JCI31405
- [3] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007;**121**(1):1-14. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x
- [4] Vesely MD, Schreiber RD. Cancer immunoediting: Antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2013; **1284**:1-5. DOI: 10.1111/nyas.12105
- [5] Khodadoust MS, Alizadeh AA. Tumor antigen discovery through translation of the cancer genome. *Immunologic Research*. 2014;**58**(2-3):292-299. DOI: 10.1007/s12026-014-8505-4
- [6] Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*. 2006;**6**(4):295-307. DOI: 10.1038/nri1806
- [7] Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Current Opinion in Immunology*. 2010;**22**:223-230. DOI: 10.1016/j.coi.2010.02.005
- [8] Bennaceur K, Chapman J, Brikci-Nigassa L, Sanhadji K, Touraine JL, Portoukalian J. Dendritic cells dysfunction in tumour environment. *Cancer Letters*. 2008;**272**(2):186-196. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.05.017
- [9] Li Q, Li Q, Chen J, Liu Y, Zhao X, Tan B, Ai J, Zhang Z, Song J, Shan B. Prevalence of Th17 and Treg cells in gastric cancer patients and its correlation with clinical parameters. *Oncology Reports*. 2013;**30**(3):1215-1222. DOI: 10.3892/or.2013.2570
- [10] Jie HB, Schuler PJ, Lee SC, Srivastava RM, Argiris A, Ferrone S, Whiteside TL, Ferris RL. CTLA-4⁺ regulatory T cells increased in cetuximab-treated head and neck cancer patients suppress NK cell cytotoxicity and correlate with poor prognosis. *Cancer Research*. 2015;**75**(11):2200-2210. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2788

- [11] Santoiemma PP, Powell DJ Jr. Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biology & Therapy*. 2015;**16**(6):807-820. DOI: 10.1080/15384047.2015.1040960
- [12] Chen J, Chen Z. The effect of immune microenvironment on the progression and prognosis of colorectal cancer. *Medical Oncology*. 2014;**31**(8):82. DOI: 10.1007/s12032-014-0082-9
- [13] Veglia F, Perego M, Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*. 2018;**19**(2):108-119. DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x
- [14] Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, Camus M, Gillard M, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;**138**(4):1429-1440. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.057
- [15] Angell H, Galon J. From the immune contexture to the Immunoscore: The role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Current Opinion in Immunology*. 2013;**25**(2):261-267. DOI: 10.1016/j.coi.2013.03.004
- [16] Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: Prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity*. 2013;**39**(1):11-26. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.008
- [17] Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;**298**(5594):850-854. DOI: 10.1126/science.1076514
- [18] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: Moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*. 2004;**10**(9):909-915. DOI: 10.1038/nm1100
- [19] Ishizuka M, Kawatsu M, Yamashita T, Ueno M, Takeuchi T. Low molecular weight immunomodulators produced by microorganisms. *International Journal of Immunopharmacology*. 1995;**17**(2):133-139. DOI: 10.1016/0192-0561(94)00086-4
- [20] Fauci AS, Rosenberg SA, Sherwin SA, Dinarello CA, Longo DL, Lane HC. Immunomodulators in clinical medicine. NIH conference. *Annals of Internal Medicine*. 1987;**106**(3):421-433. DOI: 10.7326/0003-4819-106-3-421
- [21] Bellanti J. Immunology IV: Clinical applications in health and disease. *World Allergy Organization Journal*. 2012;**5**(8):94. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182641db0
- [22] Pichichero ME. Improving vaccine delivery using novel adjuvant systems. *Human Vaccines*. 2008;**4**(4):262-270
- [23] Janin YL. Peptides with anticancer use or potential. *Amino Acids*. 2003;**25**(1):1-40. DOI: 10.1007/s00726-002-0349-x
- [24] Mader JS, Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2006;**15**(8):933-946. DOI: 10.1517/13543784.15.8.933

- [25] Rüegg C, Hasmim M, Lejeune FJ, Alghisi GC. Antiangiogenic peptides and proteins: From experimental tools to clinical drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;**1765**(2):155-177. DOI: 10.1016/j.bbcan.2005.09.003
- [26] Kaplan N, Morpurgo N, Linial M. Novel families of toxin-like peptides in insects and mammals: A computational approach. *Journal of Molecular Biology*. 2007;**369**(2):553-566. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.106
- [27] Bhutia SK, Maiti TK. Targeting tumors with peptides from natural sources. *Trends in Biotechnology*. 2008;**26**(4):210-217. DOI: 10.1016/j.tibtech.2008.01.002
- [28] Risso A, Braidot E, Sordano MC, Vianello A, Macrì F, Skerlavaj B, Zanetti M, Gennaro R, Bernardi P. BMAP-28, an antibiotic peptide of innate immunity, induces cell death through opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;**22**(6):1926-1935. DOI: 10.1128/MCB.22.6.1926-1935.2002
- [29] Okumura K, Itoh A, Isogai E, Hirose K, Hosokawa Y, Abiko Y, Shibata T, Hirata M, Isogai H. C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Letters*. 2004;**212**(2):185-194. DOI: 10.1016/j.canlet.2004.04.006
- [30] Lehmann J, Retz M, Sidhu SS, Suttman H, Sell M, Paulsen F, Harder J, Unteregger G, Stöckle M. Antitumor activity of the antimicrobial peptide magainin II against bladder cancer cell lines. *European Urology*. 2006;**50**(1):141-147. DOI: 10.1016/j.eururo.2005.12.043
- [31] Mader JS, Richardson A, Salsman J, Top D, de Antueno R, Duncan R, Hoskin DW. Bovine lactoferricin causes apoptosis in Jurkat T-leukemia cells by sequential permeabilization of the cell membrane and targeting of mitochondria. *Experimental Cell Research*. 2007;**313**(12):2634-2650. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.05.015
- [32] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double stranded RNA and activation of NF-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature*. 2001;**413**(6857):732-738. DOI: 10.1038/35099560
- [33] Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*. 2002;**20**:709-760. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842
- [34] Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: Bringing specificity to the innate-immune system. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004;**75**(5):749-755. DOI: 10.1189/jlb.1103543
- [35] Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 1997;**186**(10):1623-1631. DOI: 10.1084/jem.186.10.1623
- [36] Weiner GJ, Liu HM, Wooldridge JE, Dahle CE, Krieg AM. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;**94**(20):10833-10837. DOI: 10.1073/pnas.94.20.10833

- [37] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*. 2001;**31**(10):3026-3037. DOI: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<#60;3026::AID-IMMU3026>3.0.CO;2-H
- [38] Krieg AM. Therapeutic potential of toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews. Drug Discovery*. 2006;**5**(6):471-484. DOI: 10.1038/nrd2059
- [39] Schmidt C. Clinical setbacks for toll-like receptor 9 agonists in cancer. *Nature Biotechnology*. 2007;**25**(8):825-826. DOI: 10.1038/nbt0807-825
- [40] Mocellin S, Pilati P, Nitti D. Peptide-based anticancer vaccines: Recent advances and future perspectives. *Current Medicinal Chemistry*. 2009;**16**(36):4779-4796. DOI: 10.2174/092986709789909648
- [41] Borrello I, Pardoll D. GM-CSF-based cellular vaccines: A review of the clinical experience. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;**13**(2):185-193. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00034-X
- [42] Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;**13**(2):155-168. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00032-6
- [43] Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: Vaccines for solid tumours. *The Lancet Oncology*. 2004;**5**(11):681-689. DOI: 10.1016/S1470-2045(04)01610-9
- [44] Choudhury A, Mosolits S, Kokhaei P, Hansson L, Palma M, Mellstedt H. Clinical results of vaccine therapy for cancer: Learning from history for improving the future. *Advances in Cancer Research*. 2006;**95**:147-202. DOI: 10.1016/S0065-230X(06)95005-2
- [45] Ribas A, Amarnani SN, Buga GM, Butterfield LH, Dissette VB, McBride WH, Glaspy JA, Ignarro LJ, Economou JS. Immunosuppressive effects of interleukin-12 coexpression in melanoma antigen gene-modified dendritic cell vaccines. *Cancer Gene Therapy*. 2002;**9**(11):875-883. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700512
- [46] Serafini P, Carbley R, Noonan KA, Tan G, Bronte V, Borrello I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Research*. 2004;**64**(17):6337-6343. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0757
- [47] Parmiani G, Castelli C, Pilla L, Santinami M, Colombo MP, Rivoltini L. Opposite immune functions of GM-CSF administered as vaccine adjuvant in cancer patients. *Annals of Oncology*. 2007;**18**(2):226-232. DOI: 10.1093/annonc/mdl158
- [48] Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunology Letters*. 1996;**49**(3):185-189. DOI: 10.1016/0165-2478(96)02503-5

- [49] Bobes RJ, Navarrete-Perea J, Ochoa-Leyva A, Anaya VH, Hernández M, Cervantes-Torres J, Estrada K, Sánchez-Lopez F, Soberón X, Rosas G, Nunes CM, García-Varela M, Sotelo-Mundo RR, López-Zavala AA, Gevorkian G, Acero G, Lacleste JP, Fragoso G, Sciutto E. Experimental and theoretical approaches to investigate the immunogenicity of *Taenia solium*-derived KE7 antigen. *Infection and Immunity*. 2017;**85**(12):e00395-e00317. DOI: 10.1128/IAI.00395-17
- [50] Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2009;**16**(9):1338-1343. DOI: 10.1128/CVI.00106-09
- [51] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity*. 1999;**67**(5):2522-2530
- [52] Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, Segura R, Goldbaum FA, Sciutto E, Rosas G. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2011;**18**(7):1067-1076. DOI: 10.1128/CVI.05030-11
- [53] Segura-Velázquez R, Pérez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, Corral R, Rosetti F, Fragoso G, Grinstein S, Sciutto E. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine*. 2006;**24**(8):1073-1080. DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.09.014
- [54] Ocaña MC, Martínez-Poveda B, Quesada AR, Medina MÁ. Metabolism within the tumor microenvironment and its implication on cancer progression: An ongoing therapeutic target. *Medicinal Research Reviews*. 2018. DOI: 10.1002/med.21511
- [55] Brown CK, Kirkwood JM. Medical management of melanoma. *The Surgical Clinics of North America*. 2003;**83**(2):283-322, viii. DOI: 10.1016/S0039-6109(02)00187-1
- [56] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;**68**(1):7-30. DOI: 10.3322/caac.21442
- [57] Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, Buzaid AC, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF. An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004;**54**(3):131-149. DOI: 10.3322/canjclin.54.3.131
- [58] Miao Y, Hylarides M, Fisher DR, Shelton T, Moore H, Wester DW, Fritzberg AR, Winkelmann CT, Hoffman T, Quinn TP. Melanoma therapy via peptide-targeted {alpha}-radiation. *Clinical Cancer Research*. 2005;**11**(15):5616-5621. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0619

- [59] Eggermont AM, Suciú S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, Punt CJ, Salès F, Gore M, Mackie R, Kusic Z, Dummer R, Hauschild A, Musat E, Spatz A, Keilholz U, EORTC melanoma group. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: Final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet*. 2008;**372**(9633):117-126. DOI: 10.1016/S0140-6736(08)61033-8
- [60] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*. 2010;**363**(8):711-723. DOI: 10.1056/NEJMoa1003466
- [61] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, GA MA, BRIM-3 study group. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*. 2011;**364**(26):2507-2516. DOI: 10.1056/NEJMoa1103782
- [62] Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2004;**4**(1):11-22. DOI: 10.1038/nrc1252
- [63] Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*. 2009;**1**(6): 949-964. DOI: 10.2217/imt.09.70
- [64] Gnjatic S, Sawhney NB, Bhardwaj N. Toll-like receptor agonists: Are they good adjuvants? *Cancer Journal*. 2010;**16**(4):382-391. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3181eaca65
- [65] Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: A clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*. 2008;**8**(4):299-308. DOI: 10.1038/nrc2355
- [66] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;**392**(6673):245-252. DOI: 10.1038/32588
- [67] Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8⁺ T-cell immunity. *Journal of Immunotherapy*. 2006;**29**(5):545-557. DOI: 10.1097/01.cji.0000211309.90621.8b
- [68] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews. Cancer*. 2012;**12**(4):265-277. DOI: 10.1038/nrc3258
- [69] Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Köhler G, Noppen C, Herr W, Spagnoli GC, Cerundolo V, Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *International Journal of Cancer*. 2000;**86**(3):385-392. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000501)86:3<385::AID-IJC13>3.0.CO;2-T

- [70] Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 2002;**195**(10):1279-1288. DOI: 10.1084/jem.20012100
- [71] Slingluff CL Jr, Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH. Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;**21**(21):4016-4026. DOI: 10.1200/JCO.2003.10.005
- [72] Trepikas R, Berntsen A, Hadrup SR, Bjørn J, Geertsen PF, Straten PT, Andersen MH, Pedersen AE, Soleimani A, Lorentzen T, Johansen JS, Svane IM. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: Results from a phase I/II trial. *Cytotherapy*. 2010;**12**(6):721-734. DOI: 10.3109/14653241003774045
- [73] Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;**95**(16):9482-9487. DOI: 10.1073/pnas.95.16.9482
- [74] Cornforth AN, Fowler AW, Carbonell DJ, Fan E, Dillman RO. Characterization of interferon- γ -treated melanoma tumor cells for use in dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2011;**26**(3):345-351. DOI: 10.1089/cbr.2011.0959
- [75] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Hernaiz-Leonardo JC, Moreno-Aguilera E, Monteverde-Suarez D, Vera-Aguilera C, Estrada-Bárceñas D. The synthetic parasite-derived peptide GK1 increases survival in a preclinical mouse melanoma model. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2013;**28**(9):682-690. DOI: 10.1089/cbr.2012.1438
- [76] Pérez-Torres A, Vera-Aguilera J, Sahaza JH, Vera-Aguilera C, Moreno-Aguilera E, Pulido-Camarillo E, Nuñez-Ochoa L, Jeganathan P. Hematological effects, serum, and pulmonary cytokine profiles in a melanoma mouse model treated with GK1. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2015;**30**(6):247-254. DOI: 10.1089/cbr.2015.1835
- [77] Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: Mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *Journal of Immunology*. 2000;**165**(5):2665-2670
- [78] Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoeediting. *Nature Reviews. Immunology*. 2006;**6**(11):836-848. DOI: 10.1038/nri1961 Review
- [79] Vera-Aguilera J, Perez-Torres A, Beltran D, Villanueva-Ramos C, Wachtel M, Moreno-Aguilera E, Vera-Aguilera C, Ventolini G, Martínez-Zaguilán R, Sennoune SR. Novel

treatment of melanoma: Combined parasite-derived peptide GK-1 and anti-programmed death ligand 1 therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*. 2017;**32**(2):49-56. DOI: 10.1089/cbr.2016.2123

- [80] Teng MW, Andrews DM, McLaughlin N, von Scheidt B, Ngiow SF, Möller A, Hill GR, Iwakura Y, Oft M, Smyth MJ. IL-23 suppresses innate immune response independently of IL-17A during carcinogenesis and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;**107**(18):8328-8333. DOI: 10.1073/pnas.1003251107
- [81] Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *Journal of Immunology*. 1998;**161**(2):897-908
- [82] Ossendorp F, Toes RE, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunology Letters*. 2000;**74**(1):75-79. DOI: 10.1016/S0165-2478(00)00252-2
- [83] Brassard DL, Grace MJ, Borden RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002;**71**(4):565-581. DOI: 10.1189/jlb.71.4.565
- [84] Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005;**54**(8):721-728. DOI: 10.1007/s00262-004-0653-2
- [85] Palmer DC, Chan CC, Gattinoni L, Wrzesinski C, Paulos CM, Hinrichs CS, Powell DJ Jr, Klebanoff CA, Finkelstein SE, Fariss RN, Yu Z, Nussenblatt RB, Rosenberg SA, Restifo NP. Effective tumor treatment targeting a melanoma/melanocyte-associated antigen triggers severe ocular autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;**105**(23):8061-8066. DOI: 10.1073/pnas.0710929105
- [86] Nam JS, Terabe M, Kang MJ, Chae H, Voong N, Yang YA, Laurence A, Michalowska A, Mamura M, Lonning S, Berzofsky JA, Wakefield LM. Transforming growth factor beta subverts the immune system into directly promoting tumor growth through interleukin-17. *Cancer Research*. 2008;**68**(10):3915-3923. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0206
- [87] Zou W, Restifo NP. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*. 2010;**10**(4):248-256. DOI: 10.1038/nri2742
- [88] Xiao M, Wang C, Zhang J, Li Z, Zhao X, Qin Z. IFN-gamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. *Cancer Research*. 2009;**69**(5):2010-2017. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3479
- [89] Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine*. 2009;**206**(7):1457-1464. DOI: 10.1084/jem.20090207
- [90] Piñón-Zárate G, Herrera-Enríquez MÁ, Hernández-Téllez B, Jarquín-Yáñez K, Castell-Rodríguez AE. GK-1 improves the immune response induced by bone marrow dendritic cells loaded with MAGE-AX in mice with melanoma. *Journal of Immunology Research*. 2014;**2014**:158980. DOI: 10.1155/2014/158980

- [91] Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996;**77**(7):1303-1310. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR12>3.0.CO;2-5
- [92] Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British Journal of Cancer*. 2017;**117**(4):451-460. DOI: 10.1038/bjc.2017.220
- [93] Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;**36**(9):587-595. DOI: 10.1016/j.tips.2015.06.005 Review
- [94] Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Donskov F, Høyer M, Sjoegren P, Christensen IJ, Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer*. 2012;**118**(9):2476-2485. DOI: 10.1002/cncr.26511
- [95] Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Research*. 1992;**52**(6):1399-1405
- [96] Pulaski BA, Terman DS, Khan S, Muller E, Ostrand-Rosenberg S. Cooperativity of *Staphylococcal aureus* enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast cancer model. *Cancer Research*. 2000;**60**(10):2710-2715
- [97] Mi Z, Guo H, Wai PY, Gao C, Wei J, Kuo PC. Differential osteopontin expression in phenotypically distinct subclones of murine breast cancer cells mediates metastatic behavior. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;**279**(45):46659-46667. DOI: 10.1074/jbc.M407952200
- [98] Torres-García D, Pérez-Torres A, Manoutcharian K, Orbe U, Servín-Blanco R, Fragoso G, Sciutto E. GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model. *Vaccine*. 2017;**35**(42):5653-5661. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.08.060
- [99] Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993;**178**(4):1223-1230
- [100] Yang SX, Wei WS, Ouyan QW, Jiang QH, Zou YF, Qu W, Tu JH, Zhou ZB, Ding HL, Xie CW, Lei QM, Zhong CR. Interleukin-12 activated CD8+ T cells induces apoptosis in breast cancer cells and reduces tumor growth. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2016;**84**:1466-1471. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.10.046
- [101] Shi X, Cao S, Mitsushashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *Journal of Immunology*. 2004;**172**(7):4111-4122

- [102] Kitamura T, Qian BZ, Soong D, Cassetta L, Noy R, Sugano G, Kato Y, Li J, Pollard JW. CCL2-induced chemokine cascade promotes breast cancer metastasis by enhancing retention of metastasis-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;**212**(7):1043-1059. DOI: 10.1084/jem.20141836
- [103] Gargett T, Christo SN, Hercus TR, Abbas N, Singhal N, Lopez AF, Brown MP. GM-CSF signalling blockade and chemotherapeutic agents act in concert to inhibit the function of myeloid-derived suppressor cells in vitro. *Clinical & Translational Immunology*. 2016;**5**(12):e119. DOI: 10.1038/cti.2016.80
- [104] Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy: A focus on T-regulatory cells. *Immunology and Cell Biology*. 2018;**96**(1):21-33. DOI: 10.1111/imcb.1003
- [105] Lorusso G, Rüegg C. The tumor microenvironment and its contribution to tumor evolution toward metastasis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2008;**130**(6):1091-1103. DOI: 10.1007/s00418-008-0530-8
- [106] Wolczyk D, Zaremba-Czogalla M, Hryniewicz-Jankowska A, Tabola R, Grabowski K, Sikorski AF, Augoff K. TNF- α promotes breast cancer cell migration and enhances the concentration of membrane-associated proteases in lipid rafts. *Cellular Oncology (Dordrecht)*. 2016;**39**(4):353-363. DOI: 10.1007/s13402-016-0280-x
- [107] Qian BZ, Li J, Zhang H, Kitamura T, Zhang J, Campion LR, Kaiser EA, Snyder LA, Pollard JW. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*. 2011;**475**(7355):222-225. DOI: 10.1038/nature10138
- [108] Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 2010;**10**(2):116-129. DOI: 10.1038/nrc2780
- [109] Mantovani A, Allavena P. The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*. 2015;**212**(4):435-445. DOI: 10.1084/jem.20150295
- [110] Jarosz-Biej M, Kamińska N, Matuszczak S, Cichoń T, Pamuła-Piłat J, Czapla J, Smolarczyk R, Skwarzyńska D, Kulik K, Szala S. M1-like macrophages change tumor blood vessels and microenvironment in murine melanoma. *PLoS One*. 2018;**13**(1):e0191012. DOI: 10.1371/journal.pone.0191012
- [111] Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Scitutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2003;**93**(3-4):81-90. DOI: 10.1016/S0165-2427(03)00071-0
- [112] Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*. 2003;**348**(3):203-213. DOI: 10.1056/NEJMoa020177

- [113] Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, Kato K, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Itoh T, Morikawa T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;**28**(1):e26-e23. DOI: 10.1097/00006676-200401000-00023
- [114] Oldford SA, Robb JD, Codner D, Gadag V, Watson PH, Drover S. Tumor cell expression of HLA-DM associates with a Th1 profile and predicts improved survival in breast carcinoma patients. *International Immunology*. 2006;**18**(11):1591-1602. DOI: 10.1093/intimm/dxl092
- [115] Dieu-Nosjean MC, Antoine M, Danel C, Heudes D, Wislez M, Poulot V, Rabbe N, Laurans L, Tartour E, de Chaisemartin L, Lebecque S, Fridman WH, Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;**26**(27):4410-4417. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.0284
- [116] Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;**29**(15):1949-1955. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.5037



Impact of the GK-1 adjuvant on peritoneal macrophages gene expression and phagocytosis

L. Sánchez-Hernández^a, L. Montero^a, R. Mojica-Espinosa^b, J.P. Reyes-Grajeda^b,
J. Cervantes-Torres^a, R.M. Parkhouse^c, G. Fragoso^a, E. Sciotto^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^b Instituto Nacional de Medicina Genómica, Periférico Sur No. 4809, Col. Arenal Tepepan, Delegación Tlalpan, CDMX, CP 14610, Mexico

^c Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156, Oeiras, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

GK-1
Adjuvant
Macrophages
Gene expression
Phagocytosis

ABSTRACT

Purpose: The synthetic peptide GK-1 potentiates protective immunity elicited by the influenza vaccine in mice. In order to understand its adjuvant properties, this study was designed to determine the impact of GK-1 on gene expression and phagocytosis of peritoneal macrophages (PMa).

Methods: Increased gene expression of chemokines involved in leukocyte recruitment and of pro-inflammatory mediators was detected by microarray analysis of control and GK-1 treated PMa macrophages. The expression profile was subsequently confirmed by Multiplex Immunoassays analysis to measure cytokines levels, flow cytometer to describe M1/M2 surface markers and an assay to evaluate their phagocytic activity.

Results: Treatment of PMa with GK-1 results in development to the classically activated M1 functional macrophage subpopulation with increased expression of the CCL3 and CXCL12 chemokines, IL-6 and TNF- α pro-inflammatory cytokines with a concomitant increase in the levels of NO, accompanied by the expression of modulatory factors that downregulate the inflammatory phenotype. GK-1 treated PMa significantly increased their phagocytic activity.

Conclusion: GK-1 classical activated with enhanced phagocytic capacity may underlie in the increased specific immunity induced when concomitant administered with other antigens.

1. Introduction

Despite the clear positive impact of vaccination on global protection against infectious diseases, there are an estimated 44 million cases of life threatening diseases occurring in 219 nations. The development of new tools to improve vaccine efficiency is one realistic alternative to deal with the magnitude of this task. Indeed, a better understanding of the relevance of innate immunity in controlling the acquired immune response offers rational approaches for immunomodulation in order to improve the limited efficiency and undesirable effects of the available adjuvants [1].

Adjuvants may act at different levels of the immune system. Depending on their biochemical nature, they can selectively inhibit or enhance the functional differentiation of the different cell populations comprising the immune system (i.e. lymphocytes, neutrophils, NK killer cells, dendritic cells and macrophages) [1,2]. Between them,

macrophages play a pivotal role in activating and directing both innate and acquired immunity through their variable cytokine responses to different modes of antigen presentation. These, together with cytokines and chemokines secreted by other cells early in the innate immune response, not only affect monocytes at sites of infection, but also create the cytokine “milieu” that guides the differentiation of monocytes to macrophages and similarly dictates the functional activities of existing macrophages. Their high functional heterogeneity and plasticity highlights macrophages and monocytes as a pivotal target for modulation by adjuvants.

Two major macrophage phenotypes derived from monocytes have been operationally defined, the classically activated M1 and the alternatively activated M2 macrophages. The M1 cells are induced by IFN γ and/or TNF α or bacterial lipopolysaccharide (LPS) and have the following properties: the killing of intracellular parasites and tumor cells, the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines, the

Abbreviations: CFSE, Carboxyfluorescein succinimidyl-ester; FDR, False discovery rate; LPS, Lipopolysaccharide; IP-10, Interferon Gamma-Induced Protein 10; MIG, Monokine induced by gamma interferon; MIP-1, Macrophage Inflammatory Proteins

* Corresponding author.

E-mail address: edda@unam.mx (E. Sciotto).

<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.10.010>

Received 3 May 2018; Received in revised form 10 August 2018; Accepted 18 October 2018

Available online 14 November 2018

0165-2478/ © 2018 European Federation of Immunological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

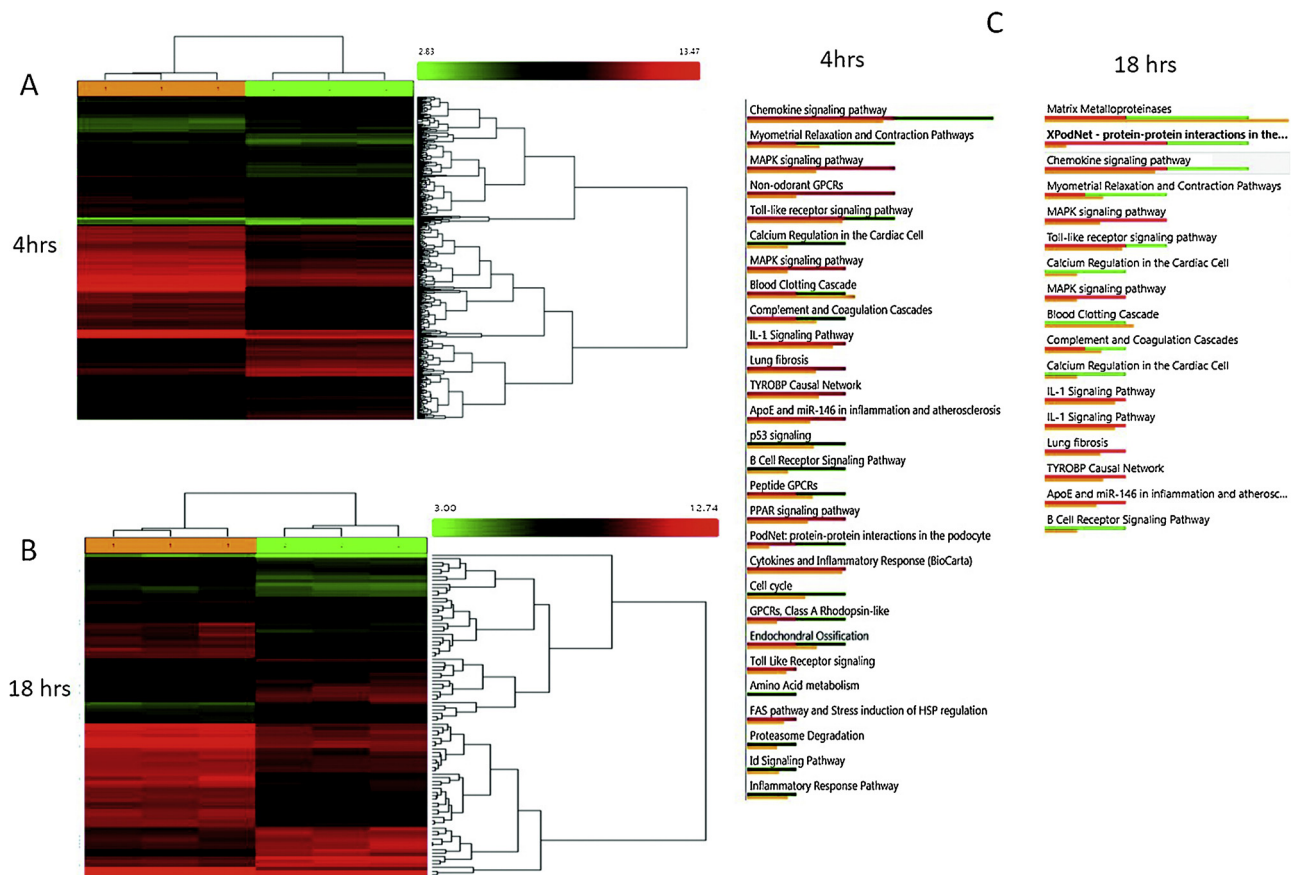


Fig. 1. Gene expression profiling of PMA treated with GK-1. Unsupervised hierarchical clustering of transcriptional profiles (fold-change > 2.0), displayed as a heat map of log-transformed expression values, from CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages of mice untreated or after 4 (A) and 18 h (B) treatment with GK-1. The top ten pathways differentially induced by GK-1 and derived from enrichment analysis are presented as the green bars, and the red bars represent the genes differentially down-regulated by GK-1. The yellow bars represent the statistically important changes induced by GK-1 compared with the control at 4 h (C) and 18 h (D). The analysis was done using Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software. Data are representative of three independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

production of nitric oxide (NO), an increased expression of MHC class II, CD80, CD86 molecules, and antigen presentation associated with Th1 cells [3,4]. In contrast, the M2 alternative activated macrophages are involved in the resolution of inflammation and tissue homeostasis and have been further subdivided into at least three different overlapping sub-phenotypes (M2a, b, c), a classification which will almost certainly be revised, given more information; for example, it has been observed that the phenotype of macrophages activated through IL-4 overlap partially with those induced by IL-13, IL-10, TGF β and glucocorticoids [5,6]. Similarly, human monocytes differentiated to macrophages in the presence of IL12 and IL18 are distinct from either M1 or M2 phenotypes [7].

Peritoneal macrophages, cells generated and matured within the body in a dynamic compartment as the peritoneum offer an accurate tool to study *ex vivo*, the effect of GK-1 [8]. In this study, therefore, we focus on the impact of GK-1 on murine peritoneal macrophages. This peptide, belongs to the *Taenia crassiceps* cysticercus recombinant protein KETc7 [9] and has being shown to enhance the protection induced by human influenza vaccine in both young and old mice [10,11]. In addition, GK-1 used as adjuvant provided some degree of protection against experimental murine melanoma and mammary cancers [12]. Perhaps relevant to its adjuvant properties GK-1 promoted the activation of dendritic cells, increasing the expression of CD80/86, MHC class II, and the secretion of IFN- γ , TNF- α , and CCL2 (MCP-1), resulting in an increase in CD4 + T cell proliferation [10,13]. Considering that the plasticity of macrophages can result in awake the adaptative immunity, we extend our studies evaluating GK-1 effect on *in vivo* matured

peritoneal macrophages towards the identification of other possible players that may underlie GK-1 adjuvant properties.

2. Materials and methods

2.1. Mice

BALB/cAnN female mice 6–8 weeks-old were used. Stocks were originally purchased from Charles River, USA, and produced in a pathogen-free facility at our Institute. Food and water were allowed *ad libitum*. All housing and experimental procedures were conducted under the guidelines established by the Committee on the Care and Use of Experimental Animals of the Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBM) at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Mouse experimentation protocols were approved by the animal safety committee of the IBM, UNAM, and manipulated following to the 'Principles of Laboratory Animal Care' (NIH publication #85-23, revised in 1985). Mice were anesthetized with sevoflurane by inhalation (ABBOTT USA.) before being sacrificed by cervical dislocation.

2.2. Isolation of peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages (PMA) were harvested from the peritoneum of BALB/cAnN mice by IP lavage with PBS. Cells were placed in a 15 mm plates at 2.5×10^6 per 2 ml of RPMI medium 1640 (Gibco BRL, USA) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco BRL, USA) and 1% antibiotics solution (100 units/ml of penicillin, 100 mg/

Table 1
List of top 50 genes up-regulated by GK-1, 4 h and 18 h, in mouse PMA.

Gene symbol	Description	Fold change (up regulated) (GK-1 4 h vs. control 4 h)	Fold change (up regulated) (GK-1 18 h vs. control 18 h)
Ptgs2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	39.11	
^a Il1b	interleukin 1 beta	25.46	2.91
Clec4e	C-type lectin domain family 4, member e		7.59
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1	19.78	
Ifi205	interferon activated gene 205	14.61	
^a Cxcl2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	14.44	2.94
Mir155	microRNA 155	12.39	
Cxcl3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	11.22	
Tnfsf9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	9.69	
Tnf	tumor necrosis factor	9.19	
Slamf1	signaling lymphocytic activation molecule family member 1	7.28	
Rab11fip1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	6.87	6.82
Marco	macrophage receptor with collagenous structure		
Fpr1	formyl peptide receptor 1		6.55
Nlrp3	NLR family, pyrin domain containing 3	6.48	
H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2		6.33
Il1a	interleukin 1 alpha	5.45	2.27
Jak2	Janus kinase 2	4.99	
Ptges	prostaglandin E synthase	4.81	2.97
Pla2g4a	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	4.79	
^a Il6	interleukin 6	4.45	
Nfkbiz	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, zeta	4.42	
Lcn2	lipocalin 2	4.36	6.77
Casp4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	4.3	
^a Ccl3	chemokine (C-C motif) ligand 3	4.11	
Cxcl5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	4.11	
Cd40	CD40 antigen	4.1	
Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13		4.03
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial		3.9
^a Nos2	nitric oxide synthase 2, inducible	3.84	
C3	complement component 3		3.82
Clec4a1	C-type lectin domain family 4, member a1		3.42
Irg1	immunoresponsive gene 1	3.79	7.1
Osgin2	oxidative stress induced growth inhibitor family member 2	3.73	
Nfib	nuclear factor I/B	3.67	
Nr4a3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	3.47	
Lox	lysyl oxidase	3.47	
Nfkbib	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, beta	3.4	
Il12b	interleukin 12b	3.19	
Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells inhibitor, alpha	3.15	
Ifrd1	interferon-related developmental regulator 1	3.02	
^a H2-M2	histocompatibility 2, M region locus 2	2.99	
Nfib	nuclear factor I/B	2.92	
Il18	interleukin 18	2.85	
Cd38	CD38 antigen	2.81	
Irf1	interferon regulatory factor 1	2.81	3.36
Icam1	intercellular adhesion molecule 1	2.78	
Cdc42ep2	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	2.72	
Tlr2	toll-like receptor 2		2.76
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1		2.7
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	2.69	
Irak3	interleukin-1 receptor-associated kinase 3		2.66
Il17ra	interleukin 17 receptor A	2.66	
Traf5	TNF receptor-associated factor 5	2.62	
Cd69	CD69 antigen	2.62	
Ccr12	chemokine (C-C motif) receptor-like 2	2.58	
Nfkb2	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 2, p49/p100	2.56	
Olr1	oxidized low density lipoprotein (lectin-like) receptor 1	2.52	
Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	2.52	
Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B cells 1, p105	2.45	
Cav1	caveolin 1, caveolae protein	2.41	
Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	2.4	
Siglece	sialic acid binding Ig-like lectin E		2.23

^a Confirmed expression of mediators of inflammation by immunoassay and/or flow cytometer.

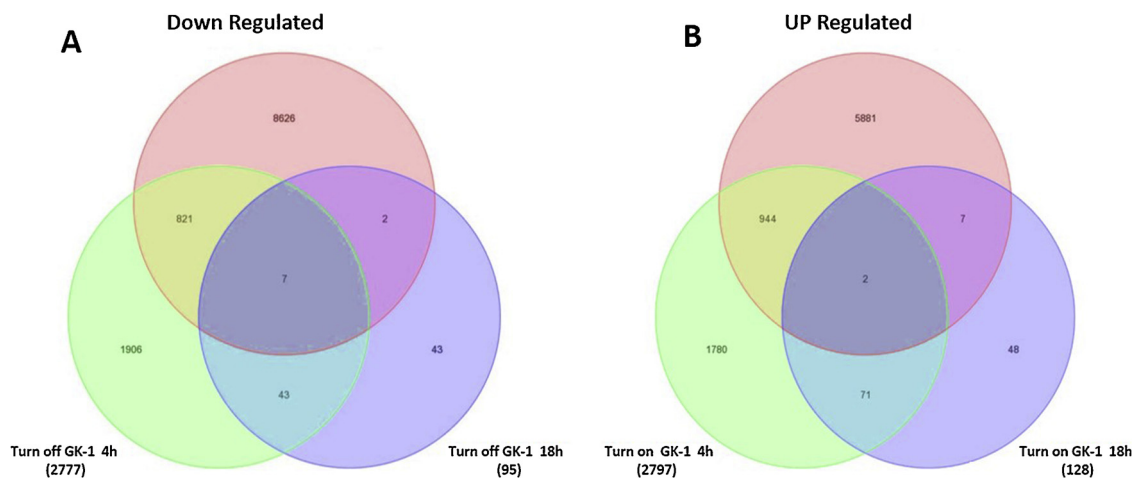


Fig. 2. Identification of gene expression changes specifically associated with the time of treatment. Venn diagram of down-regulated (A) and up-regulated (B) genes contrasting the treatments of 4 h vs 18 h, in CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages, taking into account the genes inherent in the controls: Red circles are the controls, green circles are treatment with GK-1 at 4 h and purple circles are treatment with GK-1 at 18 h. The number of genes in each part is shown in parentheses and the genes that cross-link between the conditions are shown inside the circles. Fold-change (FC) ≥ 2 , $P < 0.05$ with FDR, diff > 100 for microarray data. FC-rank plots of genes detected as differentially between 4- and 18 h. The data is representative of 3 independent experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

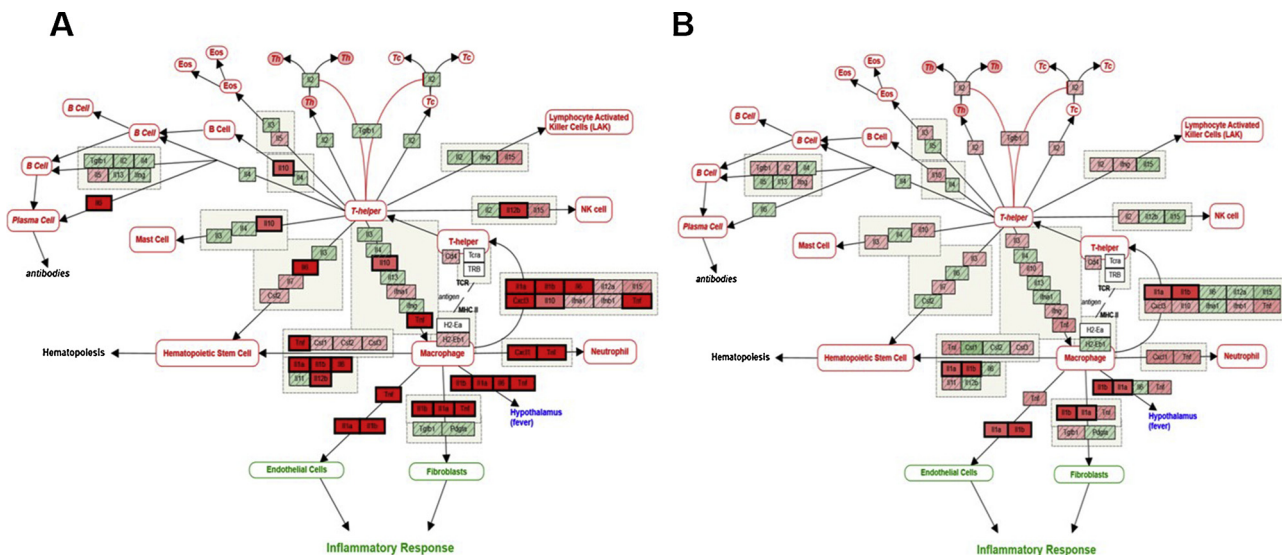


Fig. 3. Network analysis defines stimulus-associated programs of macrophage activation. Pathway representation network of transcriptional regulation of mediators of inflammation 4 h (A) and 18 h (B) after treatment CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages with GK-1 (FC > 2.0) identified by microarray analysis using Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software. The data are representative of 3 independent experiments.

ml of streptomycin (Gibco BRL, USA). Adherent cells were harvested from the plates after 2 h of culture, using cold 1X PBS buffer at 4 °C for 3 to 5 min and then scraping them off using a rubber policeman.

2.3. Peptides

GK-1 was purchased as a synthetic 18-aa peptide (GYYPSPDNTF-YAPPYSA) from USV, LTD, Mumbai, Maharashtra, India (batch RD0001). The peptide was 95% pure as determined by high pressure liquid chromatography using a reverse-phase C₁₈ column. A non-related peptide (NP) from random sequence (STLSPGSSTYTSYTTL) was employed as a negative control.

2.4. Treatment of peritoneal macrophages

PMA were cultured either in complete supplemented medium with GK-1 (10 µg), or as negative controls without the peptide or with the

non-related (NP) peptide (10 µg) described above. Cells cultured with LPS (5 ng/ml, Sigma-Aldrich) served as a positive control.

Further experiments were conducted with PMA cells treated with recombinant mouse IFN γ (5 ng/ml Biologend) or IL-4 (5 ng/ml Biologend) for 24, 48 and 72 h to polarize macrophages to the M1 or M2 phenotype, respectively [14]. The supernatants of all cultures were harvested for cytokine analysis and the cells were washed once prior to surface staining and subsequent flow cytometry.

2.5. Gene expression induced by GK-1

For evaluation of gene expression, we used the Affymetrix mouse GeneChip MouseGene 1.0.s.t microarray containing the complete transcriptome of *Mus musculus*. RNA was extracted from 2.5×10^5 peritoneal macrophages treated with GK-1 at 4, and 18 h. A non-related peptide (NP) was used as a negative unspecific control in the experiments to evaluate nitric oxide. In other experiments (microarrays, flow

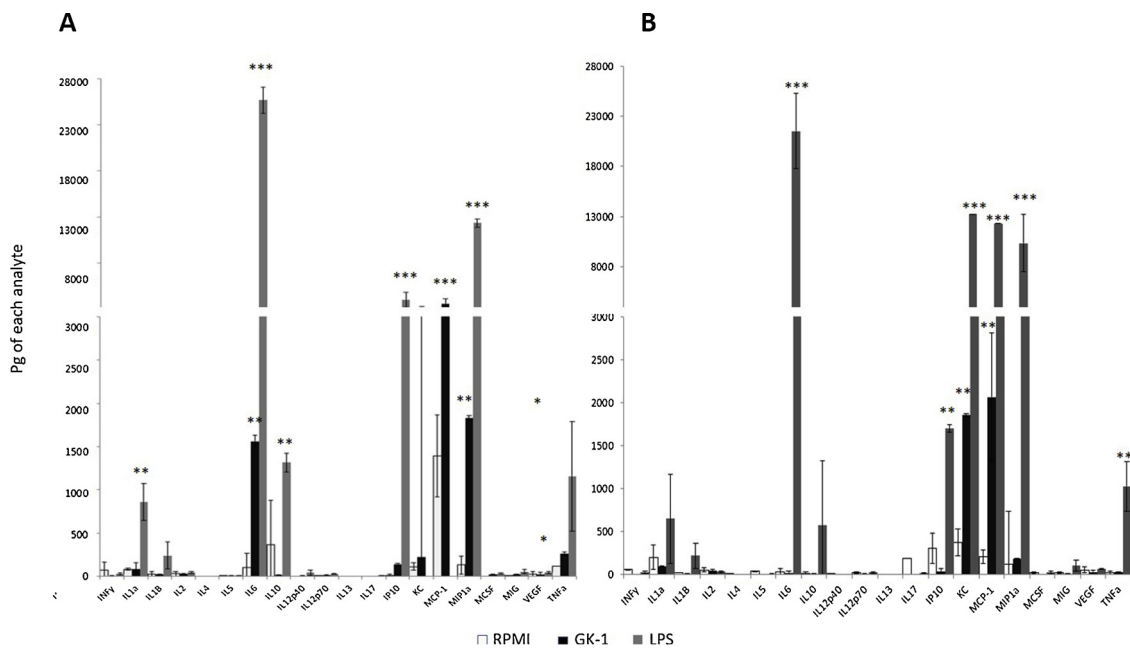


Fig. 4. GK-1 induces the secretion of proinflammatory mediators by PMA. Profile of inflammation mediators produced by CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages stimulated in vitro with GK-1 (A: 18 h; B: 72 h, dark gray bars). Positive control LPS (gray bars). Mock conditions RPMI (white bars). GK-1 induced a statistically significant increase in MCP-1, MIP1 α , IL-6, and TNF- α at 18 h (A) and in KC and MIP1 α at 72 h (B) using the ANOVA test. †Mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005.

cytometry and phagocytosis) RPMI without peptide served as negative control. RNA extraction was performed using RNeasy plus mini kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. Concentrations of RNA samples were quantified using the NanoDrop 2000 spectrophotometer (ThermoFisher) and the sample were stored at -70°C . The quality of the RNA was assessed in an Agilent 2100 Bioanalyzer system prior to subsequent hybridization to the Affymetrix GeneChip MouseGene 1.0 st, following the standard Affymetrix protocol.

From the microarray dataset, the changes in normalized gene expression intensities was analyzed and compared. Genes considered to be differentially expressed between the treated and untreated samples were categorized when their change was greater than or equal to 2-fold. The statistical parameter used to define significant change (P) was less than 0.001, and the difference between signal intensities compared to a given gene was over 200. The gene expression analysis was focused on genes related to macrophage activation, the immune response and relevant inflammatory processes.

Pairwise comparisons were performed between GK-1-stimulated cells and control non-stimulated cells in order to determine the number of genes significantly induced by the GK-1 stimulation and the relative fold changes of these genes. To do this, the two-class unpaired analysis was employed with a false discovery rate (FDR) with a cut-off of 1% and the condition that genes must have at least a two-fold change. This stringent FDR cut-off was chosen in order to focus on genes most highly induced or repressed by each condition. We treated the two time points, independently to identify genes that were consistently up or down-regulated after 4 and 18 h of co-culture.

2.6. Gene expression analysis by PCR

A PCR was performed to evaluate the expression of the Nos2 gene that was found up-regulated in PMA co-cultured with GK-1. Total RNA was prepared as described above, and the cDNA synthesis was performed with a Gibco kit according to the manufacturer's instructions.

2.7. Analysis of secreted inflammatory mediators

The cytokine levels for activated macrophages (M1) IL-12, IL-1 β , IL-6, and TNF- α and for (M2) IL-10, IL-4, TGF- β were measured in the supernatants of cultured macrophages following the protocol provided by the commercial Kit of 20 analytes (MILLIPLEX[®]). Concentrations were given in pg/ml of cultured macrophage supernatants using the Luminex Magpix (Xponent Software) system. The commercial panel of 20 analytes (Magnetic Mouse Cytokine 20-Plex Panel) included Basic FGF, IL-1 β , IL-10, IL-13, IL-6, IL-12, IL-17, MIP-1, GM-CSF, MCP-1, IL-5, VEGF, IL-1, IFN- γ , TNF α , IL-2, IP-10, MIG, KC, and IL-4.

2.8. Macrophage activation membrane markers

Single cell suspensions of peritoneal macrophages treated with GK-1 or with a Non-related peptide (negative control) or with LPS (positive control), with or without IFN γ or IL-4 (activating M1 and M2 stimulants, respectively) were first treated with 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ of anti-mouse FcR antibody (CD16/CD32 BioLegend) for 30 min at 4°C in order to "block" Fc receptors, and then surface stained with antibodies to CD11b, CD80, CD86, MHC-II, CD206, CD36 antibodies (BioLegend). Appropriate isotype controls were always included. Finally, cells were fixed with 1% paraformaldehyde in PBS and processed using a FACSCalibur flow cytometer and the Cell-Quest Pro software.

2.9. Nitric oxide

Nitrite is the primary and nonvolatile breakdown product of NO degradation. Thus, NO production was assessed in the supernatants of the macrophages cultured under the different treatments tested using the Griess reagent (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's instructions. Briefly, the supernatants were mixed with an equal volume of the Griess reagent. Nitrite concentrations were determined by comparison with standard solution of NaNO₃. The plate was analyzed at 540 nm or in range from 520 to 550 nm by the fluorometry method to determine free oxygen radicals.

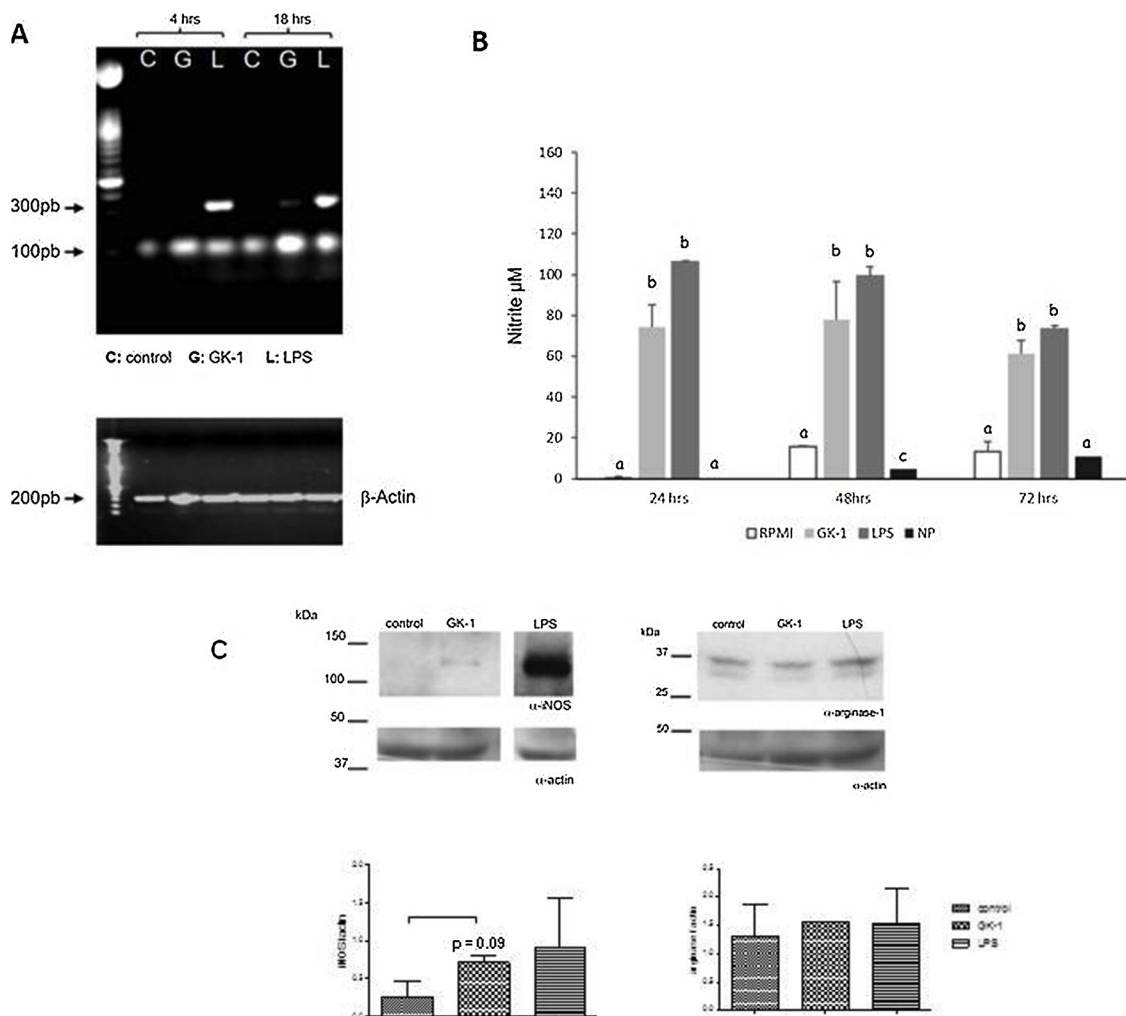


Fig. 5. GK-1 induces the overexpression of iNOS and the synthesis of NO by PMA. A) RT-PCR for iNOS and actin expression of macrophages culture in RPMI alone or with GK1 or LPD. B) Quantification using the ANOVA test of NO synthesis by CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages stimulated by GK1 (light grey bar) or LPS (grey bar) for 24, 48 and 72 h in vitro. There was no significant increase in NO in cultures incubated with non-related-peptide (black grey bar) or under “mock” stimulation (white bar). †Mean ± SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005. C) Western Blot for iNOS and arginase-1 expression in peritoneal macrophages cultured with GK1, LPS, or RPMI alone for 72 h. The graph to the right shows the mean ± SD of three independent experiments.

2.10. Immunoblotting

Macrophages previously stimulated with either GK-1 or LPS for 72 h were lysed for 10 min in lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecylsulfate (SDS), 5 mM EDTA supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM sodium vanadate, 1 mM sodium fluoride), on ice. Protein concentration was determined by the Lowry method [15]. Lysates were snap-frozen and stored at -80°C . Equal amounts of protein lysates were resolved by gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon®, Millipore). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in 5% milk or BSA-TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). Membranes were probed overnight for SOD2 (A-2) [sc-133134] (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); β -actin [ab8229] (Abcam); iNOS [GTX130182], Arginase-1 [GTX634200] (Genetex). On the next day, membranes were washed with 1x TBST for three times and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) diluted in 5% milk or TBST for 1 h at room temperature. Bound antibodies were detected by the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific).

2.11. Phagocytosis assay

Phagocytosis assay was performed by co-incubation of PMA with fluorescently-labeled *Saccharomyces cerevisiae* for 120 min at 37°C at 1:5 ratio in the presence of absence of BALB/cAn inactivated mouse serum. Yeasts were stained with CFSE (10 mM) (carboxyfluorescein succinimidyl-ester) following the procedure previously described. After incubation, the yeasts cells were centrifuged (5 min, $800\times g$), and washed with PBS X3. Yeasts were heat-inactivated at 60°C for 20 min. A total of 2×10^6 yeasts per well was incubated with 5×10^5 macrophages previously cultured with or without GK-1 (30 min, 37°C) in Chamber Slides (Nunc Lab-Tek™). The macrophages were stained for 10 min with the vital dye FM4-64 (Invitrogene™) in order to have contrast with the yeasts. The cells were washed three times with PBS at room temperature, counterstained with DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Phagocytosis of fluorescent yeasts was measured by confocal microscopy (Nikon A1R + STORM) and by epifluorescence microscopy (Nikon Labophot) 2 by counting the number of macrophages with more than three yeasts in a total of 500 cells in three independent experiments.

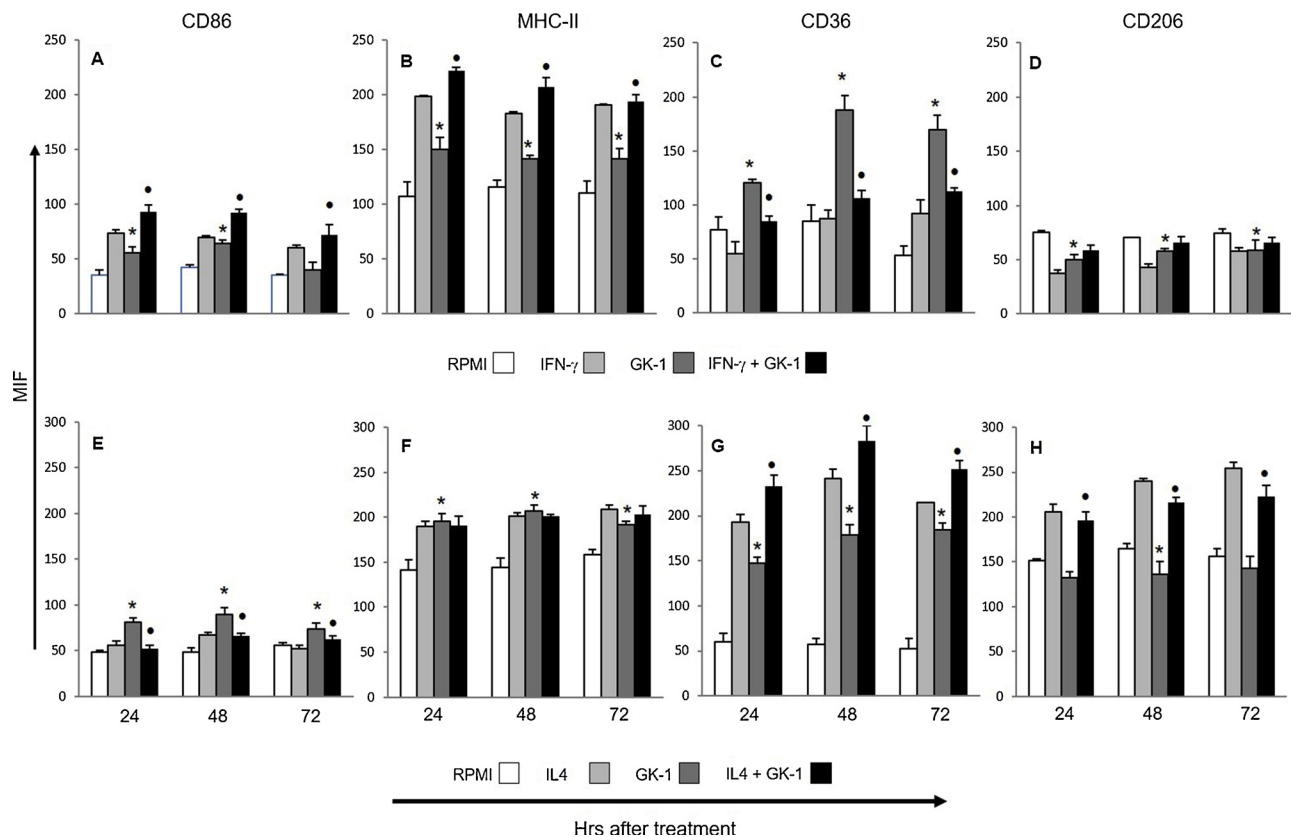


Fig. 6. GK-1 increases the expression of membrane-associated activation markers in PMA. Mean \pm SD of the median fluorescence intensity. In vitro-treatment of CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages with GK-1 significantly increases the expression of CD86 (A) at 24, 48 and 72 h, MHCII (B) at 24, 48 h, CD36 (C) at 48, 72 h and CD206 (D) at 72 h. Synergistic effect of GK-1/IFN- γ or GK-1/IL-4 treatment on expression of PMA surface membrane markers. Cells were treated with GK-1 and IFN- γ or GK-1 and IL-4 and the cell surface expression of CD86, MHCII, CD36 and CD206 was evaluated by cell surface staining and FACS. Combined treatment of GK-1 / IFN- γ (dark gray), GK-1 (gray), IFN- γ (light gray), and the mock conditions (white), are shown in A to D. Similarly, after treatment with GK-1 / IL-4 (dark gray), GK-1 (gray), IL-4 (light gray), and the mock conditions (RPMI, white), are presented in E to H. All treatments were for 24, 48 and 72 h. The values represent the mean Medium Fluorescence Intensity (MFI) of three different experiments. The data are mean \pm SD. The statistical analysis was done using the Kruskal-Wallis test. †Mean \pm SD. *P < 0.05, **P < 0.005, and ***P < 0.0005.

2.12. Statistical analysis

The statistical analysis of the inflammatory mediators and the expression of membrane phenotypes was performed with PRISM Version 5.0 software. All analyses were performed in three independent experiments. Quantitative data were presented as mean \pm S.D. and compared using ANOVA test. A P-value < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. GK-1 induced differential gene expression of peritoneal macrophages

A detailed transcriptional profile of peritoneal macrophages treated with GK-1 at 4 h at 18 h was subjected to gene expression profiling analysis with whole genome microarrays (Fig. 1A, B). Unsupervised hierarchical clustering analysis showed a differential expression between control and GK-1 treated macrophages that allowed us to perform the comparison between the heat-maps resulting from each exposure time of 4 and 18 h to GK-1.

Of the total of 28,944 genes included in the microarray, 503 were differentially expressed by cells treated with GK-1 for four h. Of these, 312 genes were up-regulated and 191 were down-regulated. A lower number of genes (90) remained differentially expressed 18 h after treatment, with 61 genes being up-regulated and 29 down-regulated (Table 1).

3.2. Identification of genes specifically associated with the time of treatment

A summary of genes that are differentially up or down regulated, with a fold-change > 1.0 at different times is presented in Venn diagrams constructed with Partner Illuminates microarray program (Fig. 2 A and B). Comparing at 4 and 18 h after treatment with GK-1, 2797 genes were up-regulated and 2777 were down-regulated, with 40% approximately of the genes implicated in immune-inflammatory responses.

3.3. Network analysis defines stimulus-associated programs of PMA activation

Treatment of GK-1 resulted in increased and/or decreased differential expression of genes involved in pro-inflammatory mediators. In Fig. 3 we present a summary of transcriptional regulation of mediators of inflammation at 4 and 18 h after treatment with GK-1.

These changes were grouped into clusters of key genes regulating inflammatory pathways, for example, interleukins and chemokines signal pathways. Four hours after treatment there was an increased expression of genes that code for cytokines such as IL-12 β , IL-6, IL-1 α , IL10, IL-1 β , TNF- α and for chemokines such as CXCL1, CXCL2 and CXCL3 (Fig. 3A). Some of these (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-10, CXCL1 and CXCL3) continued to be overexpressed 18 h later together, with the overexpression of some additional cytokines (IL15 and TGF- β) (Fig. 3B).

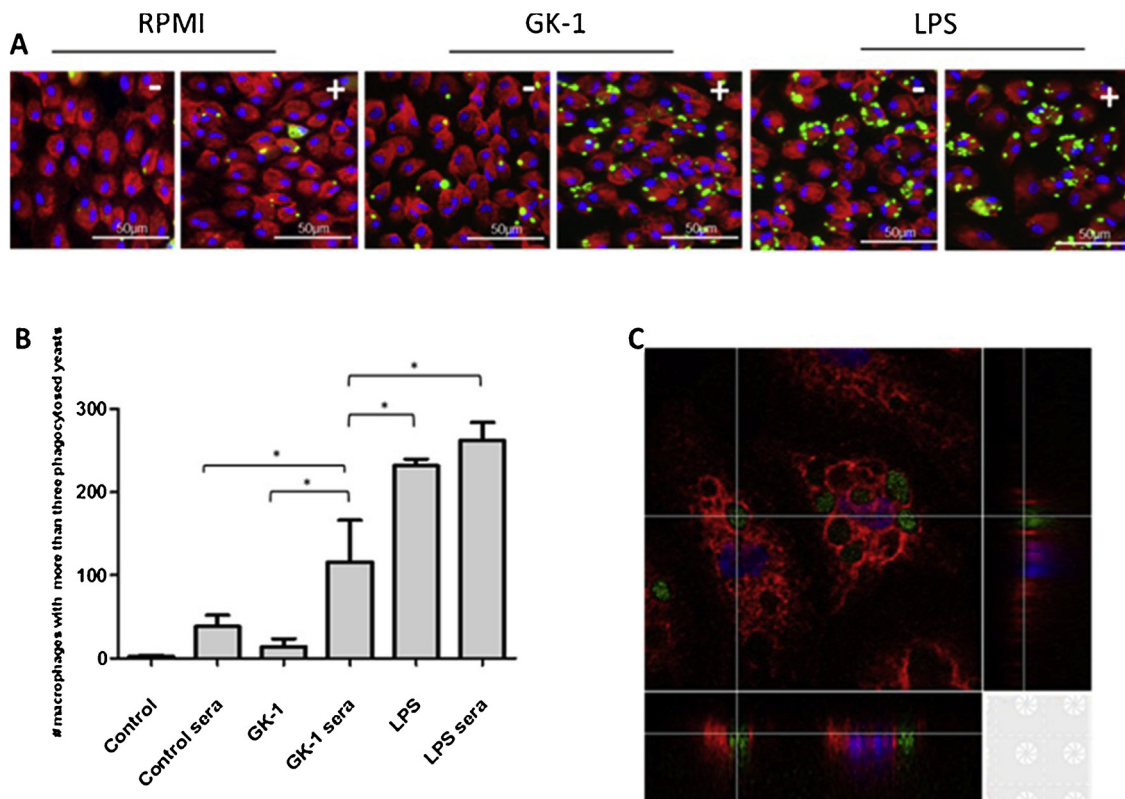


Fig. 7. Increased phagocytosis in PMA cultured with GK-1. CD11b + F4/80 + peritoneal macrophages were cultivated for 24 h with GK-1 and then cultured 30 min with *S. cerevisiae* labeled with Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (green label) in medium containing either inactivated or complete mouse sera. Thereafter, macrophages were stained with FM4-64 (red) and a nuclear marker DAPI (blue). Merged images (A) of cells treated with media, GK-1 or LPS without or with BALB/cAnN inactivated mouse serum. The phagocytosed yeasts were quantified by counting 500 macrophages in triplicate per condition in each experiment. B. Mean \pm SD of the number of macrophages with three or more yeasts of three independent experiments. *Significantly different at $P < 0.05$ using the ANOVA test. C: A 3D image z stacks in confocal microscopy that demonstrates the internalization of yeasts by macrophages. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.4. GK-1 induces the expression of pro-inflammatory mediators and NO in PMA

To confirm the microarray results, the level of inflammatory mediators was measured in the supernatants of control and GK-1 stimulated macrophages. PMA cultured with GK-1 secreted significantly increased levels of IL-6, TNF- α , IP-10 (CXCL10), Mip-1 α (CCL3) and MCP-1 (CCL2), compared to control cultures. Similarly, high levels of IL-1 β , IL-12, IL-6, CXCL10, CCL3, CCL2 and TNF- α were detected in the supernatants of LPS-treated macrophages (Fig. 4).

Importantly, GK1 induced a very small increase in iNOS expression after 4 h of culture, which slightly increased 18 h later (Fig. 5A), as reflected by an increase in NO production by macrophages stimulated for 24 h with GK-1. This increase in NO was maintained at 48 h but decreased at 72 h. A similar trend was observed in the LPS stimulated cultures, in contrast to the low level of NO in the un-treated cultures (Fig. 5B). To evaluate whether the decrease in NO levels at later times was associated with the polarization of M1 macrophages towards a M2 phenotype, both iNOS and arginase-1 expression were determined at 72 h of culture. As shown in Fig. 5C, iNOS expression remained slightly increased, but arginase-1 expression levels were not different from those in control macrophage cultures, which constitutively expressed this enzyme.

3.5. Changes in PMA surface markers induced by GK-1

Peritoneal macrophages cultured with GK-1, were evaluated for their expression of surface markers by FACS analysis, specifically, CD69, CD40, CD80, CD86, MHCII (M1), CD36 and CD206 (M2). Expression of

CD86, MHC-II and CD36 was significantly increased at 24 h in PMA stimulated with GK-1 and remained increased up to 72 h for MHC-II and CD36 (Fig. 6A–D), consistent with an M1 macrophage phenotype. In contrast, the M2 marker CD206 was expressed at low levels at 24 h by GK1 stimulated macrophages compared to cells cultured with medium. There were no significant differences in the expression of CD69, CD40 and CD80 found at any time (data not shown).

Stimulation of PMA with IFN- γ plus GK-1 resulted in significantly increased expression of CD86 and MHC-II compared to GK-1 alone after 24 h, but not after 72 h (Fig. 6A). In comparison with control cultures, incubation with IFN and GK-1 resulted in a moderately low expression of CD36 (Fig. 6C), but once again no effect was observed in the expression of CD206 (Fig. 6D).

When PMA were treated with IL-4/GK-1 (Fig. 6E–H), there was an increased expression of CD36 and CD206 at 24, 48 and 72 h compared to GK-1 alone (Fig. 6G,H). As expected IFN- γ induced a high expression of CD86 and MHC-II from 24 to 72 h (Fig. 6A, B), together with a reduced expression of CD36 and CD206 (Fig. 6C, D) (except for CD36 at 72 h, where an increase was observed, Fig. 6C). Finally, IL4 induced a considerably high expression of CD36 and CD206 (Fig. 6G, H), a discrete increase of MHC-II (Fig. 6F), but no impact on the expression of CD86 was observed (Fig. 6E).

3.6. SOD2 gene expression

It is very well known that the oxidative stress that accompanies NO production is a signal of danger to the cells. Since one of the main antioxidant enzymes whose genes were overexpressed in peritoneal macrophages cultured with GK1 was superoxide dismutase 2 (SOD2),

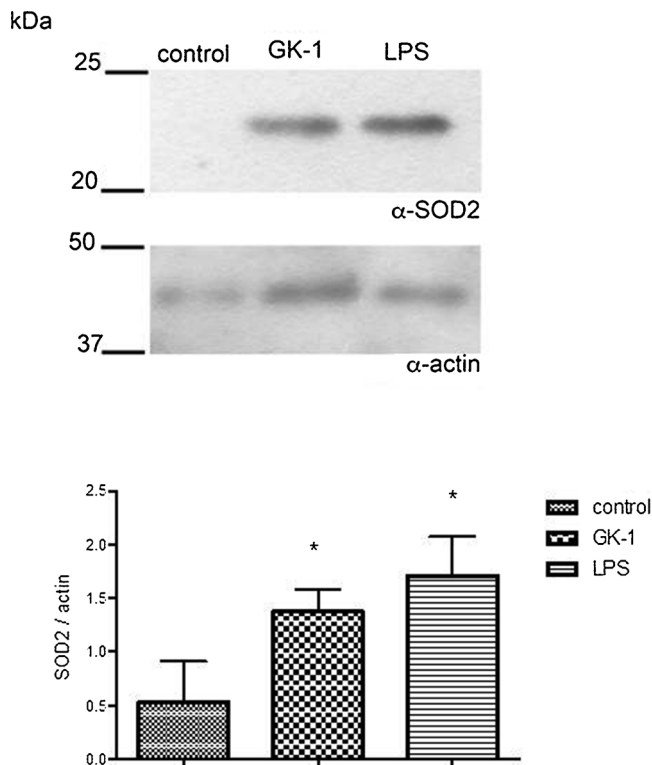


Fig. 8. Western Blot for SOD-2 expression in peritoneal macrophages cultured with GK1, LPS, or RPMI alone for 72 h. The graph shows the mean \pm SD of three independent experiments.

we probed the effectivity of GK1 in inducing its production. As shown in Fig. 8, both LPS and GK1 induced an overexpression of the SOD2 protein.

3.7. GK-1 increased phagocytosis activity of PMA in vitro

To evaluate the functional effects of GK-1 on cultured macrophages a phagocytosis assay was employed. The level of phagocytosis in PMA cultured with the fluorescent yeast and GK-1 was significantly increased when an inactivated serum was added (Fig. 7A–C).

4. Discussion

Macrophages play a key role in tissue homeostasis, inflammation, immunity, and disease pathogenesis. The wide spectrum of macrophage activities is reflected in an equally complex range of functionally distinct populations differentiated from monocytes according to the prevailing cytokine “milieu”, created as a result of the early inflammatory response to a pathogen.

Historically, those macrophages differentiated in the presence of $\text{IFN}\gamma$, LPS, or GM-CSF were defined as the M1 inflammatory population, whereas those differentiated in the presence of IL-4, IL-13, or M-CSF were defined as the M2 anti-inflammatory population [5,14]. Now, however, it is clear that there is a wide spectrum of functional macrophage subpopulations, and a more rational classification based on gene expression profiles is now in progress [16]. Moreover, macrophages display a remarkable phenotypic plasticity, i.e. they are able to change, their functional phenotypes according to varying environmental stimuli [5,14]. Thus, macrophages and their progenitors, the monocytes, are key cells in the interconnecting pathways that lead to the induction of an acquired response, thereby providing a rational basis for the development of novel adjuvants.

This work is aimed to understand the immunomodulatory activities of the highly stable synthetic GK-1 peptide [24], specifically, 1) its

proven utility as an adjuvant for immunization with the influenza vaccine [10,13], its significant antitumoral effect on 4T1 mouse mammary carcinoma [12]. Here, therefore, and considering the important role of macrophages in immunomodulation, we present our findings on the impact of GK-1 on the function and gene and cell surface marker expression of peritoneal macrophages.

The differential impact of GK-1 on gene expression profiles was analyzed through hierarchically clustered profiles related to inflammatory processes such as Toll-like receptor (TLR2) (Fig. 3 and Table 1). Our results showed an overexpression of genes encoding for M1 macrophage classical markers (IL1 β , TNF α , IL6, IL12 β) and a down-regulation of genes encoding for M2 markers (Arg1) in GK-1-treated macrophages [17]. Recently, a study analyzing transcriptional mRNA profiling data identified other markers for the M1 phenotype (CD38, Gpr18, Fpr2) [5] and, interestingly, the microarray assay also showed a GK-1 peptide induced expression of CD38, Fpr2, CCL2, and CCL7.

The observed increased expression of the transcript for TLR2 in GK1 treated cells may indicate an involvement of GK-1 in TLR2 activation, a possibility consistent with the observed and concomitant up-regulation of NF- κ B, the major downstream target of TLR2 signaling [18]. This, in turn, could predict an increased production of inflammatory cytokines (i.e. IL1, IL6, TNF α) and chemokines (MIP-1alpha, MCP1, etc.) as well as inducible enzymes such as COX-2 and iNOS [19]. Significantly therefore, an increase in most of these cytokines and chemokines was confirmed by multiplex gene expression analysis. In addition, GK-1-treated peritoneal macrophages produced NO and overexpressed the CD86 co-receptor and MHC-II. GK-1 treated macrophages also produced increased levels of iNOS (Fig. 5A and C) and NO (Fig. 2B), which can be involved in increasing phagocytic activity in macrophages (Fig. 7). Interestingly, GK-1 reduced the effect of the oxidative response by overexpressing SOD2 (Fig. 8), an essential mitochondrial antioxidant enzyme that can restore macrophage homeostasis.

After 72 h of GK-1 treatment, however, the cells had largely lost the M1 phenotype and exhibited an increased expression of CD36, indicating a shift towards an alternatively activated M2 phenotype perhaps as a strategy to control possible adverse inflammatory reactions. In relation to this possibility, when peritoneal macrophages were treated with GK-1 plus IL-4, there was a synergistic increase of the CD36 receptor, reinforcing the idea that GK-1 might interact with the CD36 receptor [20]. Also, it should be noted that peritoneal macrophages cultured in RPMI medium alone showed a constitutive expression of arginase-1, an enzyme that competes with iNOS for arginine and whose expression was not modified when macrophages were incubated with GK1. Being arginase-1 a classical M2 enzyme, its preponderance over iNOS after 72 h of culture with GK1 could help to shift the M1 phenotype to an M2 one [19].

Another result that merits comment is the synergistic effect induced by GK-1 and $\text{INF-}\gamma$ in promoting the polarization of the peritoneal cells toward the M1 phenotype, as evidenced by the increased expression of CD86 and MHCII. Finally, GK-1 treatment resulted in a decreased expression of the M2 marker CD206 by IL-4 stimulated cells.

Macrophages are professional phagocytes, playing a central role in tissue maintenance and host defense, first by engulfing and killing pathogens [21], and second through their subsequent role as antigen presenting cells. Phagocytosis, therefore, is regarded as an indicator of macrophage activity [22] representing the first essential step for the immunological defense system and a rational target for adjuvants. Thus, the observed stimulation of phagocytosis by GK-1, and the concomitant increased expression of the CD38, Rab11fip1, and Hli-MII genes, may favor antigenic presentation and contribute to the adjuvant properties of GK-1 [23].

In conclusion, this study demonstrates that GK-1 promotes significant phenotypic changes in peritoneal macrophages, including the polarization to the M1-classical phenotype and an increased phagocytic activity, both phenomena that may underlie its demonstrated adjuvant effects.

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by CONACyT project No. 253891 and the Program of Research for the Development and Optimization of Vaccines, Immunomodulators and Diagnostic Methods of the Biomedical Research Institute from National Autonomous University of Mexico (UNAM).

References

- [1] J. Bayry, Regulatory T cells as adjuvant target for enhancing the viral disease vaccine efficacy, *Virus Dis.* 25 (2014) 18–25.
- [2] A. Fernández, L. Oliver, L.E. Álvarez, K.P. Lee, C. Mesa, Adjuvants and myeloid-derived suppressor cells: enemies or allies in therapeutic cancer vaccination, *Hum. Vaccin. Immunother.* 10 (2014) 3251–3256.
- [3] S. Gordon, P.R. Taylor, Monocyte and macrophage heterogeneity, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 953–964.
- [4] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677–686.
- [5] S.A. Amici, J. Dong, A.M. Guerau, Molecular mechanisms modulating the phenotype of macrophages and microglia, *Front. Immunol.* 10 (2017) 1–18.
- [6] D.M. Mosser, The many faces of macrophage activation, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 209–212.
- [7] L. Darwich, G. Coma, R. Peña, R. Bellido, E.J.J. Blanco, J.A. Este, M. Bofill, Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18, *Immunology* 126 (2009) 386–393.
- [8] A. Cassado A dos, M.R. D'Império, K.R. Bortoluci, Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function, *Front. Immunol.* 19 (2015) 1–9.
- [9] K. Manoutcharian, G. Rosas, M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, E. Sciotto, Cisticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens, *J. Parasitol.* 82 (1996) 250–254.
- [10] V.R. Segura, T.A. Pérez, G. Rosas, A. Toledo, M. Restelli, E. Acosta, R. Corral, F. Rosetti, G. Fragoso, S. Grinstein, E. Sciotto, A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine, *Vaccine* 20 (2006) 1073–1080.
- [11] G. Fragoso, G.F. Esquivel, M.A. Santana, R.J. Bobes, B. Hernández, J. Cervantes, R. Segura, F.A. Goldbaum, E. Sciotto, G. Rosas, Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity, *Clin. Vaccine Immunol.* 18 (2011) 1067–1076.
- [12] D. Torres-García, A. Perez-Torres, K. Manoutcharian, U. Orbe, R. Servin-Blanco, G. Fragoso, E. Sciotto, GK-1 peptide reduces tumor growth, decreases metastatic burden, and increases survival in a murine breast cancer model, *Vaccine* 35 (2017) 5653–5661.
- [13] V.R. Segura, G. Fragoso, E. Sciotto, A. Sarukhan, Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK-1 on the immunogenicity of an influenza vaccine, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1338–1343.
- [14] F.O. Martínez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation, *F1000Prime Rep.* 6 (2014) 1–13.
- [15] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* (1951) 265–275.
- [16] C. Porta, E. Riboldia, A. Lppolitoa, A. Sica, Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation, *Semin. Immunol.* 27 (2015) 237–248.
- [17] C. Porta, M. Rimoldi, G. Raes, L. Brys, P. Ghezzi, D. Liberto, F. Dieli, S. Ghisletti, G. Natoli, P. De Baetselier, A. Mantovani, A. Sica, Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappa β , *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 14978–14983.
- [18] Y. Liu, Y. Wang, M. Yamakuchi, S. Isowaki, E. Nagata, Y. Kanmura, I. Kitajima, I. Maruyama, Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa β activation, *Infect. Immun.* 69 (2001) 2788–2796.
- [19] M. Triantafyllou, F.G. Gamper, R.M. Haston, M.A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung, K. Triantafyllou, Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting, *J. Biol. Chem.* 13 (2006) 31002–31011.
- [20] H.T. Aung, K. Schroder, S.R. Himes, K. Brion, W. van Zuylen, A. Trieu, H. Suzuki, Y. Hayashizaki, D.A. Hume, M.J. Sweet, T. Ravasi, LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression, *FASEB J.* 20 (Jul (9)) (2006) 1315–1327.
- [21] J.W. Kang, F.T. Nguyen, N. Lue, R.R. Dasari, D.A. Heller, Measuring uptake dynamics of multiple identifiable carbon nanotube species via high-speed confocal Raman imaging of live cells, *Nano Lett.* 12 (2012) 6170–6174.
- [22] C.Y. Lai, D.P. Strange, T.A.S. Wong, A.T. Lehrer, S. Verma, Ebola virus glycoprotein induces an innate immune response in vivo via TLR4, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1571.
- [23] J. Cervantes-Torres, R. Segura-Velázquez, P. Padilla, E. Sciotto, G. Fragoso, High stability of the immunomodulatory GK-1 synthetic peptide measured by a reversed phase high-performance liquid chromatography method, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 5 (2017) 97–102.



Lisandro Sánchez Hernandez PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants.



Laura Montero Leon PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants

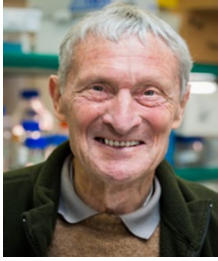


Raúl Mojica Espinosa MSc. Ascription: Subdirection of development of clinical applications Position: Head of Department in Medical Area B National Institute of Genomic Medicine of Mexico



Juan Pablo Reyes Grajeda PhD. PhD. Biomedical sciences National Autonomous University of Mexico, UNAM Associate Researcher in the Medical Proteomics Unit National Institute of Genomic Medicine of Mexico Work areas Expert in the purification and biochemical characterization of proteins, as well as in crystallogenesis and crystallography.

Jacquelynne Cervantes Torres PhD. Biomedical sciences student Biomedical research institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Development of adjuvants, expert in vitro and in vivo testing of several biological molecules involved in cell differentiation and activation.



Michael Parkhouse PhD. Biochemistry University of London, United Kingdom (UK) Researcher of the Department of Infections & Immunity Gulbenkian Institute of Science Work areas Infectious organism and its host



Edda Lydia Sciuotto Conde PhD. Researcher of Department of Immunology Biomedical Research Institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Immunoparasitology. Neuroinflammation. Identification of antigens and protective epitopes against cysticercosis. Diagnosis of human and porcine cysticercosis Development of adjuvants



Gladis Fragoso Gonzalez PhD. Researcher of Department of Immunology Biomedical Research Institute National Autonomous University of Mexico, UNAM Work areas Immunoparasitology. Neuroinflammation Identification of antigens and protective epitopes against cysticercosis. Diagnosis of human and porcine cysticercosis Development of adjuvants