



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de un andamio de GE/HA acoplado a CpGs y
MAGE A5 en células presentadoras de antígenos de
ratones C57BL/6**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

AMÉRICA ERÉNDIRA FUERTE PÉREZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE
2023
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Al comité evaluador del presente trabajo por cada uno de sus comentarios y observaciones:

- Dra. Adriana Elizabeth González Villalva
- Dr. Yair Romero López
- Dra. Katia Jarquín Yáñez
- Dra. Nadia Adriana Vázquez Torres

Agradezco especialmente mi tutora la Dra. Gabriela Piñón Zárate por su disposición, su apoyo incondicional y dedicación en mi formación académica desde el primer día. Gracias por toda su tutoría, enseñanza y por brindarme motivación para superarme a mí misma.

Agradezco a cada uno de los miembros del Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos. Al Dr. Andrés Castell Rodríguez por permitirme incorporarme en este gran equipo de trabajo. A la Dra. Katia Jarquín Yáñez por su tutoría, paciencia y enseñanza, especialmente, en la elaboración de andamios para este proyecto. Gracias a la Biología Beatriz Hernández Téllez por apoyarme en mi proceso de aprendizaje en el laboratorio. Al Dr. Miguel Herrera Enríquez por sus enseñanzas. Y todos mis compañeros de laboratorio por brindarme su apoyo y amistad, Alejandra, Pamela, Shamed, Michael y Vanesa.

Agradecimientos personales:

Agradezco profundamente a mi padre, Rafael Fuerte por siempre creer en mí, por motivarme y encaminarme en el camino de la ciencia desde que era una niña. Por todas sus enseñanzas y su amor incondicional. Eres mi más grande apoyo desde donde estés, gracias por siempre cuidar de mí. Te llevo en mi corazón siempre.

A mi mamá, por siempre creer en mí y ser mi mayor fan. Gracias por ser el pilar de nuestra familia, por todas las lecciones de vida que me has dado, por tu fuerza y valentía que siempre me ayudan a levantarme.

A mi hermano Rafael por estar detrás de mí en cada uno de los pasos que doy y escucharme en los momentos difíciles. Eres un gran hermano mayor.

A mi hermano Ángel, te admiro mucho por siempre luchar por tus sueños. Gracias por todos esos años viviendo en la ciudad. Por ser el primero que está ahí cuando me caigo, por hacerme reír y decirme que yo puedo con todo.

A mi amiga incondicional Alejandra, por compartir este periodo de crecimiento y formación. Por siempre estar conmigo para escucharme y comprenderme. Has sido un gran apoyo para mí y deseo que ambas sigamos creciendo todos los días. Recuerda que somos un equipo.

A Jenifer, Sra. Margarita, Edgar, Alina por abrirme las puertas de su hogar en momentos tan difíciles, con su ayuda este trabajo fue posible.

A Pamela por tantos momentos lindos y tener la oportunidad de compartir nuestros logros.

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	La piel	3
2.2	Melanoma	6
2.2.1	Epidemiología.....	6
2.2.2	Factores de riesgo	6
2.2.3	Clasificación y diagnóstico.....	7
2.2.4	Estadio	8
2.2.5	Pronóstico y tratamientos	9
2.2.6	Remoción quirúrgica	9
2.2.7	Quimioterapia	10
2.2.8	Radioterapia adyuvante	11
2.3	Sistema inmunológico.....	11
2.3.1	Respuesta inmune	11
2.3.2	Células del sistema inmune	12
2.3.3	Macrófagos	14
2.3.4	Células de línea linfoide	15
2.3.5	Células dendríticas (CDs).....	17
2.4	Órganos linfoides	19
2.5	Inmunidad innata	20
2.6	Presentación de antígenos	21
2.6.1	Reconocimiento de antígenos.....	21
2.6.2	Maduración de CDs	22
2.6.3	Procesamiento antigénico	22
2.6.4	Vía endógena	24
2.6.5	Vía exógena	24
2.6.6	Presentación cruzada	25
2.7	Activación de linfocitos	26
2.8	Microambiente tumoral y respuesta inmune antitumoral	28
2.8.1	Inmunoedición	29
2.8.2	Fase de eliminación	29
2.8.3	Fase de equilibrio	30

2.8.4	Fase de escape	31
2.9	Inmunoterapia	32
2.9.1	Inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales.....	32
2.9.2	Terapia con anticuerpos dirigidos a inmunocheckpoints	33
2.9.3	Terapia con citocinas	35
2.9.4	Interleucinas.....	36
2.9.5	Interferones	36
2.9.6	Terapia celular adoptiva	36
2.9.7	Terapia con CDs	38
2.9.8	Desventajas de las inmunoterapias tradicionales.....	39
2.10	Antígenos tumorales y antígenos MAGE	40
2.10.1	Antígenos MAGE	41
2.11	Adyuvantes	42
2.11.1	Agonistas de reconocimiento de patrones	43
2.11.2	Uso de CpGs.....	43
2.12	Ingeniería de Tejidos	44
2.12.1	Andamios.....	44
2.13	Materiales.....	46
2.13.1	Biomateriales poliméricos	47
2.13.2	Ácido hialurónico (HA).....	48
2.13.3	Gelatina (GE).....	50
2.13.4	Andamios porosos e hidrogeles.....	51
2.14	Agentes entrecruzantes	52
2.15	Uso de andamios en la inmunoterapia	53
2.15.1	Uso de andamios con CDs.....	56
3	ANTECEDENTES.....	57
4	JUSTIFICACIÓN.....	62
5	HIPÓTESIS	63
6	OBJETIVO GENERAL	63
7	OBJETIVOS PARTICULARES.....	63
8	METODOLOGÍA	64
8.1	Cultivo de melanoma	64

8.2	Fabricación de andamios	64
8.3	Elaboración de hidrogeles.....	65
8.4	Uso de ratones.....	66
8.5	Efecto de los andamios de GE/HA acoplados a CpGs o MAGE A5 en esplenocitos murinos de ratones con melanoma. Experimentos in vitro.....	67
8.6	Evaluación del efecto de los hidrogeles de GE/HA acoplados con CpGs y MAGE A5 en ratones C57BL/6.	67
8.7	Tinciones y análisis para citometría de flujo	68
8.8	Registro del crecimiento tumoral.....	69
8.9	Pruebas estadísticas.....	70
9	RESULTADOS.....	70
9.1	Efecto de los andamios de GE/HA acoplados a CpGs o MAGE A5 en esplenocitos murinos de ratones con melanoma. Experimentos in vitro.....	70
9.2	Evaluación del efecto de los hidrogeles de GE/HA acoplados con CpGs y MAGE A5 en ratones C57BL/6	74
9.3	Registro del crecimiento tumoral y supervivencia.....	81
10	DISCUSIÓN.....	83
11	CONCLUSIONES.....	89
12	REFERENCIAS	91

1 RESUMEN

El melanoma es un tipo de cáncer que surge de la transformación maligna de los melanocitos, y presenta la mayor mortalidad dentro de los cánceres de piel. En la actualidad se disponen de tratamientos tradicionales, como la remoción quirúrgica, la quimioterapia y las inmunoterapias. La inmunoterapia tiene como objetivo impulsar o reactivar la respuesta inmune antitumoral. Uno de los enfoques más prometedores es la activación *in vivo* de las células presentadoras de antígenos (APC), como las células dendríticas (CDs) y los macrófagos, que pueden reconocer y presentar antígenos tumorales, como los antígenos asociados a melanoma (MAGE); para lograr una respuesta específica con linfocitos T citotóxicos que eliminan a las células transformadas. Sin embargo, para que la inmunoterapia sea efectiva, generalmente se requiere de varias dosis con altas cantidades de citocinas, que conllevan diversos efectos adversos. El uso de andamios porosos e hidrogeles permite la administración localizada, y además aumentan el tiempo de vida medio de las moléculas inmunoestimuladoras. Tanto la gelatina (GE) como el ácido hialurónico (HA) son elementos de la matriz extracelular, que brindan un entorno adecuado para el reclutamiento y adhesión de las células. Adicionalmente, a los andamios se les pueden incorporar moléculas inmunomoduladoras empleadas en la inmunoterapia clásica como los antígenos tumorales y adyuvantes como oligodesoxinucleótidos ricos en citocinas y guaninas (CpGs), que interactúan con los receptores tipo Toll 9 (TLR9). Así el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto *in vitro* e *in vivo* de un andamio de GE/HA acopado a CpGs y MAGE A5 en las CDs MHCII⁺ CD11c⁺ y de macrófagos MHCII⁺ F4/80⁺ y CD3⁻ Ly6c⁺ obtenidas de ratones C57BL/6. Para lo cual, se sembraron esplenocitos de ratones con melanoma a los andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 y un grupo sin tratamiento, y se analizó por citometría de flujo la expresión de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 en CDs MHCII⁺ CD11c⁺ y macrófagos F4/80⁺ MHCII⁺ y CD3⁻ Ly6c⁺. También, se inocularon a los ratones con hidrogeles de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 y se recuperaron los esplenocitos después de 7 y 21 días, que se estimularon con el antígeno MAGE A5 por 3 días. Después se realizaron tinciones para detectar CDs MHCII⁺ CD11c⁺ y los macrófagos F4/80⁺ MHCII⁺ y CD3⁻ Ly6c⁺ por citometría de flujo. Para analizar la supervivencia, ratones C57BL/6 primero se administraron los diferentes hidrogeles y 21 días después se retaron con melanoma, se registró su crecimiento tumoral cada tercer día. Se encontró que el uso de andamios de GE/HA aumentó los porcentajes tanto de las CDs como de los macrófagos en condiciones *in vitro*. Además, los andamios con CpGs y MAGE A5, incrementaron la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86). En los análisis del efecto de los andamios *in vivo* se encontró que, a los 7 días el tratamiento con hidrogeles con CpGs y los hidrogeles con MAGE A5, registraron un porcentaje CDs mayor al de los andamios solos; así también estos grupos tuvieron un MIF para MHCII mayor en comparación con los hidrogeles de GE/HA.

En el caso de los macrófagos MHCII⁺ F4/80 los ratones tratados con hidrogeles de GE/HA con CpGs o MAGE A5 presentaron un MIF para MHCII mayor en comparación con el hidrogel de GE/HA. También se observó que los ratones tratados con andamios de GE/HA con CpGs o MAGE A5, tuvieron mayor sobrevida y un menor crecimiento tumoral que los ratones control sin tratamiento, lo cual se correlacionó con la mayor MIF para moléculas coestimuladoras y MHCII; y a los porcentajes de células, que fueron mayores al usar andamios acoplados a CpGs o MAGE A5 en comparación al grupo sin tratamiento en condiciones *in vitro*. Por lo tanto, el uso de andamios brinda un medio propicio para la proliferación y activación de las APC, debido a que los biomateriales que los componen mejoran la interacción con las células a través de los receptores CD44, RHAAM y HARE. En tanto que los CpGs acoplados inducen la producción de citocinas para establecer un medio proinflamatorio óptimo para la activación celular, y el uso de antígenos MAGE A5 promueve una respuesta dirigida a las células tumorales.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 *La piel*

La piel es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano, se estima que constituye el 16% del peso corporal (Mcknight et al. 2021). Es un órgano que realiza una amplia gama de funciones, la más importante de ellas es la de barrera que brinda protección contra el daño causado por agentes físicos, químicos o patógenos, y particularmente la radiación solar (Dehdashtian et al. 2018; Mcknight et al. 2021). Además, la piel lleva a cabo la regulación de la temperatura corporal, por medio de las glándulas, los vasos sanguíneos y el tejido adiposo; ayuda a la percepción del ambiente externo por medio de mecanorreceptores y participa en la síntesis de la vitamina D (Junqueira y Carneiro, 2022; Mcknight et al. 2021).

La piel está compuesta por epidermis, dermis e hipodermis, considerada la capa más profunda formada por tejido conjuntivo (figura 1) (Junqueira y Carneiro, 2022; Pawlina y Ross, 2020). A su vez la piel se clasifica en piel delgada y gruesa; la piel delgada es la más abundante en el cuerpo y en ella se encuentran folículos pilosos y las glándulas sudoríparas (figura 1). En tanto que la piel gruesa se encuentra únicamente en las palmas de manos y las plantas de los pies y en algunas regiones cercanas a articulaciones móviles (Junqueira y Carneiro, 2022; Pawlina y Ross, 2020)

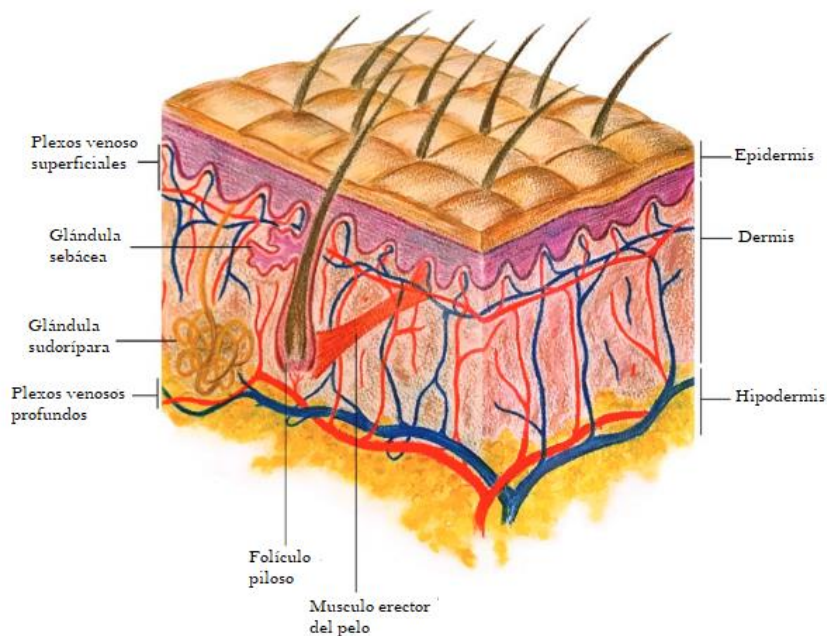


Figura 1.- Estructura de la piel. Se muestran las tres capas de la piel: epidermis, dermis e hipodermis, así como estructuras anexas: folículo piloso y glándulas. Modificado de Dehdashtian et al. 2018.

La epidermis es un epitelio plano estratificado con estrato córneo. En la piel delgada, la epidermis está formada por cuatro capas o estratos: basal, espinoso, granuloso, córneo, y en el caso de la piel gruesa se tiene un estrato adicional, el estrato lúcido (Pawlina y Ross, 2020)

El estrato basal o germinal es la capa más profunda de la epidermis, está constituido por una sola fila de células cúbicas o cilíndricas adheridas a la lámina basal por medio de hemidesmosomas (Pawlina y Ross, 2020; Sheedlo, 2006). Las células de esta capa tienen una alta actividad mitótica que dan origen a los queratinocitos. Estos queratinocitos migrarán y se desarrollarán en los estratos superiores en un periodo de 15-30 días (Junqueira y Carneiro, 2022; Pawlina y Ross, 2020). Así también este estrato posee melanocitos, células de Langerhans (CL), y células de Merkel (Dehdashtian et al. 2018; Lowe y Anderson 2015).

El estrato espinoso recibe su nombre de las proyecciones citoplasmáticas que simulan a espinas, este estrato tiene un espesor variable y estas evaginaciones están unidas por medio de desmosomas (Lowe y Anderson, 2015; Pawlina y Ross, 2020).

El estrato granuloso tiene un grosor de 1-3 filas de células alargadas, presenta numerosos gránulos que en su interior llevan proteínas ricas en hialina fosforilada y cisteína, que son

precursores de la filagrina importantes para la construcción de tonofibrillas o filamentos de queratina (Lowe y Anderson, 2015; Pawlina y Ross, 2020; Sheedlo, 2006).

El estrato córneo está conformado por queratinocitos totalmente aplanados que han perdido su núcleo, organelos celulares y su contenido citoplasmático para llenarse casi por completo de filamentos de queratina (Pawlina y Ross, 2020). Este estrato está recubierto por una capa de lípidos que proporciona una barrera contra el agua. El grosor de esta capa es sumamente variable y puede ser de utilidad para distinguir la piel delgada o gruesa, ya que como su nombre lo indica la piel gruesa, tiene un mayor espesor en el estrato córneo, debido a que estas regiones se encuentran en constante fricción con el medio externo. Además, en la piel gruesa se logra distinguir el estrato lúcido que está contenido en el estrato córneo. Este estrato adicional tiene un aspecto transparente y al igual que el estrato córneo está formado por queratinocitos muertos (Sheedlo, 2006).

Aunque la epidermis está compuesta en un 85% de queratinocitos (Pawlina y Ross, 2020), también se encuentran otros tipos celulares, como las células de Merkel ubicadas en el estrato basal, que cumplen funciones sensitivas al asociarse con las terminaciones nerviosas periféricas (Lowe y Anderson, 2015). También se pueden encontrar las CL, que se distribuyen en los diferentes estratos de la epidermis, aunque se ubican mayormente en el estrato espinoso y cuya función principal es la de presentar antígenos para generar una respuesta inmune adaptativa como se explicará en el capítulo 2.3.5 (Pawlina y Ross, 2020).

Los melanocitos, son otro tipo de células de la epidermis. Se localizan en la unión de la dermis y la epidermis en la superficie de la membrana basal como células individuales que interactúan con queratinocitos adyacentes (Damsky et al. 2011). En comparación con otros tipos celulares se encuentran en menor proporción, guardando una relación de 1:40 (Davis et al. 2019; Pawlina y Ross, 2020). Los melanocitos son los encargados de producir la melanina, un pigmento de la piel cuya función es absorber la radiación ultravioleta (UV) y prevenir daños al DNA (Davis et al. 2019). Esta melanina posteriormente será transferida a los queratinocitos y le brindará el pigmento a la piel (Pawlina y Ross, 2020).

La dermis es una capa de tejido conjuntivo que le da sostén mecánico y resistencia a la piel. Se divide en dos: dermis papilar y dermis reticular (Lowe y Anderson, 2015). La dermis papilar es la más superficial, posee abundantes evaginaciones que se denominan papilas; y

está compuesta por tejido conjuntivo laxo (Lowe y Anderson, 2015). Por otra parte, la dermis reticular es la más gruesa y está conformada por tejido conjuntivo denso y posee muchos menos fibroblastos en comparación a la dermis papilar (Lowe y Anderson, 2015; Pawlina y Ross, 2020).

Mientras que la hipodermis es la capa más profunda de la piel, y está formada principalmente por tejido adiposo. Esta composición permite retener calor y amortiguar presiones físicas; además de ser una fuente de almacenamiento de reservas energéticas (Lowe y Anderson, 2015).

2.2 *Melanoma*

2.2.1 *Epidemiología*

El melanoma es un tipo de cáncer que surge de la transformación maligna de los melanocitos (Matthews et al. 2017; Saginala et al. 2021). Esta enfermedad representa tan solo el 1% de los cánceres en piel, sin embargo, es uno de los más agresivos al ser responsable del 80% de las muertes (Saginala et al. 2021). El melanoma representa el 1.7% de los diagnósticos por cáncer, teniendo una edad promedio de detección de 65 años (Saginala et al. 2021).

Históricamente se ha considerado que el melanoma es una enfermedad poco común, sin embargo, su incidencia ha ido en aumento desde hace 50 años, especialmente en los países desarrollados. Por ejemplo, en Reino Unido se registró una tasa de incidencia de 5.9 en 1982 y para el año 2011 ésta llegó a 19.8, mientras que en Suecia hubo un aumento de 13 a 28.3 y en Australia de manera alarmante hubo un incremento de 26.4 a 51.6 (Matthews et al. 2017).

En México la incidencia es baja representando a penas el 1% de los cánceres, con dos mil casos registrados durante el 2020 (Sung et al. 2021).

2.2.2 *Factores de riesgo*

El riesgo de desarrollar melanoma está relacionado a factores tanto ambientales, como genéticos (Berwick et al. 2016; Shannan et al. 2016). Sin embargo, la exposición a la radiación solar es el principal factor causante de la enfermedad, aunque este a su vez es modulado por los factores genéticos y el tipo de melanina producida (Saginala et al. 2021).

La exposición a la radiación solar, en particular a la radiación UV, induce la formación de dímeros de timina, produciendo anomalías que no pueden ser reparadas y causa errores en la replicación; y finalmente mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, promoviendo la carcinogénesis (Saginala et al. 2021).

La radiación UV es parte del espectro electromagnético con una longitud de onda de 100-400 nm y se divide en tres subtipos: UVC (de 100-280 nm), UVB (de 280-315 nm) y UVA (de 315-400 nm) (Mcknight et al. 2021). De los cuales la radiación UVA es a la que estamos más expuestos, teniendo 20-40 veces mayor exposición que a la radiación UVB. Lo anterior adquiere relevancia ya que la radiación UVA induce daño oxidativo en el ADN, generando dímeros de pirimidina. Adicionalmente este tipo de daño tiene una menor tasa de reparación y por ende mayor tasa de mutación (Saginala et al. 2021).

La melanina es la molécula principal relacionada con la protección de la piel a los rayos UV, sobre todo la eumelanina, pero la expresión de esta varía en los grupos humanos. Así las poblaciones caucásicas o de piel clara son más propensas a esta enfermedad debido a que producen mayores cantidades de feomelanina la cual brinda una protección menor contra la radiación UV, en comparación eumelanina, la cual se presenta mayormente en personas de piel oscura (Matthews et al. 2017; Saginala et al. 2021).

Otro factor de riesgo importante es el número de nevos, formaciones de tumores de benignos conformados de melanocitos, en un individuo. Se ha reportado que las personas con más de 100 nevos tienen un riesgo de hasta 7 veces mayor de desarrollar melanoma que las personas con una cantidad menor o igual a 15 nevos. Sin embargo, no se ha logrado explicar el papel de los nevos en el desarrollo y progresión del melanoma (Berwick et al. 2016).

2.2.3 Clasificación y diagnóstico

Se definen 4 subtipos principales de melanoma:

Melanoma de extensión superficial (SSM): es el melanoma más común ya que representa el 70% de los casos, tiene un crecimiento de tipo horizontal y puede diagnosticarse de forma temprana; lo que aumenta las posibilidades de sobrevivencia. La mutación más común se produce en MAPK seguida de TERT y CDKN2A (Davies et al. 2022).

Melanoma nodular (NM): es el segundo tipo de melanoma más frecuente con un porcentaje del 15%. Sin embargo, el NM es responsable de casi la mitad de los fallecimientos. Generalmente tiene un crecimiento de tipo vertical, por lo que prolifera a través de la epidermis y rápidamente invade la dermis. Este melanoma puede surgir del SSM (Davies et al. 2022).

Melanoma lentigo maligno (LMM): Representa el 10% de los casos de melanoma. Usualmente se presenta en la piel crónicamente dañada por la radiación solar. Las mutaciones presentes casi siempre se encuentran en el gen supresor de tumores NF y los oncogenes NRAS, BRAF y ocasionalmente en KIT (Davies et al. 2022).

Melanoma lentiginoso acral (ALM): es el más raro al presentarse solamente en el 5% de los casos. Estos tumores aparecen en las superficies palmar, plantar o sublingual. El ALM es más común en personas de piel oscura. Presenta una carga mutacional baja (Davies et al. 2022).

Con relación al diagnóstico clínico, este se basa en criterios morfológicos y se realiza de manera visual con el uso de dermatoscopia de lesiones (Naik, 2021). Uno de los sistemas más empleados es el ABCDE, que se basa en cinco criterios que se observan en la lesión tumoral: la asimetría (A), la irregularidad de los bordes (B), la coloración (C), el diámetro (D) y la evolución (E) (Davies et al. 2022). Otros aspectos útiles para el diagnóstico son la picazón, dolor, sangrado o el desarrollo de una nueva lesión pigmentada en la edad adulta. No obstante lo anterior, para la confirmación del diagnóstico debe de realizarse una biopsia por escisión que incluya toda la lesión con márgenes negativos (Davies et al. 2022).

2.2.4 Estadio

La American Joint Cancer Committee (AJCC) ha establecido una clasificación para el cáncer que sirve de referencia para otorgar un pronóstico, está basado en cuatro etapas. En la etapa I y II la enfermedad está localizada y no ha migrado a los ganglios linfáticos. Por el contrario, en la etapa III se ha producido una migración hacia los ganglios regionales y la metástasis se encuentra en tránsito; y por último en la etapa IV ya se ha producido metástasis (Lozano, 2004).

Para el diagnóstico histopatológico del melanoma se utilizan dos clasificaciones: la de Clark y la de Breslow. La clasificación de Clark se basa en el grado de microinvasión observado, describiendo cinco fases o estadios: la fase I describe a un melanoma *in situ*; la fase II se refiere a melanomas con microinvasión o en el que la dermis se ve comprometida; en la fase III la dermis papilar ya se encuentra invadida; en la fase IV el cáncer ha llegado hasta la dermis reticular y finalmente la fase V describe un crecimiento del cáncer hasta la hipodermis (Acosta et al. 2009; Lozano, 2004).

Por otra parte, la clasificación de Breslow emplea el crecimiento o grosor vertical del tumor. Se obtiene midiendo en forma vertical el grosor del melanoma, desde la capa granulosa de la epidermis hasta donde se observan células tumorales (Acosta et al. 2009; Lozano, 2004).

2.2.5 Pronóstico y tratamientos

Para el pronóstico del melanoma se consideran diferentes características, una de las más importantes es la localización del tumor. Por ejemplo, las lesiones que se ubican en el cuero cabelludo, palmas de manos y plantas de los pies, están asociadas a un peor pronóstico. Otros factores que se consideran son la edad y el sexo, debido a que pacientes con mayor edad y de sexo masculino tienen un pronóstico más desfavorable (Lozano, 2004).

En la actualidad existe una amplia variedad de tratamientos contra el melanoma, como por ejemplo la resección quirúrgica, la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia (que se tratará en el capítulo 2.9), entre otros (Domingues et al. 2018). La elección del tratamiento depende de diversos factores como el estadio, la ubicación y el perfil genético del tumor (Domingues et al. 2018).

2.2.6 Remoción quirúrgica

Para los pacientes con melanoma dentro de los estadios I, II y III tipo B establecidos por la AJCC, donde aún no se ha diseminado el cáncer a otros órganos, se recomienda una remoción local amplia (Davies et al. 2022; Domingues et al. 2018). Los márgenes para la remoción quirúrgica recomendados son los siguientes: para melanomas *in situ* se recomienda dejar bordes de 0.5 cm; bordes de 1 cm para melanomas con un grosor de Breslow menor a 2 mm y bordes de 2 cm en el caso de tumores con grosor de Breslow mayor a 2 mm (Davies et al.

2022; Domingues et al. 2018). Después de la extracción se recomienda terapias adyuvantes como la terapia dirigida o inmunoterapia (Domingues et al. 2018).

Existen dos aspectos de suma importancia en la elección de la terapia para cánceres en estadios más avanzados, el primero se refiere a los efectos adversos y el segundo a la eficiencia, que puede reducirse cuando se produce resistencia (Shannan et al. 2016).

2.2.7 Quimioterapia

La quimioterapia fue el primer tratamiento para melanomas avanzados (Domingues et al. 2018). Este tratamiento se enfoca en inhibir la proliferación celular, con lo cual se previene de una invasión y metástasis (Nakamura y Maeda, 2022). Su mecanismo de acción consiste en la alteración o inhibición de la síntesis de ADN, ARN o de proteínas, lo cual conduce a la muerte celular; sin embargo, este tratamiento también tiene efecto sobre las células sanas (Nakamura y Maeda, 2022). La quimioterapia puede clasificarse en:

- Agentes alquilantes: producen un grupo alquilo inestable $R - CH_2^+$ que reacciona con los centros nucleofílicos de proteínas y ácidos nucleicos, y por lo tanto inhiben la replicación y transcripción del ADN (Nakamura y Maeda, 2022).
- Antimetabolitos: inhiben la replicación o reparación del ADN (Nakamura y Maeda, 2022).
- Agentes antimicrotubulares: alteran la producción y funcionamiento de elementos del citoesqueleto (Nakamura y Maeda, 2022).
- Antibióticos: inhiben la síntesis de ADN y ARN (Domingues et al. 2018).

Los dos medicamentos quimioterapéuticos más empleados para melanoma son la dacarbizina y la temozolamida, ambos agentes alquilantes. En el caso de la dacarbizina se ha reportado una respuesta completa en más del 5% de los casos y una supervivencia de 5 años del 2-6 % de los casos. Por otra parte, la temozolamida ha mostrado una ligera mejora en la supervivencia libre de progresión (Domingues et al. 2018).

También se han empleado otros medicamentos como el cisplatino, capaz de inducir daños en el ADN, lo cual puede mediar la inhibición en la proliferación y/o apoptosis por la vía

mitocondrial; y el 5-fluorouracilo que junto con la capecitabina actúan en contra de la enzima timidilato sintasa causando un deterioro y daño al ADN (Mattia et al. 2018).

2.2.8 Radioterapia adyuvante

Este tratamiento busca la eliminación de las células tumorales residuales después la extirpación quirúrgica del tumor, auxiliando en la reducción de los tumores que no se lograron retirar por completo (Rotte y Bhandaru, 2016). Desgraciadamente, en el caso del melanoma desde principios del siglo XX se ha considerado que estas células tienen una resistencia inherente a esta terapia (Rotte y Bhandaru, 2016).

2.3 Sistema inmunológico

2.3.1 Respuesta inmune

La respuesta inmune se refiere a la acción coordinada y conjunta de células y moléculas que responden al entrar en contacto con sustancias o agentes extraños al cuerpo (Abbas, et al. 2018). La función principal del sistema inmune es la defensa en contra de agentes extraños al cuerpo (Abbas et. al 2018).

La inmunidad clásicamente se divide en dos tipos: inmunidad innata, natural o nativo, y la inmunidad adaptativa (Abbas et al. 2018). La inmunidad innata corresponde a la primera respuesta defensiva, y efectúa mecanismos de defensa tanto celulares como bioquímicos. Las diferencias entre la inmunidad innata y adaptativa se exponen en el cuadro 1. Sin embargo, hay que destacar que estas respuestas no son independientes puesto que la respuesta innata puede dirigir la respuesta adaptativa y viceversa.

Cuadro 1.- Diferencias entre la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa

	Respuesta inmune innata	Respuesta inmune adaptativa
Tiempo de respuesta	Respuesta inmediata	Varios días
Receptores	Las células presentan receptores funcionales antes de la infección	Se hace una selección clonal y luego una expansión
Respuesta a infecciones posteriores al mismo patógeno	No se producen cambios en la velocidad de la respuesta inmune.	Hay un precedente (respuesta primaria) que permite aumento en la velocidad y eficacia de la respuesta
Diversidad de receptores	- Se limitan a los originados por la línea germinal	-Puede reconocer millones de diferentes antígenos -Codificados por genes producidos por recombinación

2.3.2 Células del sistema inmune

El término leucocito se refiere a las células que forman parte del sistema inmunológico, entre ellos se encuentran los granulocitos, macrófagos, células dendríticas (CDs), así como los diferentes tipos de linfocitos. Todas las células sanguíneas incluidos los leucocitos se originan en la médula ósea a partir de una célula madre hematopoyética (HSC) por medio de un proceso de diferenciación denominado hematopoyesis (Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

Las HSC como células madre sufren divisiones asimétricas, de tal forma que generan una célula hija que conserva las mismas características que la célula original y la otra célula generada da lugar a una célula progenitora mieloide-eritroide común o una célula progenitora linfoide (Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). La línea mieloide genera las células ligadas a la inmunidad innata y la línea linfoide genera células relacionadas a la inmunidad

adaptativa, como se muestra en la figura 2. Un aspecto importante es el origen de las CD's ya que estas pueden generarse a partir de la línea linfóide pero la mayoría surgen de la línea mieloide. Además, algunas de estas células como las CL (un tipo de CD's que se distribuyen en la dermis), se desarrollan a partir de precursores embrionarios del saco vitelino o del hígado fetal (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

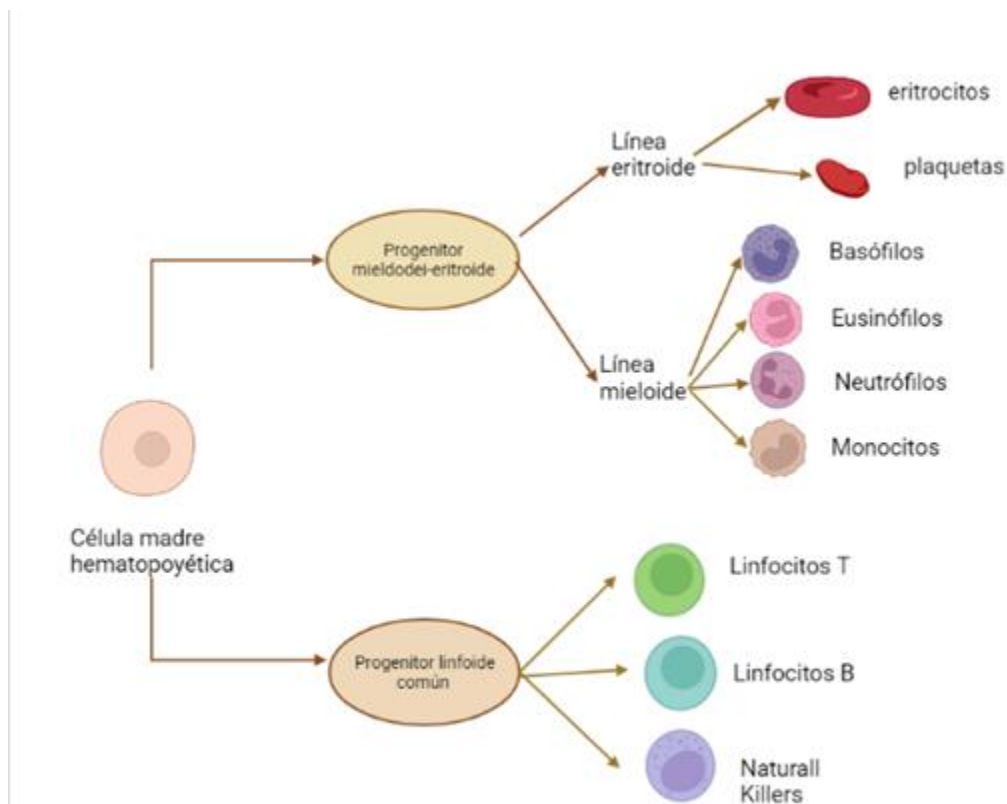


Figura 2.- Origen de las células sanguíneas

Como se muestra en la figura 2, la línea mieloide da origen a los granulocitos y los monocitos. El término granulocitos se refiere a un conjunto de células de la línea mieloide que se caracterizan por la presencia de un núcleo lobulado y una alta cantidad de gránulos en el citoplasma (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Los gránulos tienen diferentes funciones, la principal es dañar a agentes patógenos, pero también regulan el tráfico y actividad de otros leucocitos y algunos ayudan a la remodelación del tejido (Owen et al. 2014). Este grupo engloba las siguientes células: neutrófilos, basófilos y eosinófilos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

2.3.3 *Macrófagos*

Los monocitos en sangre se transportan a los tejidos como parte de una respuesta inflamatoria y su función principal es la de mantener el reservorio de macrófagos y CDs en los tejidos, ya sea como un estado estacionario o parte de una respuesta inflamatoria (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Murray y Wynn, 2011; Owen et al. 2014). Sin embargo, aunque muchos macrófagos surgen a partir de la diferenciación de las HSC, existen macrófagos de vida larga que derivan de precursores del saco vitelino o del hígado fetal y se encuentran en diferentes tejidos con fenotipos especializados (células de Kupffer en hígado, macrófagos alveolares en el pulmón o células microgliales del sistema nervioso) (Abbas et al. 2018; Wynn et al. 2013).

Por otro lado, los macrófagos tienen diversas funciones, en primer lugar, son fagocitos profesionales, es decir se encargan de reconocer, procesar y eliminar tanto microorganismos externos como detritos celulares, células necróticas o moribundas, como parte de esta función también pueden actuar como células presentadoras de antígenos (APCs) (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Murray y Wynn, 2011). La APCs son células con la capacidad de fagocitar agentes patógenos y procesarlos para presentárselos a los linfocitos T y activarlos, por lo que se considera que forman un puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014)

Además, los macrófagos pueden promover la inflamación secretando proteínas que activan y reclutan leucocitos, así como suprimir la inflamación y promover la reparación y homeostasis del tejido, estimulando la formación de vasos sanguíneos y de matriz extracelular rica en colágeno (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Murray y Wynn, 2011).

Dada la variedad existente en el origen, ubicaciones anatómicas, perfiles transcripcionales y funciones de los macrófagos, esta población es considerada altamente heterogénea y como consecuencia existe más de una clasificación. La primera se basa en el origen de los macrófagos, antes expuesta, en donde pueden generarse a partir de monocitos, saco vitelino o hígado fetal (macrófagos, macrófagos alveolares o células de Kupffer) (Murray y Wynn, 2011; Wynn et al. 2013). Otra clasificación consiste en el estado funcional que presentan, ya sea M1 o M2 (Murray y Wynn, 2011; Wynn et al. 2013).

Los M1 conocidos también como macrófagos clásicamente activados, se encargan de la defensa contra los microorganismos externos, por medio de la fagocitosis y estimulan la inflamación por lo que pueden ocasionar daño tisular y muerte tumoral (Murray y Wynn, 2011; Wynn et al. 2013). De manera *in vitro* se ha demostrado que se induce la polarización hacia M1 con citocinas de una respuesta Th1 como factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (INF- γ), en tanto que en el organismo se reclutan como consecuencia de un daño a los tejidos o una infección. Estos macrófagos generan una respuesta inflamatoria secretando citocinas proinflamatorias como interleucinas (IL) IL- β , IL-6, IL-12, IL-23 y TNF- α ; y especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico, que median un proceso oxidativo que contribuye a la muerte de organismos patógenos (Murray y Wynn 2011; Zhang et. al, 2021).

Por el contrario, los macrófagos M2 o macrófagos alternativamente activados poseen actividad antiinflamatoria y ayudan en los procesos de cicatrización y fibrosis de las heridas, restaurando el tejido. Los M2 realizan esta función apoyados en la secreción de factores de crecimiento, metaloproteasas y quimiocinas específicas para reclutar fibroblastos y células T helper 2 (Th2) y T reguladoras (Treg) adicionalmente también presentan antígenos a dichas células (Murray y Wynn, 2011; Wynn et al. 2013). De manera *in vitro* los macrófagos se polarizan a M2 por el uso de citocinas de una respuesta Th2, como IL-4 e IL-13. Los M2 producen citocinas antiinflamatorias como IL-10 y TNF- β , también importante para la reparación de tejidos (Murray y Wynn 2011; Zhang et al. 2021).

En cuanto a su identificación fenotípica, los marcadores más reconocidos y utilizados clásicamente para reconocer a los macrófagos en general son: F4/80+, CD64+ (Guilliams et al. 2016; Wynn et al. 2013). En tanto que para distinguir monocitos en distintas etapas de diferenciación se utiliza Ly6c. Los monocitos residentes se distinguen como *Ly6c^{lo}* mientras que los macrófagos inflamatorios se caracterizan por ser *Ly6c^{hi}* (Hey et al. 2016)

2.3.4 Células de línea linfoide

La línea linfoide abarca tres tipos principales de células: linfocitos B, linfocitos T y células natural killer (NK), representan entre el 20-40% de las células circundantes en sangre y el 99% de las células en linfa (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

Morfológicamente los tres tipos celulares tienen características similares, de forma inmadura son células pequeñas, con pocos organelos y con núcleos con heterocromatina, por lo que su reconocimiento se realiza por medio de las proteínas de membrana utilizando la nomenclatura CD (cluster of differentiation) (Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

Células natural killer (NK)

Las células NK, aunque proceden de la línea linfocítica a diferencia de los linfocitos no presentan receptores específicos para antígeno (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Forman parte de la respuesta inmune innata al eliminar microorganismos patógenos, sin embargo, también tienen una capacidad alta para reconocer células estresadas, dañadas o anormales e incluso las células tumorales; al detectar la ausencia de complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHCI) por medio de receptores (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

Linfocitos

Existen dos tipos de linfocitos: linfocitos T y linfocitos B. Estos son los únicos capaces de expresar receptores para antígenos que se pueden distribuir de manera clonal, además las células B y T se distinguen por expresar el receptor de células B (BRC) y receptores de células T (TRC) (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). Los linfocitos que no han entrado en contacto con los antígenos se denominan vírgenes, una vez que reconocen al antígeno se induce un proceso de proliferación y diferenciación hacia su forma activa denominada linfocitos efectores, de mayor tamaño con un núcleo con eucromatina y con mayores cantidades de citoplasma y ARN citoplásmico (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). Algunos de los linfocitos activados en un primer evento se diferencian a linfocitos de memoria que pueden sobrevivir en estado inactivo durante meses o inclusive años después de la infección (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

Los linfocitos B se originan y maduran en la médula ósea (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). Los linfocitos B al ser activados se diferencian en células

plasmáticas cuya función principal es la secreción de anticuerpos (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). Existen algunos subgrupos de linfocitos B como los linfocitos B foliculares, son los más numerosos y los que generan anticuerpos con alta afinidad; los linfocitos B de la zona marginal, producen anticuerpos con afinidades distintas, y los linfocitos B-1 que se encuentran en tejidos mucosos, cavidad pleural y peritoneal (Abbas et al. 2018).

Por otro lado, los linfocitos T maduran en el timo, y a diferencia de los linfocitos B que pueden reconocer antígenos solubilizados o particulados, solo reconocen antígenos por medio del complejo MHC-péptido (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014). Una vez activados pueden diferenciarse en células con diferentes funciones: muerte, activación o regulación (Murphy et al. 2008). Los linfocitos T citotóxicos CD8+ se encargan del reconocimiento y eliminación de células infectadas por virus u otros microorganismos que pueden vivir dentro de la célula, así como células cancerosas; las células T auxiliares o cooperadoras CD4+ activan las células B estimuladas para que secreten anticuerpos. Por último, las células T reguladoras CD4+ como su nombre lo indican se encargan de regular la respuesta inmune suprimiendo la actividad de linfocitos para evitar una respuesta inmune autorreactiva (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008; Owen et al. 2014).

2.3.5 Células dendríticas (CDs)

Las CDs son las células presentadoras de antígenos por excelencia que se distribuyen en los tejidos linfáticos, epitelios mucosos y parénquima de los órganos (Abbas et al. 2018). Las CDs son nombradas así debido a sus largas proyecciones digitiformes con una morfología similar a las dendritas de las neuronas, estas proyecciones le permiten a la célula capturar antígenos y fagocitarlos (Abbas et al. 2018; Murphy et al. 2008).

Las CDs pueden tener diferentes orígenes, algunas pueden derivarse de la línea mieloide y otras de la línea linfoide; además las CL que residen en la dermis, se originan en una etapa temprana del desarrollo embrionario (Satpathy et al. 2012). Actualmente las CDs se clasifican en 4 tipos: Células dendríticas clásicas o convencionales (cCDs), células dendríticas plasmacitoides (pCDs), CL y células dendríticas derivadas de monocitos (Cabeza-Cabrerizo et al. 2021; Guilliams et al. 2016; Satpathy et al. 2012)

Las cCDs son una población altamente fagocítica con gran capacidad de presentar antígenos, por lo que generalmente se encuentran en casi todos los tejidos. Tienen un tiempo de vida media de 3-5 días y migran al capturar antígenos por medio de los vasos linfáticos hacia las zonas ricas en células T en los órganos linfoides secundarios (Guilliams et al. 2016; Satpathy et al. 2012). Fenotípicamente se reconoce a las CDs por el uso del marcador CD11c, así como algunos adicionales como CD26 o moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86 (Cabeza-Cabrerizo et al. 2021; Guilliams et al. 2016). Por lo que las cDC se definen como MHCII+ (al ser APCs) y CD11c+.

A diferencia de las demás CDs, las pCD presentan una morfología esférica característica de las células plasmacitoides; su función principal es la secreción de INF-I después de un encuentro con material viral, y no son fagocíticas debido a que mantienen una alta tasa de recambio de MHC (Satpathy et al. 2012).

Las CL se originan a partir de monocitos provenientes del hígado fetal y se caracteriza por localizarse en la piel, tener una alta capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos, y para migrar a los ganglios linfáticos una vez activadas. Adicionalmente secretan IL-10 de manera constitutiva, sin embargo, son una población enigmática al presentar marcadores de macrófagos (F4/80) y de CDs (CD11c) (Cabeza-Cabrerizo et al. 2021; Guilliams et al. 2016; Satpathy et al. 2012).

Como su nombre lo indica las células dendríticas derivadas de monocitos provienen de monocitos, por lo que poseen la capacidad de producir TNF y óxido nítrico sintasa, que se presentan en los macrófagos, por lo que son una población controvertida (Cabeza-Cabrerizo et al. 2021).

En general las CDs inmaduras ubicadas fuera de los ganglios se encuentran en las mucosas en busca de agentes patógenos. Al fagocitarlos y procesarlos sufren un proceso de maduración, en el cual su fenotipo se ve modificado para dirigirse a los ganglios linfáticos y presentar dichos antígenos a los linfocitos T (Owen et al. 2014).

2.4 Órganos linfoides

Los órganos linfoides se dividen en dos tipos, los órganos linfoides primarios o generadores y los órganos linfoides secundarios. Los órganos linfoides primarios engloban la médula ósea y el timo, los cuales secretan factores de crecimiento y señales moleculares para la maduración de los linfocitos B y T respectivamente. Así también brindan un microambiente adecuado para la presentación de antígeno, el reconocimiento y selección (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

En cuanto a los órganos linfáticos secundarios, están conformados por el bazo y los ganglios linfáticos, las amígdalas y el tejido linfoide asociado a mucosas. El bazo y los ganglios linfoides se caracterizan por poseer una cápsula fibrosa que los contiene (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). El bazo se encuentra en el lado superior izquierdo de la cavidad abdominal es un órgano en forma ovoide sumamente vascularizado, puesto que una de sus principales funciones es el filtrado de los eritrocitos para eliminar aquellos dañados o defectuosos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Aunado a esto también atrapa antígenos presentes en la sangre transportada por la arteria esplénica, los cuales funcionan para iniciar respuestas adaptativas. Aunque el bazo no posee irrigación vía linfática, la circulación de la sangre permite que el bazo responda a infecciones sistémicas (Abbas et al. 2018). Los ganglios linfáticos son estructuras encapsuladas que tienen circulación sanguínea y que se encuentran a lo largo de los conductos linfáticos, poseen un alto contenido de macrófagos, CDs y linfocitos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Las CDs que se distribuyen por la piel, el aparato digestivo o respiratorio capturan antígenos y maduran para migrar por las vías linfáticas hacia los ganglios, que poseen un microambiente adecuado para la presentación de antígenos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Adicionalmente todas las mucosas poseen barreras epiteliales que tienen un alto contenido de células inmunitarias tanto innatas como adaptativas que actúan de manera conjunta, que se conocen como tejido linfoide asociado a mucosas (MALT); algunas veces se le otorga un nombre más específico dependiendo de su ubicación, por ejemplo: tejido linfoide asociado a bronquios (BALT), tejido linfoide asociado a nariz (NALT) o tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). El GALT es uno de los tejidos más descritos, ya que presenta agrupaciones laxas apenas organizadas y estructuras con un alto

grado de organización como las amígdalas, las placas de Peyer, los adenoides y el apéndice (Owen et al. 2014).

2.5 *Inmunidad innata*

La inmunidad innata es parte de la primera línea de defensa del cuerpo que se produce una vez que los agentes patógenos superan las barreras físicas y químicas del organismo (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Las barreras físicas se conforman por los epitelios que recubren el cuerpo separando el ambiente externo del tejido interno; estas son la piel, y las superficies mucosas que se encuentran en las vías digestivas, respiratorias y genitourinarias, así como tejido glandular secretoras de saliva, lágrimas y las mamas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Otras barreras físicas como los cilios en las vías respiratorias actúan en conjunto con el moco para expulsar a los agentes patógenos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Los epitelios impiden la entrada de los microorganismos por medio de diversas estrategias entre los que se incluyen a las uniones intercelulares como las herméticas y las tipo ocluyentes. Sin embargo, los epitelios no solo proporcionan una protección física, sino también de tipo química, las células epiteliales secretan sustancias con actividad microbiana como las defensinas y las catelicidinas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Aunado a lo anterior, las mucosas también pueden contener glándulas donde se secreta saliva, lágrimas y moco, brindando una defensa de tipo química. La saliva y las lágrimas contienen enzimas antimicrobianas como la lisozima; y el moco es rico en glucoproteínas llamadas mucinas que atrapan a gran cantidad de microorganismo (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014). Existen otras defensas de tipo químico como las enzimas digestivas y el pH ácido presente en el estómago, la piel y el tracto urinario (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Cuando los agentes patógenos son capaces de atravesar estas barreras y llegan al tejido conjuntivo, son reconocidos por las células fagocíticas, principalmente los neutrófilos y macrófagos, que cuentan con una gamma de receptores de membrana y proteínas solubles capaces de reconocer componentes microbianos (Owen et al. 2014).

Estos receptores se generan desde la línea germinal por lo que su variabilidad es limitada en comparación con los que se pueden generar en la inmunidad adaptativa, sin embargo, reconocen estructuras conservadas, ligadas a la viabilidad y virulencia, que están presentes en una gran diversidad de microorganismos (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010). A estos motivos que se han conservado en la superficie de los microorganismos se les llama patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como, por ejemplo: RNA bicatenario, secuencias CpGs no metiladas presentes en bacterias, y proteínas microbianas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

El sistema inmune innato también puede reconocer células que han sido infectadas o dañadas por diversos agentes, las células dañadas o en proceso de muerte producen una serie de componentes que se han denominado patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Algunos ejemplos son la proteína de choque térmico (HSP), el ácido úrico y proteínas de alta movilidad (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010).

2.6 Presentación de antígenos

2.6.1 Reconocimiento de antígenos

Tanto los PAMPs como los DAMPs son reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que pueden ser expresados tanto en la superficie celular, como en vesículas fagocíticas y en el citosol (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010). Cuando se produce la unión del ligando a un PRR se activa un proceso de señalización que promueve la síntesis de sustancias antimicrobianas, citocinas proinflamatorias, así como la fagocitosis (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010).

Existen diversos tipos de PRR entre los que destacan los receptores tipo Toll (TLR), y receptores tipo Nod (NLR) y receptores de lectina tipo C (CLR). Los receptores tipo Toll son una amplia familia, los receptores del 1-10 se encuentran en humanos y en ratones, aunque TLR 10 no es funcional en ratones. Son dímeros (homo o heterodímeros) que poseen repeticiones ricas en leucina que constituye el dominio de unión al ligando (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010).

Los TLR se encuentran tanto en la superficie celular, como en las membranas de lisosomas y endosomas, y se encargan de reconocer tanto a los DAMPs como a los PAMPs. Cuando se une el ligando a un TLR se culmina con la activación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-I o IRF-3 que conducen a la producción de citocinas proinflamatorias, moléculas para la maduración de CD4 y otras respuestas inmunológicas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010).

Los receptores NLR son una familia de proteínas citosólicas activadas por PAMPs y DAMPs, dentro de esta destacan NOD1 y NOD2, ambas proteínas detectan distintas estructuras generadas durante la síntesis y degradación de los peptidoglicanos de las bacterias y activan la transcripción de citocinas inflamatorias y proteínas antimicrobianas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014; Turvey y Broide, 2010).

Los receptores CLR se encuentran en la membrana plasmática y se encargan de identificar a los carbohidratos de hongos, bacterias, parásitos, virus, e incluso alérgenos; algunos activan la fagocitosis (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

2.6.2 Maduración de CD4

Las CD4 se activan por señales y citocinas, y como consecuencia se pierde su adhesividad al epitelio o a los tejidos, después se expresa el receptor para la quimiocina CCR7 que se une a las quimiocinas CCL29 y CCL21, que se producen en los vasos linfáticos. De esta manera, se promueve la migración de las CD4 a los ganglios linfáticos, en donde residen linfocitos T vírgenes. Además, las CD4 aumentan la expresión de complejos péptido-MHC, así como de moléculas coestimuladoras (Abbas et al. 2018; Yin et al. 2021).

2.6.3 Procesamiento antigénico

Para montar una respuesta inmune adaptativa es necesario que los linfocitos sean capaces de reconocer antígenos. En el caso de los linfocitos B tienen receptores de células B (BCR) capaces de reconocer antígenos solubles (glucósidos, lípidos), antígenos superficiales microbianos, antígenos en las células del hospedador y sustancias químicas pequeñas. Por el contrario, los linfocitos T son incapaces de reconocer antígenos solubles, puesto que el receptor de linfocitos T (TCR) únicamente puede reconocer antígenos asociados a células

que se encuentren presentados por medio de complejos proteicos conocidos como complejo mayor (o principal) de histocompatibilidad (MHC) (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

El MHC es uno de los genes más altamente polimórficos y poligénicos. Los loci de MHC contienen dos tipos de genes MHC, los genes de la clase I y los de la clase II, que codifican dos grupos de proteínas homólogas, pero con estructuras diferentes (Abbas et al. 2018). MHC I se expresa en todas las células nucleadas, y está asociada a la normalidad de la célula, ya que en ausencia de esta molécula las células son eliminadas por las células NK. Una función de suma relevancia es la presentación de péptidos extraños por MHC I que permite la maduración de las células T citotóxicas; la presentación de péptidos por MHC I y MHC II también permite la generación de tolerancia a proteínas propias. Lo cual está determinado por la ubicación, el tipo de célula con la que se haga la interacción, así como la cronología de la expresión (Owen et al. 2014).

Las moléculas de MHC de la clase II son expresadas por las APC profesionales, como lo son las CD, los macrófagos y los linfocitos B, los cuales están más relacionados con la activación y el desarrollo de los linfocitos T CD4+, cuya función es ayudar a la activación y maduración de macrófagos y otros leucocitos para la eliminación de antígenos fagocitados, y la activación de linfocitos B para producir anticuerpos, además de la activación de células T (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Los macrófagos y los linfocitos B presentan antígenos sobre todo a las células T CD4+ previamente activadas, mientras que las CD pueden presentar y activar a los linfocitos T vírgenes. Las CD también se consideran las APC por excelencia no solo por esta capacidad sino porque expresan MHC II de manera constitutiva y pueden tener actividad coestimuladora para los linfocitos T vírgenes, al contrario de los macrófagos que deben ser activados por medio de los TLR para expresar MHC II o moléculas coestimuladoras como CD80 o CD86. (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Los antígenos y microbios ingresan a través de los epitelios como la piel, mucosas y órganos parenquimatosos que contienen numerosos capilares que drenan la linfa hasta los ganglios linfáticos regionales. Algunos antígenos son capturados por las APC que presentan diversos receptores que favorecen la endocitosis, y son transportados a los vasos linfáticos. Otros antígenos pueden estar libres y ser capturados en el bazo (Abbas et al. 2018).

Debido a que los antígenos provienen de diversas fuentes es necesario procesarlos para conseguir una longitud apropiada para entrar en la hendidura de MHC formando un complejo péptido-MHCI que es capaz de unirse a los TCR (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Existen tres rutas para el procesamiento de un antígeno: la vía endógena, la vía exógena y la presentación cruzada como se resume en la figura 3.

2.6.4 Vía endógena

La vía endógena se encarga de procesar los antígenos presentes en el citosol que pueden ser productos de la replicación viral, productos microbianos o de otros microorganismos extracelulares; pero también pueden derivarse de proteínas sintetizadas en los ribosomas libres o en el retículo endoplasmático (RE), que se pliegan inadecuadamente, no tienen un ensamblado correcto o son sobre expresados, este tipo de proteínas se encuentran principalmente en células tumorales (Abbas et al. 2018).

Estas proteínas se unen a la ubiquitina para ser procesadas por el proteasoma para su degradación y posteriormente se asocia la proteína de transportador asociado con el procesamiento de antígeno (TAP) que consta de dos unidades TAP1 y TAP 2. La proteína TAP se encarga de transportar el péptido a la luz del retículo endoplasmático rugoso (RER) en un proceso dependiente de ATP. En el RER se sintetiza las moléculas de MHCI cuyo plegamiento requiere de la participación de chaperonas como la calnexina, la calreticulina y la tapsina. La proteína TAP se asocia con la tapsina y permite que las MHCI adquieran un péptido (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Una vez unido el péptido al MHCI, este último pierde afinidad por el complejo de tapsina, y calreticulina y el complejo péptido-MHCI sale del RER y se dirige al complejo de Golgi. Desde este lugar los complejos péptido-MHCI son dirigidos a la superficie celular por medio de las vesículas exocíticas (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

2.6.5 Vía exógena

Los antígenos digeridos por esta vía son de origen extracelular, son proteínas que han sido capturadas por endocitosis (fagocitos o pinocitosis), estas generalmente proceden de diversos

microorganismos, pero también pueden provenir de células propias por medio de la formación de autofagosomas durante la autofagia (Abbas et al. 2018).

Los antígenos que son endocitados son degradados en varias etapas que se realizan en endosomas tempranos, endosomas tardíos, endolisosomas y finalmente lisosomas, entre las cuales hay una disminución progresiva de pH (Owen et al. 2014).

Las moléculas de MHCII al igual que MHCI también se sintetizan en el RER, junto con una proteína llamada cadena invariante (Ii) que se une al surco unión del péptido de MHCII, evitando así que este complejo se asocie con los péptidos de la vía endógena que están disponibles en el lumen del RER. El complejo MHCII con la Ii se transportan del RER al complejo de Golgi y a la red trans-Golgi desde donde se mueven del endosoma temprano al lisosoma. Durante su traslado a los endosomas la Ii es progresivamente degradada hasta que solo queda el péptido de cadena invariante asociado con clase II (CLIP) unido a la hendidura del péptido de MHCII (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

Por la acción de la proteína HLA-DM es posible que CLIP se intercambie con un péptido digerido por el lisosoma, esta unión estabiliza al complejo y permite que el complejo péptido-MHCII sea llevado a la superficie celular (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

2.6.6 Presentación cruzada

Debido a la división en el procesamiento de antígenos, generalmente los antígenos citosólicos o endógenos se presentan por el MHC clase I a las células T CD8+, y los antígenos en el medio extracelular son presentados por el MHC clase II a las células T CD4+. Sin embargo, existe una excepción en donde los antígenos provenientes del medio extracelular pueden ser presentados por el MHCI, esto se conoce como presentación cruzada. Esta habilidad solamente se presenta en las CDs, lo cual permite que antígenos tumorales sean presentados a los linfocitos T CD8+. Se ha descrito que los antígenos fagocitados son degradados por medio del proteasoma en lugar del lisosoma, y se continúa con el proceso descrito en la vía endógena (Abbas et al. 2018; Owen et al. 2014).

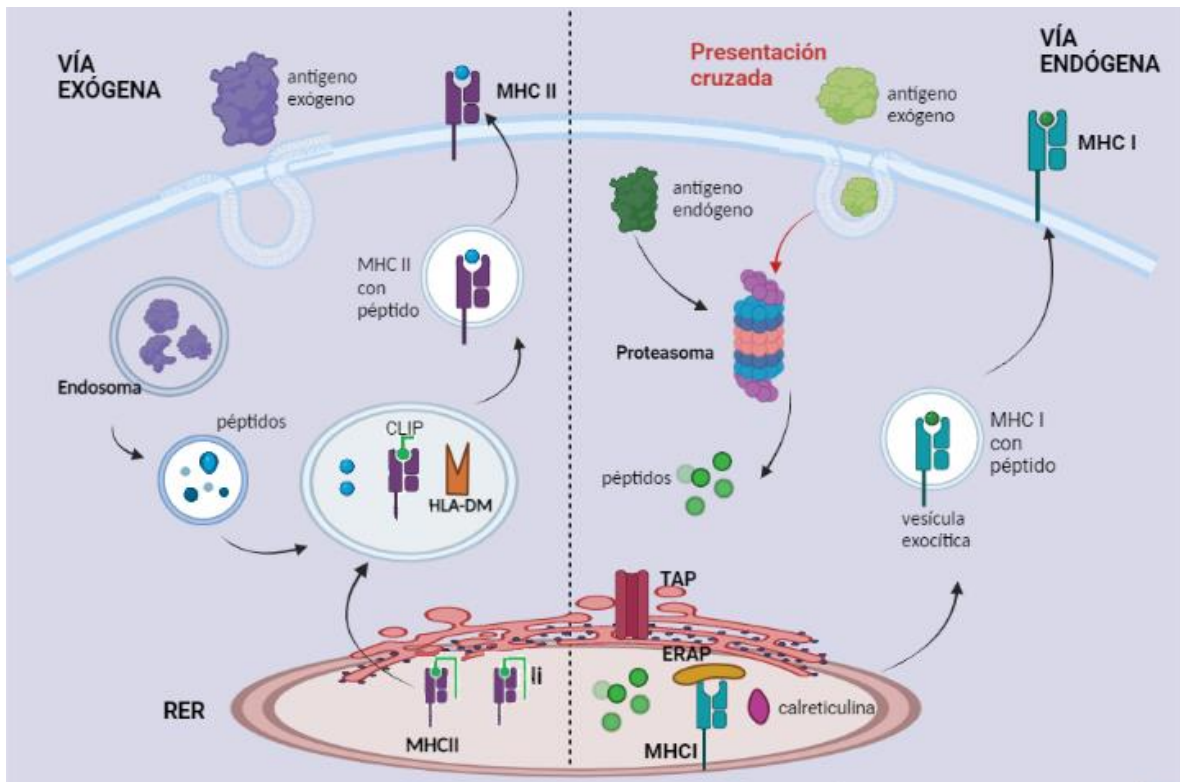


Figura 3. - Presentación de antígenos. Se muestra la vía exógena donde los antígenos se procesan para presentarse en MHC II, la vía endógena donde los antígenos endógenos se presentan por MHC I y la presentación cruzada donde los antígenos exógenos se digieren vía proteasoma para ser presentados por MHC I.

2.7 Activación de linfocitos

Para activar los linfocitos T no solo se necesita la unión del complejo péptido-MHC con los receptores TCR, también se necesita de señales coestimuladoras, la intervención de las células T CD4+ cooperadoras así como la expresión de diversas citocinas, como se muestra en la figura 4 (Dembic, 2015; Mir, 2015; Yin et al. 2021). Es importante resaltar que la unión del complejo péptido-MHCI con el receptor TCR media la especificidad de la respuesta, pero por si sola da como resultado la apoptosis o la anergia de la célula T (Mir, 2015).

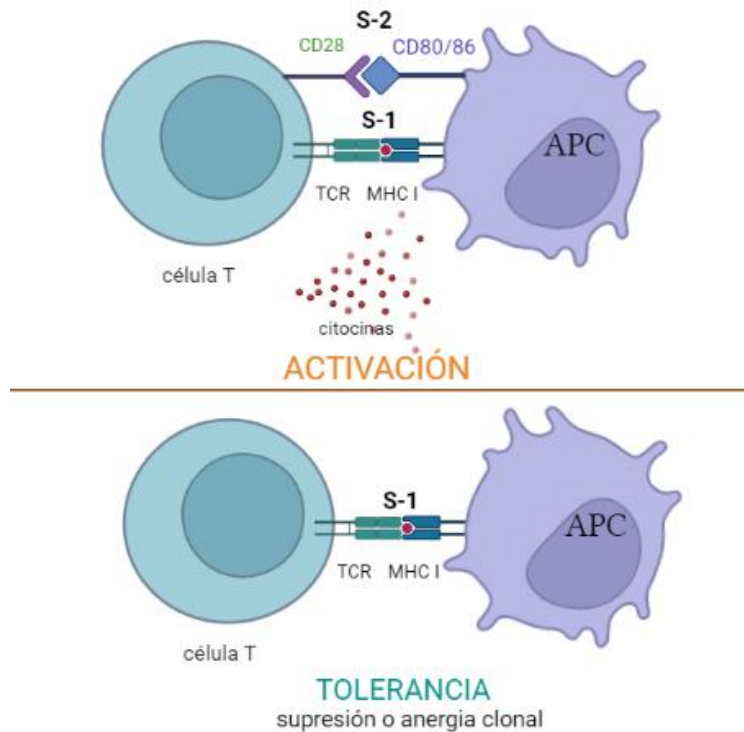


Figura 4.- Activación de células T. Para la activación de los linfocitos T se necesitan de tres señales, (S-1): la unión del receptor de linfocitos T (TCR) al complejo mayor de histocompatibilidad tipo I con el péptido acoplado (MHCI), (S-2): el reconocimiento y unión de moléculas coestimuladoras (CD28-CD80/86) y por último la presencia de citocinas. Si no se encuentran las tres señales se induce anergia o supresión de las células T. Modificada de Mir, 2015.

Una molécula coestimuladora es una proteína transmembrana que induce una cascada de señalización. Sin embargo, para la activación de las células T es necesario que primero se realice la unión de MHC con el TCR. Los ligandos de los receptores de las moléculas coestimuladoras se expresan de manera constitutiva en APC, pero los receptores se expresan en los linfocitos T (Mir, 2015). Además, es importante destacar que, aunque las APC puede ser capaces de presentar un antígeno, sin un estímulo inmunogénico no se producen las moléculas coestimuladoras necesarias para lograr establecer una respuesta inmune adaptativa por medio de los linfocitos T. Por lo que la activación de células T involucra tanto moléculas coestimuladoras con señales positivas como señales negativas con el fin de mantener la homeostasis de células T en el organismo (Mir 2015).

Las moléculas coestimuladoras mejor descritas son CD80 y CD86 que pertenecen al grupo B7, se expresan principalmente en APCs, incluidos macrófagos, CD8 y linfocitos B. La expresión de estas moléculas se ve potenciada por la presencia de microorganismos y las citocinas producidas cuando se reconocen PAMP o DAMPs por los PRR. Estas moléculas se unen a CD28 que se expresa de manera constitutiva en las células T y es el principal receptor coestimulador (Dembic 2015; Mir 2015).

La unión CD28 con sus ligandos desencadena una cascada de señalización que promueve la expresión de IL-2, que regula al alza la expresión de los genes de supervivencia celular Bcl-xL, promueve el metabolismo energético (captación de glucosa y tasa de glucólisis) y facilita la progresión del ciclo celular. Lo que, en resumen, promueve la expansión de células T y su maduración a células T efectoras o de memoria (Mir, 2015).

Durante fases posteriores la expresión de CD28 se ve disminuida y las células T comienzan a expresar el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), que se une con mayor afinidad a CD80/86. La interacción CTLA-4 con CD80/86 detiene la proliferación de linfocitos T CD4+ activados (Dembic, 2015).

También se conoce la función de CD40 que se expresa igualmente en APC. Su unión al ligando CD40-L que se expresa en células T CD4+ de manera transitoria, desencadena la producción de citocinas como IL-12, IL- α , IL-1 β e IL-16. Influye en la activación de APC y linfocitos T; y en macrófagos induce la actividad contra los patógenos fagocitados (Dembic, 2015; Mir 2015).

2.8 Microambiente tumoral y respuesta inmune antitumoral

El entorno completo del tumor se puede considerar todo un microambiente ya que, aunque se compone principalmente de células tumorales, también tienen partida las células no neoplásicas, como las células mesenquimales residentes, células endoteliales, las células inmunes infiltrantes e inflamatorias, así como los factores presentes en la matriz extracelular (MEC). Las células no neoplásicas, al igual que los elementos presentes en la MEC ayudan a alimentar y modelar el ambiente tumoral. En este sentido se ha expuesto por ejemplo que la inflamación crónica aumenta la inestabilidad genómica y epigenética de las células, induce la proliferación de células y estimula la angiogénesis (Gonzalez et al. 2018). Sin embargo,

también las células del sistema inmunológico, sobre todo los linfocitos pueden promover la eliminación de las células tumorales. Así, la inmunoedición es el proceso que trata de explicar cómo cambia el microambiente tumoral, para el crecimiento o eliminación de células tumorales.

2.8.1 Inmunoección

La inmunoección es un proceso dinámico que se refiere a la destrucción y reorganización por la respuesta inmune de las células transformadas, además de ser responsable de crear y remodelar el perfil inmunológico del cáncer. La inmunoección está dividida en tres procesos principales, la fase de eliminación o inmunovigilancia, la fase de equilibrio y la fase de escape (Dunn et al. 2002; Dunn et al. 2004).

2.8.2 Fase de eliminación

La fase de eliminación se refiere a la respuesta inmune en contra de las células transformadas, este proceso es multivariable, puesto que se ve influenciado por el origen de las células tumorales, la locación anatómica, la respuesta estromal, el perfil de expresión de citocinas y la inmunogenicidad inherente de las células (Dunn et al. 2004).

Cuando el tumor genera un crecimiento invasivo, en el que se requiere un aporte sanguíneo y se ha producido un daño tisular, se inducen señales inflamatorias que reclutan células para una respuesta inmune innata como los macrófagos tipo M1 y las células NK que eliminan células tumorales por medio de la secreción de perforina y granzima o por vías apoptóticas TRAIL o FAS-L, así también los NK estimulan la producción de INF- γ que puede inducir la muerte de células tumorales, como se muestra en la figura 5 (Dunn et al. 2002; Gonzalez, et al. 2018)

Los restos de células tumorales son fagocitados por las APC que deben migrar a los ganglios linfáticos y ahí presentar y activar a los linfocitos (Dunn et al. 2002; Gonzalez et al. 2018). Los linfocitos T, especialmente los linfocitos T CD8+ citotóxicos, llevan a cabo una respuesta inmune adaptativa en contra del tumor. Por otro lado, los linfocitos T CD4+ ayudan al desarrollo de células T CD8+ específicas de tumor (Dunn et al. 2002; Lugowska et al. 2017).

Las células T se valen de dos mecanismos de muerte celular para eliminar a las células cancerosas: la muerte lítica y apoptótica. En la muerte lítica los antígenos asociados a tumor (AAT) son reconocidos por los CTL activados, lo que provoca la liberación de gránulos con perforina y granzima B que inducen apoptosis de las células diana (Gonzalez et al. 2018; Mattia et al. 2018). Además, los CTL pueden reconocer el receptor de muerte FAS en las células diana, y la interacción FAS-FASL induce la activación de la vía de muerte celular por apoptosis (Mattia et al. 2018). Si la respuesta inmune no es suficiente para erradicar a las células tumorales se continúa a la fase de equilibrio.

2.8.3 Fase de equilibrio

Esta fase de la inmuoedición es un periodo de latencia en el que las células tumorales originales se eliminan, pero al mismo tiempo mutan para generar nuevas variantes capaces de evadir la respuesta inmune y proliferar. El perfil inmunogénico de las nuevas células tumorales surge como consecuencia de la respuesta inmune, en un principio las células T reconocen las células tumorales más inmunogénicas, seleccionando las variantes tumorales menos inmunogénicas y capaces de escapar de la detección inmune por diversos mecanismos, como se muestra en la figura 5 (Dunn et al. 2002, 2004; Gonzalez et al. 2018).

El surgimiento de estos mecanismos de evasión se debe a un proceso de impronta, como consecuencia de la inestabilidad genómica de las células tumorales, esa inestabilidad se vincula con la escisión de nucleótidos, la inestabilidad de microsatélites y/o la inestabilidad cromosómica (Dunn et al. 2004; Gonzalez et al. 2018). Los mecanismos que utilizan las células tumorales para evadir al sistema inmune son: i) bloqueo o alteración de receptores de reconocimiento celular o presentadores de antígenos, ii) reprogramación de células inmunes para producir moléculas que promuevan la supervivencia y agresividad del tumor, iii) mejorar la actividad y supervivencia de células Treg, iv) Inducir apoptosis a las células T efectoras, iv) secreción de moléculas inmunosupresoras (IL-10, TGF- β , prostaglandinas, etc) iiiiv) Baja expresión de antígenos tumorales (Dunn et al. 2002; Onitilo y Wittig, 2020).

2.8.4 Fase de escape

La proliferación exitosa de las células tumorales más agresivas prosigue en la fase de escape, en la cual se presenta un crecimiento tumoral sin restricciones y se desarrolla un tumor clínicamente detectable (figura 5). En esta etapa la respuesta inmune suele ser insuficiente ya que las células cancerosas se han vuelto resistentes a la respuesta inmune montada por el paciente (Dunn et al. 2002, 2004). Algunas de estas células logran adquirir características que les permiten migrar y colonizar otros tejidos, proceso que se conoce como metástasis (Gonzalez et al. 2018).

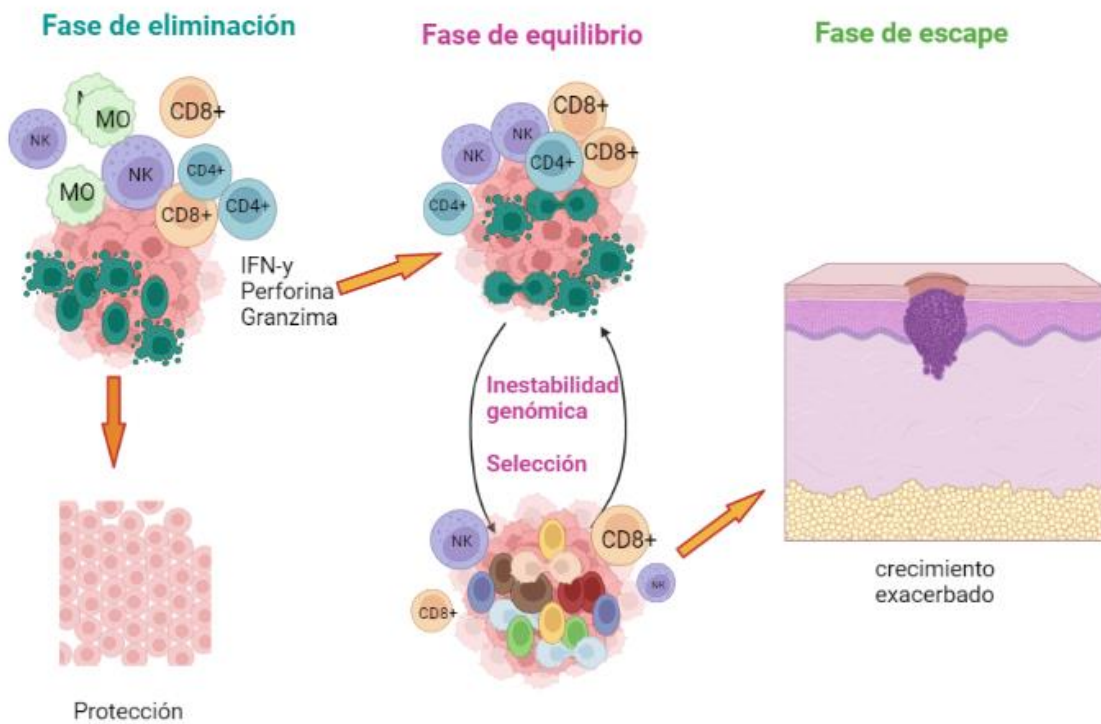


Figura 5.- Inmunoección. Se muestra como la inmunoección consiste en tres fases 1) Fase de eliminación: se monta una respuesta inmune en contra de las células transformadas, 2) Fase de equilibrio: las células tumorales son eliminadas, pero surgen nuevas células que logran evadir la respuesta inmune. 3) Fase de escape: las células seleccionadas proliferan sin restricciones. Modificada de Dunn et al. 2004.

2.9 Inmunoterapia

La inmunoterapia es el uso de las características del sistema inmunológico para el tratamiento de enfermedades. En el caso del cáncer, consiste en la sensibilización o modulación del sistema inmunológico del paciente para atacar células tumorales, incrementando la selectividad o reactivando la respuesta inmune antitumoral cuando se ha producido inmunosupresión (Akkın et al. 2021; Tan et al. 2020). A diferencia de los tratamientos tradicionales, la inmunoterapia brinda una respuesta más selectiva y dirigida, y fortalece la respuesta inmune modulando el microambiente tumoral y reduciendo la presencia de neoantígenos tumorales (Akkın et al. 2021; Tan et al. 2020). Existen diferentes tipos de inmunoterapias como la basada en el empleo de anticuerpos, citocinas o la terapia de célula adoptiva específica e inespecífica, como se describe a continuación.

La inmunoterapia se puede clasificar en pasiva y activa, la inmunoterapia pasiva consiste en la transferencia de células inmunes o anticuerpos generados de manera *in vitro* con la capacidad de reconocer y eliminar a las células tumorales, al contrario de la inmunoterapia activa en donde se logra una respuesta antitumoral a partir de la estimulación del sistema inmune de manera *in vivo* (Akkın et al. 2021; Galluzzi et al. 2014; Inogés et al. 2004).

2.9.1 Inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales

La terapia con anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos a tumor, se basan en el principio de reconocimiento de antígeno-anticuerpo, este tipo de terapia cuenta con diferentes estrategias para atacar al tumor: 1) alterar la señalización de los receptores expresados por células transformadas, que se encargan de la proliferación o supervivencia de las células. 2) Unirse y neutralizar señales producidas por células tumorales o componentes estromales derivados de las lesiones neoplásicas. 3) Reconocer a las células cancerígenas a partir de los AAT (Akkın et al. 2021; Galluzzi et al. 2014).

Existe una gran variedad de mAbs dirigidos a tumores, pero estos se han clasificados en seis tipos principales:

- 1.- mAbs simple: inhibe vías de señalización necesarias para la proliferación o supervivencia exclusivas de células tumorales, por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).
- 2.- mAbs que activan receptores relacionados a la letalidad como el miembro 10B de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TRAILR2 o DR5).
- 3.- mAbs conjugados: es un mAbs que reconoce a un AAT asociado a una toxina o radionucleótido.
- 4.- mAbs específico: reconoce a un AAT específico, opsonizando a las células tumorales y activando mecanismos de muerte como la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, la fagocitosis, y la citotoxicidad por el sistema de complemento.
- 5.-Activadores de células T bioespecíficos (BiTES): son proteínas quiméricas, formados por dos cadenas de proteínas, una se une a un AAT y la otra al antígeno presente en la superficie de células T (Galluzzi et al. 2014).

El uso de estos mAbs se encuentra dentro de las inmunoterapias pasivas, sin embargo, tanto la terapia con mAbs específicos como BiTES, son inmunoterapias activas puesto que es necesario una estimulación por parte del sistema inmune del paciente para su efectividad.

2.9.2 Terapia con anticuerpos dirigidos a inmunocheckpoints

El último tipo de inmunoterapia basada en mAbs es contra moléculas inmunomoduladoras. Es uno de los que ha tenido mayor impacto, operan interaccionando con componentes solubles o células del sistema inmune. Pueden inhibir los receptores inmunosupresores de los linfocitos T principalmente se han descrito dos blancos CTLA-4 o PD1, esta terapia también es conocida como terapia basada en el bloqueo de puntos de control inmunológico (Galluzzi et al. 2014; Mattia et al. 2018).

CTLA-4 está relacionado con el bloqueo de la activación de los linfocitos T, por lo que induce tolerancia inmunológica. CTLA-4 se expresa sobre todo en linfocitos T reguladores y es un receptor que compite con CD28 para unirse a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86; por lo que en última instancia evita la activación linfocitos T CD8+ (figura 6) (Waldman et al. 2020). La administración del anticuerpo que reconoce a CTLA-4 inhibe la tolerancia

inmunológica, puesto que se inhibe el efecto inducido por el receptor, promoviendo la activación prolongada de los linfocitos T (Domingues et al. 2018). En 2011 la administración de alimentos y medicamentos (FDA) de Estados Unidos, aprobó el anticuerpo monoclonal para CTLA4, Ipilimumab. Se ha estimado que aproximadamente el 20% de los pacientes bajo este tratamiento tienen el potencial de sobrevivir por al menos 3 años y hasta 10 años desde su aplicación (Eggermont et al. 2017). Sin embargo, los efectos adversos se presentan en el 40% de los pacientes, estos incluyen erupciones cutáneas, colitis, hepatitis e hipofisitis (Eggermont et al. 2017). En el caso del punto de control de muerte celular programada-1 (PD-1), este se encarga de disminuir la actividad de los linfocitos T (Mattia et al. 2018). PD-1 se expresa en las células T y cuando se une a su ligando (PDL), las células T CD8+ pueden entrar en un estado disfuncional conocido como agotamiento y en ciertos contextos inducir apoptosis (figura 6); Cuando las células tumorales expresan los PDL-1 o PDL-2 la respuesta antitumoral de los linfocitos T se ve atenuada (Mattia et al. 2018; Waldman et al. 2020).

Nivolumab fue el primer medicamento basado en el uso de anticuerpos anti PDL-1 aprobado por la FDA en 2014 para pacientes con melanoma metastásico (Domingues et al. 2018), se ha reportado una media de supervivencia libre de progresión (SLP) de 6.9 meses, en comparación con el tratamiento con Ipilimumab que registra una SLP de 2.9 meses y con dacarbizina que registra una mayor tasa de respuesta (Nakamura y Maeda, 2022; Shannan et al. 2016). Aunque de igual manera, se han reportado efectos adversos como alteraciones autoinmunes, dermatitis, colitis, hepatitis, endocrinopatías y en altas dosis, neuritis (Domingues et al. 2018).

Pembrolizumab otro anticuerpo anti-PD-1 se aprobó en 2015 por la FDA para tratar melanoma avanzado y ha presentado buenos resultados con una toxicidad menor a la presentada en la terapia con Ipilimumab (Domingues et al. 2018). Aunque los efectos adversos reportados fueron 44% de diarrea, fatiga 35% y prurito 33.2 % (Lugowska et al. 2017).

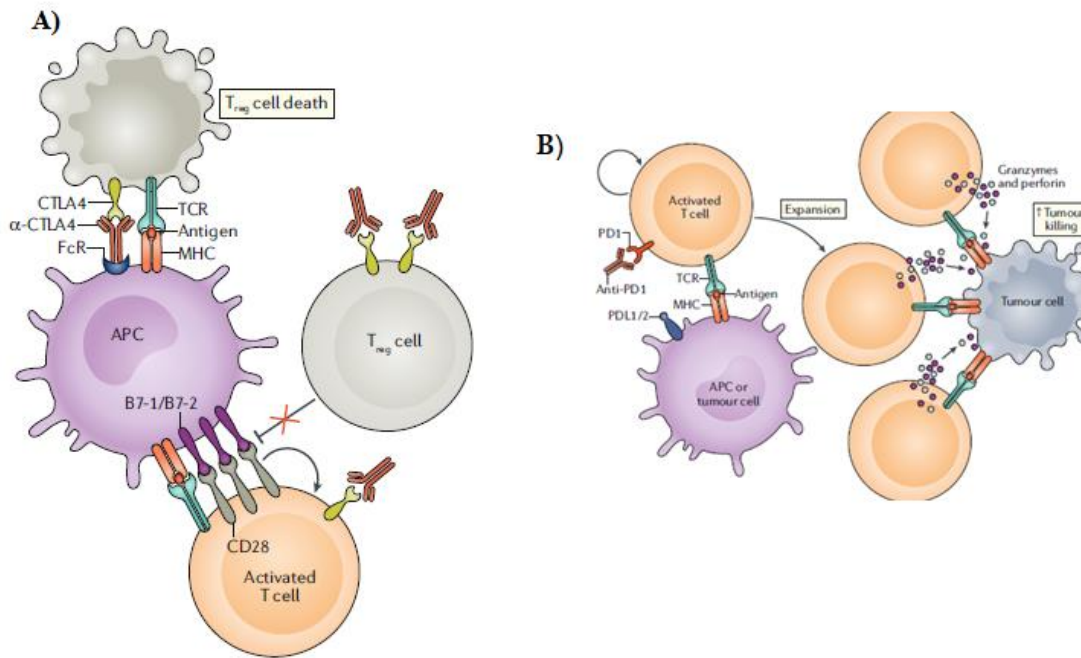


Figura 6.- Terapias con antígenos dirigidos a inmunocheckpoints. A) Bloqueo de CTLA-4, B) Bloqueo de PD-1. Tomado de: Waldman et al. 2020.

2.9.3 Terapia con citocinas

Las citocinas son moléculas liberadas por células, y son las principales mediadoras de las respuestas inmunológicas. En su mayoría son moléculas solubles, pero también existen moléculas en la membrana celular. La unión de citocinas a su receptor desencadena varias funciones como la producción de moléculas de adhesión, receptores, aumento o disminución en la producción de enzimas o cambios en el perfil transcripcional, lo que conlleva a un cambio en el fenotipo; así también pueden enviar señales de muerte o supervivencia celular (Akkin et al. 2021; Owen et al. 2014).

El uso de citocinas en las terapias antitumorales se encuentra dentro de las inmunoterapias activas, ya que depende del sistema inmune del paciente, y generalmente se tiene una respuesta limitada o nula. Por tales circunstancias, frecuentemente se usan como auxiliares para mejorar la inducción o la activación de CD, células NK, y células T (Akkin et al. 2021; Galluzzi et al. 2014). Aunque en el caso de melanoma se han implementado terapias basadas en el uso de interleucinas e interferón.

2.9.4 Interleucinas

El uso de la interleucina IL-2 como terapia contra el melanoma metastásico ha tenido resultados positivos en ensayos con 270 pacientes (Onitilo y Wittig, 2020). Las altas dosis de IL-2 (360 000 a 540 000 UL/kg en un estudio, 600 000 UL/kg en 3 estudios o 720 000 en 4 estudios), reportaron una respuesta general del 16%, una respuesta parcial del 10% y respuesta completa de 6% en los pacientes durante 30 meses (Onitilo y Wittig, 2020). A pesar de esto, los efectos adversos reportados son de alto riesgo ya que los pacientes han presentado arritmias, edema pulmonar y neurotoxicidad, por lo que uso es limitado (Onitilo y Wittig, 2020).

2.9.5 Interferones

Los interferones (INF) son citocinas que se encargan principalmente de impedir la replicación viral. Pero, también pueden activar respuestas inmunomoduladoras, antiangiogénicas, antiproliferativas y antitumorales, debido a que pueden activar células T, NK y CDs (Domingues et al. 2018). En la terapia contra melanoma se ha implementado principalmente INF α -2b ya que estimula la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y promueve la apoptosis (Domingues et al. 2018). Un ensayo en pacientes con melanoma mostró un aumento en la supervivencia libre de recurrencia (SLR) de 5 años de un 26 a un 37% y una supervivencia general de 5 años de un 47% (Onitilo y Wittig, 2020).

El tratamiento con INF α -2b fue altamente recomendado como adyuvante en el tratamiento de melanoma no metastásico de alto riesgo, sin embargo, después de la aparición de las terapias bloqueadoras de inmunocheckpoints se ha reducido su aplicación (Onitilo y Wittig, 2020)

2.9.6 Terapia celular adoptiva

La terapia celular adoptiva es un tipo de inmunoterapia pasiva que consiste en la recolección de linfocitos de sangre periférica o infiltrantes del parénquima tumoral. Posteriormente estas células son activadas y expandidas *in vitro* para luego ser administrarlas al paciente, como se

muestra en la figura 7 (Galluzzi et al. 2014; Lugowska et al. 2017). Las inmunoterapias con células adoptivas se pueden clasificar en específicas y no específicas.

Dentro de las inmunoterapias específicas encontramos aquellas en las que las células inmunes se han estimulado y reconocen a antígenos tumorales o factores estimulantes específicos, como es el caso de la terapia basada en células T infiltrantes de tumores (TIL), la terapia con células T y la terapia CAR-T. Las cuales han tenido buenos resultados en cuestión de especificidad y letalidad hacia las células tumorales sobre todo en el caso de cánceres hematológicos (Tan et al. 2020). Por ejemplo, en el caso del melanoma un ensayo con 96 pacientes se reportó una tasa de respuesta general de 56% y los pacientes con una respuesta completa presentaron una SLR de 31 meses (Lugowska et al. 2017). Existe una variante de este tipo de terapia en la cual las células T del paciente son modificadas por medio de ingeniería genética para aumentar afinidad en el reconocimiento de células tumorales, esta es conocida como terapia con células T con receptores de antígeno quimérico (CAR-T). En la terapia con células CAR-T, se crea un receptor en las células T que reconoce un dominio de unión a un AAT y una inmunoglobulina unida a uno o más dominios inmunoestimuladores. Esto mejora la actividad de los linfocitos T, puesto que son capaces de reconocer un AAT sin necesidad de que sea presentado por MHC I (Galluzzi et al. 2014; Tan et al. 2020).

A pesar de los resultados positivos esta terapia tiene un costo sumamente elevado debido a las semanas de cultivo celular, el personal altamente capacitado, las instalaciones especializadas y la preparación del paciente (Lugowska et al. 2017). Además, se han reportado efectos adversos como neurotoxicidad y agotamiento de células T (Tan et al. 2020).

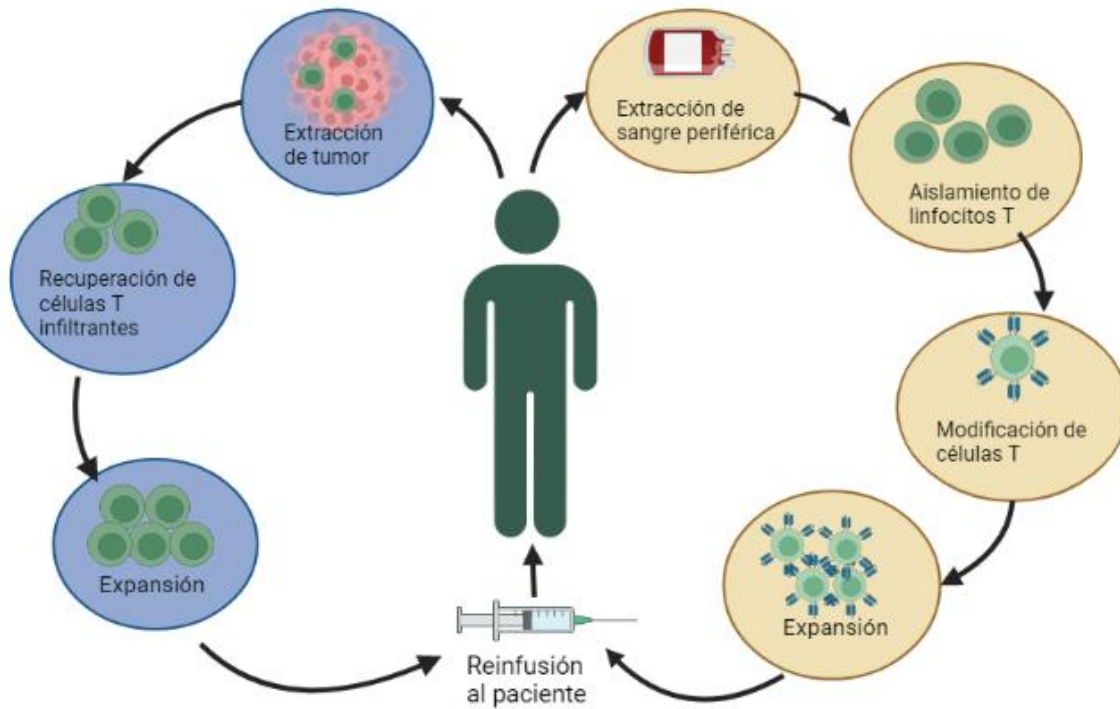


Figura 7.- Terapia con células adoptivas. En azul terapia a partir de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL), en café terapia con células CAR-T. Modificado de Akkin et al. 2021.

Por otro lado, en la terapia con células no específica se utilizan CD8, NK o células asesinas activadas por linfocitos, las cuales se activan por medio de citocinas, pero como su nombre lo indica no están dirigidas a un AAT específico (Akkin et al. 2021).

2.9.7 Terapia con CD8

El uso de terapias con CD8 permiten la activación de vías inmunitarias innatas y adaptativas. La mayoría de las terapias basadas en CD8 consisten en el aislamiento de monocitos circundantes del paciente y su amplificación y diferenciación *ex vivo* mediante el uso del GM-CSF. Las CD8 son expuestas a un AAT que puede proceder de un péptido, o un lisado de células tumorales. Sin embargo, también se pueden dirigir la respuesta de las CD8 de forma *in vivo* por medio de exosomas derivados de CD8 con AAT específicos, el uso de vectores de expresión que codifican un AAT o el uso de nanopartículas (Galluzzi et al. 2014; Saxena y Bhardwaj, 2017).

Para que una vacuna con CDs sea efectiva se requiere de: 1) la presencia de antígenos tumorales inmunogénicos, 2) el reclutamiento y la maduración de las CDs, 3) la captación y procesamiento de antígenos por CDs maduros y 4) la presencia de señales coestimuladoras, citocinas estimulantes y ausencia de señales inhibitorias (Wong et al. 2016).

Las vacunas *ex vivo* que se han desarrollado son DC Vax-Direct y DC Vax-L (donde las CDs se cargan con antígeno), y IVAC a partir de CDs autólogas que se cargan con neoantígenos (Saxena y Bhardwaj, 2017).

Sipuleucel-T (Provenge) fue aprobada en 2010 por la FDA y es la primera vacuna con CDs que se ha comercializado. Se basa en el uso de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con la proteína de fusión compuesta de fosfatasa ácida prostática de longitud completa y GM-CSF. Se ha utilizado en el tratamiento de cáncer de próstata y se ha reportado que proporciona una supervivencia general de hasta 4 meses (Akkın et al. 2021; Wong et al. 2016).

2.9.8 Desventajas de las inmunoterapias tradicionales

La inmunoterapia busca la reactivación o creación de una respuesta inmunológica en contra de las células tumorales. Sin embargo, la aplicación de algunos de estos tratamientos puede alterar la homeostasis de las células del sistema inmune (Kurum et al. 2020). Por tal motivo, las inmunoterapias presentan efectos secundarios autoinmunes que ocasionan distintas morbilidades a los pacientes e incluso pueden llegar a ser potencialmente mortales (Kurum et al. 2020; Li et al. 2020).

Entre las más conocidas se encuentra el uso de citocinas, en primer lugar, se deben de administrar altas dosis o inyecciones en bolo de estas moléculas debido a su rápida degradación y eliminación renal y hepática (Han y Wu 2022; Li et al. 2020). Y aunque tienen efecto terapéutico, las altas dosis de IFN- α y IL-2, provocan efectos secundarios como síndrome de liberación de citocinas, el síndrome de resfriado común y el síndrome de fuga vascular; en especial el uso de IL-2 provoca reacciones inflamatorias graves (Han y Wu, 2022; Wong et al. 2016; Zhao et al. 2019). Así también el uso de anticuerpos agonistas para activar a los linfocitos como CD80/86 en altas cantidades genera toxicidad, al activar otras poblaciones de linfocitos no deseados (Li et al. 2020; Zhao et al. 2019).

A pesar de los resultados observados en las terapias basadas en anticuerpos contra inmunocheckpoints, este tipo de tratamiento puede producir daño a diversos órganos. Por otro lado, solo un pequeño porcentaje responden a este tipo de terapias (Zhao et al. 2019).

En general las terapias en las que se administran moléculas solubles, como las citocinas o los anticuerpos, tienen menor efectividad en los tumores sólidos debido a la poca infiltración que tienen dentro del microambiente tumoral, y al desarrollo de un ambiente inmunosupresor (Han y Wu 2022; Kurum et al. 2020; Li et al. 2020).

En el caso de la terapia con células adoptivas las limitantes abarcan tanto las dificultades de la manipulación *ex vivo*, así como la complejidad del proceso que puede resultar en el agotamiento funcional de las células antes de la administración al paciente (Han y Wu 2022; Li et al. 2020). Entre otras desventajas también se encuentran, las bajas tasas de rendimiento en la obtención de células, la funcionalidad deficiente y la vitalidad frágil de las células que se trasplantan; además de tener un costo elevado (Han y Wu, 2022) . En el caso de la terapia adoptiva de linfocitos T aunque se ha tenido éxito en los cánceres hematológicos, su efectividad en tumores sólidos se ve limitada debido a la baja infiltración de las células T, la falta mantenimiento de la población y su funcionalidad, y al ambiente inmunosupresor dentro del microambiente tumoral (Kurum et al. 2020).

En el caso de las vacunas basadas en CDs que se expanden y activan de manera *ex vivo*, se presenta una baja viabilidad, ya que del total de células que se inyectan al paciente alrededor del 10% permanecen viables en el paciente, y tan solo del 0.5-2.0% de estas células logran migrar a los ganglios linfáticos para activar a las células T (Ali et al. 2009; Kurum et al. 2020).

2.10 Antígenos tumorales y antígenos MAGE

Otro enfoque de la inmunoterapia consiste en reforzar la respuesta antitumoral a partir de la activación de las células T por medio del reconocimiento antígenos tumorales, para que posteriormente la población de células T prolifere y se diferencie; lo cual permitirá reconocer células tumorales que expresan los antígenos y finalmente eliminarlas (Domingues et al. 2018).

Los antígenos tumorales pueden clasificarse en dos grupos, 1) Los AAT, los cuales se presentan tanto en células tumorales como en células normales y 2) los antígenos específicos de tumores (TSA) que se expresan únicamente en células tumorales (Davis et al. 2019). Existen una clasificación más específica que se refiere a su origen: los antígenos oncofetales que se expresan normalmente durante el desarrollo embrionario y se silencian en tejidos adultos; 2) los antígenos virales en cánceres que se desarrollan por infecciones virales como el VPH, 3) los neoantígenos que son antígenos nuevos generado a partir de mutaciones y por ende no se expresan en células sanas y 4) los antígenos de diferenciación: son proteínas que se sobre expresan por las células tumorales (Wong et al. 2016).

Además, los melanocitos neoplásicos también presentan antígenos tumorales específicos denominados (MDA) implicados en la diferenciación; estos tres tipos de antígenos son presentados en el MHCI de los melanocitos, por lo que son detectables para el sistema inmunológico (Davis et al. 2019).

2.10.1 Antígenos MAGE

Los antígenos asociados a melanoma (MAGE) son una super familia de alrededor de 60 genes en los seres humanos (Marcar et al. 2015). Se localizan en el cromosoma X, y son parte de la familia de antígenos de cáncer de testículo. Las proteínas MAGE se expresan en células germinales y brevemente en el desarrollo embrionario en ciertas células como las de la médula espinal y el tronco encefálico (Marcar et al. 2015; Meek y Marcar, 2012).

Los MAGE se clasifican en dos grupos de acuerdo con su localización en el genoma y su distribución en los tejidos: MAGE-I y MAGE-II. MAGE-I comprende las subfamilias A, B y C. Los genes para MAGE- D, E, F, G, H, L y Necdin son parte del grupo MAGE-II, los cuales se ubican no solo en el cromosoma X, por lo que se expresan tanto en órganos sexuales como en otros tejidos; sin embargo, generalmente no se asocian con cáncer (Lee y Potts, 2017; Marcar et al. 2015).

El uso de los antígenos MAGE puede tener tres posibles aplicaciones: inmunoterapia y vacunación contra epítomos de MAGE, interrupción de las interacciones con MAGE, así como la alteración de las vías con impacto en la expresión de MAGE (Meek y Marcar 2012).

Una de las ventajas de MAGE es que es altamente inmunogénico en comparación a otros antígenos; además dado que las células germinales no expresan MHCI, la acción de las células inmunes está restringida a las células tumorales (Meek y Marcar, 2012).

Eggert et al. 2004, demostró que dos péptidos asociados a MAGE: MAGE AX y MAGE A5, se unen con alta afinidad a MHCI. En sus experimentos se vacunaron ratones con células de esplenocitos estimuladas de forma *in vivo* con los péptidos de MAGE. Como resultado se observó que hubo lisis de células de melanoma B78-D14. Además, observó que el número de linfocitos CD8+ infiltrados en el tumor mejoró, y se encontró que parte de estas células eran específicas para MAGE A5.

2.11 Adyuvantes

Uno de los más grandes desafíos al crear las vacunas contra el cáncer es vencer el ambiente inmunosupresor, además a diferencia de otros antígenos, los neoantígenos y los antígenos virales son menos inmunogénicos en comparación con aquellos generados por patógenos externos. Por lo tanto, una estrategia consiste en el uso de adyuvantes que promuevan el reclutamiento, la activación y la maduración de células de la inmunidad innata, que proporcionan las señales suficientes para estimular la respuesta adaptativa (Saxena y Bhardwaj, 2017; Wong et al. 2016).

Un adyuvante es una sustancia de estructura química variada que se adicionan a los tratamientos para aumentar o potenciar la respuesta inmune. Existen varias clasificaciones para los adyuvantes, pero una de las más conocidas agrupa a estas sustancias en inmunoestimuladores y vehículos. Dentro de los inmunoestimuladores encontramos por ejemplo a las citocinas, endotoxinas, saponinas; y en los vehículos se tiene como ejemplo a las micro y nanopartículas, los liposomas y las emulsiones (Batista-Duharte, et al. 2014; Florindo et al. 2017).

Por otro lado, los mecanismos de acción han agrupado a los adyuvantes en 3 tipos:

- Señal 1: actúan como depósitos que liberan de manera pausada y prolongada los antígenos.

- Señal 2: la activación de APC por medio de señales PAMP o DAMP que provocan la liberación de citocinas en forma soluble o de moléculas coestimuladoras para las APC.
- Señal tipo 3: capaces de polarizar una respuesta específica por las células Th (Batista-Duarte et al. 2014).

Se han caracterizado distintos adyuvantes, algunos de los más relevantes son el alumbre que utilizan el mecanismo 1, además se ha reportado que activa el inflamosoma (Saxena y Bhardwaj, 2017). Este además induce una respuesta auxiliar Th2, pero son poco efectivos para inducir a los CTL (Wong et al. 2016). Otro es el GM-CSF que ayuda al reclutamiento y maduración de CDs para inducir respuestas de los CTL (Wong et al. 2016).

2.11.1 Agonistas de reconocimiento de patrones

Los agonistas de receptores de reconocimiento de patrones operan como adyuvantes de señal tipo 2. Los PRR detectan un amplio rango de señales de daño o de patógenos, incluidos los patrones moleculares asociados a microbios (MAMP), y DAMPs. La activación derivada de la unión del ligando al PRR es una cascada de señalización de una respuesta proinflamatoria, que incluye la síntesis de moléculas como NF- κ B y citocinas inmunoestimuladoras como INF-1, y TNF- α . Además, la señalización de PRR puede desencadenar la maduración de células inmunes como las CDs, macrófagos y células NK (Galluzzi et al. 2014).

Dentro de estos adyuvantes encontramos a un grupo muy grande que se conocen como agonistas de TLR. Estos se pueden unir a diferentes TLR para madurar a los APC y así vencer la inmunosupresión. Algunas de las sustancias que se han usado en ensayos clínicos son IMO-2055, MGNI703, DUK-Cp6001 y SD-101 (Saxena y Bhardwaj, 2017).

2.11.2 Uso de CpGs

Uno de los adyuvantes agonistas de TLR más utilizados han sido los CpGs, que son motivos ricos en citocinas y guaninas no metilados provenientes de ADN bacteriano. Actualmente se han sintetizado oligodesoxinucleóticos (ODN) que contienen motivos CpGs (Kayraklioglu et al. 2021; Klinman, 2004).

Los CpGs son adyuvantes que operan como agonistas del TLR9. Aunque la mayoría de las células son capaces de endocitar los CpGs, solo las células B, las CD4 y los macrófagos en ratones presentan el TLR 9 (Kayraklioglu et al. 2021; Klinman, 2004). Los CpGs se unen a TLR9 con alta afinidad, esta unión da como resultado la activación de vías de señalización que desencadenan la expresión de moléculas MHCII, así como moléculas coestimuladoras de la familia B7, proteínas de resistencia a la apoptosis y citocinas como CCR7 necesaria para promover la migración de las células a los ganglios linfáticos. También promueven la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-9 e INF- α , que sesgan una respuesta de tipo Th1 (Kayraklioglu et al. 2021; Klinman, 2004).

Estas señales proinflamatorias promueven la maduración, diferenciación y proliferación indirecta de células NK, células T, monocitos y macrófagos (Klinman, 2004). Los CpGs se han usado en vacunas con CD4 para activar a estas células, ya que ayudan a la maduración y presentación del antígeno (Kayraklioglu, Horuluoglu, and Klinman 2021).

2.12 Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos se define como la aplicación de los métodos de la ingeniería y las ciencias de la vida para comprender las relaciones entre la función y la estructura de los tejidos (normales o con patologías) (O'Brien, 2011). Es campo multidisciplinario que combina la biología celular y molecular, la ciencia de materiales y la ingeniería biomecánica para la creación de sustitutos biológicos que puedan restaurar, sustituir o mejorar la función de tejidos y órganos dañados o enfermos; en este proceso se puede apoyar de otras estrategias como la terapia basada en células, la terapia génica o la inmunomodulación (Han et al. 2020; Hoque et al. 2015; Mhanna y Hasan, 2016)

La ingeniería de tejidos se basa en tres pilares, el uso de células, factores de crecimiento y andamios (Han et al. 2020; Mhanna y Hasan 2016).

2.12.1 Andamios

Los andamios se definen como una estructura de soporte temporal cuya finalidad es mantener la proliferación celular, el transporte de nutrientes y desechos, así como el intercambio

gaseoso necesarios para la reparación o reemplazo del tejido (Collins y Birkinshaw, 2013; Han et al. 2020).

Para tal propósito los andamios deben de poseer las siguientes características:

- Permitir la adhesión celular
- Promover el crecimiento celular
- Permitir la retención de células diferenciadas
- Ser biocompatible: ni el biomaterial ni sus productos de degradación deben producir reacciones adversas como la inflamación o toxicidad
- Ser biodegradable: ser procesado y posteriormente eliminado
- Debe de contar con suficiente integridad estructural o soporte mecánico para resistir el crecimiento celular, hasta que finalice el proceso de remodelación.(Collins y Birkinshaw 2013; Hoque et al. 2015)

Las características de los andamios pueden agruparse principalmente en biológicas y físicas. Siendo las propiedades biológicas la cito y biocompatibilidad, la no toxicidad, la biodegradación del andamio, la permeabilidad al agua y al oxígeno, la adhesión celular, inmunogenicidad, el comportamiento *in vitro* e *in vivo*, la proliferación y la migración celular (Adel, et al. 2022; Collins y Birkinshaw 2013; Suamte et al. 2023)

Con relación a las características físicas, estas pueden ser estudiadas por medio de diferentes parámetros como: el módulo de compresión, el módulo de elasticidad, la resistencia a la tracción, la absorción de agua, la densidad, la rigidez y la degradación, la cual debe de ser igual o menor a la creación de nuevo tejido. Además de las características de la superficie como la topografía o arquitectura y sus relaciones de hidrofobicidad/hidrofilia. Por otro lado, es de suma importancia la porosidad y la interconectividad de los poros (Adel, et 2022; Collins y Birkinshaw 2013; Suamte et al. 2023; Sultana 2018) .

La interconectividad de los poros debe facilitar la comunicación celular y la creación de matriz extracelular (MEC). En este mismo sentido, el tamaño de los poros tiene un rol fundamental, dado que el andamio debe de tener alta porosidad y suficiente área de superficie, de acuerdo con el tejido y la morfología de las células; en el que se piensa aplicar

el andamio. Puesto que, esta característica influye en la migración celular, la infiltración, la circulación de nutrientes y oxígeno, así como los productos de desecho (Adel, et 2022; Collins y Birkinshaw 2013; Suamte et al. 2023).

Existen tres enfoques para el uso de andamios, el estructural, el inductivo y el celular. En el enfoque estructural los andamios están orientados a ser estructuras con propiedades mecánicas; acordes al tejido que se piensa tratar y orientadas a soportar la proliferación celular que reemplazará el tejido dañado. Por lo que este enfoque se basa en la elección de materiales para la creación de andamios, lo cual es relevante en todo el proceso, puesto que los tejidos tienen propiedades mecánicas y biológicas distintivas. En otras palabras, los materiales deben idealmente mimetizar la MEC para promover la reparación o mejoramiento del tejido (Suamte et. al, 2023). Con relación al enfoque inductivo, éste está implicado en la adición de factores de crecimiento y otras moléculas al andamio, para dirigir a las células en su crecimiento y diferenciación. Finalmente, el último enfoque está relacionado con la adición de células a los andamios antes de ser implantados (Collins y Birkinshaw, 2013).

2.13 Materiales

Para la elaboración de andamios se puede usar una gran diversidad de materiales, los cuales se pueden clasificar en cerámicas, metales, polímeros y materiales compuestos (Agrawal et al. 2014), en el cuadro 2 se muestran sus características principales. Algunos materiales como las cerámicas, los polímeros sintéticos o naturales y los materiales compuestos se consideran biomateriales, los cuales se definen como materiales que puede interactuar con los sistemas biológicos para evaluar tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido u órgano (O'Brien, 2011; Williams, 1999).

Cuadro 2.-Tipos de biomateriales

	CERÁMICAS	METALES	POLÍMEROS	COMPUESTOS
Propiedades	Sólidos (vidrio cristalino o amorfo) Forman enlaces covalentes o iónicos Compuestos de elementos metálicos y no metálicos (nitratos, carburos, óxidos)	Formados de elementos metálicos Hacen enlaces metálicos	Conformados de materiales orgánicos, de largas cadenas Ricos en carbono e hidrógeno Enlaces covalentes Cristalinos y/o amorfos	Poseen dos fases: Fase de relleno y la fase matriz. Combinaciones de diferentes materiales
Ventajas	Alta dureza Resistencia a las altas temperaturas y a la electricidad	Buenos conductores del calor y la electricidad Maleables y dúctiles Altamente densos	Poseen gran diversidad de composición, por lo que sus propiedades se pueden modelar	Las propiedades se determinan por los constituyentes y sus porciones relativas
Desventajas	Baja ductilidad Baja tenacidad y tendencia a la formación de fracturas Fáciles de quebrar Difíciles de modelar	Fáciles de corroer	Bajo módulo de elasticidad y resistencia Baja transmisión de calor	

2.13.1 Biomateriales poliméricos

Los polímeros pueden ser tanto de origen sintético como natural. Algunos ejemplos de los polímeros sintéticos más utilizados en la ingeniería de tejidos son poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y poli (caprolactona) (PCL) (Collins y Birkinshaw, 2013; Hoque et al. 2015; O’Brien, 2011). Estos polímeros se generan bajo condiciones controladas, por lo tanto, la reproducción de sus características es sencilla. Además, es factible manipular sus propiedades, así como modelar las estructuras tridimensionales, por lo que son mecánicamente más fuertes y poseen mayor flexibilidad (Adel, et 2022; Collins y Birkinshaw, 2013; Hoque et al. 2015). En este aspecto

se ha reportado que la degradación de estos polímeros se puede controlar mediante el cambio en la concentración del polímero o modificándolo directamente (O'Brien, 2011). Una de las principales desventajas de estos biomateriales es que la adhesión celular depende de la incorporación de ligandos, además de un riesgo de rechazo. Otra desventaja es la evaluación de la compatibilidad, debido a los productos generados durante su degradación. Por ejemplo, el PGA y el PLA producen dióxido de carbono durante su degradación por hidrólisis, y como consecuencia reducen el pH local, lo que puede inducir necrosis celular y tisular (Collins y Birkinshaw, 2013; Hoque et al. 2015; O'Brien, 2011)

Por otro lado, los polímeros naturales son producidos por los seres vivos, por lo que en muchos casos son componentes de la MEC o en su defecto los imitan. Como resultado favorecen la adhesión celular debido a los ligandos en forma de secuencias de unión RGD que son regiones de arginina, glicina y ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), lo cual favorece al crecimiento celular. Entre otras características se puede mencionar que son biodegradables, altamente biocompatibles y en su mayoría tienen un costo menos elevado, ya que pueden obtenerse de diversas fuentes (Collins y Birkinshaw 2013; Hoque et al. 2015). Algunos ejemplos son el alginato, el ácido hialurónico (HA), el colágeno, la gelatina (GE) y la seda (Afewerki et al. 2019).

2.13.2 Ácido hialurónico (HA)

Entre los polímeros naturales se puede encontrar al ácido hialurónico, el cuál es un glucosaminoglicano no sulfatado, compuesto de por dos monómeros el ácido glucurónico y el N-acetil D-glucosamina, que forman largas cadenas compuestas por más de 30 000 unidades repetitivas que oscila en un peso entre 5×10^5 y $4-5 \times 10^6$ kDa (Afewerki et al. 2019; Collins y Birkinshaw, 2013; Vigetti et al. 2014). El HA se encuentra en la mayoría de los vertebrados ya que es un componente de la MEC. Es parte importante del tejido conjuntivo, aunque es esencialmente abundante en el humor vítreo, articulaciones, piel, etc, como se muestra en la figura 8. En mamíferos es sintetizado por la hialuronano sintasa que posee tres isoformas (HAS-1,2 y 3), aunque la que HAS-2 es la enzima que tiene mayor actividad en adultos (Vigetti et al. 2014).

Dentro de sus ventajas se encuentra que es hidrofílico por sus grupos funcionales (grupo carboxilo e hidroxilo) por lo que este polímero ayuda a mantener el equilibrio hídrico, la distribución y transporte de proteínas, por lo que favorece en la diferenciación, y crecimiento celular (Collins y Birkinshaw 2013; Gariboldi et al. 2008). Además, dado que es un componente de la MEC posee características importantes para la creación de andamios como biocompatibilidad, fácil degradación y reabsorción (Collins y Birkinshaw, 2013). Una de sus ventajas más importantes es la interacción que establece con las células por medio de receptores como CD44, el receptor de motilidad mediado por hialuronano (RHAMM) y receptor de hialuronano por endocitosis (HARE) (Vigetti et al. 2014).

CD44 es un receptor de membrana celular que se encuentra en casi todas las células humanas, su función principal es ayudar en la adhesión celular y por tanto es clave en la migración celular. Además, puede interactuar con factores de crecimiento, citocinas y proteínas de la MEC; y también se encarga de la internalizar el HA. Particularmente se ha encontrado que la interacción con el HA puede inducir migración celular y brindarle direccionalidad en los procesos de cicatrización de heridas. Por otro lado, RHAMM o CD168 es de suma importancia para la locomoción de las células, puesto que interactúa con los filamentos de actina, el centrosoma, los microtúbulos y el huso mitótico, por lo que también es de suma relevancia en la migración celular durante la reparación de lesiones tisulares (Collins y Birkinshaw, 2013; Vigetti et al. 2014). En el caso de HARE la función de esta proteína como su nombre lo indica es la endocitosis del HA, al activarse puede inducir la activación de vías de señalización como NF- κ B o ERK1/2.

El HA es degradado por medio de las hialuronidasas, y está determinado por el número de sitios de escisión en el polímero y por la disponibilidad de las enzimas. Sin embargo, en condiciones de inflamación o de lesión tisular el HA puede despolimerizarse no solo por la acción de las hialuronidasas sino también por la actividad de radicales de oxígeno, β -glucuronidasa y hexosaminidasa, formando cadenas de ácido hialurónico de bajo peso molecular. A diferencia del HA de alto peso molecular, estas cadenas simples pueden activar mecanismos de inmunidad puesto que son reconocibles por los TLR2 y 4, estimulando la producción de citocinas y quimiocinas por macrófagos, CDs y linfocitos T (Collins y Birkinshaw, 2013; Gariboldi et al. 2008; Vigetti et al. 2014). Por lo tanto, el HA tiene un

tiempo de degradación corto y falta de integridad mecánica, lo que puede dificultar su uso para constituir andamios sólidos, sin embargo, sus grupos funcionales facilitan el entrecruzamiento al formar enlaces éter y éster (Collins y Birkinshaw, 2013).

2.13.3 Gelatina (GE)

La gelatina (GE) se deriva de la hidrólisis del colágeno. El colágeno es la principal proteína que compone a la MEC, y por tanto está presente en diferentes animales como un componente importante del tejido conjuntivo, como parte de hueso, cartílago, tendones y vasos sanguíneos (Afewerki et al. 2019; Chocholata, et. al 2019; Hoque et al. 2015), como se ilustra en la figura 8. Esta proteína posee cadenas flexibles compuestas principalmente de glicina, hidroxiprolina, prolina y lisina, además el grado de flexibilidad está determinado por el porcentaje de glicina. Se conocen alrededor de 29 tipos de colágeno, sin embargo, la de mayor distribución es la colágeno tipo I (Chocholata, et. al 2019). La colágena está compuesta por tres hélices levógiras entrelazadas para formar una estructura cuaternaria igualmente levógira en forma de barra. La gelatina se obtiene del rompimiento de las triple hélices de la colágena tipo I a cadenas simples por hidrólisis (figura 8), esta puede realizarse en condiciones tanto ácidas como alcalinas dando como resultado la gelatina tipo A y tipo B respectivamente (Afewerki et al. 2019; Chocholata, et. al 2019; Bello et al. 2020)

La GE al derivarse de la colágena, es un biomaterial biocompatible, biodegradable y posee baja antigenicidad, posee grupos RGD y es de fácil acceso. Algo importante de mencionar es que posee gran similitud molecular con la colágena ya que contiene las mismas secuencias de aminoácidos, aunque su peso es menor en comparación con el de la colágena, ya que las cadenas oscilan en un peso de entre 15-250 kDa. Se ha calculado que la gelatina contiene ~21% de glicina, ~12% de hidroxiprolina, ~12% de prolina y otros aminoácidos como la alanina, la arginina, ácido aspártico, la serina y la valina; sin embargo posee en cantidades pequeñas o están ausentes aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, el triptófano o la tirosina, lo que contribuye a que tengan baja antigenicidad y toxicidad (Bello et al. 2020). Entre otras ventajas debe resaltar que por sus grupos RGD la gelatina tiene gran capacidad de adhesión celular, además posee gran disponibilidad, puesto que se puede extraer de diversas fuentes como hueso de ganado, pescados, piel de cerdo y hasta de algunos insectos;

y en general se ha encontrado que la GE obtenida de estas fuentes no induce toxicidad, antigenicidad u otros efectos adversos (Bello et al. 2020; Chocholata et al. 2019).

A pesar de estos puntos a su favor la GE presenta desventajas como malas propiedades mecánicas por su falta de estabilidad en altas temperaturas, ya que los monómeros no se pueden mantenerse unidos entre sí y solidificarse cuando se someten a temperaturas superiores a los 40°C. También tiene una degradación rápida (al ser más susceptible a las proteasas), alta viscosidad y reducida solubilidad en medios acuosos (Afewerki et al. 2019; Bello et al. 2020; Hoque et al. 2015). Sin embargo, los grupos funcionales disponibles permite su modificación con polisacáridos, que mejoran sus propiedades; se ha fabricado andamios de Ge-celulosa, Ge-quitina, Ge-HA y Ge-quitosano, entre otros (Afewerki et al. 2019).

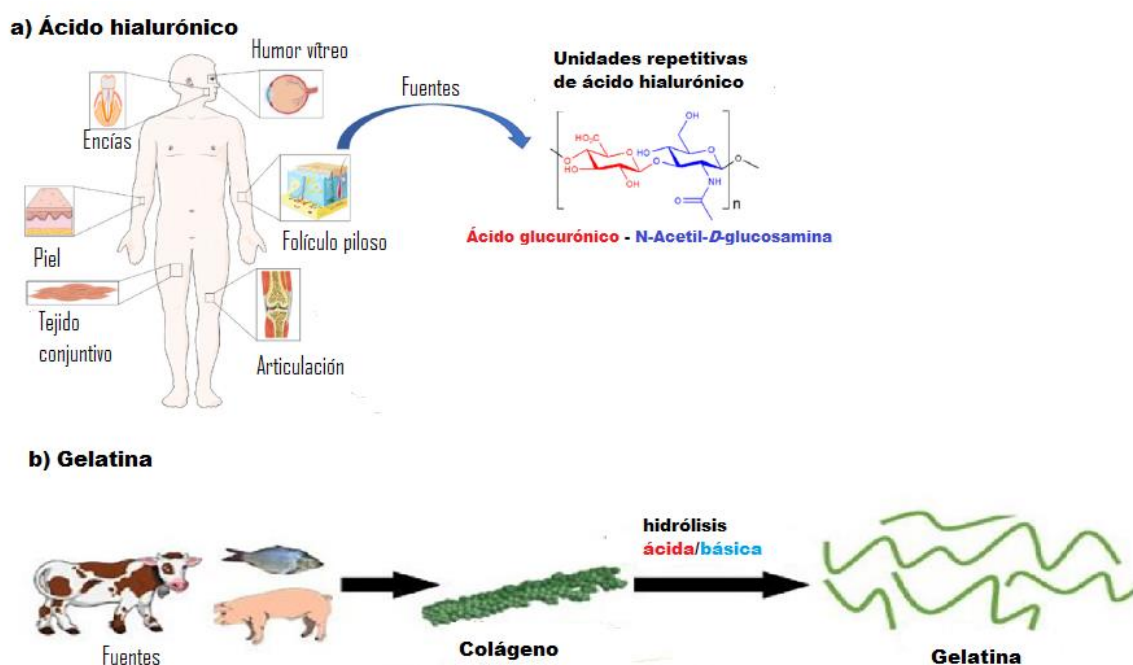


Figura 8.- Obtención y estructura del ácido hialurónico (a) y gelatina (b). Modificada de Afewerki et al. 2019.

2.13.4 Andamios porosos e hidrogeles

En base a la elección del biomaterial y a la técnica empleada para su elaboración los andamios pueden clasificarse en andamios porosos, hidrogeles, andamios fibrosos, microsferas y

andamios acelulares. Sin embargo, en esta investigación nos enfocamos al uso de andamios porosos implantables e hidrogeles. Los andamios porosos pueden estar en distintas formas como mallas, espumas, esponjas y compuestos por micro o nanofibras (Suamte et al. 2023).

En comparación, un hidrogel es un tipo de andamio que consiste en una red flexible de polímeros naturales o sintéticos. Entre sus características destaca su capacidad de retener grandes cantidades de agua o fluidos biológicos; esta característica se atribuye a los grupos hidrofílicos presentes en los materiales que lo componen como pueden ser $-NH_2$, $-CONH_2$, $-COOH$, $-OH$ (Chocholata et.al, 2019). Además, el uso de hidrogeles tiene diversas ventajas, como la capacidad de mimetizar tejidos, ya que responden a los cambios del ambiente como el pH, la temperatura y el campo eléctrico. También se pueden aplicar por métodos no invasivos como inyecciones subdérmicas; y algunos pueden pasar de líquido a gel dentro del organismo al someterse a la temperatura corporal (Chocholata et.al, 2019).

2.14 Agentes entrecruzantes

A pesar de la amplia variedad de biomateriales, algunos de los andamios basados en materiales presentes en la MEC, poseen propiedades mecánicas deficientes, así como tiempos de degradación muy rápidos. Por lo tanto, una de las soluciones en la creación de andamios es el empleo de agentes entrecruzantes, puesto que su uso mejora las propiedades fisicoquímicas, modela la estructura de los poros y sus propiedades mecánicas, y en especial aumenta las tasas de degradación (Krishnakumar et al. 2019; Powell y Boyce, 2006).

El entrecruzamiento consiste en establecer enlaces, covalentes o no covalentes, entre los grupos funcionales de una cadena polimérica, estas interacciones controlan la actividad de los componentes, la estabilidad y el ensamblaje del andamio. Los agentes entrecruzantes pueden inducir la reticulación por mecanismos químicos, físicos, enzimáticos y no enzimáticos. Pero independientemente de esto, cada uno debe de tener un comportamiento no tóxico, no impedir las interacciones entre las células, ni reducir la permeabilidad a los gases (Krishnakumar et al. 2019).

Dentro de los agentes entrecruzantes químicos más empleados podemos encontrar al glutaraldehído, al genipin y al 1-etil 3(3-dimetilaminopropil) carboiimida hidrocioruro

(EDC). Los dos primeros han sido cuestionados puesto que presentan efectos tóxicos dependiendo de la concentración (Krishnakumar et al. 2019; Powell y Boyce, 2006). A diferencia de los otros entrecruzantes, el EDC no se mantiene en el andamio.

El EDC puede conjugar grupos carboxilos o fosfatos de aminas formando O-urea activa que se une a los grupos amino formando un enlace amida que libera iso-urea, la cual es soluble en agua, que puede ser retirada por medio de lavados con agua (Krishnakumar et al. 2019; Powell y Boyce, 2006). Además, se ha reportado que el uso de EDC en andamios de colágeno aumenta la temperatura de desnaturalización y mejora sus propiedades mecánicas (Powell y Boyce, 2006).

2.15 Uso de andamios en la inmunoterapia

El uso de andamios se ha extendido a varias áreas de la medicina para recuperación o reemplazo de tejidos dañados, tratamiento de enfermedades óseas, infecciosas e inmunoterapia (Han y Wu, 2022).

Los andamios poseen una serie de ventajas que pueden ser aprovechadas para la inmunoterapia. Para empezar, en la actualidad se cuenta con una amplia variedad de biomateriales biocompatibles disponibles para el modelado de las propiedades fisicoquímicas del andamio, lo que a su vez ha permitido la creación de diferentes tipos de andamios como los andamios implantables, los hidrogeles, nano o micro- partículas, varillas de sílice mesoporosas entre otros, figura 9. Estos andamios pueden modelarse para imitar el contexto biológico (características mecánicas, estructurales), brindando señales bioquímicas para reclutar, promover la supervivencia activar y/o madurar a las células de interés tanto de manera *ex vivo* como *in situ*, figura 9 (Kurum et al. 2020; Li et al. 2020; Wong et al. 2016). Así mismo la elección de biomateriales juega un rol importante ya que algunos pueden ayudar a regular el ambiente inmunosupresor (Han y Wu, 2022).

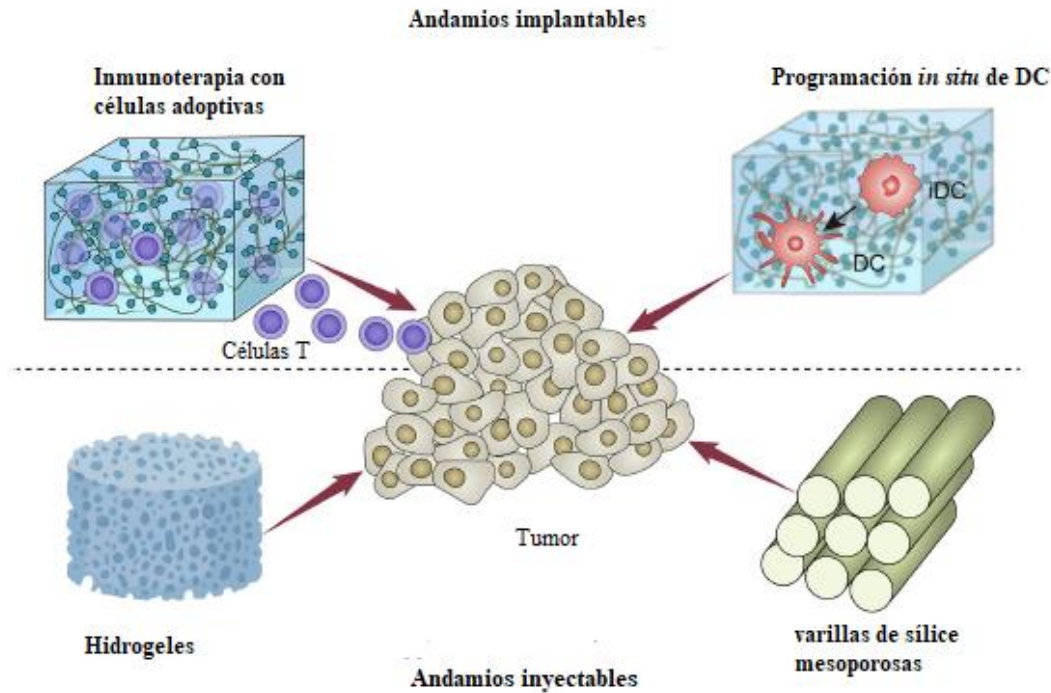


Figura 9.- Tipos de andamios implementados en inmunoterapia. Modificada de Li et al. 2020.

Los andamios 3D como los andamios sólidos implantables, los hidrogeles o las varillas de sílice, brindan un ambiente biomimético, que permite la infiltración celular y el establecimiento de interacciones células-células, células-material (Wong et al. 2016). Además, los andamios pueden diseñarse para empaquetar agentes inmunomoduladores, inmunoterapéuticos, así como células, factores de crecimiento, antígenos tumorales y adyuvantes mejorando su farmacocinética, como se muestra en la figura 10, que mejoren la inmunidad tanto innata como adaptativa (Han y Wu 2022; Li et al. 2020; Wong et al. 2016). La incorporación de estos elementos a un andamio permite prolongar su vida media, al protegerlos de la degradación en condiciones *in vitro*, y por tanto aumentar su biodisponibilidad (Han y Wu 2022; Kurum et al. 2020; Li et al. 2020).

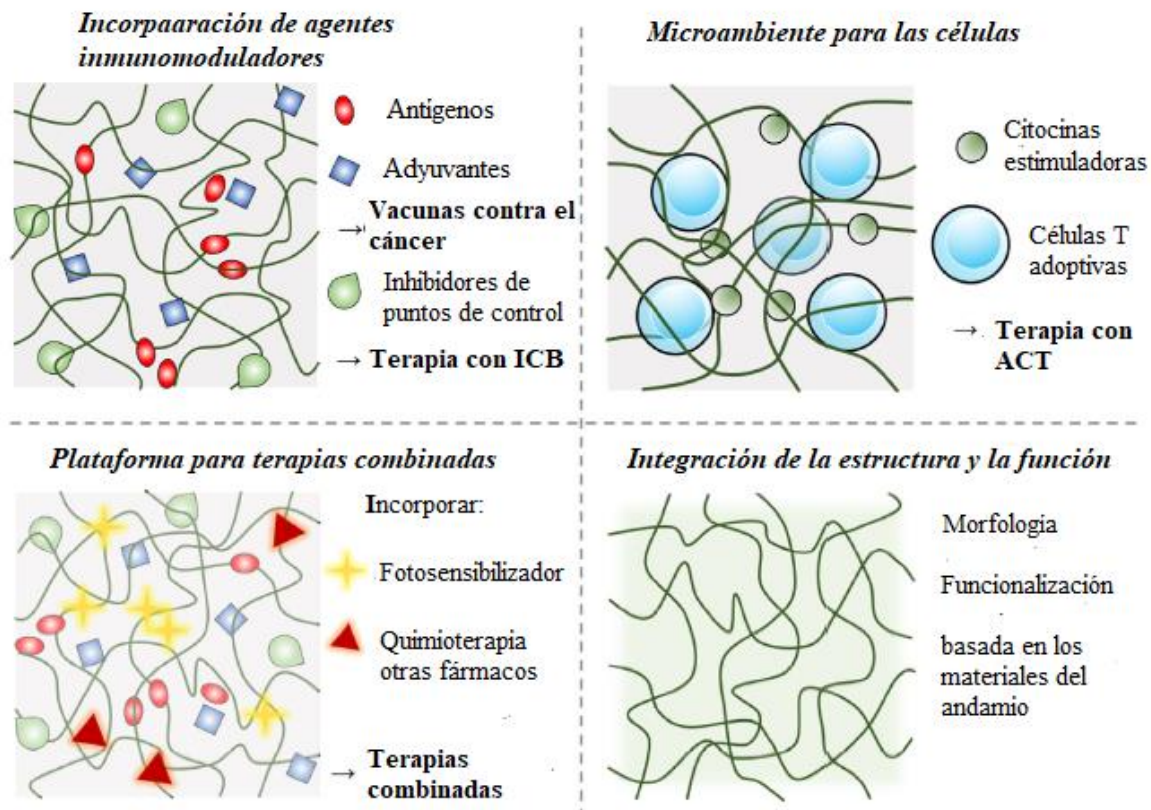


Figura 10.- Ventajas del uso de andamios en la inmunoterapia. Se muestran 4 enfoques: la incorporación de elementos al andamio, la formación de un microambiente mimético, la combinación de andamios con inmunoterapias clásica y el modelado de las propiedades del andamio.

La administración de los andamios también posee un papel relevante ya que la implantación de manera subcutánea mediante un procedimiento quirúrgico o de un hidrogel, que por sus propiedades se puede administrar por medio de una inyección, ayudan a mejorar el direccionamiento del fármaco al tener una administración más localizada y romper las barreras físicas, que impiden las interacciones de interés entre el microambiente tumoral y las células (Han y Wu 2022; Li et al. 2020; Zhao et al. 2019). Particularmente, el uso de hidrogeles no solo permite la administración en situaciones donde no es posible realizar una intervención quirúrgica, sino que además evita daños tisulares, y complicaciones debido a las respuestas inflamatorias (Han y Wu 2022; Zhao et al. 2019).

Al mismo tiempo la administración localizada en el tumor reduce la toxicidad sistémica, debido a que reduce las cantidades de los fármacos o agentes inmunoterapéuticos necesarios

para una respuesta. Posibilita el control espacio-temporal y mejoran la farmacocinética de las moléculas incorporadas al andamio, al permitir la liberación prolongada y lenta de la carga útil, que está íntimamente relacionada con la biodegradación de los biomateriales que constituyen el andamio (Han y Wu 2022; Li et al. 2020; Zhao et al. 2019). Estas propiedades se pueden usarse tanto para la diferenciación de linfocitos, así como mejorar las administración de inmunoterapias tradicionales como citocinas, y también de fármacos quimioterapéuticos o de otro tipo. Recientemente se han diseñado andamios que permiten controlar aún más la dinámica de liberación de dichos agentes por medio de andamios foto/sono/termo sensibles que aumentan su degradación o se entrecruzan con luz a ciertas longitudes de onda, ondas sonoras de amplitud específica o determinada temperatura, figura 10 (Han y Wu 2022; Li et al. 2020)

2.15.1 Uso de andamios con CDs

Partiendo de las ventajas que brinda el uso de andamios a las inmunoterapias y el bajo número de CDs exitosas que se trasplantan al paciente, se han investigado el uso de andamios para la maduración de las CDs de manera *in vivo*. En este tipo de experimentos, a los andamios implantables o los hidrogeles se les incorporan factores de crecimiento para reclutar CDs o precursores de CDs a los que se les inducirá su diferenciación. Además, se pueden acoplar otras moléculas adyuvantes para promover su activación. Por ejemplo, se construyó un hidrogel de alginato con GM-CSF, este se administró a ratones C57BL/6J, y se observó una liberación sostenida de GM-CSF, que permitió el reclutamiento de CDs, mostrando al día 5 una ocupación de más el 90% del andamio con estas células (Verbeke y Mooney, 2015). Luo et al. 2017, implementó un hidrogel de un D-tetrapéptido (D-gel) en un modelo de murino B16-OVA, el hidrogel con ovoalbúmina eliminó los tumores en un 50% del grupo. Además, implementaron estos hidrogeles acoplados con células tumorales y encontraron que las células T CD8⁺ que producían IFN- γ proliferaban en el microambiente tumoral.

3 ANTECEDENTES

En 2011 Zhang et. al caracterizaron un andamio de GE/HA entrecruzado con EDC, probaron diferentes proporciones p/p de GE/HA en los andamios 100:0, 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 y 0:100. La construcción de los andamios fue a partir de liofilización y se entrecruzaron con EDC 50 mM. Caracterizaron los andamios midiendo sus propiedades de hinchamiento, degradación *in vitro*, resistencia a la compresión, adhesión y proliferación celular, características del poro mediante microscopía electrónica de barrido. Encontraron que, al aumentar la concentración del HA en los andamios, los poros incrementaban su tamaño, lo que se atribuye a la afinidad del HA al agua por sus grupos hidroxilo. Se concluyó que la absorción del agua se vio favorecida por la estructura porosa del andamio, además al aumentar la proporción del HA en los andamios se absorbió mayor cantidad de agua, sin embargo, cuando el HA estaba en una proporción del 100%, el andamio perdía estabilidad y se disolvía. Esto concuerda con las pruebas de degradación *in vitro*, ya que al aumentar la concentración de HA el tiempo de degradación disminuyó, los andamios de HA puro se disolvieron durante la primera semana, en comparación los andamios de GE/HA 80:20 tuvieron una pérdida de peso del 19.3% después de 28 días, la degradación de los andamios se muestra en la figura 11.

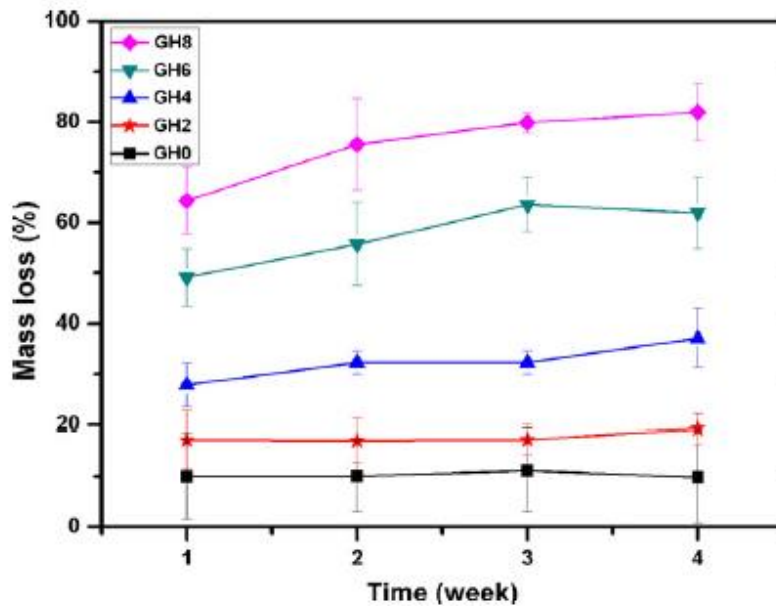


Figura 11.- Ensayos de degradación in vitro en PBS a 37°C de andamos de GE/HA durante 1,2, 3 y 4 semanas. GH8: andamios de GE/HA proporción 20:80, GH6: andamios de GE/HA proporción 40:60, GH4: andamios de GE/HA proporción 60:40, GH2: andamios de GE/HA proporción 80:20, GH0: andamios de GE. Tomado de Zhang *et. al*, 2011.

En las pruebas mecánicas se reportó que, al aumentar la proporción de GE en los andamios, se incrementó tanto la resistencia a la compresión como en el módulo elástico, esto pudo ser ocasionado debido a que los andamios con mayor contenido en HA forman poros más grandes, y además el HA puede interactuar menos eficientemente con el EDC, en comparación a la GE.

La adhesión y la proliferación se evaluaron sembrando fibroblastos de ratón L929, se encontró que la adhesión en andamios basados en HA era mala, puesto que las células mostraban una morfología esférica, en comparación a los andamios con mayor proporción de GE, con morfología en forma de huso. En cuanto a la proliferación y viabilidad celular el ensayo con MTT mostró que los andamios de GE/HA entrecruzados con EDC no son citotóxicos y permiten el crecimiento celular. Por otro lado, se encontró que al aumentar la proporción de GE en los andamios la proliferación celular fue mayor en comparación a los andamios con mayor proporción de HA (figura 12).

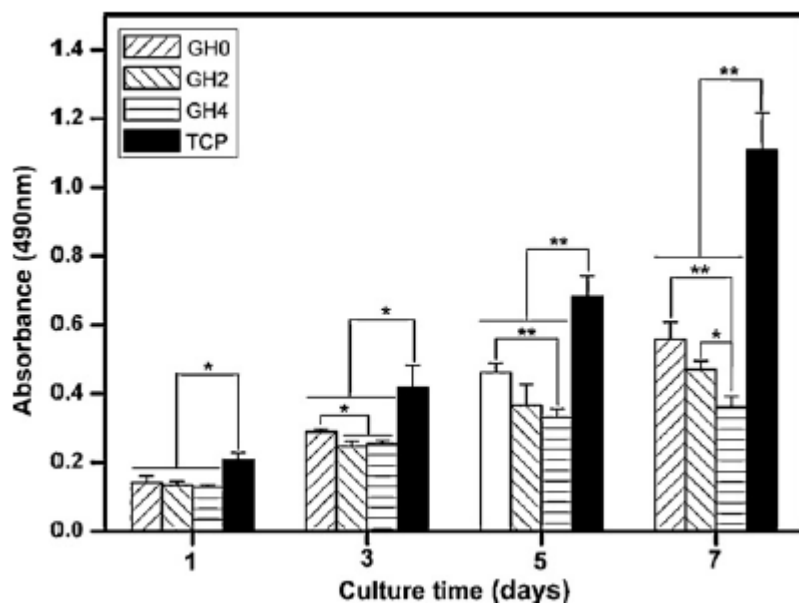


Figura 12.- Proliferación de fibroblastos de ratón L929. GH0: andamios de gelatina pura, GH2: andamios de GE/HA proporción 80:20, GH4: andamios de GE/HA proporción 60:40 y TCP: tissue culture plastic grupo de control positivo. Se muestra la absorbancia en el día 1, 3, 5 y 7, que aumenta proporcionalmente al número de células. Tomado de Zhang et al. 2011.

En 2016 Jarquín-Yáñez analizó como el efecto de las distintas concentraciones, 6, 30, 50 y 60 mM EDC como agente entrecruzante en la elaboración de andamios de GE/HA. En este estudio se encontró que el tamaño de poros disminuía al incrementar la concentración de EDC, y estos cambios eran estadísticamente significativos entre los grupos excepto entre los andamios con EDC a 30 y 50 mM, figura 13. Además, la cantidad de poros incrementó al aumentar la concentración de EDC.

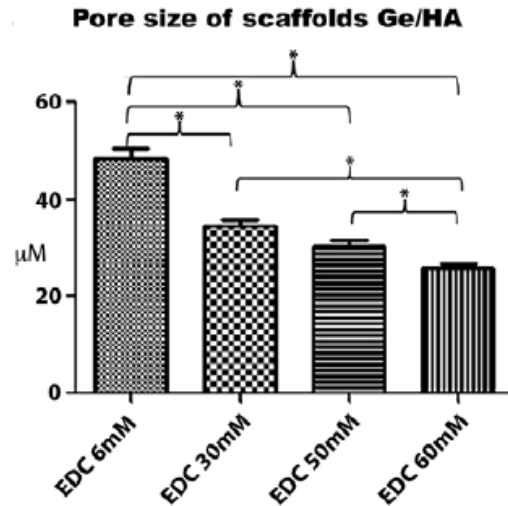


Figura 13.- Tamaño de poros en los andamios de GE/HA entrecruzados con EDC a 6mM, 30mM, 50mM y 60mM. Tomado de: Jarquín Yáñez et al. 2016

Por otro lado, la capacidad de absorción se vio disminuida al aumentar la concentración de EDC, esto se atribuyó a la formación de redes entre las cadenas poliméricas de los biomateriales.

Los estudios de citotoxicidad se realizaron sembrando células mesenquimales de médula ósea sobre los andamios por 4h y cuantificando los niveles de la enzima lactato deshidrogenasa (LHD). Se encontró que la citotoxicidad aumentaba conforme se incrementaba la concentración de EDC, estas diferencias fueron significativas entre los grupos (figura 14), pero solo los andamios con EDC a 60 mM mostraron diferencias significativas con respecto al control. Estos resultados fueron congruentes con los análisis histológicos, puesto que en los andamios con EDC 60mM se observó células dañadas y núcleos picnóticos.

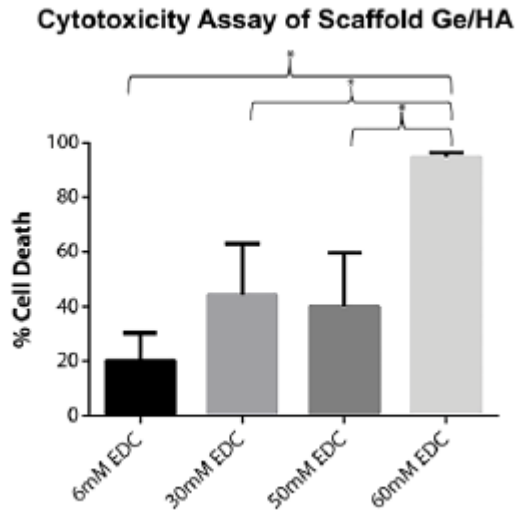


Figura 14.- Ensayo de citotoxicidad con LDH en andamios de GE/HA. Tomado de: Jarquín Yañez et al. 2016

Por otra parte, De la Rosa-Ledesma 2021, construyó andamios de GE/HA entrecruzado con EDC a 50 mM, por medio de un ensayo con Anexina V y el colorante 7AAD, evidenció que el andamio no es citotóxico. Evaluó la liberación de proteínas y la degradación del andamio en condiciones *in vitro* por 48 hrs, concluyendo que el andamio es capaz de liberar las proteínas acopladas durante el proceso de degradación del andamio y que esta degradación es constante.

Además, implantó los andamios de GE/HA en ratones C57BL/6 y por medio de tinciones con H&E reconoció la presencia de neutrófilos y macrófagos en los andamios desde el día 2 hasta el día 10, lo que se atribuyó a la degradación paulatina del andamio que prolongó una respuesta de citocinas proinflamatorias. Al inducir melanoma a los ratones y posteriormente implantarles el andamio de GE/HA encontró que los ratones tratados con el andamio retardaron el crecimiento tumoral y tuvieron mayor supervivencia en comparación con los ratones a los que se les indujo melanoma, como se muestra en la figura 15.

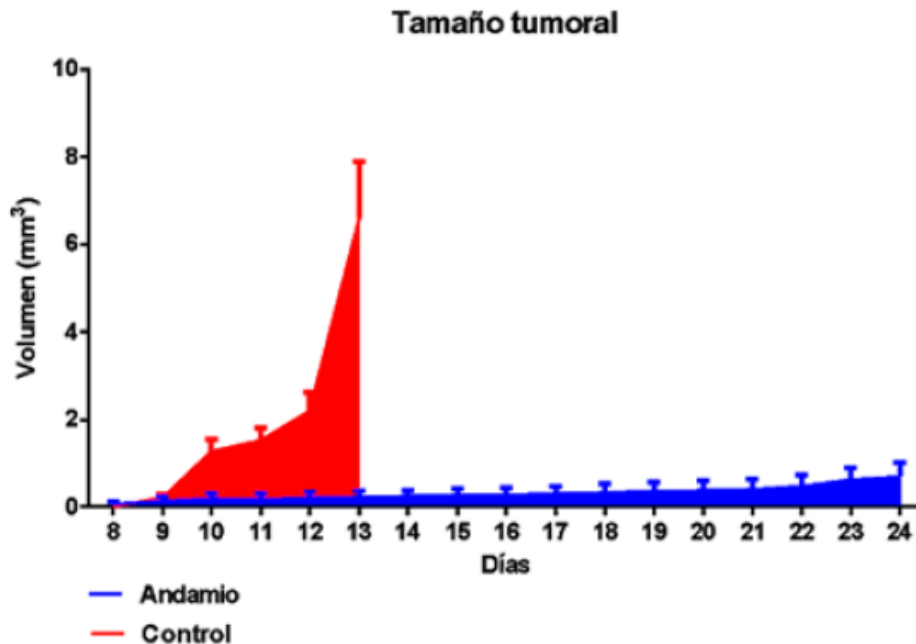


Figura 15.-Crecimiento tumoral en ratones con melanoma tratados con el andamio de GE/HA y sin tratamiento. Tomado de: De la Rosa Ledesma, 2021.

4 JUSTIFICACIÓN

El melanoma es una de las neoplasias más agresivas, puesto que a pesar de su baja incidencia representa el 80% de muertes debido a cáncer de piel (Saginala et. al, 2021). Los tratamientos actuales como la cirugía y la quimioterapia tienen un uso limitado dependiendo de la etapa en que se encuentre el tumor, además de los numerosos efectos adversos. Las inmunoterapias clásicas cuentan con una mayor especificidad en el reconocimiento de las células tumorales, sin embargo, poseen efectos secundarios graves, como el síndrome de liberación de citocinas o de fuga vascular. Además de contar con efectos limitados en la supervivencia en general.

Los andamios poseen propiedades que pueden mejorar las inmunoterapias tradicionales, al aumentar el tiempo de vida media de las moléculas inmunoestimuladoras y fármacos, permitir una administración local, reduciendo las dosis mínimas de respuesta y las posibles toxicidades sistémicas. Los andamios de GE/HA presentan una alta biocompatibilidad, mejoran la migración y adhesión celular por las propiedades de los biomateriales que los componen. Se ha reportado que fomentan el reclutamiento y persistencia de células de inmunidad innata, y mejorar la supervivencia en ratones C57BL/6 con melanoma. El uso de

un andamio de GE/HA acoplado con CpGs y antígeno tumoral MAGE A5 podría mejorar una respuesta específica hacia las células de melanoma, a partir del reclutamiento de células presentadoras de antígenos como los macrófagos y las células dendríticas sensibilizadas con antígeno MAGE A5 y una respuesta inmune innata promovida por señales asociadas a patógenos.

5 HIPÓTESIS

Si la GE y el HA promueven el reconocimiento y adhesión de leucocitos, los CpGs inducen la activación de macrófagos y células dendríticas *in vitro*, y MAGE A5 induce una respuesta inmune específica antitumoral, entonces los andamios de GE/HA acoplados a CpGs y MAGE A5 promoverán la maduración y activación de macrófagos en estudios *in vitro*, además de inducir un decremento en la tasa de crecimiento tumoral de ratones con melanoma.

6 OBJETIVO GENERAL

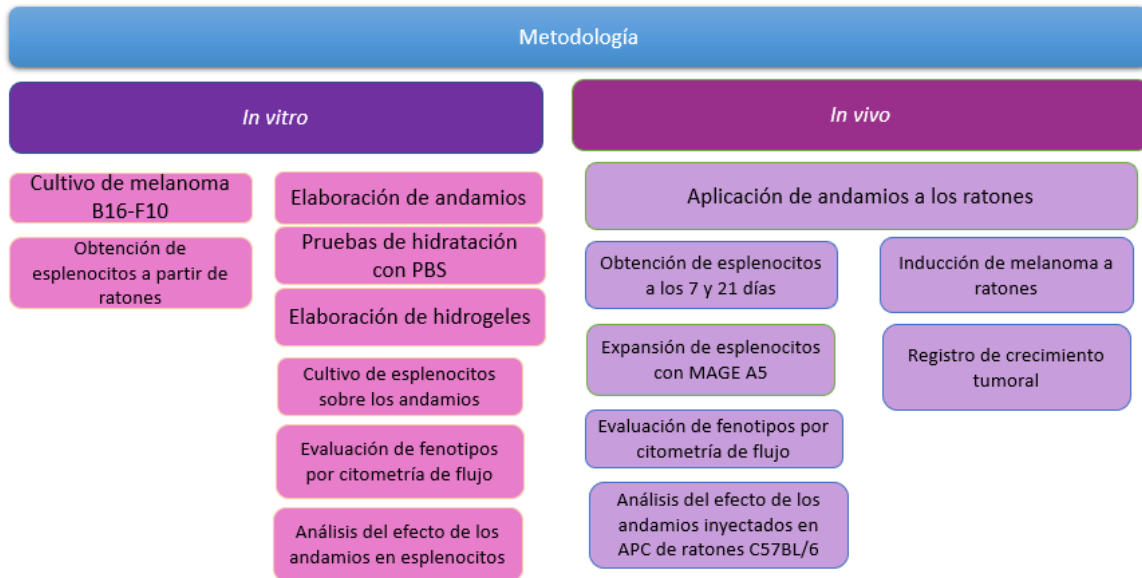
Analizar el efecto *in vitro* e *in vivo* del andamio de GE/HA acoplado a CpGs y MAGE A5 en macrófagos y células dendríticas de ratones C57BL/6.

7 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto *in vitro* de los andamios de GE/HA acoplados a CpGs, MAGE-A5 o ambos en esplenocitos mediante los siguientes parámetros:
 - Niveles de macrófagos (MHCII+ F4/80 o Ly6c+ CD3-) y células dendríticas (CD11c+ MHCII+)
 - Grado de activación mediante la expresión de CD40, CD80 y CD86
- Fabricar hidrogeles a partir de los andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE
- Analizar los niveles y grado de activación de macrófagos F4/80+, MHCII+, y Ly6c+CD3-, y células dendríticas MHCII+, CD11c+ en los esplenocitos de ratones inoculados con los hidrogeles.

- Analizar la supervivencia y tasa de crecimiento tumoral en ratones inoculados con el hidrogel de GE/HA acoplado a CpGs y/o MAGE-A5 y luego retados con células de la línea celular B16-F10.

8 METODOLOGÍA



8.1 Cultivo de melanoma

Para expandir la línea celular de melanoma B16-F10 (the American Type Culture Collection, USA) y obtener células suficientes para inocular melanoma a los ratones C57BL/6, las células se cultivaron con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (FSB) al 10% y 1% de antibiótico, a 37°C con CO_2 al 5% y humedad al 35%.

8.2 Fabricación de andamios

Se crearon cuatro tipos de andamios esponjosos y tridimensionales: GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5 y GE/HA+ CpGs +MAGE A5 basados en el método de Jarquín-Yañez et al., 2016. Se preparó una dilución al 4% de gelatina (Sigma-Aldrich) y el ácido hialurónico al 1% (Sigma-Aldrich) en agua destilada a 50°C con agitación constante con ayuda de una

barra magnética durante 30 minutos. Para los andamios de GE/HA+ CpGs, se incorporó CpGs (Invitro Gen) a una concentración de 10 μ M (Ali et. al, 2009), a la dilución de gelatina y ácido hialurónico. En el caso de los andamios de GE/HA+MAGE A5, se agregó el antígeno MAGE-A5 LGITYDGM sintetizado por Research Genetics (Invitrogen, Leiden, Holanda), con una pureza del 94%, a una concentración de 25 μ M (Eggert et. al, 2004; Piñón-Zárate et. al, 2014) a la solución de gelatina y ácido hialurónico durante la agitación. Por último, para los andamios de GE/HA+ CpGs +MAGE A5 se incorporó a la solución de gelatina y ácido hialurónico CpGs a 10 μ M y antígeno MAGE A5 a 25 μ M durante la agitación.

Después se recuperó la solución con ayuda de una jeringa de insulina y se colocaron en tubos de 1.5 mL y se refrigeraron por 24 horas a -20°C. Posteriormente los andamios se liofilizaron durante 10 horas a una temperatura de -110°C con una fuerza de vacío de 0.025 hPa. Luego los andamios se entrecruzaron sumergiéndolos en una solución de etanol al 96% con EDC (N-(3-dimetilaminopropil) N'-etilcarbodiimida) (Sigma-Alrich) a una concentración de 30 μ M durante un periodo de 24 horas a 4°C. Para retirar el EDC a los andamios se realizaron 3 lavados de 10 minutos con agua destilada y se liofilizaron nuevamente bajo las mismas condiciones durante 8 horas.

8.3 *Elaboración de hidrogeles*

Para inyectar los andamios a los ratones fue necesario formar un hidrogel, para lo cual los andamios de GE/HA con diferentes pesos, se colocaron en cajas de 6 pozos y se rehidrataron con PBS por 24 horas, como se muestra en el cuadro 3. Después los andamios se disgregaron con el embolo de una jeringa.

Cuadro 3.- Pruebas de hidratación para la formación de hidrogeles

Peso del andamio (g)	PBS (μL)
0.007	150
0.008	250
0.009	500
0.006	150
0.008	250
0.009	500

Se seleccionaron los andamios de GE/HA y andamios de GE/HA acoplado con CpGs y/o MAGE A5 con un peso de 0.009 g hidratados con 500 μ L de PBS como se muestra en la figura 16. Los andamios hidratados se esterilizaron con luz UV durante 20 minutos y bajo condiciones estériles se disgregaron utilizando el embolo de una jeringa. Finalmente, los hidrogeles se recuperaron con una jeringa.



Figura 16.- Hidratación de los andamios.

8.4 *Uso de ratones*

Para los diferentes experimentos se utilizaron 51 ratones macho de la línea C57BL/6 con haplotipo H2Kb de 7 semanas de edad. Se mantuvieron en condiciones de luz oscuridad 12/12, con temperatura controlada entre 20-25°C, humedad 40-70%, alimentación *ad libitum* en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones se criaron en cajas con pisos y paredes continuas sólidas y con tapa removible de reja con dimensiones de 32cm x 42 cm x 20 cm, con bordes y aristas redondeados (artículo 5.1.1 NOM-062-ZOO-1999), con un máximo de 4 ratones por caja. Las cajas contenían una cama de aserrín libre de pirógenos e hipoalergénico en condiciones limpias y secas. Todas las cajas se lavaron con ayuda de una fibra antirayas, jabón (ROMA) y agua, y se retiró el exceso de agua con ayuda de una tela de microfibra.

El alimento y el agua potable se mantuvo con libre acceso durante toda la vida del animal (artículo 5.1.3.1, NOM-062-ZOO-1999). Los usuarios encargados del cuidado de los ratones utilizaron en todo momento cubrebocas, bata, y gorra quirúrgica. Todo lo anterior de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y

uso de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Para la eutanasia, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical.

8.5 Efecto de los andamios de GE/HA acoplados a CpGs o MAGE A5 en esplenocitos murinos de ratones con melanoma. *Experimentos in vitro*

Se obtuvieron los esplenocitos de ratones C57BL/6 con melanoma. Para lo cual se sacrificaron dos ratones por dislocación cervical, se les extirparon los bazo y se lavaron tres veces en PBS a 4°C, por medio de agitación constante. En condiciones estériles, los bazo se colocaron en cajas de 5 cm de diámetro y entre dos mallas de poro de 100 micras. Se agregó medio RPMI con FSB al 10% y 1% de antibiótico y usando un embolo se disgregaron mecánicamente los órganos. Se extrajo el medio de cultivo y se centrifugó a 1800-2000 rpm durante 3 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y el botón celular obtenido se lavó bajo las mismas condiciones. Se contabilizó el número de células utilizando la cámara de Neubauer y azul de tripano.

Para determinar el efecto que ejercen los diferentes andamios tridimensionales, se cultivaron 1.5×10^6 de esplenocitos a los andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5, los cuales se colocaron en cajas de 24 pozos con medio RPMI suplementado con FSB al 10% y 1% de antibiótico, así también se implementó un grupo sin tratamiento que consistió en esplenocitos cultivados en medio RPMI. Los andamios con células y el grupo sin tratamiento se incubaron por un periodo de 5 días a 37°C con humedad al 90% y CO_2 al 5%. Posteriormente se realizaron tinciones para citometría de flujo para detectar las células dendríticas MHCII+ CD11c+, los macrófagos MHCII+ F4/80+, macrófagos CD3-Ly6c+ y para las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86.

8.6 Evaluación del efecto de los hidrogeles de GE/HA acoplados con CpGs y MAGE A5 en ratones C57BL/6.

Para analizar el efecto *in vivo* que ejercen los andamios en los ratones C57BL/6, se aplicaron 100 μ L de los hidrogeles de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones por medio de una inyección subdérmica cerca del ganglio inguinal (4 ratones por grupo). Después de 7 y 21 días, dos ratones de cada grupo se sacrificaron por dislocación cervical y se aislaron las células de bazo bajo el mismo procedimiento empleado

para el cultivo de esplenocitos sobre los andamios. Se contabilizaron las células utilizando la cámara de Neubauer y azul de tripano. Se cultivaron 1×10^6 células de bazo en cajas de 24 pozos con medio de cultivo RPMI suplementado con FSB al 10% y antibiótico al 1%, además se les agregó antígeno MAGE A5 a 25 μM para estimularlas. Las células se incubaron por 3 días a 37°C con humedad al 95% y CO_2 al 5%. Posteriormente se realizaron tinciones para citometría de flujo para detectar células dendríticas MHCII+CD11c+, macrófagos MHCII+F4/80 y macrófagos CD3-Ly6c+.

8.7 Tinciones y análisis para citometría de flujo

Las tinciones de para citometría de flujo se realizaron para determinar los siguientes fenotipos: células dendríticas CD11c+MHCII+, macrófagos F4/80+ MHCII+ y Ly6c+ CD3- y los marcadores de activación CD40, CD80 y CD86 para los fenotipos F4/80+ MHCII+ y CD11c+ MHCII+. Los anticuerpos que se utilizaron fueron anti-CD3 FITC, anti-CD11c APC, anti-MHCII-FITC, anti-F4/80-PECy5, anti-Ly6c-biotPE, -anti-CD40-PE, anti-CD80-PE y anti-CD86-PE, adquiridos en Biolegend, USA.

Las células cultivadas en cajas de 24 pozos, provenientes de ratones inoculados con los hidrogeles o los esplenocitos cultivados sobre los andamios, fueron resuspendidas. Luego se colocaron en tubos de 1.5 mL y se centrifugaron a 2000 rpm por tres minutos, se descartó el sobrenadante y después se agregó 1000 μL de PBS de tinción. Los tubos se agitaron con ayuda del vortex hasta homogeneizar las muestras y se volvieron a centrifugar a 2000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se añadieron los cocteles de anticuerpo de acuerdo con los fenotipos implementados. Todos los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 1:300. Los tubos se mezclaron por 10 segundos en el vortex o hasta que se homogeneizaron las soluciones, y se incubaron en condiciones de oscuridad por 30 minutos.

Después de la incubación de los tubos, las soluciones celulares se mezclaron con ayuda del vortex y se centrifugaron bajo las condiciones anteriores. Se retiró el sobrenadante de los tubos y se agregó 1000 μL de PBS de tinción, las soluciones se volvieron a homogeneizar con ayuda del vortex y se centrifugaron bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se agregó nuevamente 1000 μL de PBS de tinción para repetir el mismo

procedimiento, al descartar el sobrenadante se agregó 250 μ L de PBS de fijación y los tubos se guardaron a -4 C°.

Para los tubos a los que se les adicionó un anticuerpo biotinilado (anti-Ly6c), después del segundo lavado con PBS de tinción y posterior a la primera incubación, se les adicionó un coctel con estreptavidina a una concentración de 1:400. Después las soluciones celulares se mezclaron por 5 segundos con ayuda del vortex y se incubaron en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente por 30 minutos. Al terminar la incubación se realizaron dos lavados con PBS de tinción, se descartó el sobrenadante y se agregó 250 μ L de PBS de fijación a cada tubo y se guardaron a -4 C°.

Todas las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSCalibur y los resultados se procesaron en el programa FlowJo X para obtener el porcentaje de células de MHCII+ CD11c+, MHCII+ F4/80 y CD3- Ly6c+. Además, se obtuvo la media de intensidad de fluorescencia (MIF) para MHCII, Ly6c, CD40, CD80 y CD86

8.8 Registro del crecimiento tumoral

A los ratones C57BL/6 se les aplicó 5 diferentes tratamientos: GE/HA (5 ratones), GE/HA+ CpGs (8 ratones), GE/HA+ MAGE A5 (5 ratones), GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 (5 ratones) y el grupo control sin tratamiento (10 ratones). Se aplicaron 100 μ L de los hidrogeles a los ratones por medio de una inyección subdérmica en la zona del ganglio inguinal. Después de 21 días se indujo melanoma a los ratones con una inyección subdérmica de 5×10^4 de células de melanoma B16-F10, en la zona del ganglio inguinal.

Se registró el crecimiento tumoral en los ratones cada tres días. Para lo cual se midió el diámetro menor y el diámetro mayor de la masa tumoral con un vernier. Para evaluar el crecimiento tumoral, se obtuvo el volumen del tumor con la siguiente fórmula:

$$volumen\ tumoral = \frac{(diámetro\ mayor^2)(diámetro\ menor)}{2}$$

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical una vez presentaron una masa tumoral con un diámetro mayor >2.2 cm.

8.9 Pruebas estadísticas

Para el análisis de resultados se utilizó el programa GraphPad Prism 9 para realizar ANOVAS de una y dos vías, además de la prueba post hoc Tukey. Se consideró una $p < 0.05$ para que los resultados fueran estadísticamente significativos.

9 RESULTADOS

9.1 Efecto de los andamios de GE/HA acoplados a CpGs o MAGE A5 en esplenocitos murinos de ratones con melanoma. *Experimentos in vitro*

Para conocer el efecto directo de los andamios en los leucocitos, esplenocitos de ratones C57BL/6 con melanoma se cultivaron con los diferentes andamios durante 5 días. Después se analizó el porcentaje de macrófagos MHCII⁺ F4/80, células dendríticas MHCII⁺ CD11c⁺ y la expresión de moléculas coestimuladoras. El porcentaje de macrófagos y células dendríticas se aprecia en la figura 17. Con base en los resultados obtenidos en la prueba de ANOVA a un 95% de confianza se halló que existen diferencias significativas en el porcentaje de macrófagos dependiendo del tratamiento. Al aplicar la prueba de Turkey se encontraron que existen diferencias significativas entre el porcentaje de macrófagos en los tratamientos de GE/HA con una media de 54.93 ± 13.76 y el grupo de GE/HA + MAGE A5 con una media de 11.61 ± 5.56 . También existen diferencias significativas entre las células que se cultivaron sobre los andamios de GE/HA + CpGs con una media de 50.2 ± 9.88 y el grupo de GE/HA+ MAGE A5.

En el caso de las células dendríticas se apreció que los grupos que presentaron mayores porcentajes de células fueron GE/HA con una media de 11.62 ± 5.95 y GE/HA+ CpGs con una media de 11.61 ± 5.56 , a diferencia del tratamiento con GE/HA+ CpGs +MAGE A5 en donde se registró una media de 3.8 ± 1.06 . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas al aplicar la prueba de ANOVA de dos vías.

Cultivo *in vitro* de esplenocitos

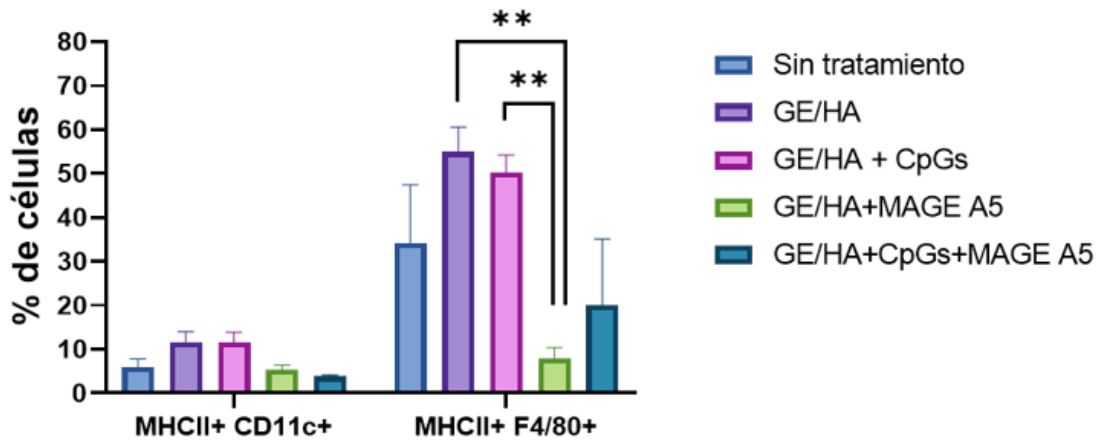


Figura 17.- Células dendríticas (MHCII+ CD11c+) y macrófagos (MHCII+ F4/80) presentes en los cultivos sobre andamios GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 y un grupo sin tratamiento. Prueba de ANOVA a dos vías $p < 0.05$, error estándar.

Para la población de macrófagos CD3- Ly6c+, las células cultivadas sobre los andamios de GE/HA mostraron un mayor porcentaje de células, en comparación con los grupos tratados con GE/HA+ MAGE A5 y/o CpGs. Sin embargo, no se encontraron cambios estadísticamente significativos como se aprecia en la figura 18.

Porcentaje de células CD3- Ly6C+

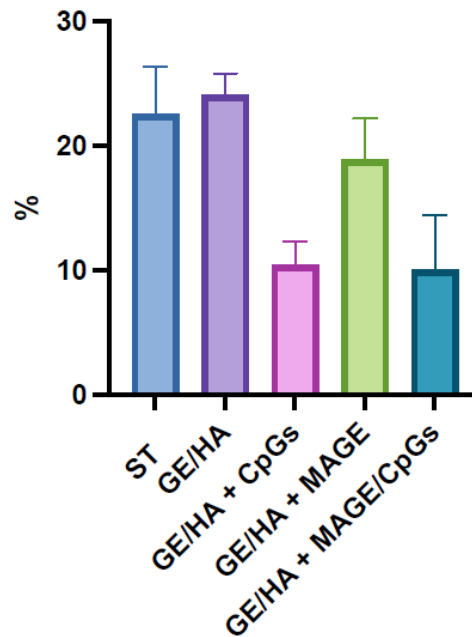


Figura 18.- Macrófagos CD3- Ly6c+, presente en los cultivos de esplenocitos de ratones con melanoma, sin tratamiento (ST) y sobre andamios de GE/HA, GE/HA+CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Prueba de ANOVA a dos vías $p < 0.05$, error estándar.

Se registró la media de intensidad de fluorescencia para las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, para evaluar la activación de células dendríticas MHCII+ CD11c+ y macrófagos MHCII+ F4/80+ como se muestra en la figura 19. En el caso del MIF para CD86 se encontró que el tratamiento con GE/HA fue el que tuvo mayor MIF en las células dendríticas con una media de 138.75 ± 65.40 en comparación con los grupos de GE/HA+ CpGs y/o MAGE A5.

También con CD86 pero en el caso de los macrófagos el tratamiento con GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 fue el que registró los niveles de fluorescencia más altos con una media de 88.25 ± 16.47 , en comparación con los tratamientos de GE/HA+CpGs y GE/HA+ MAGE A5. Sin embargo, para ambas poblaciones no se encontraron diferencias significativas.

Al evaluar CD80 en las poblaciones de células dendríticas se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de GE/HA+ MAGE A5 con una media de 145.5 ± 9.19 y el tratamiento de GE/HA que presentó una media de 67.5 ± 11.59 . En el caso de los macrófagos se encontró que el tratamiento con GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 fue el que

presentó mayor fluorescencia en comparación con el MIF observado en los andamios de GE/HA. Paralelamente a lo observado en las CDs estas diferencias no fueron significativas

En el caso del MIF registrado para CD40 se encontraron diferencias significativas para la población de macrófagos entre los tratamientos de GE/HA+ CpGs con una media de 14.95 ± 5.3 y el tratamiento de GE/HA+ MAGE A5 con una media de 41.75 ± 5.16 . Por otro lado, en las células dendríticas hubo mayor fluorescencia en el tratamiento de GE/HA+ CpGs+ MAGE en comparación con los andamios de GE/HA+ CpGs o MAGE A5, no obstante, no se encontraron diferencias significativas.

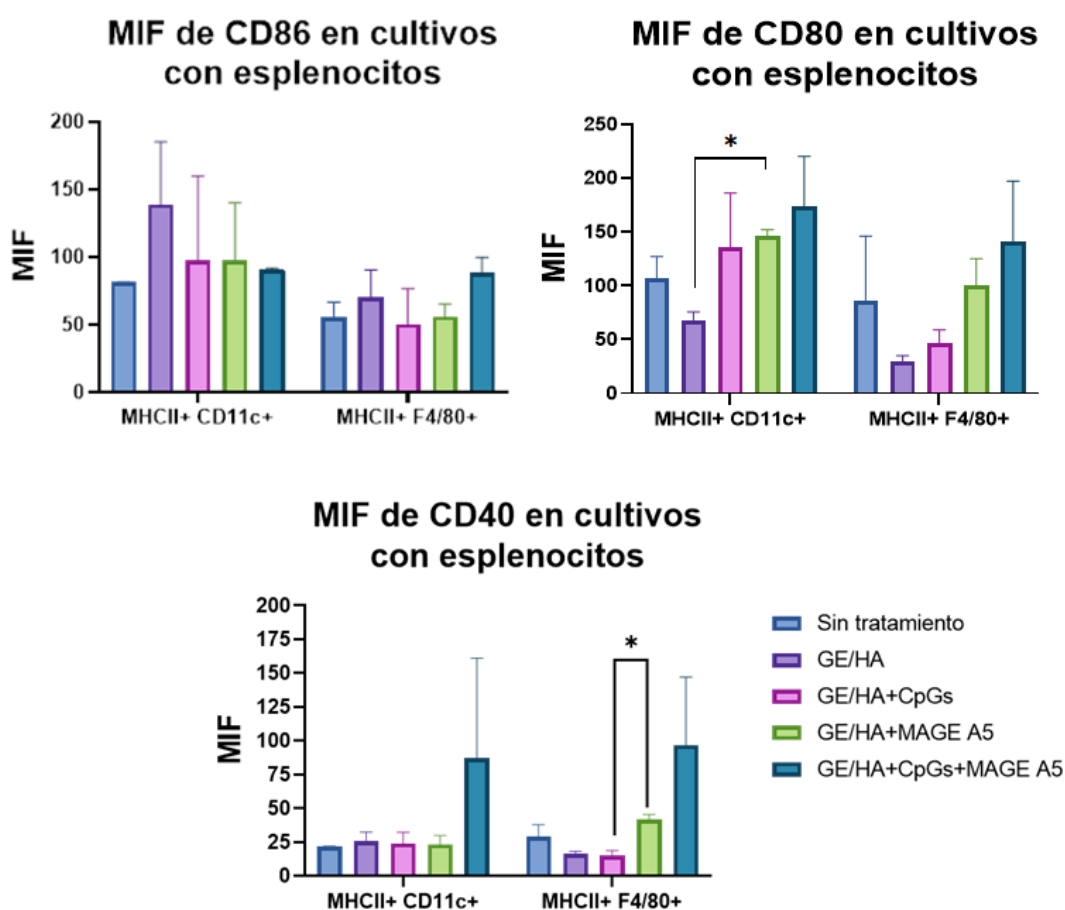


Figura 19.-Moléculas coestimuladoras CD86 (superior izquierda), CD80 (superior derecha) y CD40 (inferior), para las células dendríticas (MHCII+ CD11c+) y macrófagos (MHCII+ F4/80+) a partir de cultivos con esplenocitos de ratones con melanoma sin tratamiento y sobre andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Prueba de ANOVA a dos vías $p < 0.05$, error estándar.

Para evaluar la maduración de los macrófagos CD3- Ly6c+ se midió la MIF de Ly6c como se muestra en la figura 20. El tratamiento con GE/HA+ CpGs registró mayor fluorescencia con una media de 198 ± 21.21 en comparación con el andamio de GE/HA, pero no se encontraron diferencias significativas.

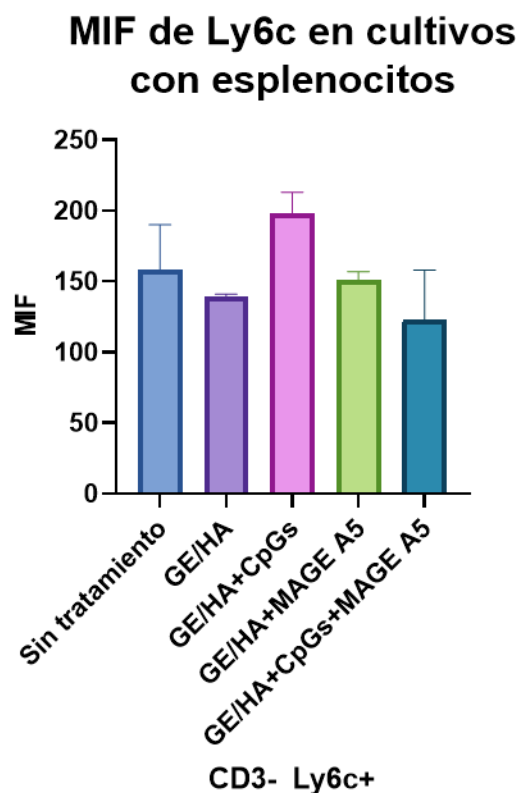


Figura 20.- Expresión de Ly6c en la población de macrófagos CD3- Ly6c+ obtenidos de cultivos de esplenocitos de ratones con melanoma sobre andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Prueba de ANOVA a dos vías $p < 0.05$, error estándar.

9.2 Evaluación del efecto de los hidrogeles de GE/HA acoplados con CpGs y MAGE A5 en ratones C57BL/6

Para analizar el efecto de los hidrogeles en las poblaciones de células dendríticas y macrófagos, se elaboraron hidrogeles a partir de los andamios de GE/HA, GE/HA+CpGs, GE/HA+MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Estos se aplicaron a los ratones C57BL/6 cerca del ganglio inguinal, para posteriormente extraer los esplenocitos a los 7 y a los 21 días,

estimularlos con MAGE A5 e incubarlos por 3 días. Se evaluó el crecimiento de la población de células dendríticas MHCII+ CD11c+ y macrófagos MHCII+ F4/80+ como se muestra en la figura 21, después de 7 días de aplicar los andamios, el tratamiento de GE/HA+ CpGs fue el que presentó el mayor porcentaje de células dendríticas con una media de 4.07 ± 2.24 , en comparación con el andamio de GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Mientras que en el caso de los macrófagos el andamio de GE/HA fue el que tuvo el mayor porcentaje de células con una media de 6.25 ± 8.83 , en comparación con los grupos de GE/HA+ CpGs y GE/HA+ MAGE A5. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas entre los porcentajes de células tanto para células dendríticas como para macrófagos.

Después de 21 días de la aplicación de los andamios, el tratamiento que presentó mayor porcentaje de células dendríticas en comparación con el tratamiento con GE/HA, fue a base de andamios de GE/HA+ MAGE A5 con una media de 1.33 ± 0.43 . En el caso de los macrófagos, el tratamiento con andamios de GE/HA fue el que tuvo el porcentaje de células más elevado con una media de 2.53 ± 1.95 , a diferencia del tratamiento de GE/HA+ CpGs. Pero igualmente estas diferencias no fueron significativas.

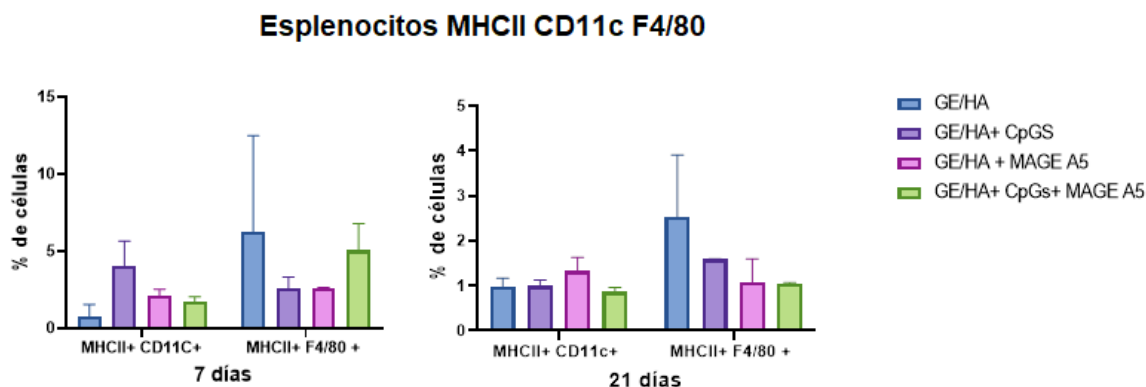


Figura 21.- Células dendríticas (MHCII+ CD11c) y macrófagos (MHCII+ F4/80) después de 7 días (izquierda) y 21 días (derecha) de aplicar andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones C57BL/6. Prueba de ANOVA de dos vías $p < 0.05$, error estándar.

Se encontró que los porcentajes de células tanto para células dendríticas como para macrófagos fueron mayores después de los 7 días como se muestra en la figura 22. En el caso de las células dendríticas la diferencia fue notoria en el tratamiento con andamios de GE/HA+

CpGs, ya que después de 7 días se registró una media de 4.07 ± 2.24 y para los 21 días se encontró una media de 0.99 ± 0.19 . En el caso de macrófagos esta diferencia se aprecia más en el tratamiento de GE/HA, ya que después de 7 días se registró una media de 6.25 ± 8.83 , y a los 21 días se encontró una media de 2.53 ± 1.95 . A pesar de estas observaciones las diferencias no fueron significativas.

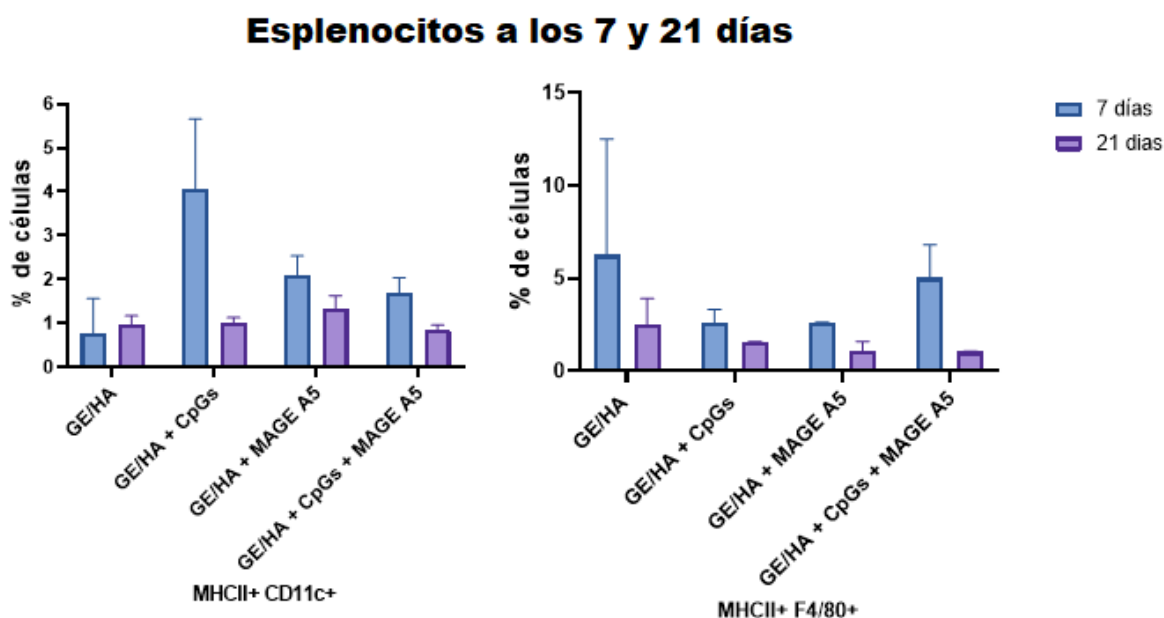


Figura 22.- Células dendríticas (MHCII+ CD11c+) y macrófagos (MHCII+ F4/80) presentes después de 7 (izquierda) y 21 días (derecha) de aplicar los hidrogeles de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones C57BL/6. Prueba de ANOVA, $p < 0.05$, error estándar.

Así también se registraron los porcentajes de macrófagos CD3- Ly6c+ a los 7 y 21 días después de aplicar los hidrogeles a los ratones, como se muestra en la figura 23. A los 7 días la población de macrófagos con el tratamiento de GE/HA+ CpGs fue mayor en comparación con el tratamiento con andamios de GE/HA+ CpGs+ MAGE A5. Por otro lado, a los 21 días se encontró que el tratamiento con GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 tuvo mayor porcentaje de células en comparación a los tratamientos con GE/HA+ CpGs o MAGE A5.

Porcentaje de células CD3-, Ly6c+

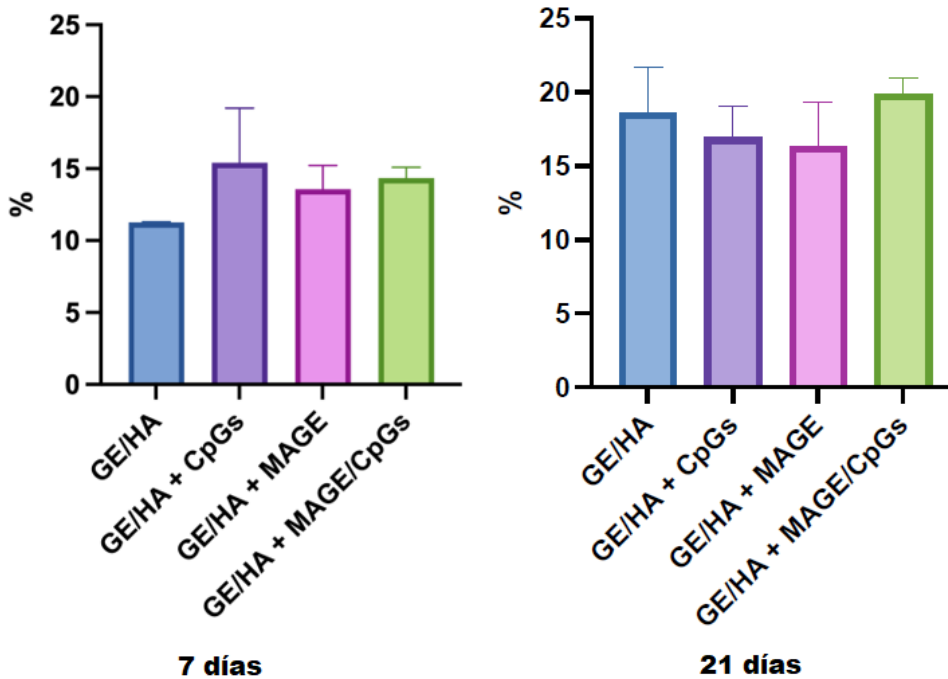


Figura 23.- Macrófagos CD3- Ly6c+, presentes después de 7 (izquierda) y 21 días (derecha) de aplicar los hidrogeles de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5, GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones C57BL/6. Prueba de ANOVA de dos vías $p < 0.05$, error estándar.

Para evaluar la maduración de las células dendríticas MHCII+ CD11c+ y los macrófagos MHCII+ F4/80+ se obtuvo la MIF para MHCII como se muestra en la figura 24. En el caso de las células dendríticas a los 7 días de aplicar los andamios se aprecia que los tratamientos de andamios con moléculas acopladas (GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5) mostraron mayor fluorescencia, en comparación con el andamio de GE/HA. Además, se encontró que el tratamiento con GE/HA+MAGE A5 fue el que tuvo mayor fluorescencia con una media de 1542 ± 90.51 a diferencia del tratamiento con el andamio de GE/HA, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Por otro lado, para los macrófagos a los 7 días se encontró que el tratamiento con los andamios de GE/HA+ CpGs un MIF mayor al de los andamios de GE/HA, con una media de 774 ± 5.66 , aunque como se aprecia en la figura 24 no se encontraron diferencias significativas.

En el caso de la media de intensidad de fluorescencia de MHCII a los 21 días después de aplicar los andamios, se encontró que en las células dendríticas hubo diferencias significativas entre los tratamientos con GE/HA+ CpGs y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5, siendo este último el que presentó mayor fluorescencia con una media de 645 ± 38.18 , en comparación a la media de 563.5 ± 37.48 para el tratamiento de GE/HA+ CpGs.

En el caso de los macrófagos, a los 21 días se presentó mayor fluorescencia en el tratamiento de GE/HA+ MAGE A5 con una media de 662.5 ± 28.99 , a diferencia del tratamiento con GE/HA+ CpGs+ MAGE A5, como se aprecia en la figura 24. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas.

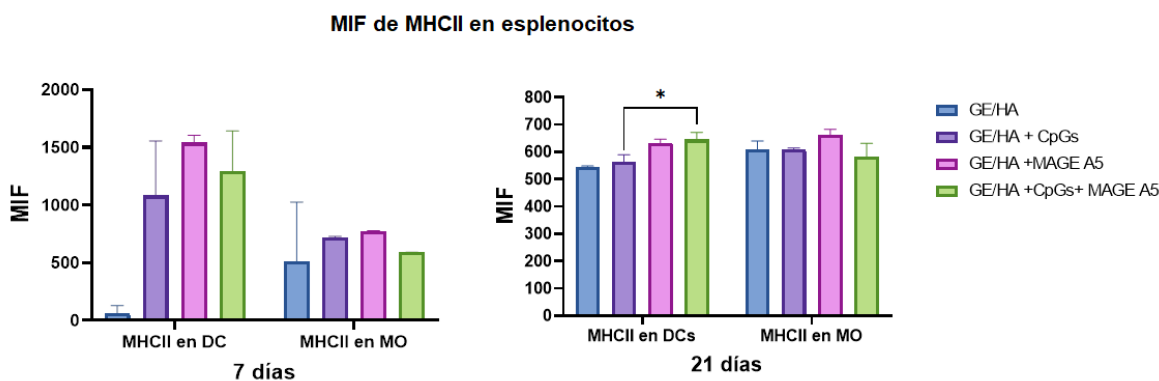


Figura 24.- Expresión de MHCII a los 7 (izquierda) y 21 días (derecha) después de aplicar los andamios de GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones C57BL/6. Prueba de ANOVA de dos vías, $p < 0.05$, error estándar.

En la figura 25 se compara la media de intensidad de fluorescencia de MHCII registra en células dendríticas y macrófagos a los 7 y 21 días. Se puede observar que en el caso las células dendríticas la fluorescencia para MHCII creció del día 7 al día 21 solamente para el caso del tratamiento con GE/HA donde al día 7 se encontró una media de 64.5 ± 91.22 y para el día 21 la media fue de 545.5 ± 4.95 . Para los demás tratamientos la fluorescencia registrada de MHCII fue mayor a los 7 que a los 21 días. Por ejemplo, al aplicar el tratamiento de GE/HA+ MAGE A5, a los 7 días se registró una media de 1542 ± 90.51 , mientras que a los 21 días se encontró una media de 633.5 ± 19.09 . A pesar de estos datos, estas diferencias no fueron significativas.

Por otro lado, los macrófagos registraron una fluorescencia ligeramente mayor a los 7 días que a los 21 días. Por ejemplo, en los andamios de GE/HA+MAGE A5 a los 7 días se tuvo una MIF de 774 ± 5.67 mientras que a los 21 días fue de 662.5 ± 28.99 . Pero, igualmente estas diferencias no fueron significativas.

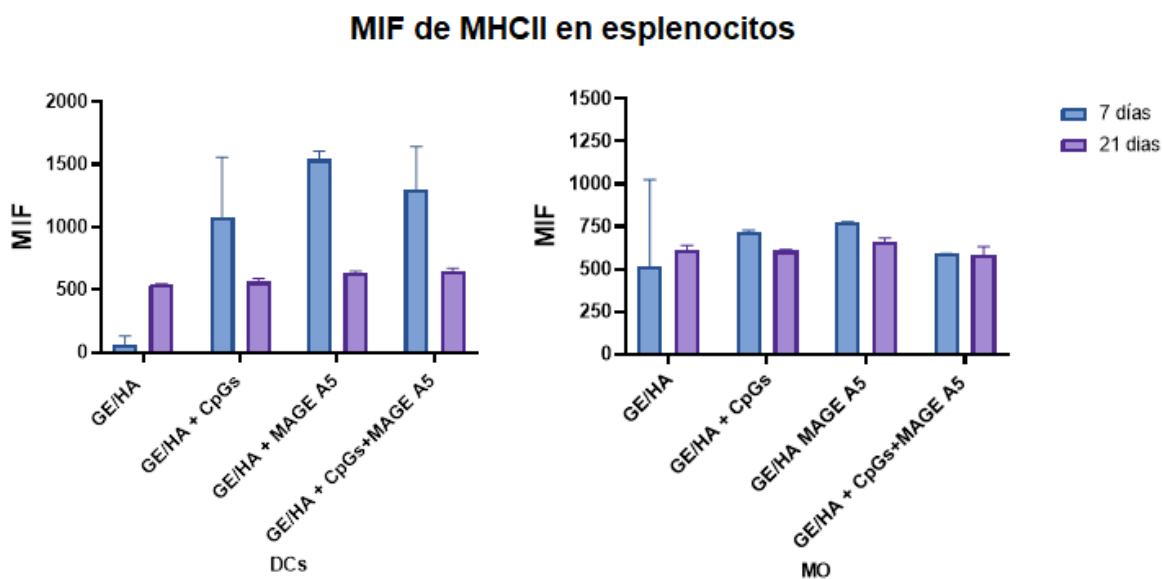


Figura 25.- Comparación de media de intensidad de fluorescencia a los 7 y 21 después de aplicar los andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5, para las células dendríticas (izquierda) y macrófagos (derecha). Prueba de ANOVA, $p < 0.05$, error estándar.

Se evaluó también la media de intensidad de fluorescencia de Ly6c para los macrófagos CD3-Ly6c+ a los 7 y 21 días, como se presenta en la figura 26. Se observó que después de 7 días la fluorescencia fue similar para los diferentes tratamientos, y solo ligeramente menor en el tratamiento con Ge/HA+ CpGs+ MAGE A5 comparando a lo observado en el tratamiento con Ge/HA+CpGs. Además, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Después de los 21 días el tratamiento con mayor fluorescencia fue con andamios de Ge/HA+ CpGs+ MAGE A5 en comparación con el tratamiento con Ge/HA. Pero no se encontraron diferencias significativas.

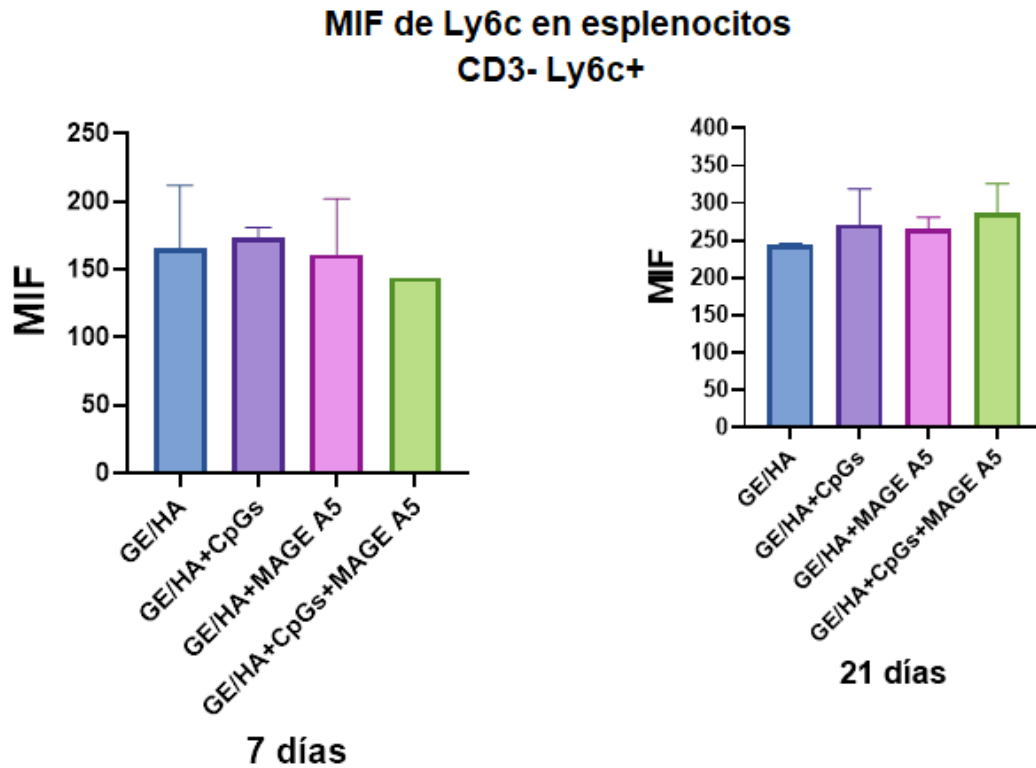


Figura 26.- Expresión de Ly6c en macrófagos CD3- Ly6c+ después de 7 y 21 días de aplicar los andamios de GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 a los ratones C57BL/6. Prueba de ANOVA a dos vías, $p < 0.05$, error estándar.

En la figura 27 se muestra la comparación entre la MIF de Ly6c en macrófagos CD3- Ly6c+ a los 7 y 21 días de aplicar los andamios. Se aprecia que la fluorescencia fue superior a los 21 días, este aumento se observa más en el grupo de GE/HA+ CpGs en el cual se registró una MIF 173.5 ± 10.60 a los 7 días mientras que a los 21 días se encontró una MIF de 271 ± 67.88 , aunque no se encontraron que estas diferencias fuesen significativas.

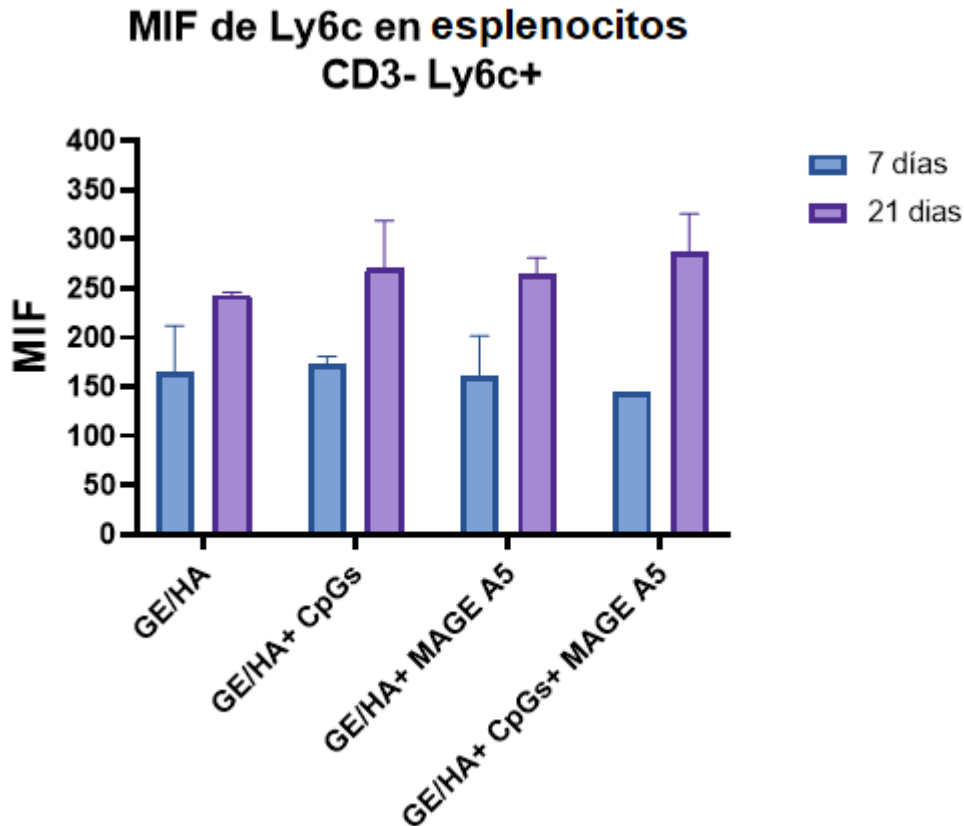


Figura 27.- Comparación entre la media de intensidad de fluorescencia de Ly6c a los 7 y 21 días después de aplicar los andamios de GE/HA, GE/HA+CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA +CpGs +MAGE A5 a los ratones C57/BL6. Prueba de ANOVA, $p < 0.05$, error estándar

9.3 Registro del crecimiento tumoral y supervivencia

Para evaluar el efecto de los hidrogeles en el crecimiento tumoral, se aplicaron los hidrogeles (GE/HA, GE/HA+ CpGs, GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA +CpGs +MAGE A5) a los ratones C57BL/6 y 21 días después se retaron con melanoma B16-F10. También tuvo un grupo de control que consistió en ratones C57BL/6 a los que se les indujo melanoma. Se registró el tamaño tumoral cada tercer día y se obtuvo el volumen de la masa tumoral. Los resultados del volumen tumoral registrado en los ratones a partir del día 22 se muestran en la figura 28. Como se aprecia, el grupo control, fue el que registró mayor volumen tumoral en comparación a los ratones a los que se les aplicó algún tratamiento. En los ratones sin tratamiento se desarrolló un tumor que llegó a medir 22.5 cm^3 al día 26, cuando se sacrificaron

Los ratones tratados con GE/HA+ MAGE A5 fueron los que desarrollaron los tumores más grandes antes del día 28, ya que se registró una media de $10.62 \pm 11.19 \text{ cm}^3$, los ratones con andamios de GE/HA+ CpGs presentaron una media de $5.6 \pm 5.7 \text{ cm}^3$, el grupo de GE/HA tuvo una media de $4.44 \pm 2.77 \text{ cm}^3$ y finalmente el grupo de GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 tuvo una media de $1.29 \pm 2.934 \text{ cm}^3$, hasta el día 26. Aunque los ratones tratados con el andamio de GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 fueron los que presentaron menor volumen tumoral en comparación al de GE/HA hasta el día 26. Los ratones tratados con GE/HA+MAGE A5 que sobrevivieron después del día 27 tuvieron un crecimiento tumoral ralentizado hasta el día 34 en donde se registró una media de $2.43 \pm 2.22 \text{ cm}^3$. Sorprendentemente, los ratones tratados con GE/HA+ CpGs que sobrevivieron después del día 28 nunca desarrollaron una masa tumoral, hasta el día 42 en donde todos los ratones restantes fueron sacrificados.

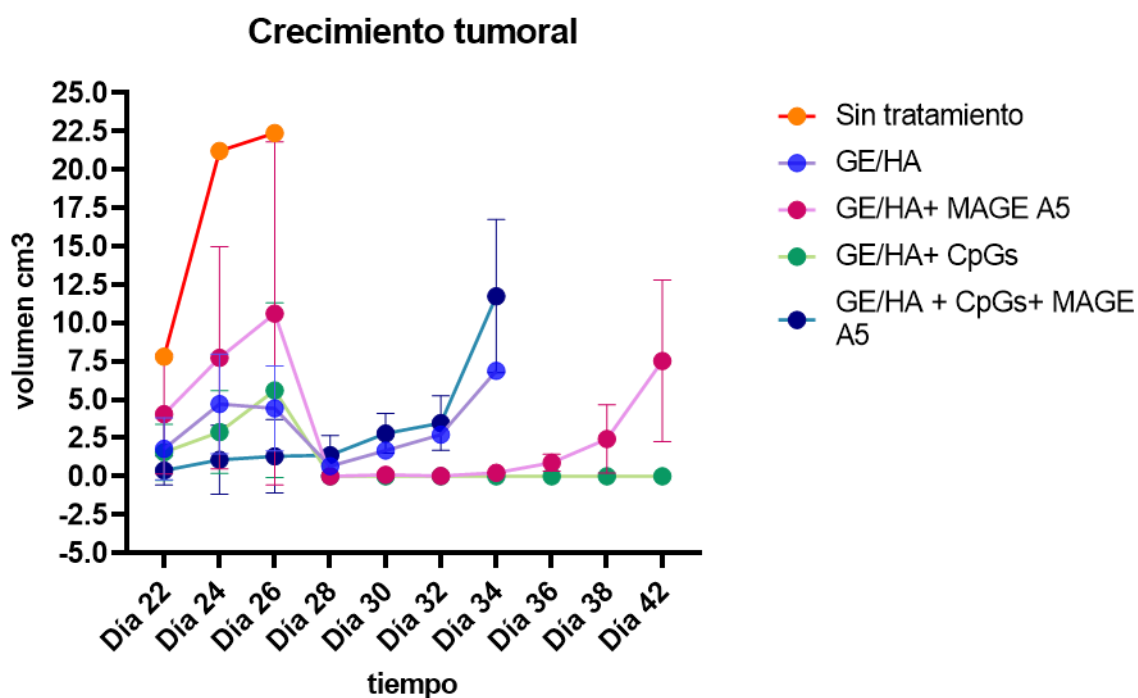


Figura 28.- Crecimiento tumoral registrado para los ratones C57BL/6 a los que previamente se habían administrado hidrogeles de GE/HA (5 ratones), GE/HA+ CpGs (8 ratones), GE/HA+ MAGE A5 (5 ratones) y GE/HA+ CpGs + MAGE A5 (5 ratones) y a los que no se les aplicó tratamiento (10 ratones). Media con desviación estándar.

En la figura 29 se muestra la supervivencia registrada en los ratones, se puede apreciar que a partir del día 34 el porcentaje de supervivencia de ratones tratados con GE/HA+ MAGE A5+

CpGs fue alrededor del 43%. En el caso del tratamiento con andamios de Ge/HA, después del día 28 sobrevivió alrededor del 14% hasta el día 34 cuando fueron sacrificados.

Por otro lado, los grupos de GE/HA+ MAGE A5 y GE/HA+ CpGs fueron los que tuvieron mayor supervivencia (figura 29). Ambos grupos registraron una supervivencia alrededor del 28% desde el día 28 hasta 41 donde se sacrificaron. El grupo de Ge/HA+MAGE A5 mostró un crecimiento ralentizado del tumor, sin embargo los ratones del grupo tratado con GE/HA+ CpGs no desarrollaron tumor.

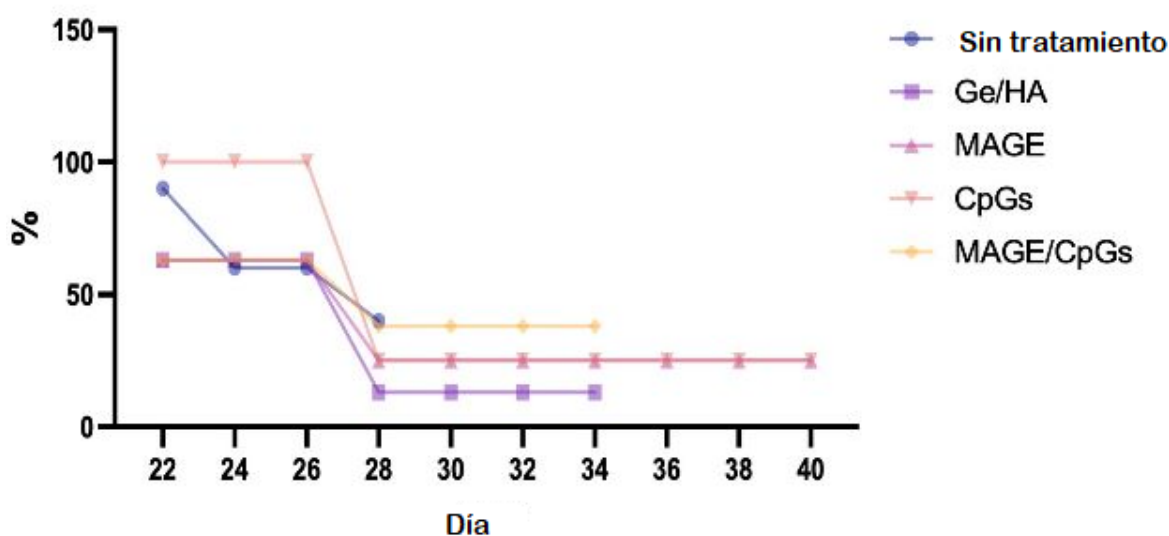


Figura 29.- Sobrevida de los ratones retados con melanoma. Se muestra el porcentaje de sobrevida de los ratones a lo largo de los días después de la aplicación de los hidrogeles de GE/HA (5 ratones), GE/HA+ MAGE A5 (5 ratones), GE/HA+ CpGs (8 ratones), GE/HA+ CpGs+ MAGE A5 (5 ratones) y sin tratamiento (10 ratones).

10 DISCUSIÓN

El uso de andamios se ha implementado en la expansión y activación de APCs tanto *ex vivo* como *in vivo* puesto que mejora el reclutamiento y la activación de las células. Esto responde a dos aspectos importantes, la elección y proporción de biomateriales; y el proceso de entrecruzamiento para el modelado de las propiedades físicas y biológicas. Sobre todo, las características como la hidrofobicidad/hidrofilia y las cargas eléctricas de los biomateriales,

puesto que una carga positiva y superficies hidrofílicas favorecen la adhesión celular. Además, las distintas propiedades pueden influir en el fenotipo de las células y la polarización de las respuestas por parte de las células T (Han y Wu, 2022).

El HA por medio del receptor CD44 es capaz de interactuar con diversos leucocitos, promoviendo su adhesión en sitios donde se presenta inflamación, además la interacción entre CD44 y HA puede promover la migración celular y la cicatrización de heridas al reclutar fibroblastos. Adicionalmente, el HA es capaz de influir en procesos de desarrollo, morfogénesis supervivencia e inflamación por medio de otros receptores como RHAMM, HARE y TRL4 y TLR2 (Collins y Birkinshaw, 2013; Vigetti et al. 2014). A las características inherentes del HA se le pueden sumar los beneficios de la GE, principalmente los grupos RGD que promueven la adhesión celular, al entrecruzar el andamio con EDC. Por otro lado, la formación enlaces entre la GE-GE, HA-HA y GE-HA por medio del entrecruzamiento, brinda mayor rigidez al andamio al mismo tiempo que mantiene la porosidad adecuada para permitir la comunicación celular y aumentar el tiempo de degradación de los materiales en el andamio (Ahn et al. 2020; Zhang et al. 2011) . En conjunto, estas características adquiridas pueden construir un entorno que favorece la maduración de las células aun sin adicionar factores de diferenciación.

Los andamios de GE/HA como elementos presentes en la MEC pueden construir un medio favorable para el desarrollo de los leucocitos, debido a sus propiedades físicas, brindando características mecánicas, como la rigidez y porosidad del andamio; que ayudan a la viabilidad celular. Además, este ambiente no es inerte, sino que, al degradarse estos biomateriales permite su interacción con receptores que facilitan la adhesión, la comunicación y la migración celular; así como la construcción de una respuesta inflamatoria al interactuar con TLRs (Afewerki et al. 2019; Donaldson et al. 2018; Gariboldi et al. 2008; Vigetti et al. 2014). Así, la respuesta inflamatoria asociada al andamio se debe tanto a la degradación del HA, como a la inmunogenicidad inherente de la GE al ser reconocido por los macrófagos (Donaldson et al. 2018). Se ha documentado que el HA al ser degradado, por medio de las hialuronidasas, forman moléculas ácido hialurónico de bajo peso molecular que pueden activar a las células inmunocompetentes. El HA de bajo peso molecular se puede unir a los receptores TLR4, promoviendo la síntesis de quimiocinas y citocinas por macrófagos,

CDs y células T (Gariboldi et al. 2008). Este reclutamiento de células derivado del ambiente mimético que proporciona el andamio se puede apreciar en esta investigación, en el aumento en el porcentaje de CDs MHCII⁺ CD11c⁺ y macrófagos MHCII⁺ F4/80 que se observa en las células tratadas con andamios de GE/HA (Figura 17). Además, en el porcentaje de macrófagos Ly6c⁺ CD3⁻ se aprecia que el andamio de GE/HA tuvo un mayor porcentaje de células, lo cual se puede asociar por el reconocimiento de los biomateriales del andamio por este tipo de células para su degradación (Figura 18).

Por otro lado, aunque en los porcentajes de células dendríticas MHCII⁺ CD11c⁺ no se observaron diferencias significativas (figura 17), si observamos que la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), muestran una tendencia de incremento al adicionar CpGs y/o MAGE A5 al andamio como se muestra en la figura 19. El uso de CpGs como adyuvantes en el establecimiento de la respuesta inmune está relacionado a la mimetización de condiciones de infección bacteriana que promueven la síntesis de citocinas proinflamatorias. El reconocimiento de CpGs por los TLR9 conduce a la expresión de moléculas coestimuladoras B7 y MHCII así como un incremento en la producción del receptor para quimiocinas CCR7, que promueven la migración de las células a los ganglios linfáticos para activar a las células T (Ali et al. 2009; Kayraklioglu et al. 2021). Como se evidenció en el estudio de Bencherif et al. 2015 donde realizaron cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea sobre andamios de alginato con y sin CpGs, después de 4 días de incubación encontraron que las poblaciones de células dendríticas MHCII⁺ CD11c⁺ no presentaron diferencias significativas en el porcentaje, sin embargo cuando se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras (MHCII⁺ CD86⁺) en las CDs cultivadas de manera *in vitro* sobre el andamio con CpGs, este fue significativamente mayor en comparación al encontrado en las células cultivadas en andamios simples, teniendo aproximadamente un 80% de CDs activadas; esto se relacionó con el aumento de citocinas proinflamatorias como TNF- α IL-6 e IL-12 en los andamios con CpGs. Por otro lado, los esplenocitos tratados con andamios con CpGs, fueron los que presentaron mayor MIF para Ly6c (Figura 20) en comparación con los otros tratamientos, lo que puede indicar que las citocinas proinflamatorias secretadas favorecen la diferenciación de los macrófagos M1.

Sin embargo, los altos MIF de moléculas coestimuladoras no estuvieron limitados a los grupos con CpGs. Puesto que los grupos con MAGE A5 en el caso del MIF de CD80 y CD40 presentaron diferencias significativas. En otros estudios como el de Piñón-Zárate et al. 2014, se encontró que las CD expresan CD40, CD80 y CD86 al tratarlas con antígeno MAGE AX y TNF- α . Por lo tanto, la degradación del HA y su reconocimiento por TLRs, puede brindar citocinas proinflamatorias, en tanto que el antígeno MAGE A5 puede incorporarse al MHCI para formar los complejos MHCI-péptidos necesarios para la activación de las células T (Eggert et al. 2004; Gariboldi et al. 2008). Además, se ha documentado que el uso de andamios de GE metacrilada para el cultivo de monocitos procedentes de sangre periférica, estimula la producción de citocinas como IL-1 β , IL-8 e IL-6 que inducen una respuesta proinflamatoria debido a la xenotoxicidad de la gelatina (Donaldson et al. 2018)

En cuanto a las pruebas *in vivo*, al inyectar los hidrogeles a los ratones se esperaba incrementar el porcentaje de APC (células dendríticas MHCII+ CD11c+ y macrófagos MHCII+ F4/80+) así como su activación para montar una respuesta inmune específica hacia el antígeno MAGE A5. En la figura 21 se aprecia que el porcentaje de células dendríticas es mayor en los andamios de GE/HA con CpGs en comparación a los andamios solos, tal como se sucedió en los experimentos *in vitro* sobre andamios. Otros trabajos también han demostrado la efectividad de los CpGs. Se ha constatado que la maduración y activación de CD también está ligada a las citocinas proinflamatorias que se puede inducir con el uso de CpGs en los andamios tridimensionales, ya que promueve la síntesis de IL-16, IL-12 e IL-6 (Ali et al. 2009). En el estudio de Ali, 2009 se demostró que el uso de CpGs en andamios de PLG en un modelo ratones C57BL/6J aumentó el número de células dendríticas MHCII+ CD11c+ en comparación con los ratones a los que se les administró el andamio de PLG solo. Phuengkham et al. 2018 probaron que en andamios de HA- colágeno con lisados tumorales incorporados y un agonista de TLR3 (poli(I:C)), las poblaciones de CD infiltrados en el andamio eran superiores en comparación los ratones tratados con los andamios solos.

En la presente investigación, no solo se estudió el efecto de los andamios de GE/HA *in vitro*, sino que también se estudió el efecto del hidrogel construido a partir de los andamios empleados en los estudios ya mencionados. Se comprobó que a pesar de que la inyección del hidrogel es menos invasiva que la implantación de un andamio sólido, se produce la

maduración de APCs. Esto se puede apreciar en el crecimiento de los porcentajes de CD4 y macrófagos MHCII+, F4/80, puesto que en los primeros 7 días el porcentaje es mayor en comparación a los 21 días (figura 22), tiempo en el cual se monta una respuesta innata. Esto puede relacionarse a que el hidrogel permite aumentar la vida media de los elementos inmunomoduladores como los CpGs y los antígenos MAGE permitiendo la liberación prolongada de estas moléculas y la producción de citocinas proinflamatorias como IL-16 e IL-12 (Phuengkham et al. 2018). Bencherif et al. 2015, también registró que la población de CD4 era mayor en los primeros 13 días y que posterior a ellos se observaba un crecimiento en la población de linfocitos hasta el día 24, lo cual va acorde con el establecimiento de una respuesta adaptativa.

Además, aunque el porcentaje de macrófagos MHCII+ F4/80+ en los ratones tratados con andamios de GE/HA fue mayor en comparación a los andamios con CpGs o MAGE (figura 21), la MIF registrada para MHCII fue mayor en los andamios con CpGs o MAGE en comparación con el andamio solo, tanto para las CD4 como para los macrófagos MHCII+ F4/80 (figura 24), lo que indica que hubo una mejor activación. Se ha encontrado que citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-10, IL-13, así como GM-CSF que promueve el reclutamiento y la diferenciación a células dendríticas aumenta en las áreas adyacentes al sitio de la vacunación (Bencherif et al. 2015). La inducción de un ambiente proinflamatorio por medio de señales de daño asociadas a la degradación HA y el reconocimiento de los CpGs por los TLR9, permite madurar y promover la presentación de antígenos a las células T por medio de MHC, lo cual se refleja especialmente en los CD4 que mostraron un MIF para MHCII superior en los primeros 7 días (figura 25).

Con respecto a las células Ly6c+ CD3-, tanto los porcentajes de células en ratones tratados con GE/HA+CpGs+MAGE A5 como el MIF de Ly6c fue mayor a los 21 días que a los 7 días (figura 23 y 27), lo que puede asociarse a la degradación paulatina y la liberación de moléculas inmunomoduladoras que induce la diferenciación hacia un fenotipo M1 (datos de laboratorio no publicados).

La maduración de APCs también puede relacionarse con la sobrevida y el crecimiento tumoral en los ratones inoculados con melanoma, debido a que el uso de andamios con moléculas inmunoestimuladoras mejoró la supervivencia de los ratones. Para establecer una

respuesta antitumoral por los linfocitos T citotóxicos es necesario la presentación de antígeno para lo cual se requieren al menos tres señales, la unión de las moléculas coestimuladoras a sus receptores en las APC, la unión del complejo antígeno-MHC a los receptores TCR, así como un ambiente con citocinas apropiadas (Dembic 2015; Mir 2015; Yin, et al. 2021). Como se observó en la gráfica 28, el crecimiento tumoral de los ratones tratados con andamios GE/HA+ MAGE fue mucho menor en comparación con el de GE/HA o el grupo sin tratamiento. Esto se puede relacionar a los resultados obtenidos en los cultivos *in vitro*, donde el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras fue estadísticamente significativo en el caso de los andamios con MAGE en comparación con el andamio solo. Así como se aprecia en la gráfica 29, los ratones tratados con andamios de GE/HA+ MAGEA 5 tuvieron una supervivencia del 28% hasta el día 42, lo cual confirma que el uso de antígenos MAGE puede promover una respuesta específica por parte de los linfocitos T, ya que puede unirse con facilidad a los complejos MHC I por su alta afinidad; además de poseer una alta inmunogenicidad, que pueden ayudar a brindar una inmunidad contra células de melanoma (Eggermont, et. al. 2017).

Asimismo, en la gráfica 28, se aprecia que los ratones tratados con andamios con CpGs que sobrevivieron hasta el día 42, no presentaron crecimiento tumoral, lo cual guarda relación con la presencia de moléculas coestimuladoras (CD86) y con el aumento de MIF para MHC II de células extraídas de ratones inoculados con el hidrogel en donde se encontró un aumento en la intensidad de fluorescencia en las CDs en los grupos tratados con andamios con MAGE A5 y/o CpGs. Esto también se observó en la supervivencia de los ratones tratados con GE/HA+ CpGs que fue mucho mayor en comparación con los andamios de GE/HA solos (gráfica 29). Otro punto clave es la secreción de citocinas proinflamatorias impulsada por la detección de CpGs como señales de daño, que pueden promover no solo la maduración sino la correcta activación de células T hacia una respuesta antitumoral. De hecho, se ha encontrado que los ratones tratados con andamios con CpGs y lisados tumorales muestran mejor supervivencia y menor crecimiento de la masa tumoral en modelos profilácticos contra melanoma que se relaciona igualmente con el incremento en la producción de INF- γ e IL-12, en donde se ha registrado un mayor número de linfocitos Th1 infiltrantes de tumor (Ali et al. 2009; Bencherif et al. 2015).

Aunque se esperaba que los ratones tratados con andamios de GE/HA con CpGs y MAGE A5, tuvieran mejor supervivencia y menor crecimiento tumoral en comparación con los andamios de GE/HA con CpGs o MAGE A5 solos, los ratones se sacrificaron a la par que los tratados con los andamios simples. Esto probablemente está relacionado a que, aunque los MAGE y los CpGs acoplados a los andamios hayan inducido la producción de citocinas proinflamatorias, estas posteriormente se hayan acoplado al andamio, inhibiendo su disponibilidad. Anteriormente Piñón-Zárate et al. 2014, estudió el efecto de los péptidos MAGE en la respuesta antitumoral, dado que promueve la producción de INF- γ y la activación de linfocitos T. Además, como lo menciona Donaldson et al. 2018, andamios de GE con lipoproteínas bacterianas asociadas sembradas con monocitos promovieron la disminución en la disponibilidad en el medio de TNF- α , lo cual se atribuyó a los grupos RGD que tienen la capacidad de adherirse a ciertas citocinas. Nuestro andamio contiene grupos RGD, por lo tanto, se deben de esclarecer el nivel y biodisponibilidad de las citocinas proinflamatorias secretadas en cada uno de los tratamientos.

11 CONCLUSIONES

El uso de andamios en la inmunoterapia puede mejorar los tratamientos contra el cáncer. Los andamios de GE/HA por las características químicas, físicas y biológicas de los biomateriales que los componen pueden brindar un ambiente que mejora el reclutamiento y activación de células presentadoras de antígenos, como los macrófagos y las células dendríticas. Tal como se observó en este estudio los andamios de GE/HA mostraron mayores porcentajes de células para las CDs y los macrófagos (F4/80+, MHCII+ y Ly6c+), también el uso de moléculas inmunomoduladoras como los CpGs y MAGE en los andamios mejoraron el reclutamiento de estas células en comparación a los andamios solos en condiciones *in vitro*. Además, este estudio, se encontró que la GE y el HA promovieron el desarrollo de un ambiente proinflamatorio que permitió desacelerar la proliferación de células tumorales y que se tradujo a la disminución de la tasa de crecimiento tumoral y el incremento en la supervivencia de los ratones.

Por otro lado, se encontró que la adición de los CpGs o de antígenos MAGE inmunogénicos, mejoraron la expresión de moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de las

APC, y por tanto ayudaron en el establecimiento de una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T. Mientras que los antígenos MAGE A5 ayudaron a establecer una respuesta específica contra células tumorales al incorporarse a los MHCI por su alta afinidad, aumentando la eficacia de las estrategias inmunoterapéuticas. Así se constató que los ratones tratados con los hidrogeles acoplados a CpGs o MAGE A5 mostraron la mayor supervivencia y menor crecimiento tumoral.

12 REFERENCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman A. H., y Pillai S. 2018. “Inmunidad Innata.” Pp. 55–88 en *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: ELSEVIER.
- Abbas, A. K., Lichtman A. H., y Pillai S. 2018. “Presentación del antígeno a los linfocitos T y funciones de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.” Pp. 117–44 en *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: ELSEVIER.
- Abbas, A. K. Lichtman, A. H., y Pillai S. 2018. “Células y tejidos del sistema inmunitario.” Pp. 13–38 en *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: ELSEVIER.
- Abbas A.K., Lichtman A.H., y Pillai S. 2018. “Propiedades y Generalidades de las respuestas inmunitarias.” Pp. 1–13 en *Inmunología celular y molecular*. Barcelona: ELSEVIER.
- Acosta, Á. E., Fierro E., Velásquez V. E., y Rueda X. 2009. “Melanoma: Patogénesis, Clínica e Histopatología” *Rev Asoc Col Dermatol* 17(2):108.
- Adel, I. M., Elmeligy, M. F., y Elkasabgy, N. A. 2022. Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering. In *Pharmaceutics*. 14 (2).
- Afewerki, S., Sheikhi A., Kannan S., Ahadian S. y Khademhosseini A. 2019. “Gelatin-Polysaccharide Composite Scaffolds for 3D Cell Culture and Tissue Engineering: Towards Natural Therapeutics.” *Bioengineering & Translational Medicine* 4(1):96–115.
- Agrawal, C. M., Ong J.L., Appleford M.R. y Mani G. 2014. “Introduction.” Pp. 1–18 en *Introduction to biomaterials. Basic theory with Engineering Applications*. Cambridge: Cambridge University press.
- Ahn, Y.H., Ren L., Min Kim S., Hwan Seo S., Rok Jung C., Seul Kim D., Yoon Noh J., Yun Lee S., Lee H., Young Cho M., Jung H., Ran Yoon S., Eun Kim J., Nam Lee S., Kim S., Woo Shin I., Sik Shin H., Soo Hong K., Taik Lim Y., Choi I. y Don Kim T. 2020. “A Three-Dimensional Hyaluronic Acid-Based Niche Enhances the Therapeutic Efficacy of Human Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy.” *Biomaterials* 247.

- Akkin, S., Varan G., y Bilensoy E. 2021. “A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers.” *Molecules* 26(11).
- Ali, O.A., Huebsch N., Cao L., Dranoff G. y Mooney D. J. 2009. “Infection-Mimicking Materials to Program Dendritic Cells in Situ.” *Nature Materials* 8(2):151–58.
- Batista-Duharte, A., Lastre M. y Pérez O. 2014. “Adyuvantes Inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas.” *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 32(2):106–14.
- Bello, A. B., Kim, D., Kim, D., Park, H., y Lee, S. H. 2020. Engineering and functionalization of gelatin biomaterials: From cell culture to medical applications. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* 26(2):164-180.
- Bencherif, S.A., Sands R. W., Ali O.A., Li W.A., Lewin S.A., Braschler T.M., Yu Shih T., Verbeke C.S., Bhatta D., Dranoff G. y Mooney D.J. 2015. “Injectable Cryogel-Based Whole-Cell Cancer Vaccines.” *Nature Communications* 6.
- Berwick, M., Buller D. B., Cust A., Gallagher R., Lee T. K., Meyskens F., Pandey S., Thomas N. E., Veierød M. B., y Ward S. 2016. “Melanoma Epidemiology and Prevention.” Pp. 17–49 en *Cancer Treatment and Research*. Vol. 167. Kluwer Academic Publishers.
- Cabeza-Cabrerizo, M., Cardoso A., Minutti C.M., Pereira Da Costa M. y Reis Sousa C. 2021. “Dendritic Cells Revisited.” *Annual Review of Immunology* 39:131–66.
- Chocholata, P., Kulda, V., y Babuska, V. 2019. Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. In *Materials* 12(4). MDPI AG.
- Collins, M.N. y Birkinshaw C. 2013. “Hyaluronic Acid Based Scaffolds for Tissue Engineering - A Review.” *Carbohydrate Polymers* 92(2):1262–79.
- Damsky, W. E., Rosenbaum L. E., y Bosenberg M. 2011. “Decoding Melanoma Metastasis.” *Cancers* 3(1):126.
- Davies, E. J., Terlizzo M. y Hayes A. J. 2022. “Melanoma.” *Surgery (Oxford)* 40(1):46–52
- Davis, Lauren E., Shalin S. C. y Tackett A. J. 2019. “Current State of Melanoma Diagnosis and Treatment.” *Cancer Biology and Therapy* 20(11):1366–79.

- De la Rosa Ledesma, Carlos. 2021. “Immunoestimulación a través de un andamio de Gelatina-Ácido Hialurónico entrecruzado, en un modelo murino con melanoma” (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dehdashtian, A., Stringer T. P., Warren A. J., Mu E. W., Amirlak B. y Shahabi L. 2018. “Anatomy and Physiology of the Skin.” Pp. 15–26 en *Melanoma: A Modern Multidisciplinary Approach*. Springer International Publishing.
- Dembic, Z. 2015. “Activation of Cells of the Immune System.” Pp. 57–98 en *The Cytokines of the Immune System*. Elsevier.
- Domingues, B., Lopes J., Soares P., y Populo H. 2018. “Melanoma Treatment in Review.” *ImmunoTargets and Therapy* Volume 7:35–49.
- Donaldson, A. R., Tanase C.E., Awuah D., Bathrinarayanan P.V., Hall L., Nikkiah M., Khademhosseini A., Rose F., Alexander C. y Ghaemmaghami A.M. 2018. “Photocrosslinkable Gelatin Hydrogels Modulate the Production of the Major Pro-Inflammatory Cytokine, TNF- α , by Human Mononuclear Cells.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6(SEP). doi: 10.3389/fbioe.2018.00116.
- Dunn, G. P., Bruce A. T., Ikeda H., Old L. J. y Schreiber R. D. 2002. “Cancer Immunoediting: From Immuno-Surveillance to Tumor Escape.” *Nature Immunology* 3(11):991–98.
- Dunn, G. P., Old L.J. y Schreiber R. D. 2004. “The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting.” *Immunity* 21:137–48.
- Eggermont, A.M.M., Schadendorf D. y Robert C. 2017. “Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma Define a New Era in Immunotherapy Aiming for Cure.” Pp. 427–36 en *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*. Springer International Publishing.
- Eggert, A.O., Andersen M.H., Voigt H., Schrama D., Kämpgen E., Straten P. y Becker J.C. 2004. “Characterization of Mouse MAGE-Derived H-2Kb-Restricted CTL Epitopes.” *European Journal of Immunology* 34(11):3285–90.
- Florindo, H. F., Lopes J., Silva L.C., Corvo M.L., Martins M.B. y Gaspar R. 2017. “Regulatory Development of Nanotechnology-Based Vaccines.” *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development* 393–410. doi: 10.1016/B978-0-323-39981-4.00021-X.

- Galluzzi, L., Vacchelli E., Bravo-San Pedro J.M., Buqué A., Senovilla L., Baracco E.E., Bloy N., Castoldi F., Abastado J.P., Agostinis P., Apte R.N., Aranda F., Ayyoub M., Beckhove P., Blay J.Y., Okada H., Palucka A.K., Peter M. E., Pienta K.J., Porgador A., Prendergast G. C, Rabinovich G.A., Restifo N.P., Rizvi N., Sautès-Fridman C., Schreiber H., Seliger B., Shiku H., Silva-Santos B., Smyth M.J., Speiser D.E., Spisek R., Srivastava P. K., Talmadge J.E., Tartour E., van der Burg S.H., van den Eynde B.J., Vile R., Wagner H., Weber J.S., Whiteside T. L., Wolchok J.D., Zitvogel L., Zou W. y Kroemer G. 2014. “Classification of Current Anticancer Immunotherapies.” *Oncotarget* 5(24):12472–508.
- Gariboldi, S., Palazzo M., Zanobbio L., Selleri S., Sommariva M., Sfondrini L., Cavicchini S., Balsari A. y Rumio C. 2008. “Low Molecular Weight Hyaluronic Acid Increases the Self-Defense of Skin Epithelium by Induction of β -Defensin 2 via TLR2 and TLR4.” *The Journal of Immunology* 181(3):2103–10.
- Gonzalez, H., Hagerling C. y Werb Z. 2018. “Roles of the Immune System in Cancer: From Tumor Initiation to Metastatic Progression.” *GENES & DEVELOPMENT* 1(32):1267–84.
- Guilliams, M., Dutertre C. A., Scott C. L., McGovern N., Sichien D., Chakarov S., Van Gassen S., Chen J., Poidinger M., De Prijck S., Tavernier S. J., Low I., Irac S. E., Mattar C.N., Sumatoh H.R., Ling Low G.H., Kit Chung T. J, Hong Chan D.K., Kan Tan K., Kiat Hon T.L., Fossum E., Bogen B., Choolani M., Yen Chan J. K., Larbi A., Luche H., Henri S., Saeys Y., Newell E. W., Lambrecht B. N., Malissen B. y Ginhoux F. 2016. “Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species.” *Immunity* 45(3):669–84.
- Han, F., Wang J., Ding L., Hu Y., Li W., Yuan Z., Guo Q., Zhu C., Yu L., Wang H., Zhao Z., Jia L., Li J., Yu Y., Zhang W., Chu G., Chen S y Li B. 2020. “Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8.
- Han, S. y Wu J. 2022. “Three-Dimensional (3D) Scaffolds as Powerful Weapons for Tumor Immunotherapy.” *Bioactive Materials* 17:300–319.
- Hey, Y.Y., Tan, J. K. H., y O’Neill, H. C. (2016). Redefining myeloid cell subsets in murine spleen. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN).

- Hoque, E.M., Nuge T., Yeow T.K., Nordin N. y Prasad R. G. S. v. 2015. “Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering.” *Polymers Research Journal* 9(1):15–32.
- Inogés S., M. Rodríguez Calvillo A. López Díaz De Cerio N. Zabalegui I. Melero, A. Sánchez-Ibarrola, E. Rocha y M. Bendandi. 2004. “Inmunoterapia Activa en el Tratamiento de Neoplasias Hematológicas.” *Anales Sistema Sanitario de Navarra* 27(1):45–62
- Jarquín Yáñez, K., Arenas-Alatorre J., Piñón-Zárate G., Arellano-Olivares R. M., Herrera-Enríquez M., Hernández Tellez B. y Castell Rodríguez A.E. 2016. “Structural Effect of Different EDC Crosslinker Concentration in Gelatin-Hyaluronic Acid Scaffolds.” *Journal of Bioengineering & Biomedical Science* 06(02).
- Junqueira, L. C., y Carneiro J. 2022. “Capítulo 18: Piel y Anexos.” Pp. 386–92 en *Histología básica texto y atlas*. Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana.
- Kayraklioglu, N., Horuluoglu B. y Klinman D.M. 2021. “CpG Oligonucleotides as Vaccine Adjuvants.” Pp. 51-85 en *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2197.
- Klinman, D.M. 2004. “Immunotherapeutic Uses of CpG Oligodeoxynucleotides.” *Nature Reviews Immunology* 4(4):249–58.
- Krishnakumar, G.S., Sampath S., Muthusamy S. y John M.A. 2019. “Importance of Crosslinking Strategies in Designing Smart Biomaterials for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review.” *Materials Science and Engineering C* 96:941–54. doi: 10.1016/j.msec.2018.11.081.
- Kurum, A., Gao M. y Tang L. 2020. “Synthetic 3D Scaffolds for Cancer Immunotherapy.” *Current Opinion in Biotechnology* 65:1–8.
- Lee, A.K. y Potts P.R. 2017. “A Comprehensive Guide to the MAGE Family of Ubiquitin Ligases.” *Journal of Molecular Biology* 429(8):1114–42.
- Li, J., Luo Y., Li B., Xia Y., Wang H. y Fu C. 2020. “Implantable and Injectable Biomaterial Scaffolds for Cancer Immunotherapy.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:1-13. doi: 10.3389/fbioe.2020.612950
- Lowe, J. S., y Anderson P. G. 2015. “Capítulo 18: Piel y Mamas.” en *Histología humana*. Elsevier Health Sciences Spain.

- Lozano, J.A. 2004. “Melanoma. Detección y Tratamiento de un Tumor de Gran Incidencia.” *Offarm* 23(6):86–92.
- Luo, Z., Wu, Q., Yang, C., Wang, H., He, T., Wang, Y., Wang Z., Chen H., Li X., Gong C. y Yang Z. 2017. A Powerful CD8+ T-cell stimulating D-Tetra-peptide hydrogel as a very promising vaccine adjuvant. *Adv. Mater.* 29 (5).
- Lugowska, I., Teterycz P. y Rutkowski P. 2017. “Immunotherapy of Melanoma.” *Wspolczesna Onkologia* 2(1A):61–67.
- Marcar, L., Ihrig B., Hourihan J., Bray S.E., Quinlan P.R., Jordan L. B., Thompson A.M., Hupp T.R. y Meek D.W. 2015. “MAGE-A Cancer/Testis Antigens Inhibit MDM2 Ubiquitylation Function and Promote Increased Levels of MDM4.” *PLoS ONE* 10(5). doi: 10.1371/journal.pone.0127713.
- Matthews, N. H., Li WQ., Qureshi A.A, Weinstock M. A., y Cho E. 2017. “Epidemiology of Melanoma.” *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy* 3–22.
- Mattia, G., Puglisi R., Ascione B., Malorni W., Carè A., y Matarrese P. 2018. “Cell Death-Based Treatments of Melanoma: Conventional Treatments and New Therapeutic Strategies Review-Article.” *Cell Death and Disease* 9(2).
- Mcknight, G., Shah J., y Hargest R. 2021. “Physiology of the Skin.” *Surgery* 40(1):8–12.
- Meek, D. W. y Marcar L. 2012. “MAGE-A Antigens as Targets in Tumour Therapy.” *Cancer Letters* 324(2):126–32.
- Mhanna, R. y Hasan. 2016. “Introduction to Tissue Engineering.” *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine* 1–2:1–34.
- Mir, M. A. 2015. “Introduction to Costimulation and Costimulatory Molecules.” Pp. 1–43 en *Developing Costimulatory Molecules for Immunotherapy of Diseases*. Elsevier.
- Murphy, K., Travers P., y Walport M. 2008. “Principios de inmunidad innata y adaptativa.” Pp. 5–10 en *Inmunobiología de Janeway*. Ciudad de México: McGraw Hill.
- Murray, P. J., y Wynn T. A. 2011. “Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets.” *Nature Reviews Immunology* 11(11):723–37.

- Naik, P.P. 2021. “Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management.” *World Journal of Oncology* 12(1):7–19.
- Nakamura, H. y Maeda H. 2022. “Cancer Chemotherapy.” *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience* 401–27. doi: 10.1007/978-1-4614-9164-4_15.
- O’Brien, F. J. 2011. *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. Materials Today* 14(3):88-95. Elsevier B.V.
- Onitilo, A. A. y Wittig J. A. 2020. “Principles of Immunotherapy in Melanoma.” *Surgical Clinics of North America* 100(1):161–73.
- Owen, J.A., Punt J., Stanford S. A. y Jones P. P. 2014. “Células, Órganos y Microambientes del Sistema Inmunitario.” Pp. 27–60 en *Kuby Inmunología. Ciudad de México: McGraw Hill*.
- Owen, J. A., Punt J., Stanford S. A. y Jones P. P. 2014. “Inmunidad Innata.” Pp. 142–85 en *Kuby Inmunología. Ciudad de México: McGraw Hill*.
- Owen J. A., Punt J., Stranford S. A. y Jones P. P. 2014. “Receptores y Señalización: Citocinas y Quimiocinas.” P. 105 en *Kuby inmunología. Ciudad de México: McGrawHill*.
- Owen, J. A., Punt J., Stranford S.A. y Jones P. P. 2014. “Complejo Mayor (Principal) de Histocompatibilidad y presentación de antígeno.” Pp. 261–98 en *Kuby inmunología. Ciudad de México: McGrawHill*.
- Pawlina, W., y Ross M. H. 2020. “Capítulo 15: Sistema Tegumentario.” Pp. 524–36 en *Ross. Histología texto y atlas. Ciudad de México: Wolters kluwer*.
- Phuengkham, H., Song C., Ho Um S. y Taik Lim Y. 2018. “Implantable Synthetic Immune Niche for Spatiotemporal Modulation of Tumor-Derived Immunosuppression and Systemic Antitumor Immunity: Postoperative Immunotherapy.” *Advanced Materials* 30(18).
- Piñón-Zárate, G., Herrera-Enríquez M. Á., Hernández-Téllez B., Jarquín-Yáñez K. y Castell-Rodríguez A.E. 2014. “GK-1 Improves the Immune Response Induced by Bone Marrow Dendritic Cells Loaded with MAGE-AX in Mice with Melanoma.” *Journal of Immunology Research* 2014. doi: 10.1155/2014/158980.
- Powell, H. M., y Boyce S.T. 2006. “EDC Cross-Linking Improves Skin Substitute Strength and Stability.” *Biomaterials* 27(34):5821–27.

- Rotte, A., y Bhandaru M. 2016. “Melanoma—Treatment.” Pp. 79–109 en *Immunotherapy of Melanoma*. Springer International Publishing.
- Saginala, K., Barsouk A., Aluru J. S., Rawla P., Barsouk A., Sanguedolce F., y Murray-Stewart T. 2021. “Epidemiology of Melanoma.” *Medical Sciences* 9(63):1-9.
- Satpathy, A., Wu X., Albring J.C. y Murphy K. M. 2012. “Re(de)Fining the Dendritic Cell Lineage.” *Nature Immunology* 13(12):1145–54.
- Saxena, M. y Bhardwaj N. 2017. “Turbocharging Vaccines: Emerging Adjuvants for Dendritic Cell Based Therapeutic Cancer Vaccines.” *Current Opinion in Immunology* 47:35–43.
- Shannan, B., Perego M., Somasundaram R., y Herlyn M. 2016. “Heterogeneity in Melanoma.” Pp. 1–15 en *Cancer Treatment and Research*. Vol. 167. Kluwer Academic Publishers.
- Sheedlo, H. J. 2006. “Capítulo 13: Tegumentos.” Pp. 121–24 en *Histología*. Ciudad de México: McGrawHill Interamericana.
- Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., y Jayasekhar Babu, P. 2023. Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*, 1, 100011.
- Sultana, N.2018. Mechanical and biological properties of scaffold materials. En: *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications* (pp. 1–21).
- Sung, H., J. Ferlay, RL. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jernal, y F. Bray. 2021. “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” Recuperado de: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_it

ems=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse
%257D

- Tan, S., Li D. y Zhu X. 2020. “Cancer Immunotherapy: Pros, Cons and Beyond.” *Biomedicine and Pharmacotherapy* 124. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109821.
- Turvey, S. E., y Broide D. H. 2010. “Innate Immunity.” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2 SUPPL. 2). doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.016.
- Verbeke, C. S., y Mooney, D. J. 2015. Injectable, pore-forming hydrogels for in vivo enrichment of immature Dendritic Cells. *Adv. Healthcare Mater.* 4, 2677–2687.
- Vigetti, D., Karousou E., Viola M., Deleonibus S., de Luca G. y Passi A. 2014. “Hyaluronan: Biosynthesis and Signaling.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1840(8):2452–59.
- Waldman, A. D., Fritz J.M. y Lenardo M.J. 2020. “A Guide to Cancer Immunotherapy: From T Cell Basic Science to Clinical Practice.” *Nature Reviews Immunology* 20(11):651–68.
- Williams, D. F. 1999. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool, Liverpool University Press.
- Wong, K.K., Aileen Li W.W., Mooney D. J. y Glenn Dranoff. 2016. “Advances in Therapeutic Cancer Vaccines.” Pp. 191–249 en *Advances in Immunology*. Vol. 130. Academic Press Inc.
- Wynn, T. A., Chawla A., y Pollard J.W. 2013. “Macrophage Biology in Development, Homeostasis and Disease.” *Nature* 496(7446):445–55.
- Yin, X., Chen S. y Eisenbarth S. C. 2021. “Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells.” *Annual Review of Immunology* 39:759–99.
- Zhang, F., He C., Cao L., Feng W., Wang H., Mo X. y Wang J. 2011. “Fabrication of Gelatin-Hyaluronic Acid Hybrid Scaffolds with Tunable Porous Structures for Soft Tissue Engineering.” *International Journal of Biological Macromolecules* 48(3):474–81.
- Zhang, C., Yang, M., y Ericsson, A. C. 2021. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology* 12.

- Zhao, Z., Zheng L., Chen W., Weng W., Song J. y Ji J. 2019. “Delivery Strategies of Cancer Immunotherapy: Recent Advances and Future Perspectives.” *Journal of Hematology and Oncology* 12(1).