



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Vacunación anti-melanoma con células dendríticas  
pulsadas con el péptido MAGE-AX en ratones inoculados  
con el péptido GK1**

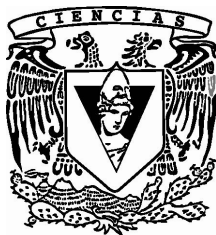
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**Patricia Torres Barrera**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. Gabriela Piñón Zárata  
2014**



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.

## ÍNDICE

❖ AGRADecIMIENTOS PERSONALES.....	4
❖ AGRADecIMIENTOS ACADÉMICOS .....	5
❖ ABREVIATURAS.....	6
❖ RESUMEN.....	7
❖ ABSTRACT.....	8
❖ INTRODUCCIÓN.....	9
• Generalidades del melanoma maligno.....	9
♦ Tipos de melanoma.....	9
♦ Etiología.....	11
♦ Epidemiología.....	11
♦ Diagnóstico.....	11
♦ Tratamiento.....	18
• Antígenos tumorales de melanoma.....	18
• Sistema inmunológico.....	20
• Células dendríticas.....	21
♦ Diferenciación de las células dendríticas.....	21
♦ Poblaciones de células dendríticas.....	23
♦ Reclutamiento de células dendríticas.....	26
♦ Captura de antígenos.....	27
♦ Migración y maduración.....	28
♦ Presentación de antígenos.....	28
♦ Moléculas coestimuladoras.....	32
• Activación de linfocitos T.....	34
♦ Respuesta Th1.....	35
♦ Respuesta Th2 .....	37
♦ Respuesta reguladora.....	37
• Memoria inmunológica.....	38
• Respuesta inmunológica vs cáncer.....	39
• Inmunoterapia antitumoral.....	39
♦ Estimulación inmunológica no específica.....	39
♦ Inmunoterapia adoptiva.....	41
♦ Inmunoterapia adoptiva con células dendríticas.....	41
• Adyuvantes.....	42
♦ Acción de los adyuvantes .....	43
♦ Ejemplos de adyuvantes.....	43
❖ ANTECEDENTES.....	45
• Inmunoterapia.....	46
• Inmunoterapia adoptiva con células dendríticas.....	46
• Antígeno tumoral MAGE-AX.....	47
• GK-1 como inmunoestimulante.....	48

❖ ANTECEDENTES.....	45
❖ JUSTIFICACIÓN.....	50
❖ HIPÓTESIS.....	50
❖ OBJETIVO GENERAL.....	50
❖ OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
❖ MATERIAL Y MÉTODO.....	51
• Obtención de GM-CSF a partir de células CHO.....	52
• Diferenciación y activación de células dendríticas.....	52
• Fenotipo de las células dendríticas.....	53
• Preparación de vacunas.....	54
• Esquema de vacunación.....	55
• Inducción de melanoma.....	55
• Evaluación postinducción de melanoma.....	55
• Desarrollo tumoral.....	55
♦ Obtención y análisis de linfocitos.....	56
♦ Análisis estadístico.....	57
❖ RESULTADOS.....	58
• Fenotipo de las células dendríticas.....	58
• Sobrevida y tamaño tumoral.....	59
• Respuesta Inmunológica.....	60
• Comportamiento de las células T CD4+ de bazo.....	61
• Comportamiento de las células T CD8+ de bazo.....	63
• Comportamiento de las células T CD4+ de ganglio.....	65
• Comportamiento de las células T CD8+ de ganglio.....	67
❖ Discusión.....	70
❖ Conclusiones.....	79
❖ Perspectivas.....	80
❖ Referencias.....	81

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A MI FAMILIA porque fueron, son y serán un pilar esencial en mi vida.

A mis padres, Esperanza y Juan, que han sido mi ejemplo de perseverancia y convicción. Nunca olvidaré cada una de las Mil y una noches que me leías cada noche mamá, gracias a ti ahora soy una lectora empedernida, y tampoco olvidaré las tardes de juegos en el parque y visitas a los diferentes rincones de nuestra ciudad papá, gracias a ti ahora soy una viajera imparable. Una parte importante de lo que hoy soy es gracias a ustedes.

A mi hermana Kary, por tomar mi mano siempre que lo necesito, por apoyarme en todo momento y porque siempre una charla antes de dormir es buena.

A mi hermano Rubén por todas aquellas tardes de museos cuando niña, y ahora por todas las noches de pláticas amenas donde hablamos de cosas relevantes e irrelevantes de la vida.

A mi hermana Lety, porque más que una hermana eres mi amiga y protectora, por hacer mis noches de estudio amenas con chistes malos y por tener siempre listo un abrazo para mí.

A Dani y Mani, porque siempre con sus preguntas tienen nuevos retos para mí.

A los bebés de la casa, Terry y Spike, siempre saben cuándo es un buen momento para un apapacho o para jugar al escondite.

A MIS AMIGOS, o mejor dicho mis hermanos y compañeros de vida: Alex, Sianya, Emily, Fer y Valeria porque la vida sin ellos sería muy aburrida.

A MI SEGUNDA FAMILIA, mi familia académica: Gat, Mike, Bety, Dany, Pau, Katy y a todos los chicos del laboratorio, gracias por hacer de mi estancia algo inolvidable.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias: Diana, Kary, Beto, Mollete y Diego

A mis amigos de UNIVERSUM que llegaron para quedarse, en especial a mis amigos Ricardo y Roma porque siempre tienen algo nuevo con que hacerme reír. Gracias a Richi, la pluma para escribir mi tesis funcionó a la perfección.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Agradezco especialmente a la M. en C. Gabriela Piñón Zárate por su excelente dirección y colaboración en el presente trabajo de tesis. También quiero agradecer al M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez y al Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez por sus valiosas asesorías teóricas y prácticas.

Agradezco a los miembros del jurado por su tiempo y dedicación en la revisión del trabajo escrito:

Dra. Patricia Rivas Manzano

Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez

M. en C. Gabriela Piñón Zárate

Dra. Martha Luz Ustarroz Cano

M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez

El presente trabajo fue posible gracias a la aportación y asesoría teórica y técnica de:

Biól. Beatriz Hernández Téllez

M. en C. Katia Jarquín Yáñez

Biól. Paulina Villena López

Biól. Rodrigo José Jiménez Sandoval

Biól. Daniel Santillán Cortés

La tesis fue llevada a cabo gracias a los proyectos PAPIIT

## **ABREVIATURAS**

Antígeno (Ag)

Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)

Receptores de reconocimiento de patógenos (PRR)

Células presentadoras de antígenos (CPA)

Células Natural Killer (NK)

Células dendríticas (CDs)

Células troncales hematopoyéticas (CTH)

Células progenitoras multipotentes (CPM)

Progenitores linfoides comunes (PLC)

Progenitores mieloides comunes (PMC)

Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)

Receptor de GM-CSF (GMR)

Células de Langerhans (CL)

Complejo principal de histocompatibilidad I (MHCI)

Complejo principal de histocompatibilidad II (MHCII)

Cadena invariante (Ii)

Inmunoglobulinas (Igs)

Receptores para proteínas de choque térmico (HSPr)

Receptores tipo Toll (TLRs)

Factor de necrosis tumoral (TNF)

Interleucina (IL)

Células T cooperadoras 1 (Th1)

Células T cooperadoras 2 (Th2)

Células T regulatorias (Treg)

Interferones (INF)

## RESUMEN

El melanoma maligno es la neoplasia más letal entre los tumores cutáneos, ya que presenta un desarrollo rápido y tiene una alta probabilidad de desarrollar metástasis. En México la incidencia de ésta neoplasia ha aumentado 500% en los últimos años y la mayoría de los pacientes con melanoma que se han sometido a tratamiento tienen una alta probabilidad de reincidencia. Los tratamientos existentes para el melanoma carecen de eficacia para prevenir un tumor secundario, por lo que el desarrollo de un tratamiento de larga duración para posibles reincidencias sería muy útil. Las vacunas con células dendríticas (CDs) han sido utilizadas como tratamiento contra el cáncer, dado que tienen la capacidad de iniciar una respuesta antitumoral. El éxito de la vacuna depende tanto del grado de activación de las CDs como de la presencia de un ambiente inflamatorio, lo cual en múltiples ocasiones es difícil de conseguir. Dado lo anterior es importante el estudio de moléculas como los inmunomoduladores para desarrollar una respuesta inmune efectiva. Por lo que en el presente trabajo se evaluó el efecto protector antitumoral de la inmunoterapia adoptiva con CDs pulsadas con el antígeno tumoral MAGE-AX y el inmunomodulador GK-1. Para poder estudiar lo anterior, ratones C57BL/6 fueron inoculados con GK-1 y posteriormente vacunados con células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con el antígeno tumoral MAGE-AX, un mes después se administraron  $1 \times 10^5$  células de la línea de melanoma B16F10. El tratamiento indujo 100% de sobrevida y ausencia tumoral. Asimismo se constató el aumento en los niveles de linfocitos T CD4  $INF\gamma^+$  o IL-4+ y linfocitos T CD8  $INF\gamma$  en ganglio y bazo. En relación con IL-10, ésta también aumentó no obstante fue mayor la producción de  $INF\gamma$ . Los resultados indican que la terapia con CDs puede producir protección inmunológica contra el melanoma, por lo que, este tipo de vacunas pueden ser utilizadas en personas que hayan sufrido de resección tumoral, con el objetivo de inhibir la aparición de un tumor secundario.



## **ABSTRACT**

Melanoma is one of the most lethal neoplasia in skin; due to this kind of cancer is able to develop metastasis. In Mexico, melanoma incidence has increased 500% last years, and most patients have high probability of reoccurrence. Actually the treatment efficiency against the reapperment of a secondary melanoma tumor is inefficient, so it is necessary to develop a success therapy that could inhibit cancer reincidence. Dendritic cells based vaccines are one of the most succesful therapies against cancer. The success in this kind of therapy depends of the grade of dendritic cells maturation and the inflammatory response, which can induce dendritic cells migration to lymph nodes and consequently the activation of antigen specific lymphocytes. In order to induce a succesful immune response against cancer is important to study the use of immunomodulators such GK-1, which are able to protect against cysticercosis and influenza virus. Therefore, in this work the efficiency of GK-1 and dendritic cell based vaccine in the development of immunological memory were studied in a murine model of melanoma. For that purpose C57BL/6 mice were inoculated with GK-1, subsequently mice received  $1 \times 10^6$  dendritic cells loaded with MAGE-AX, an important tumor specific antigen found in melanoma. A month later, mice received  $1 \times 10^5$  B16F10 cells, which can induce the appearance of a tumor. Treatment produced 100% of survivor and tumor absence in all mice. Likewise, T CD4 IFN- $\gamma$ + or IL-4+ and T CD8 IFN- $\gamma$ + lymphocytes levels increased not only in lymph nodes but also in spleen of mice with melanoma. IL-10 is an inhibitory cytokine characterized for been founded in high levels in melanoma patients; it was found IL-10 level in lymph nodes and spleen increased, however IFN- $\gamma$  production were bigger than IL-10 production. All results showed that dendritic cells based therapy in combination with GK-1 can improve memory immune response against melanoma; as a result this vaccine program could be use in patients with melanoma or other kinds of cancer.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades del melanoma maligno

El melanoma maligno, es un tipo de cáncer\* que se deriva de la proliferación descontrolada de las células responsables de la pigmentación, los melanocitos. Éste tipo de tumor se presenta generalmente en la piel, aunque puede desarrollarse en cualquier región anatómica que presente melanocitos como en los epitelios de las mucosas, en la retina o en las leptomeninges (Acosta *et al.*, 2009).

### Tipos de melanoma

El melanoma es una enfermedad heterogénea que se pueden presentar en cuatro tipos histopatológicos: extensión superficial, lentigo maligno, nodular y acral lentiginoso. La descripción que se hace a continuación de cada tipo de melanoma, se realizó de acuerdo al compendio que realizó Acosta y colaboradores en el 2009.

**Melanoma de extensión superficial.** Se desarrolla como una mácula o mancha asimétrica en la piel con bordes irregulares, su pigmento es heterogéneo (Fig. 1, A) y generalmente la forma de crecimiento es lenta y radial, es decir, no traspasa rápidamente a la dermis. Éste tipo de melanoma se asocia a exposición solar intermitente (Acosta *et al.*, 2009).

---

*\*Cáncer: El cáncer en realidad no sólo es una enfermedad, es un conjunto de por lo menos cien enfermedades diferentes entre sí, las cuales implican alteraciones en el estado y la expresión de múltiples genes que conlleva a un crecimiento y proliferación anormal y desordenado de las células del cuerpo, así dicha proliferación puede producir tumores malignos que invaden el tejido sano circundante. La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo evitando, por diversos mecanismos, la muerte celular programada, de manera que poseen inmortalidad lo que provoca que su división celular sea mucho más rápida que en el resto de las células. Además, cuando una célula se convierte en una célula tumoral presenta un cambio morfológico, lo que conlleva al cambio en sus funciones, así la función que anteriormente realizaba ya no lo pueden llevar a cabo.*

---

**Léntigo maligno.** Inicia como una mancha asimétrica color pardo con bordes irregulares que se va oscureciendo al pasar el tiempo (Fig. 1, B). Su crecimiento inicial es horizontal (sobre la epidermis) y puede durar más de 20 años. Cuando se inicia el crecimiento vertical (invadiendo la dermis) se observa la evolución de un nódulo pigmentado sobre la mancha antes desarrollada. Éste tipo de melanoma es común en personas de edad avanzada y se localiza en áreas expuestas al sol, como la cara y los antebrazos (Acosta *et al.*, 2009).

**Melanoma nodular.** Se caracteriza por iniciar con el desarrollo de un nódulo con bordes regulares y coloración homogénea de color negro, o bien, puede ser sin pigmento (amelanótico), lo que le da coloraciones rosas o rojas (Fig.1, C). Es común que se localice en el tronco, cuello y cabeza (Acosta *et al.*, 2009).

**Melanoma acral lentiginoso.** Sólo se encuentra en ciertas zonas de las extremidades, como en las palmas, plantas y lechos ungulares (piel debajo de las uñas), (ver Fig.1, D). Se presenta como una mácula pigmentada de coloración oscura y bordes irregulares (Acosta *et al.*, 2009). El melanoma acral lentiginoso es el más frecuente debido a que su ocurrencia es mayor entre la población de piel oscura. Este tipo de melanoma, se presenta en zonas del cuerpo que están protegidas de los rayos UV por una capa gruesa de estrato córneo, o bien por la uña, por lo que es poco probable que radiación UV desempeñe un papel importante en su desarrollo (Herrera y Acosta, 2010).



**Fig. 1.** Tipos de melanoma. (A) Melanoma de extensión superficial; (B) Léntigo maligno; (C) Melanoma nodular; (D) Melanoma acral lentiginoso. Modificado de Acosta *et al.*, 2009.

## **Etiología**

Existen diversos factores de riesgo que parecen intervenir en el desarrollo de melanoma. Estos factores de riesgo se dividen en tres grupos principales: factores del individuo, factores genéticos y factores ambientales (Acosta *et al.*, 2009)

**Factores del individuo.** Comprenden el conjunto de factores de riesgo que han estado presentes a lo largo de la vida del individuo, de tal manera que es importante considerarlos en la génesis del desarrollo de melanoma. El principal factor de riesgo para el desarrollo de melanoma es la presencia de un melanoma previo. Se ha estimado que de 1 a 12% de los individuos que han presentado melanoma, desarrollarán un melanoma secundario (Benuto-Andrade *et al.*, 2005). Sin embargo, autores como Mackie y colaboradores observaron un riesgo relativo de hasta un 70% de probabilidad de desarrollar un tumor secundario (Mackie *et al.*, 2002), y es de notar que éste riesgo se incrementará si existe una historia familiar positiva a melanoma. Además, el riesgo aumenta si hay presencia de nevos displásicos (Benuto-Andrade *et al.*, 2005; Acosta *et al.*, 2009).

Los individuos con gran número de nevos atípicos tienen mayor riesgo de desarrollar melanoma, pero no necesariamente sobre uno de ellos. La incidencia de melanoma en un nevo atípico es de 1:3,000 por año (Alcalá *et al.*, 2010). Además, se sabe que la remoción profiláctica de los nevos atípicos no elimina el riesgo de desarrollar melanoma en la piel aparentemente sana (Benuto-Andrade *et al.*, 2005).

**Factores genéticos.** Los factores genéticos también tienen una fuerte influencia en el desarrollo de melanoma, como en otros tipos de cáncer. Así, se ha observado que mutaciones de genes que controlan alguna parte del ciclo celular aumenta la probabilidad de desarrollar melanoma (Acosta *et al.*, 2009). Entre el 6 y 12% de los melanomas malignos se presentan en un patrón familiar (Tsao *et al.*, 2004), es decir, su desarrollo está directamente relacionado a la herencia de

mutaciones en genes específicos. De estos casos el más común es la mutación en el gen supresor de tumores *CDKN2A* ya que del 20% a 50% de los casos familiares de melanoma es causado por dicha mutación (Thompson *et al.*, 2005), existen otros genes importantes, como el gen de la proteína supresora de tumores p53 (Desmond y Soong, 2003) y el gen de la ciclina *CDk4* (Thompson *et al.*, 2005) en la que una mutación en ellos puede significar una probabilidad significativa de desarrollar melanoma.

**Factores ambientales.** El último grupo de factores de riesgo es el de los factores ambientales. Uno de los factores más importantes en el desarrollo de melanoma es la exposición a la luz solar (Acosta *et al.*, 2009). Se ha demostrado que algunos factores individuales, como el color claro de piel, elevan la susceptibilidad a los rayos ultravioleta y, asimismo, el riesgo de desarrollar melanoma (Desmond y Soong, 2003). Existen dos tipos de daño por rayos UV: daño al material genético inducido por la generación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, producidos por la interacción de UVA con sustancias cromóforas y daño directo al ADN por radiación UVB (Echaverría y Botella-Estrada, 2009). La reparación de estos daños genéticos es mediada por la proteína p53, así que si hay una mutación en ésta proteína puede inducir proliferación celular de los melanocitos (Desmond y Soong, 2003).

La proliferación celular de melanocitos estimulada por rayos UV puede ser de forma ordenada y controlada, generando lesiones benignas como los nevos melanocíticos, popularmente conocidos como lunares, o bien, puede ser de forma descontrolada, debido a factores genéticos y ambientales, originando lesiones malignas como el melanoma (Echaverría y Botella-Estrada, 2009).

Pero no sólo la susceptibilidad tiene efectos, Gallagher y Lee (2006) demostraron que los individuos con mayor exposición a rayos UV presentan un incremento estadísticamente significativo en el riesgo de desarrollar melanoma. Si a éste factor se le agrega la ubicación geográfica de México, entonces hay un mayor

riesgo, dado que el país está situado en una de las zonas con mayor radiación solar del mundo.

### **Epidemiología**

En los últimos 30 años la incidencia mundial de melanoma ha aumentado considerablemente convirtiéndose así en un problema de salud pública. Según las estimaciones de la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), México posee una prevalencia de 1.3 en 100 mil habitantes (IARC, 2013), además los últimos reportes del Instituto Nacional de Cancerología muestran que en nuestro país el aumento ha sido casi del 500% en los últimos años, llegando a tener 1,500 casos de melanoma al año en el 2012 (Alcalá, 2010). Se prevé que este aumento continúe hasta el año 2020, lo que ocasionará que este tipo de cáncer sea cada vez más común.

### **Diagnóstico**

El factor más importante para el éxito en el tratamiento del melanoma es el diagnóstico temprano. La mayoría de los melanomas pueden diagnosticarse clínicamente con un examen cuidadoso y detallado.

**Revisión del ABCDE.** El examen clínico típico debe incluir una inspección completa de la superficie corporal, al examinar una lesión sospechosa existen seis características fundamentales que deben evaluarse: asimetría, borde, coloración, diámetro, elevación y evolución, todas juntas conocidas como el sistema ABCDE. Este sistema ABCDE ha sido implementado para el diagnóstico clínico de melanoma desde 1985. El examen se debe hacer en un lugar con buena iluminación, con lupas y dermatoscopio para garantizar un diagnóstico acertado (Acosta *et al.*, 2009).

Generalmente, los primeros cambios que se observan cuando un nevo se maligniza son un aumento en el tamaño de la lesión y los cambios de color, ambos cambios ocurren en etapas tempranas en el 70% de los pacientes. Se sabe que

un melanoma está en etapa avanzada cuando se observa aumento de altura (elevación), hay prurito y presencia de ulceración o sangrado (Acosta *et al.*, 2009).

Es muy importante tomar como sospecha clínica cualquier cambio significativo en nevo preexistentes o lesiones en la piel ya que algunos melanomas no presentan los cambios típicos antes descritos; por ejemplo del 2 al 8% de los melanomas no son pigmentados, como consecuencia ese tipo de melanoma se diagnostica erróneamente como una lesión benigna (Acosta *et al.*, 2009).

La revisión visual ABCDE no es suficiente para diagnosticar la presencia de melanoma, por ello se debe hacer una biopsia de la lesión sospechosa para su posterior análisis histológico. El mejor método es la biopsia por escisión con resección de un margen amplio de piel sana alrededor (Tran *et al.*, 2008). Además, es importante descartar la presencia de metástasis en tránsito. Como generalmente los ganglios cercanos son los primeros en presentar metástasis, es imprescindible realizar procedimientos para diagnosticar el ganglio centinela, el ganglio al que las células malignas han migrado, por medio de inyección de colorantes y la presencia de estos indican el ganglio al que las células han migrado primero (Acosta *et al.*, 2009).

**Histopatología.** Las biopsias de las lesiones sospechosas deben ser evaluadas idealmente por un dermatatólogo o patólogo con experiencia. La certeza y la precisión de los hallazgos histopatológicos dependen en gran parte de la técnica y del sitio elegido para la toma de la biopsia en lesiones pigmentadas sospechosas. Biopsias pequeñas tomadas superficialmente o incisionales de sitios poco representativos de la lesión pigmentada, llevan a diagnósticos erróneos, lo cual retarda el inicio del tratamiento y empeora el pronóstico (Acosta *et al.*, 2008).

La *American Academy of Dermatology* y la *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomienda realizar biopsia por escisión con márgenes laterales de 1 a 3 mm en todas las lesiones sospechosas de melanoma (Tran *et al.*, 2008),

sin embargo, esto varía dependiendo del tipo de melanoma que se sospeche. Por ejemplo, en las lesiones con posibilidad de cierre primario del defecto, se realiza una biopsia por escisión con márgenes laterales de 1 a 3 mm. Mientras que en lesiones de gran tamaño en áreas anatómicas especiales (genitales, dedos, región subungular, cara, orejas, palmas, plantas) sin posibilidad de cierre primario, se realiza una biopsia por incisión amplia del área más representativa de la lesión (nódulos, región más pigmentada o elevada) orientada por dermatoscopia (Acosta et al., 2008). Como ya se mencionó anteriormente, el método más confiable en el diagnóstico del melanoma es el estudio histopatológico, en dicho estudio las lesiones se clasifican por su crecimiento y extensión de acuerdo con los criterios de la clasificación de Clark y el índice de Breslow.

**Clasificación de Clark.** Ésta clasificación consiste en agrupar los melanomas según su fase de crecimiento horizontal (radial) o vertical, dependiendo del tipo de crecimiento es la probabilidad de metástasis que tiene el tumor: crecimiento horizontal significa que la extensión del tumor sólo es superficial y no existe un riesgo elevado de presentar metástasis, mientras que si el crecimiento es vertical la probabilidad se aumenta drásticamente (Acosta et al., 2008). De acuerdo a éste criterio general, se establecieron cinco niveles, ver Tabla 1.

Conocer el tipo de crecimiento del melanoma es uno de los factores más importantes. La fase del crecimiento radial, se caracteriza por un crecimiento lento y proliferación de las células atípicas, éste tipo de lesiones se expanden de manera radial y sólo se encuentran en la epidermis; a pesar de que la lesión es maligna, los pacientes que se tratan en ésta etapa tienen probabilidad de recuperación cercana al 100%. En la fase de crecimiento vertical comienza la formación de un nódulo tumoral que se extiende

I	Melanoma <i>in situ</i>
II	Microinvasión, compromiso unión dermoepidérmica
III	Invasión de la dermis papilar en nidos individuales
IV	Invasión de la dermis reticular
V	Invasión de la hipodermis

**Tabla 1.** Niveles de Clark.  
Tomada de Acosta et al., 2008



a la dermis, donde las células de melanoma pueden diseminarse. La probabilidad de metástasis es directamente proporcional a la profundidad y al grosor del tumor (Homsí *et al.*, 2005).

**Índice de Breslow.** Consiste en medir de manera vertical, con un ocular calibrado, el grosor del melanoma, desde la capa granulosa de la epidermis hasta donde se observen células tumorales. Como ésta evaluación es cuantitativa, da mayor exactitud como medida de pronóstico. Incluso el sistema de la *American Joint Committee on Cancer* toma en cuenta éstas mediciones para estadificar el grosor del tumor (Acosta *et al.*, 2008).

**Clasificación anatomopatológica.** En contraste con la estadificación clínica, mencionada anteriormente, ésta tiene mayor exactitud y define de mejor manera los subgrupos de pronóstico cuando se combina la información anatomopatológica del melanoma primario y el estudio histopatológico de los ganglios linfáticos. Los estadios patológicos I y II comprenden pacientes sin evidencia de metástasis regional ni a distancia, con base en la ausencia de compromiso tumoral después de realizar un examen histopatológico de los ganglios y los exámenes radiológicos y clínicos de rutina. El estadio III corresponde a pacientes con evidencia histopatológica de metástasis regionales. Esta estadificación requiere que el patólogo reporte el número de ganglios extraídos, el número de ganglios examinados y, de éstos, cuántos están comprometidos. El estadio anatomopatológico IV incluye pacientes con confirmación histológica de metástasis a distancia en uno o más sitios. En la clasificación TNM se hace referencia a la presencia de micrometástasis y macrometástasis. Las primeras son diagnosticadas por estudio del ganglio centinela o linfa de neotomía terapéutica. Las segundas se definen como metástasis ganglionares detectables clínicamente y confirmadas por estudios histopatológicos (Acosta *et al.*, 2008).

## Diagnóstico clínico

El melanoma es el ejemplo más claro de los tipos de cáncer en el que la detección temprana juega un papel fundamental en la supervivencia. La localización anatómica del tumor primario es un factor pronóstico muy importante. En ausencia de metástasis y para igual índice de Breslow, los melanomas que se encuentran en las extremidades muestran porcentajes de supervivencia de 90% a 10 años, en comparación con 70% cuando se encuentra en el cuello o el tronco (Thompson *et al.*, 2005).

Los pacientes que son diagnosticados en los estadios más tempranos tienen una probabilidad muy alta de sobrevivir, el análisis del *American Joint Committee on Cancer* demuestra que 49% de todos los pacientes con metástasis ganglionar sobreviven a 5 años y 37% a 10 años. Debe tenerse en cuenta que en el sistema de estadificación, las metástasis ganglionares se dividen en microscópicas y macroscópicas. La supervivencia, comparando ambos grupos de pacientes es estadísticamente significativa. A 10 años la supervivencia de pacientes con metástasis microscópicas es de 63%, mientras que, si se presentan metástasis macroscópicas, es de 47% (Honsi *et al.*, 2005). Se ha estimado que la supervivencia a 5 años es de 95% para los melanomas con nivel de Clark II, de 80% a 85% para Clark III y IV, y de 55% para melanomas que presentan Clark V (Honsi *et al.*, 2005).

Balch y colaboradores (1980), demostraron una reducción de 80% a 55% en la supervivencia de pacientes que presentaban ulceración en comparación con los que no la presentaban, asociado a una medida del índice de Breslow significativa. Además, mostraron que los pacientes con lesiones ulceradas con una respuesta inflamatoria mínima, tenían peor pronóstico. También demostraron que el riesgo aumentó cuando la ulceración microscópica fue mayor de 6 mm.

Desafortunadamente, en nuestro país como en muchos otros, los pacientes con melanoma acuden a una revisión médica en etapas muy avanzadas, debido a que

las lesiones suelen confundirse con lunares normales, verrugas, hongos y hematomas, entre otros; lo que ocasiona que en gran parte de esos casos el tratamiento de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia ya no sean suficientes para atacar el problema.

## **Tratamiento**

Hoy en día no se cuenta con un tratamiento para melanoma en estadios avanzados que sea completamente eficaz. El tratamiento que frecuentemente se sigue, una vez diagnosticado el melanoma, consiste en una cirugía que remueva completamente el tumor, con un margen proporcional al estadio de la lesión, seguido de un periodo de tratamiento que puede ser radioterapia o quimioterapia (Acosta *et al.*, 2008).

Si el melanoma se encuentra en etapas tardías y se ha diseminado, pocas veces resulta efectivo dicho tratamiento, puesto que el melanoma posee características químico y radio resistentes que hasta la fecha no han podido ser explicadas por completo. Soengas y Lowe, en 2003, reportaron que el tratamiento quimioterapéutico difícilmente favorece a más del 20% de los pacientes en etapas tardías. Si a lo anterior se añade que del 1 al 12% de los pacientes que se someten a cirugía y quimioterapia desarrollan un tumor secundario. Estos tumores secundarios aumentan en un 70% si hay historia de melanoma familiar (Mackie *et al.*, 2002) tenemos un panorama poco alentador para el tratamiento de ésta neoplasia. Así, ya que los tratamientos inespecíficos como lo son la radioterapia y la quimioterapia no son una buena alternativa para combatir el melanoma, cabe preguntarse ¿cómo hacer un tratamiento eficaz y específico para melanoma y que al mismo tiempo pueda prevenir la formación de un tumor secundario? En las últimas décadas se han desarrollado diversas investigaciones en el campo de la inmunología con el propósito de modular algunos factores del sistema inmunológico y, de este modo, dirigir una respuesta tumor-específica que culmine con la destrucción de células tumorales, y no sólo eso, sino también inducir una respuesta de larga duración.

## Antígenos tumorales de melanoma

Para lograr la inducción de una respuesta inmune específica se han usado diversos antígenos tumorales que pueden ser: sintéticos, proteínas o péptidos, ADN plásmido o un virus (Tabla 2). En cuanto a la inmunoterapia del melanoma se han utilizado los siguientes antígenos (Ags) tumorales:

Estos Ags tumorales derivan de productos génicos activamente transcritos en varios tipos de tumores, pero no así en células normales y están relacionados con las etapas primarias del desarrollo embrionario (Tanzarella *et al.*, 1999). El grupo de Ags detectado más frecuentemente en pacientes con melanoma, está formado por los antígenos de diferenciación, también denominados antígenos asociados al tipo de tejido. A esta categoría pertenecen los antígenos melanosomales MART-1/Melan A, gp100 y tirosinasa. Los genes que codifican a estos antígenos, no sólo se expresan en los melanomas, sino también en melanocitos normales y en el epitelio pigmentario de la retina, por lo que pueden ser considerados como auto-antígenos (Kawakami *et al.*, 1994, 1995). Otro antígeno de estas características es el receptor de melanocortina 1 (MC1R) expresado en melanomas y melanocitos. MC1R es el ligando natural de la hormona peptídica melanocito-estimulante- $\alpha$ , involucrada en la proliferación, diferenciación, pigmentación y potencial metastásico de los melanomas (Chhajlani y Wikberg, 1992).

Antígeno empleado para pulsar las CDs	Expresión	Células dendríticas usadas	Respuesta inmunológica
Gp100, tirosinasa, MART-1	Se expresan en melanoma y melanocitos normales	Monocitos de sangre periférica	Inducción de respuesta T específica en 20/27 pacientes
Lisados tumorales autólogos	Todas las células tumorales	Monocitos de sangre periférica	DTH positiva
MART-1, tirosinasa, MAGE-A3 y gp 100	Melanoma y melanocitos normales. MAGE-3 se encuentra en testículo y melanoma	Monocitos de sangre periférica	Inducción de respuesta Th1 específica en todos los pacientes
MART-1, tirosinasa, MAGE-3 y gp 100	Melanoma y melanocitos normales.	Progenitores CD34+	Inducción de respuesta T específica en 16/18 pacientes
Tirosinasa y gp 100	Importante en la síntesis de	Monocitos de sangre	Inducción de respuesta T

	melanina	periférica	específica
gp 100 y MART-1	Melanoma y melanocitos normales	Monocitos de sangre periférica	Inducción de respuesta T específica
MART-1, tirosinasa, MAGE-3 y gp 100	Melanoma y melanocitos normales	Progenitores hematopoyéticos CD34+	Inducción de respuesta T específica
MAGE-3	Proteína presente en testículo y en melanoma	Monocitos de sangre periférica	Expansión de linfocitos T CD8+ antígeno específicos
Lisados tumorales	Células tumorales	Monocitos de sangre periférica	Inducción de respuesta T específica

**Tabla 2.** Ensayos clínicos utilizando células dendríticas en melanoma. Se muestran los diversos antígenos tumorales utilizados y la respuesta inmunológica inducida. Tomado y adaptado de López *et al.*, 2004.

### Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico se encarga de distinguir lo propio de lo “extraño”, induciendo una respuesta a ésta condición, la cual puede ser inmunogénica o tolerogénica. El funcionamiento del sistema inmunológico depende de los distintos elementos que lo constituyen y de la forma en que estos elementos se relacionan a nivel humoral, celular y tisular. Las actividades combinadas de células con diferentes funciones, algunas de las cuales se encuentran vigilando el cuerpo mientras que otras están concentradas en órganos linfoides, como la médula ósea, el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. En conjunto, las células que lo constituyen y los órganos linfoides forman el sistema inmunológico (Medzhitov y Jeneway, 2000).

Las células del sistema inmunológico participan en la detección de moléculas tanto endógenas como exógenas. Este sistema es capaz de establecer respuestas inmunogénicas, contra las moléculas detectadas, así como respuestas tolerogénicas, donde las moléculas detectadas no son atacadas por el sistema inmune. Estas respuestas se inducen a través de dos tipos principales de mecanismos conocidos como: inmunidad innata e inmunidad adaptativa (Zimmerman *et al.*, 2010).

**Respuesta inmune innata.** La inmunidad innata es la primera línea de defensa del cuerpo se distingue porque es activada rápidamente después del primer

contacto con un patógeno. La activación de la respuesta innata es generada por medio del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por los receptores de reconocimiento de patógenos (PRR). En términos generales, cuando los PAMPs son reconocidos las células de la inmunidad innata se activan. Los efectores de la respuesta innata incluyen citocinas y proteínas plasmáticas como las del complemento. Asimismo, la respuesta innata incluye células como: neutrófilos, células presentadoras de antígenos (CPA), células Natural Killer (NK) y células NKT. Dentro de las CPAs profesionales se encuentran los macrófagos y las células dendríticas (CDs) (Medzhitov y Jeneway, 2000).

### **Células dendríticas**

En 1973, cuando Ralph Steinman y sus colaboradores describieron a las células dendríticas, Steinman dijo: *“Tal vez estas células tan raras que acabo de descubrir, sirvan para enfrentar muchas enfermedades”*. Efectivamente, como Steinman lo dijo, esas células de morfología peculiar tienen una función muy importante para el mantenimiento de la homeostasis del organismo y son cruciales para modular y dirigir la respuesta inmunológica, características que son herramientas cruciales para la inmunoterapia.

Las CDs poseen la capacidad de captar, procesar y presentar Ags a los linfocitos T vírgenes, y así activar y direccionar una respuesta inmunológica adaptativa que puede derivar en una respuesta de memoria. Los Ags que procesan las CDs pueden ser endógenos o exógenos, contribuyendo así a la activación de una respuesta inmunológica específica contra el Ag presentado, ésta respuesta puede ser inmunogénica o tolerogénica. Las CDs son las CPAs más eficaces y se encuentran distribuidas en todo el cuerpo, por lo que constituyen una red complejísima de defensa contra patógenos (Bachereau et al., 2000; Liu *et al.*, 2010).

## Diferenciación de las células dendríticas

***In vivo.*** La producción de células sanguíneas, proceso llamado hematopoyesis, es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian, dando lugar a los distintos tipos de células maduras circundantes. Las células troncales hematopoyéticas (CTH) son capaces de auto-renovarse y dan origen a las células progenitoras multipotentes (CPM), las cuales ya no pueden auto-renovarse pero conservan su potencial proliferativo. Las CPM originan a los progenitores linfoides comunes (PLC), así como a los progenitores mieloides comunes (PMC) (Mayani *et al.*, 2007). Las CDs se originan a partir tanto de PMC como de PLC (Fig.2) y posteriormente migran a través del torrente sanguíneo en respuesta a quimiocinas sitio específicas que dirigen la entrada de los precursores a los diferentes tipos de tejidos, donde terminan de diferenciarse y donde residirán, llevando a cabo su función de inmunovigilancia como CDs tisulares o migratorias (Belz y Nutt, 2012).

***In vitro.*** Se sabe que de cultivos tanto de precursores mieloides como de precursores linfoides, cultivados y expuestos al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), se pueden diferenciar CDs maduras (Wu *et al.*, 2001).

La vía de diferenciación que siguen los progenitores de medula ósea para su diferenciación hacia CDs ha sido ampliamente revisada en diferentes estudios. En el presente estudio nos enfocaremos al papel que desempeña el GM-CSF en la diferenciación de las CDs. El GM-CSF es una citocina que actúa como factor proliferativo y de supervivencia de células hematopoyéticas, ésta citocina es requerida para la formación de CDs *in vitro*, ya que *in vivo* se requieren otras citocinas tales como el Flt-3L (Liu y Nussenzweig, 2010).

El GM-CSF es producido, *in vivo*, por diferentes poblaciones celulares, tales como los fibroblastos, células endoteliales, células T, macrófagos, células mesoteliales,

células epiteliales y muchos tipos de células tumorales. Las poblaciones de células a las que afecta la expresión de este factor son las que pertenecen al linaje de granulocitos y macrófagos, así como las células endoteliales, ya que expresan el receptor de GM-CSF (GMR) en grandes cantidades. El GMR es en la superficie de éstas células hematopoyéticas y consiste en la subunidad  $\alpha$  y la subunidad  $\beta c$ . La subunidad  $\alpha$  se une con poca afinidad a esta citocina, pero la presencia de la subunidad  $\beta c$  provoca que exista una alta afinidad entre la subunidad  $\alpha$  y el GM-CSF, provocando la dimerización de ambas subunidades y la activación del receptor por medio de la vía de Jak2 que envía una cascada de señalización intracelular. Esta cascada de señalización intracelular culmina con procesos de diferenciación y proliferación, entre otras funciones celulares (Beltz y Nutt, 2012).

Cuando las suspensiones de médula ósea de ratón son cultivadas en presencia de GM-CSF proliferan tres tipos de células mieloides: a) predominan los neutrofilos, pero no se adhieren a la superficie del cultivo y expresan el antígeno RB-6, además carecen de moléculas de MHCII; b) los macrófagos que se adhieren firmemente a la caja de cultivo y expresan pobremente MHCII, y c) las células dendríticas que se originan de agregados celulares que se encuentran en la superficie del cultivo (Inaba *et al.*, 1992).

### **Poblaciones de células dendríticas**

Las CDs constituyen un grupo muy heterogéneo de células, que han sido divididas en diferentes poblaciones, las cuales se caracterizan por su fenotipo y por su localización, cada uno de los tipos de CDs desempeña un papel específico. Los diferentes tipos de CDs, de acuerdo a su localización son: CDs residentes de tejidos no linfoides, CDs residentes de tejidos linfoides, CDs de redes circulatorias del cuerpo (en las cuales se incluyen las CDs de la sangre, vasos linfáticos aferentes y órganos linfoides secundarios) y CDs de mucosas. De acuerdo a su fenotipo, las poblaciones de CDs descritas, son las siguientes: CDs



plasmacitoides, CDs derivadas de monocitos, células de Langerhans (CL) y CDs convencionales (Fig. 4) (Belz y Nutt, 2012).

**CDs plasmacitoides.** Son células en reposo y están ampliamente distribuidos por el cuerpo. Se caracterizan por producir grandes cantidades de interferones tipo I (INFs), una condición muy evidente durante infecciones virales. Su capacidad de presentar antígenos es muy reducida (Belz y Nutt, 2012).

**CDs derivadas de monocitos.** Bajo condiciones inflamatorias, los monocitos circulantes en sangre pueden movilizarse rápidamente y diferenciarse en estas células. Estas células poseen una alta capacidad de presentar antígenos, incluyendo la presentación cruzada. Las CDs derivadas de monocitos es un reservorio importante de CPAs que pueden ser reclutadas ante una infección y en casos de una inflamación crónica (Belz y Nutt, 2012).

**Células de Langerhans.** Son células residentes de la piel y, como las CDs migratorias, migran al ganglio linfático cuando presentan Ag's. Esta población de CDs se activa rápidamente ante cualquier estímulo (Belz y Nutt, 2012).

**Células dendríticas convencionales.** Las CDs convencionales son células altamente especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos. Pueden agruparse en dos clases dependiendo de su localización en tejidos y sus rutas de migración. La primera categoría engloba a las CDs migratorias, ellas se encuentran en todo tipo de tejidos periféricos. Las CDs convencionales migratorias constituyen una población variable de CDs en estado basal (Belz y Nutt, 2012; Banchereau *et al.*, 2000).

Una vez que las CDs convencionales migratorias entran en contacto con un Ag, migran generalmente a ganglios linfáticos y ahí el número de CDs convencionales migratorias que se encuentran va a depender directamente de los tejidos que drenen hacia los ganglios linfáticos y por supuesto de los daños e infecciones que

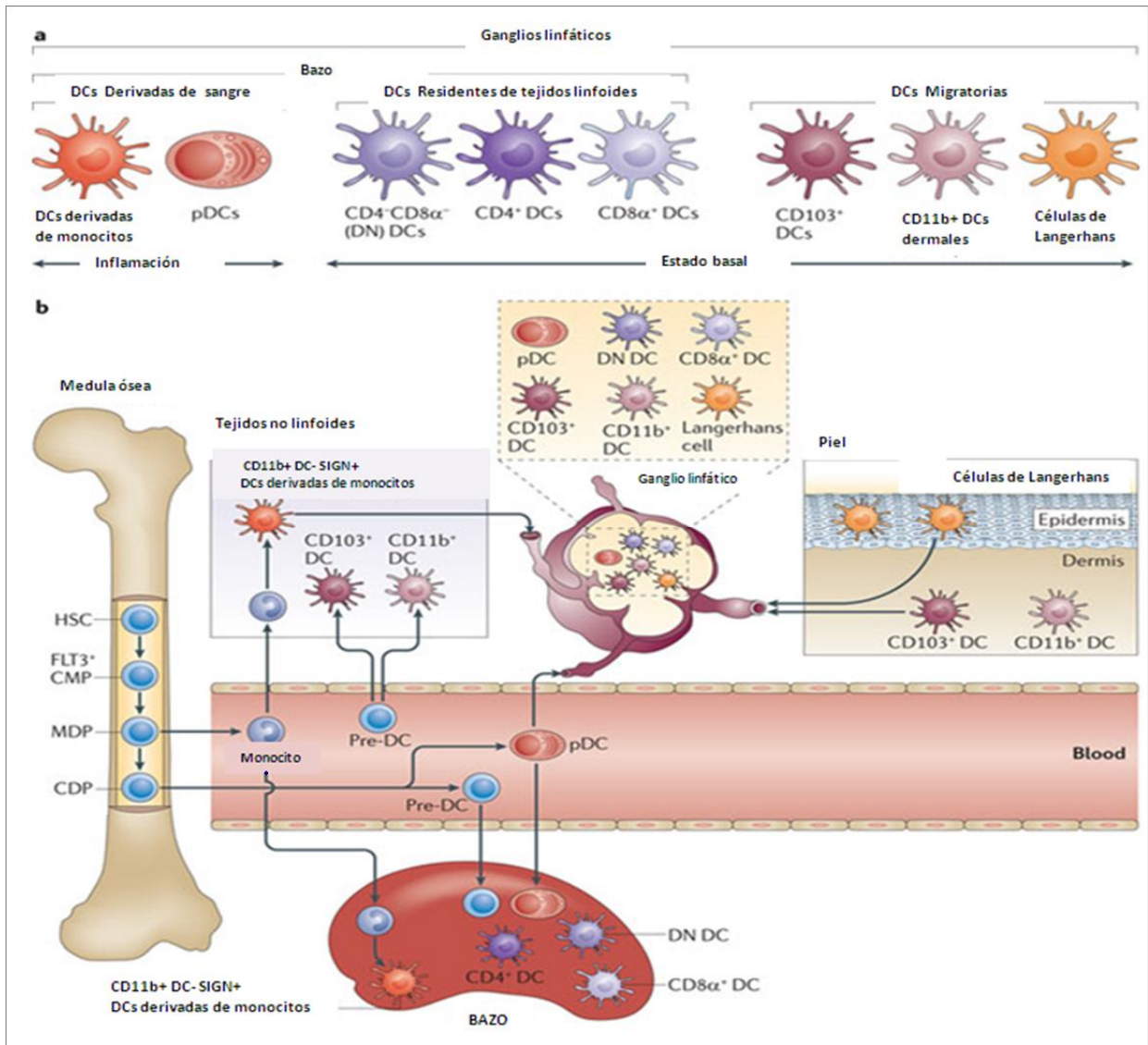
presenten dichos tejidos. Su fenotipo característico puede ser: CD8 CD11C+CD103+, y CD8 CD11c+CD11b+ intersticiales o dermales (Banchereau *et al.*, 2000).

La segunda categoría principal de las CD8 convencionales son las células residentes de tejidos linfoides y como es de suponerse se encuentran en ganglios linfáticos, bazo y timo. Su residencia en los órganos linfáticos las posiciona en un lugar ideal para interactuar con Ags acarreados por linfa o sangre. Su fenotipo característico puede ser de tres tipos: CD8 CD4+, CD8 CD8+ y CD8 CD4-CD8- (típicamente conocidas como CD8 doble negativas). Las CD8 CD8+ se diferencian de las demás por su capacidad para la presentación cruzada de Ags y por su papel principal en activar la respuesta citotóxica por células T CD8+. Las CD8 CD4+ tienen también la capacidad de presentar Ags vía MHCI aunque ésta se ve un poco restringida, parece ser más eficiente la presentación por MHCII asociado a células T CD4+ (Belz y Nutt, 2012; Banchereau *et al.*, 2000).

Las características y los mecanismos clave que participan en la plasticidad de la red de CD8 es probable que incluyan la vida corta de las CD8 convencionales maduras. Las CD8 tienen una vida promedio de 5 a 7 días, aunque pueden vivir hasta 25 días en algunas circunstancias (Liu y Nussenzweig, 2010), su rápido reclutamiento y proliferación ante una situación de daño en los tejidos, y su capacidad para responder a señales extrínsecas (tales como ligandos de TLR y las citoquinas pro-inflamatorias) (Banchereau *et al.*, 2000).

Es importante hacer notar que las CD8 diferenciadas de precursores de médula ósea *in vitro*, como las que se usaron en el presente trabajo, no poseen el fenotipo característico de ninguna población de CD8 encontrada *in vivo*. Sin embargo, las CD8 *in vitro* poseen los marcadores CD11c, IL-12, así como muchos otros marcadores que comparten mayoritariamente con las CD8 convencionales. Es por esta razón que a pesar de no tener un fenotipo idéntico a alguna población de las

antes mencionadas, sí se parecen a las CD convencionales con relación a su fenotipo y función (Belz y Nutt, 2012).



**Fig.2.** Diferenciación de las distintas poblaciones de CD de ratón a partir de células troncales hematopoyéticas. Imagen modificada de *Belz y Nutt, 2012*.

### Reclutamiento de CD

Las CD se congregan rápidamente en los sitios de depósito de los Ags, aproximadamente en una hora (McWilliam *et al.*, 1996). Dicha acumulación, se da por respuesta a la producción de ciertas quimiocinas como las que produce el aumento de inflamación local. La quimiocina MIP-3α, está relacionada con la

migración de CD4 hacia los órganos linfoides secundarios, además su producción juega un papel importante en la atracción de más CPA's inmaduras y sus precursores al sitio de inflamación (Dieu *et al.*, 1998)

### **Captura del Antígeno**

Las CD4 poseen diferentes mecanismos para la captura de Ags, como: (a) macropinocitosis; (b) endocitosis mediada por receptores, como los receptores de lectina tipo C o Receptores Fcγ tipo I y tipo II; (c) fagocitosis de partículas, como células apoptóticas o necróticas. Es importante mencionar que las CD4 también pueden capturar péptidos (Banchereau *et al.*, 2000).

Para que las CD4 puedan capturar un Ag necesitan de receptores que los reconozcan, así como receptores para poder realizar la fagocitosis, endocitosis, pinocitosis o macropinocitosis. Los principales receptores presentes en las CD4 son: (a) lectinas tipo C; (b) receptores que reconocen la fracción cristizable Fc de las inmunoglobulinas; (c) receptores para proteínas de choque térmico (HSP); (d) integrinas, como CD11c y CD11b; (e) receptores tipo Toll (TLRs); (f) receptores de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) como el receptor CD40, TNFα, FasL entre otros (Belz y Nutt, 2012; Banchereau *et al.*, 2000).

Antes del reconocimiento de un Ag, las CD4 se encuentran en un estado inmaduro que les confiere una alta capacidad fagocítica, pero un potencial activador de linfocitos T muy bajo. Sin embargo, en contacto con productos microbianos como: LPS, DNA, CgG, RNA y proteínas, se activa el proceso de maduración de las CD4. El reconocimiento de estos PAMPs por medio de receptores específicos, como los mencionados anteriormente, produce una serie de cambios metabólicos y de expresión génica que finalmente conducen a la maduración de las CD4. La maduración provoca la migración de las CD4 hacia órganos linfoides secundarios y la presentación de Ags ya procesados a linfocitos T vírgenes (Banchereau *et al.*, 2000; Kapsenberg, 2003).

## **Migración y maduración de las células dendríticas**

La maduración de las CDs es un proceso continuo que inicia con la captura de un Ag, el cual induce una serie de cambios fenotípicos y funcionales en la CD inmadura. La maduración de las CDs está íntimamente asociada a su migración hacia los órganos linfoides secundarios y/o la interacción con citocinas inflamatorias y se completa con la sinapsis inmunológica de la CD madura con una célula T inmadura (Bachareau et al., 2000)

Diferentes factores inducen y regulan la maduración de las CDs. (a) las moléculas relacionadas a patógenos; (b) el balance entre señales proinflamatorias y antiinflamatorias en el microambiente; y (c) las señales derivadas de las células T (Bachareau *et al.*, 2000). Al mismo tiempo, existen diferentes características que indican si una CD es madura o no lo es, por ejemplo: (a) la pérdida de receptores de endocitosis/fagocitosis; (b) el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86; (c) cambio en su morfología; y (d) cambios en la expresión de moléculas MHC II en la membrana. Así las CDs inmaduras presentan el fenotipo: MHCII *low*; CD40, CD80 y CD86 *low*; CCR1, CCR5 y CCR6 *high*; CCR7 *low*; CD68 *high*, mientras que las CDs maduras poseen un fenotipo: MHCII *high*; CCR7 *high*; CCR1, CCR5 y CCR6 *low*; CD40, CD80 y CD86 *high* (Bachareau et al., 2000; Belz y Nutt, 2012), fenotipo que ayuda tanto a que se lleve a cabo una exitosa migración a órganos linfoides secundarios como a una posterior presentación de Ags.

## **Presentación de antígenos**

Una vez que las CDs poseen un fenotipo maduro, entonces son capaces de presentar un Ag a las células T. Dicho proceso lo pueden llevar a cabo mediante tres vías: (a) por el complejo principal de histocompatibilidad I (MHCI) (b) mediante el complejo principal de histocompatibilidad II (MHCII) y/o (c) presentación cruzada, que es la capacidad de presentar antígenos endógenos y exógenos mediante MHCI (Banchereau *et al.*, 2000; Kapsenberg, 2003).

**Presentación de antígenos vía MHC I.** Las moléculas MHC I son expresadas en la membrana celular de todas las células nucleadas del organismo y tienen la capacidad de presentar péptidos intracelulares. Estas moléculas endógenas unidas al MHC I, cuando son presentadas a un linfocito T, generalmente dan pie a una activación inmune tolerogénica, dicha respuesta es de vital importancia para establecer la tolerancia hacia lo propio. Sin embargo, bajo diversas circunstancias puede suceder que la respuesta sea inmunogénica (Banchereau *et al.*, 2000)

La generación de complejos MHC clase I cargados con algún péptido, activa la presentación de Ags a células T CD8+ citotóxicas. Dicha presentación, puede realizarse directamente por las células infectadas o malignas (tumores) y asegura la destrucción de estas células, sin dañar las células sanas adyacentes. Sin embargo, dicha presentación directa del Ag, no es suficiente para asegurar la activación de las células T CD8+, particularmente cuando el patógeno no infecta a las CPA, tales como las CD (Banchereau *et al.*, 2000).

El MHC I es un heterodímero compuesto por una cadena pesada  $\alpha$  transmembranal y una cadena  $\beta$  extramembranal, conocida como  $\beta 2$  microglobulina. Los antígenos localizados en el citosol de una CPA se degradan enzimáticamente hasta obtener pequeños péptidos por acción de proteasas que forman parte de los proteosomas celulares. Estas proteasas dividen proteínas citosólicas en fragmentos de 8 a 10 residuos de largo, adecuados para unirse a la molécula MHC clase I. A continuación, los péptidos son transportados a través de la membrana del retículo endoplasmático rugoso hacia la luz de éste, mediante una proteína dimérica llamada TAP. Una vez en la luz del retículo endoplásmico, el péptido puede unirse con una molécula MHC I recién sintetizada, que se encuentra como una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico. El complejo MHC-péptido se mueve por la vía biosintética hasta llegar a la membrana plasmática, donde se presenta el péptido (Banchereau *et al.*, 2000; Belz y Nutt, 2012).

En circunstancias normales, las células del cuerpo que están en contacto con células T CD8+ presentan fragmentos de sus propias proteínas relacionadas con moléculas MHC I. Las células T no atacarán a las células que presenten fragmentos de proteínas normales, ya que las células T capaces de unirse con gran afinidad con péptidos derivados de las proteínas celulares normales se eliminan durante su desarrollo en el timo. En cambio, cuando una célula está infectada presenta fragmentos de las proteínas víricas, o bien péptidos mutados en el caso del cáncer, a los linfocitos T, los cuales reconocen los péptidos extraños y destruyen dicha célula (Banchereau *et al.*, 2000).

**Presentación cruzada.** Las células T CD8+ citotóxicas también pueden activarse por CDs que presentan Ags extracelulares a través de moléculas MHC I, por una vía que se conoce como presentación cruzada. Esta vía resulta en la generación de células T CD8+ citotóxicas que son reactivas a Ags exógenos, o bien, en la inducción de tolerancia mediante la delección de células T CD8+ autoreactivas (Banchereau *et al.*, 2000).

Los antígenos que son presentados por esta vía son principalmente proteínas completas, aunque también pueden presentarse péptidos, complejos péptidos-HSP, RNA y DNA. Los mecanismos por medio de los cuales las CDs internalizan el antígeno son: fagocitosis y macropinocitosis. Los antígenos internalizados entran al fagosoma y posteriormente, a través de dos vías distintas, los antígenos son cortados en péptidos y luego cargados al MHC I. La primera de estas vías consiste en transferir al antígeno del fagosoma al citosol, se cree que la proteína que lleva a cabo este proceso es la Sec61. Una vez en el citosol, el antígeno es hidrolizado en el proteasoma y posteriormente se une a una molécula TAP que lo transporta al RE, donde se une con el MHC I. Una variante de esta vía consiste en que el proceso de hidrólisis, y unión al MHC I, se lleva a cabo en el fagosoma. La segunda vía no depende de TAP ni del proteosoma. Los péptidos se generan en vacuolas endocíticas, en donde son degradados por medio de la proteasa catépsina S. Una vez degradados los antígenos, éstos se unen al MHC I, se piensa

que el MHCI llega al endosoma por medio de la fusión de un fagosoma con el endosoma (Banchereau *et al.*, 2000; Kapsenberg, 2003).

Las CDs convencionales, presentan éste tipo de presentación antigénica, además se ha sugerido que la presencia de IFN tipo I promueve la presentación cruzada en algunas poblaciones de CPAs (Banchereau *et al.*, 2000).

**Presentación de antígenos vía MHCII.** Las moléculas MHCII solamente son expresadas por CPAs, como linfocitos B, CDs y macrófagos. El MHCII presenta fragmentos de proteínas exógenas (péptidos) a distintas subpoblaciones de linfocitos T CD4+ cooperadores.

Las moléculas MHC clase II también se sintetizan como proteínas de membrana del retículo endoplásmico rugoso, pero se unen de manera no covalente con una proteína llamada cadena invariante (Ii), que bloquea el sitio de unión (donde se une el péptido) de la moléculas MHC II. Posterior a su síntesis, el complejo MHC II-Ii sale del retículo endoplásmico por la vía biosintética, guiada por secuencias directrices localizadas dentro del dominio citoplásmico de Ii. El complejo MHC clase II-Ii, cuando sale del aparato de Golgi, se dirige hacia un endosoma o lisosoma, donde se digiere la proteína Ii por acción de proteasas ácidas. Después se libera la molécula MHC clase II y se une con péptidos digeridos de los antígenos que ingresaron a la célula y se dirige por la vía endocítica. Más tarde, el complejo péptido- MHC II se traslada a la membrana plásmica, donde es presentado el péptido (Banchereau *et al.*, 2000).

Se ha demostrado que cuando las CDs están activas expresan mayor número de moléculas MHCII en membrana, mientras que cuando están inactivas se encuentran en el citoplasma (Banchereau *et al.*, 2000).



## **Moléculas coestimuladoras.**

La activación de las células T también requiere de una segunda señal, conocida como señales coestimuladoras. A diferencia del TCR, los receptores que emiten la señal co-estimulante, no son específicos para un antígeno en particular y no necesitan unirse con una molécula MHC. Las señales de coestimulación son requeridas para optimizar la respuesta inmunológica, ya que son obligatorias para la iniciación de la inmunidad efectiva y la ausencia de estas señales resulta en respuestas T tolerantes y anergia de estas células (Kapsenberg, 2003).

Los principales tipos de coseñales (coestimulación y coinhibición) provienen de las moléculas de la familia B7:CD28, perteneciente a la familia de inmunoglobulinas (Igs) y a los TNF: TNFR. Estas moléculas son un conjunto de proteínas ligando-receptor (APC-células T). Los miembros de la familia B7:CD28 se clasifican en tres grupos, presentados a continuación, de acuerdo a sus funciones (Leithner et al, 2010).

El grupo 1 está compuesto por B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-H2 (CD275 o L-ICOS)- C80 y CD86 se expresan únicamente en CPA y células hematopoyéticas. Cuando CD80 o CD86 interactúan con CD28 se induce la activación de células T vírgenes, además se estimula la producción de IL-2, así como la supervivencia de células T. La supervivencia de células T ocurre, por la regulación positiva de Bcl<sub>xL</sub> (proteína antiapoptótica), además la respuesta de las células T se asegura después de la activación inicial ya que esta coestimulación está asociada al metabolismo de glucosa (vía AKT). Al contrario, cuando CD80 o CD86 interactúan con el receptor inhibidor antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4 o CD152), se produce una respuesta negativa donde se inhibe la progresión del ciclo celular, así como la producción de IL-2. Además, la molécula L-ICOS (expresada en células B, macrófagos y tejidos no linfoides) se une a ICOS (de células T y B), esta unión se requiere para la activación de células T CD4+ y la polarización de células T hacia células efectoras (Leithner et al, 2010).

El grupo 2 está compuesto por moléculas B7-H1 (ligando de muerte programada PD-L1 o CD274) y B7-DC (PD-L2 o CD273) que son los ligandos del receptor de muerte celular programada 1 (PD-1 o CD279). La unión del PD-1 con sus ligandos resulta en una respuesta negativa, ya que da como resultado la inhibición de la actividad de linfocitos T, inhibiendo la proliferación y la producción de citocinas (como IL-2), además no permiten la transcripción del gen que codifica para CD28. Como estas moléculas previenen la activación excesiva de las células T, están relacionadas con las células T reguladoras. Se ha sugerido que el PD-1 está involucrado en el mantenimiento de la autotolerancia (tolerancia periférica) ya que se ha observado que cuando el PD-1 está ausente en ratones, estos desarrollan enfermedades autoinmunes (Leithner et al, 2010).

Por último, se encuentra el grupo 3 que está compuesto por moléculas B7-H3 (CD276) y B7-H4 (B7x o B7S1), a los cuales no se les ha identificado un receptor. La expresión de CD276 es regulada positivamente por LPS en CDs. La expresión de B7-H4 está restringida a células del epitelio de riñones, pulmones y páncreas. Se sabe que CD276 tienen una función coestimuladora, ya que estimula la proliferación de células T, así como la secreción de citocinas y la actividad citolítica, aunque también presenta funciones inhibitoras como el deterioro de la respuesta Th1 y la lisis mediada por NK. B7-H4 tiene actividad inhibitora, ya que es capaz de bloquear la producción de citocinas y la proliferación de células T CD8+ y CD4+ (Leithner et al, 2010).

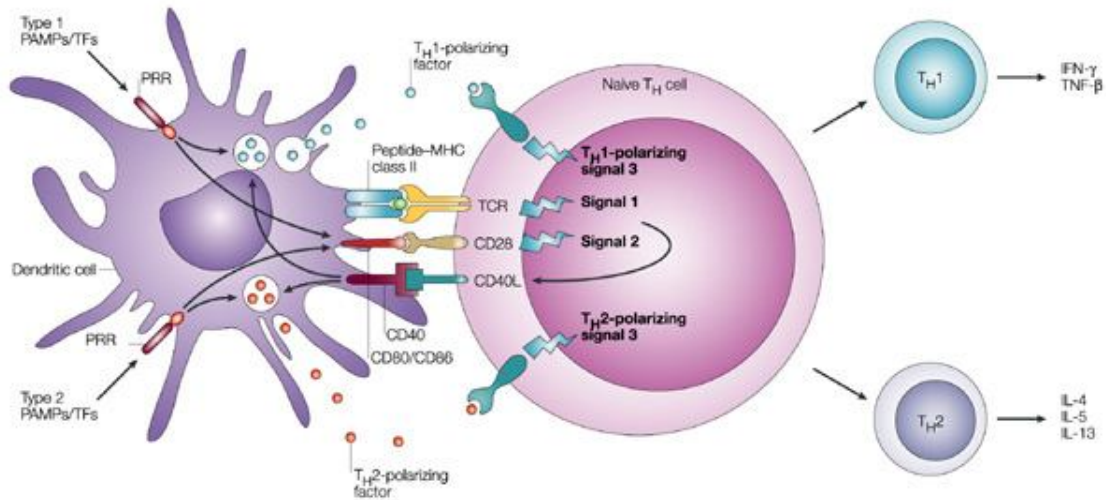
Se ha observado que las señales provenientes de las moléculas de la familia TNF: TNFR tienen funciones muy importantes. Algunos de los pares de receptores-ligandos que están involucrados en procesos de coestimulación de células T son: 4-1BB/4-1BBL, OX40/OX40L, CD27/CD70, GITR/GITRL, CD30/CD30L y CD40/CD40L (CD154). Se ha visto que OX40L, CD27, GITRL y 4-1BB poseen una función coestimuladora, induciendo la proliferación de células T, así como la producción de citocinas por parte de estas mismas células. La interacción entre CD40 de CDs y CD40L en células T CD4+, puede amplificar ampliamente la

respuesta de Th, ya que ésta unión finaliza en la regulación positiva de moléculas MHC y otras moléculas coestimuladoras de las CDs (Leithner *et al*, 2010).

### **Activación de linfocitos T**

Como se explicó antes, la activación de las células T requiere la interacción entre el TCR de la célula T y un complejo péptido-MHC en la superficie de una CPA. Esta interacción es conocida como respuesta primaria y brinda la especificidad de la respuesta inmunológica, la cual asegura que sólo se activen las células T que puedan unirse con el antígeno (Kapsenberg, 2003). La estimulación de los TCR y la co-estimulación permite que las células Th vírgenes se desarrollen en células efectoras. Existe una tercera señal que, normalmente, va acompañada de la expresión de altos niveles de algunos tipos de citocinas. Esta señal, promueve la polarización inmunológica que es mediada por diversos factores solubles o factores unidos a membrana, por ejemplo la Interleucina 12 (IL-12) y el CCL2, que promueve el desarrollo de células Th1 o Th2, respectivamente. El equilibrio de estas citocinas y la clase resultante de respuesta inmune depende, en gran medida, de las condiciones en las que las CDs se desarrollan y de cómo fueron activadas (Fig. 3) (Kapsenberg, 2003).

Posterior a la sinapsis inmunológica, donde los linfocitos T inmaduros se activan, comienza la fase inicial donde los linfocitos T activos rápidamente proliferan, esto sucede dentro de las 18 a 24 primeras horas. Las células T que ya son antígeno-específicas pueden expandirse aproximadamente 10,000 veces a un tiempo de 4-6 horas por ciclo y completan 20 divisiones celulares en un periodo de una semana, durante estas divisiones se diferencian y adquieren funciones efectoras, así como la habilidad de migrar a los sitios de infección. Estos linfocitos T citotóxicos (CTLs) producen citocinas y granzimas que pueden matar células neoplásicas, o bien a patógenos para así controlar infecciones (Cui y Kaech, 2010).



**Fig.3.** Estimulación de células T cooperadoras 1 (Th1)/ células Th2, su polarización requiere de las tres señales derivadas de las CDs. Esquema modificado de *Kapsenberg, 2003*.

Las diferentes clases de respuestas inmune específicas son conducidas por el desarrollo de distintos tipos de células Th efectoras, cada una con distintas funciones biológicas. Hasta el momento se han identificado seis tipos de células Th efectoras. Las Th1, Th2, Th17, Tfh, y Th9 son células que están implicadas en las respuestas inflamatorias, mientras que las células T regulatorias (Treg) tienen un papel inmunosupresor (Wan y Flavell, 2009).

Cada tipo de célula T cooperadora activa diferentes componentes celulares y de la inmunidad humoral. La comprensión del papel de las CDs en la polarización de las células Th es de importancia fundamental para el diseño de tratamientos anti-tumorales, como el presente trabajo. A continuación se describirán cada una, haciendo especial énfasis en las respuestas Th1, Th2 y Treg, ya que son las que comúnmente se encuentran en pacientes con cáncer. En la inmunoterapia adoptiva con CDs, se busca conducir a una respuesta Th1, ya que es la más apropiada para la eliminación de los tumores (Kapsenberg, 2003)

## Respuesta Th1

Existen ejemplos bien documentados de factores que conducen hacia una respuesta Th1. Los factores más importantes y característicos de la respuesta Th1

son los Interferones (INFs) tipo I, como INF- $\gamma$ , INF- $\alpha/\beta$  (Vieira *et al.*, 2000); también es característica la interleucina-12 (IL-12), TNF- $\beta$  e IL-27 (Trinchieri, 2003). La expresión de moléculas de adhesión de membrana celular (ICAM) y quimiocinas como: CXCL9, CXCL10, CCL21. En el presente estudio se evaluó la presencia de INF- $\gamma$  para evaluar la presencia de una respuesta Th1 (Trinchieri, 2003).

Para la diferenciación de una respuesta Th1, existen dos factores muy importantes el INF- $\gamma$  y IL-12, por lo que a continuación profundizaremos en estos dos factores (Fig. 4).

**INF- $\gamma$ .** INF- $\gamma$  es una citocina clave para las células Th1, se ha sugerido que es muy importante para la diferenciación de estas células. Las principales fuentes de INF $\gamma$  son células NKs, células T CD8+ y células T CD4+ Th1. Muchas células linfoides, y no linfoides, expresan el receptor heterodimerico -1 y -2 de INF $\gamma$ , así pueden ser estimulados por INF- $\gamma$  a través de la vía de señalización Jak1/ Jak2-STAT<sub>1</sub> se ha observado que si hay una deficiencia en esta vía se compromete la respuesta inmune contra agentes patógenos microbiales y algunos virus en ratones y humanos. *In vitro*, sólo la producción de INF- $\gamma$  en el ambiente promueve la diferenciación de células T CD4+ Th1 (Wan y Flavell, 2009).

**IL-12.** IL-12 es un factor soluble que induce la potencialización de la diferenciación de Th1. IL-12 comprende de dos subunidades, p53 y p40. Este factor es producido por las células innatas después de su activación mediada por el estímulo de INF- $\gamma$  IL-12 se une a los receptores que activan la vía de señalización Jak<sub>2</sub>/Tyk<sub>2</sub>-STAT<sub>1, 3, 4</sub> (Wan y Flavell, 2009).

Las células T CD4+ sólo regulan IL-12R por medio de la estimulación de TCRs. El funcionamiento del receptor IL-12R se mantiene funcional en las células Th1, pero disminuye en las células Th2. La vía de IL-12 parece ser necesaria para la expresión de IL-18R $\alpha$ , un receptor para IL-18 que es una citocina de la familia IL-1 que sirve de cofactor para IL-12 en la estimulación de células T CD4+ para la producción de INF- $\gamma$  y para la diferenciación de una respuesta Th1 (Robinson *et al.*, 1997).

Con base en numerosos estudios, se ha sugerido que IL-12 quizá no sea requerido para iniciar la respuesta Th1, pero sí es muy importantes en la inducción de una producción optima de INF- $\gamma$  después de la activación de células T (Wan y Flavell, 2009).

## **Respuesta Th2**

Los factores que demuestran que existe una respuesta Th2 son: Interleucinas 4, 5, 9, 13 y 25, además algunas quimiocinas como la 2, 7, 8, 13 y 17 (Fig. 4) (Wan y Flavell, 2009).

**IL-4.** Aunque no es la única citocina de la respuesta Th2, sí es la que tienen una mayor influencia en conducir la diferenciación de una respuesta Th2. La unión de IL-4 a su receptor IL-4R $\alpha$  activa a STAT6 y promueve la diferenciación de Th2. La habilidad de activas células T CD4+ productoras de IL-4 depende de una re-estimulación, es decir, depende de la concentración exógena de IL-4 (Wan y Flavell, 2009).

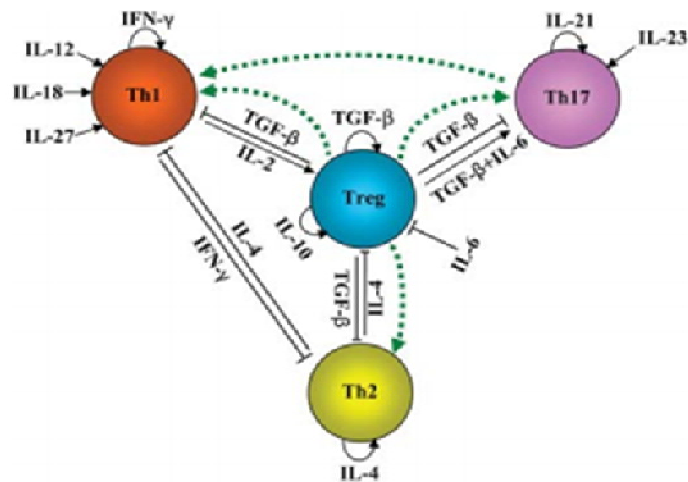
## **Respuesta Regulatoria**

La respuesta regulatoria se caracteriza por presentar producción de la citocina inhibitoria IL-10, TGF- $\beta$  y TSP1 (Fig. 4) (Wan y Flavell, 2009).

**IL-10.** Es una citocina inhibitoria, crucial para el desarrollo de células T reguladoras. La unión de IL-10 con su receptor activa la vía JAK<sub>1</sub>/Tyk<sub>2</sub>-STAT<sub>1 $\alpha$</sub>  y <sub>3</sub>, en células T diana. IL-10 es una citocina ampliamente expresada en algunos subtipos de células Treg, como las Tr1, y es crucial para su funcionamiento.

**TGF- $\beta$ .** El TGF- $\beta$ <sub>1</sub> se una a un receptor heterodimerico que inicia una cascada de señales intracelulares a través de las MAPK. Estudios recientes han demostrado que el TGF- $\beta$ <sub>1</sub> promueve la generación de *novo* de células Treg, e incrementa la expresión de Foxp3 (Wan y Flavell, 2009).

## Funciones de las células T CD4+ efectoras



**Fig.4.** El papel de las principales citocinas involucradas en la diferenciación de células Th y su conversión en otro tipo de respuesta. Bajo ciertas circunstancias, un tipo de células Th se puede convertir en otro tipo (líneas verdes).

## Memoria inmunológica

Después de la respuesta hacia el patógeno, la población de células T CD8+ citotóxicas experimenta una disminución repentina. Durante esta disminución poblacional, la mayoría de las células T CD8+ efectoras mueren por apoptosis, pero aproximadamente el 5 al 10 % sobreviven y se quedan como un recurso de protección a largo plazo, estas células son llamadas células T CD8+ de memoria (Lau *et al.*, 1994; Cui y Kaech, 2010)

Las células T CD8+ pueden persistir por largos periodos en ausencia de un Ag, estas células proveen protección a largo plazo (Lau *et al.*, 1994) Generalmente, las células T CD8+ de memoria son estables en el tiempo, están ligadas a la interacción con algunas citocinas como: IL-7 e IL-15, las cuales median su sobrevivencia y su auto-renovación (proliferación homeostática) (Cui y Kaech, 2010). Además, las células T CD8+ de memoria quedan en un estado de inactividad, pero cuando hay un segundo encuentro con el mismo Ag, tienen la capacidad de proliferar rápidamente y diferenciarse de nuevo en células T CD8+ efectoras (Cui y Kaech, 2010).

## **Respuesta inmunológica vs cáncer**

El sistema inmunológico evolucionó para reconocer y destruir materiales “extraños”, pero el cáncer proviene de células del propio individuo. Aunque muchas células tumorales poseen proteínas que no se expresan de manera normal en las células sanas, o proteínas mutadas que son distintas a las que se encuentran en las células normales, aún así siguen siendo proteínas del hospedero. Como consecuencia, el sistema inmunológico casi nunca las reconoce como extrañas, incluso si la persona tiene linfocitos T funcionales, que reconocen los antígenos relacionados con el tumor, las neoplasias desarrollan mecanismos que les permiten escapar a la destrucción inmunitaria. Estas estrategias de escape, van desde la inhibición de la presentación antigénica, hasta la producción de sustancias inmunosupresoras como las citocinas TFG- $\beta$  e IL-10 (Salazar-Onfray, 1999), las cuales son citocinas relacionadas con la tolerancia inmunológica.

## **Inmunoterapia antitumoral**

Se han formulado muchas medidas diferentes para vencer estos obstáculos y estimular al sistema inmunológico con el fin de que establezca una respuesta vigorosa contra las células tumorales. A continuación se mencionarán brevemente las estrategias que hasta el momento se han probado para el tratamiento contra el cáncer.

**Estimulación inmunológica no específica.** La estimulación no específica puede lograrse con agentes que estimulen a células inmunes efectoras, tales como las células T y las CPAs (por ejemplo CDs), o bien, inhibiendo o eliminando células inmunoregulatoras tales como las células T reg. Las células T efectoras pueden ser estimuladas con citocinas como IL-2 e INF- $\alpha$ . Ambos tratamientos han sido aprobados para el tratamiento del melanoma y el carcinoma de células renales. En algunos pacientes con melanoma se han observado regresiones completas y



duraderas después del tratamiento con IL-2. Sin embargo, el tratamiento requiere de un uso prolongado de IL-2 y se han observado efectos tóxicos, así que no son de uso común (Zitvogel *et al.*, 2008).

Existen otras alternativas, como adyuvantes que son ligandos de TLRs de CDs, estos activan a las CDs y contribuyen a una buena presentación antigénica. El agonista TLR7 *imiquimod* está aprobado para el tratamiento de carcinoma. El adyuvante BCG, que tiene el mismo efecto sobre las CDs, ha sido aprobado como un tratamiento estándar para el cáncer de vejiga. Algunos tratamientos están basados en la inoculación de anticuerpos dirigidos a moléculas específicas, como el anticuerpo dirigido a inhibir la molécula coestimuladora CD40. También las células Treg pueden ser atacadas por medio de la inhibición del receptor de IL-2 con el anticuerpo *daclizumab* anti-CD25 (IL-2 receptor  $\alpha$ -cadena) (Zitvogel *et al.*, 2008).

Otros agentes quimioterapéuticos citotóxicos y medicamentos contra el cáncer dirigidos pueden tener efectos estimulantes del sistema inmune mediante la inducción inmunogénica de la muerte celular, eliminación de las células inmunosupresoras, interrumpiendo las vías inhibitorias o mediante la eliminación de células tumorales por las células T citotóxica. La falta de especificidad de este tipo de inmunoterapia plantea un reto importante, es por eso que se están desarrollando nuevos tratamientos que tratan de aprovechar plenamente las propiedades inmunogénicas de los compuestos del propio tratamiento (Zitvogel *et al.*, 2008).

Otra forma de estimulación indirecta es obtener células tumorales del paciente, irradiarlas y volverlas a introducir en el paciente, así se obtiene un cocktail de antígenos tumorales que pueden ser captados por CPA y desencadenar una respuesta inmunológica mediada por LTCs. Sin embargo, se ha observado que depende mucho de la forma de muerte celular que tengan las células tumorales, ya que se puede inducir diferente respuesta inmunológica (Zitvogel *et al.*, 2008).

### **Inmunoterapia adoptiva**

Las células antígeno-específicas efectoras pueden ser extraídas del paciente, seleccionadas y expandidas *ex vivo*, y luego re-inoculadas en el paciente, obviando la necesidad de proporcionar Ags que activen a las CPA. Dos enfoques principales están siendo explorados, con infiltrados tumorales y con CDs. En el primer enfoque, las células T infiltradas en el tumor se extraen y son cultivadas (se ha probado principalmente para el melanoma), se expanden *ex vivo* en presencia de IL-2. Cuando ya hay un número suficiente de estas células T policlonales, entonces se recolectan y se vuelven a infundir en el paciente. Esta estrategia se ha mejorado mediante la combinación con un pre-acondicionamiento de quimioterapia. En pacientes con melanoma se han observado respuestas alentadoras, completas y duraderas. Sin embargo, en la actualidad sólo es posible obtener suficientes células T en una minoría de pacientes (Joost y Cornelis, 2012).

En la segunda estrategia se utilizan células T aisladas de sangre periférica que son modificadas genéticamente para expresar TCRs Ag-tumoral-específicos y después vuelven a ser infundidas en el paciente. Esta estrategia tiene la ventaja de que se pueden obtener suficientes células T para la infusión en el paciente, sin embargo, una desventaja potencial es que los TCR que son transfectados en las células T tienen un limitado repertorio Ag-específico (Joost y Cornelis, 2012).

### **Inmunoterapia adoptiva con células dendríticas**

Las CPAs pueden ser extraídas del torrente sanguíneo del paciente, posteriormente cultivadas y activadas con citocinas o adyuvantes. Además, es indispensable que sean cargadas con el antígeno tumoral *ex vivo* y readministradas al paciente. Alternativamente, CDs pueden diferenciarse a partir de monocitos de sangre periférica en presencia de IL-4 y GM-CSF, y activarse con antígenos tumorales *ex vivo*. Las CDs cargadas adecuadamente con antígenos

asociados a tumor han inducido una respuesta inmunoprotectora y eficaz en la eliminación de los tumores en modelos animales (Joost y Cornelis, 2012).

Un primer estudio, realizado por Nestle *et al*, utilizó CDs cargadas con péptidos o lisados tumorales y hemocianina de la lapa Californiana (KLH) como adyuvante, las que fueron administradas intranodalmente a pacientes con melanoma. En este estudio fueron reportadas respuestas objetivas en 5 de los 16 pacientes evaluados (dos respuestas completas y tres respuestas parciales). Menciones actuales sobre este estudio muestran que la respuesta clínica se ha mantenido por algunos años (Nestle *et al.*, 1998). Otros estudios que utilizaron el péptido MAGE-3, lograron una buena respuesta péptido específica *in vitro*, sin embargo ésta no se correlacionó con una respuesta clínica, posiblemente por la baja presentación de este péptido restringido a HLA-A2 en la mayoría de las células de melanoma (Thurner *et al.*, 2000). Aunque, fue reportado que CDs maduras y criopreservadas cargadas con múltiples péptidos restringidos a MHC clase I y clase II, indujeron una respuesta rápida y específica de células tipo Th1, productoras de IFN- $\gamma$  contra el antígeno MAGE-3.

### **Adyuvantes**

Los avances en cuanto a vacunas de la última década han dado muchos frutos, llegando así al desarrollo de las denominadas “vacunas de la nueva generación”. Sin embargo, en muchos casos, es necesario mejorar la respuesta inmunitaria a los antígenos presentes en una vacuna, con el fin de estimular el sistema inmune de manera suficiente para hacer una vacuna eficaz, es decir, para conferir inmunidad (Morris, 1999).

Muchos antígenos proteínicos y la mayoría de los peptídicos y de carbohidratos, administrados solos, no provocan una respuesta Ag-específica suficiente para conferir inmunidad (Guy, 2007). Con el fin de inducir una mejor respuesta inmunológica, en las últimas décadas se han usado compuestos que pueden incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca del antígeno. Estos

compuestos pueden ser heterogéneos, formados por diferentes tipos de moléculas, llamados adyuvantes; o compuestos homogéneos, formados por un solo tipo de molécula, llamados inmunoestimulantes (Guy, 2007).

Las sustancias inmunomoduladoras constituyen una familia muy heterogénea, si se toma en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Dentro de ellas ocupan un lugar muy importante los agentes inmunopotenciadoras, a los cuales se les atribuyen dos funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y por otra parte, la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta *in vivo* en modelos experimentales con vistas a la producción de antisueros (Morris *et al.*, 1999; Guy, 2007).

**Acción de los adyuvantes.** La iniciación de la respuesta de células T cooperadoras (Th), como ya se mencionó, requiere de tres señales (ver fig. 5). En teoría los adyuvantes pueden actuar directamente- solos o en combinación- en una de estas tres señales e indirectamente sobre todas las señales. Por ejemplo, los adyuvantes que actúan sobre los TLRs son considerados como adyuvantes tipo A. Los adyuvantes tipo A actúan sobre la señal 0, de reconocimiento, e indirectamente en la señal 2, activando las CPAs y promoviendo la secreción de citocinas como IL-12. Además, los agonistas de TLRs pueden actuar sobre la señal 1 favoreciendo la presentación eficiente de los Ags co-administrados. Algunos agonistas de TLRs activan directamente la señal 0 en células T regulatorias y en células B que expresan ciertos receptores correspondientes (Guy, 2007)

**Ejemplos de adyuvantes.** Los adyuvantes pueden ser incorporados al Ag o inyectados simultáneamente con él hacen más efectiva la respuesta inmune. Con el empleo de adyuvantes se logra la economía de Ag y de tiempo, así como un mayor nivel de células T citotóxicas específicas contra el Ag, o bien de anticuerpos

específicos (Guy, 2007). Las diferentes moléculas que conforman a los adyuvantes poseen la capacidad de inducir respuestas inmunes diversas. El adyuvante más conocido, es el adyuvante completo de Freund, que consiste en una mezcla de micobacterias en una emulsión de aceite/agua. El adyuvante de Freund funciona de dos modos: en primer lugar, mejorando la inmunidad mediada por células, así como la humoral. En segundo lugar, bloqueando la dispersión rápida de la activación del Ag. Sin embargo, debido a las frecuentes reacciones fisiológicas e inmunológicas tóxicas para este material, el adyuvante de Freund no puede usarse en seres humanos. Otra molécula en la que se ha observado actividad inmunoestimulante o adyuvante es la endotoxina, también conocida como lipopolisacárido (LPS). El LPS estimula el sistema inmunológico poniendo en marcha la respuesta inmune innata. Aunque el LPS es demasiado tóxico para ser un adyuvante viable, moléculas que están estructuralmente relacionadas con la endotoxina, tales como el monofosforil-lípido A (MPL) se están aprobando como adyuvantes en experimentos clínicos (Guy, 2007). Sin embargo, es necesario investigar el efecto de otras moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmune inducida por DCs, dado que así podría ser utilizada en la inmunoterapia contra el cáncer.

## ANTECEDENTES

**Inmunoterapia.** El desarrollo de la inmunoterapia no ha sido algo sencillo, ni ha sido un evento único, sino que ha ido evolucionando. Así, la inmunoterapia ha sido posible gracias a diferentes descubrimientos e investigaciones que comenzaron a surgir en el año 1898, con el tratamiento anti-tumoral de Coley. Este tratamiento marcó el inicio de un tratamiento con amplias perspectivas clínicas.

El pionero neoyorkino William Coley, en 1891, se interesó enormemente por el caso de un paciente que tenía un tumor inoperable en el cuello, pero sorprendentemente, éste paciente tuvo una regresión tumoral después de haber contraído una infección bacteriana. Coley, teniendo como base dicho caso clínico, desarrolló un extracto bacteriano que estimulará al sistema inmunológico de los pacientes y así éste pudiera destruir las células tumorales. El trabajo de Coley tuvo éxito sólo en algunos tipos de cáncer como el carcinoma, sin embargo, éste experimento confirmó que el organismo posee la capacidad de destruir un tumor, incluso cuando ya está bien establecido.

Experimentos pioneros demostraron que el crecimiento de tumores singénicos en ratones podía ser prevenido previa inmunización con el mismo tumor (Lein *et al.*, 1957). A partir de los 80's, se logró aislar linfocitos T citotóxicos (CTL) con actividad antitumoral de sangre periférica, ganglios linfáticos y tejido tumoral de pacientes con melanoma (Topalian *et al.*, 1989), se observó que estos CTLs eran específicos contra el tumor, lo cual daba la pauta para poder usar células del sistema inmunológico en una terapia anti-tumoral. Para esa época, ya había un creciente interés por utilizar el sistema inmune como herramienta en el tratamiento contra el cáncer.

En 1985, se probaron las primeras terapias adoptivas utilizando CTL estimulados *in vitro*, en algunos protocolos clínicos. (Rosenberg *et al.*, 1986). Se evidenció que los CTL específicos contra melanoma, reconocen fragmentos peptídicos (de 8-10

a.a.) derivados de proteínas citoplasmáticas o nucleares asociadas al MHC clase I. Estos resultados, en conjunto, proveen evidencias innegables de la existencia de una respuesta mediada por linfocitos T contra tumores autólogos que poseen capacidad terapéutica, pudiendo inducir la regresión de tumores y sus micrometástasis (Boon *et al.*, 1995)

La capacidad de activar *in vitro* o *in vivo* CTL específicos contra melanoma, requiere de una presentación antigénica en un contexto celular especial dado por las CPAs, entre ellas se incluyen a las CDs. Estas últimas, juegan un papel fundamental en la generación de una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T, ya que poseen la capacidad de capturar antígenos tumorales y presentarlos asociados a las moléculas MHC. Además, expresan gran cantidad de moléculas coestimuladoras, las que proveen señales cruciales que garantizan la efectividad de la respuesta mediada por linfocitos T (Banchereau y Steinman, 1998)

**Inmunoterapia adoptiva con CDs.** La habilidad única de las CD para inducir una respuesta inmune primaria, hace de ellas las mejores candidatas para ser usadas en protocolos de vacunación en cáncer (Banchereau y Steinman, 1998). De hecho, CD cargadas adecuadamente con antígenos asociados a tumor han inducido una respuesta inmune protectora y eficaz en la eliminación de los tumores en modelos animales (Porgador y Gilboa, 1995; Toes *et al.*, 1998).

**Terapia con CDs y memoria inmunológica.** Se tiene bien documentado que la respuesta inmunológica específica anti-tumoral depende de la presentación de antígenos tumorales por células dendríticas (Diamon *et al.*, 2011; Fuertes *et al.*, 2005). Por más de una década se ha estudiado el efecto terapéutico de la inmunoterapia tumoral con células dendríticas diferenciadas *ex vivo*, dichos estudios concluyen que la vacunación con CDs induce la activación y expansión de células T CD4+ cooperadoras, y células T CD8+ citotóxicas que tienen el potencial de formar memoria inmunológica (Ueno *et al.*, 2010).

Goldzmid y colaboradores, en 2011, evidenciaron que la inmunoterapia adoptiva con CD8 es específica contra el tumor si las CD8 se pulsan con Ag's tumorales. La inmunoterapia adoptiva con CD8, puede activar la proliferación de linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ conduciendo y modulando una respuesta adaptativa. Además, se demostró que éste tipo de terapia puede ser de larga duración ya que induce la formación de células T CD8+ y T CD4+ tumor-específicas de memoria

Un factor muy importante para la inmunoterapia con CD8 son los antígenos tumorales, durante los últimos diez años, varios antígenos asociados a melanoma (AAM), reconocidos por los linfocitos CD8+ citotóxicos, fueron identificados y sus epitopos peptídicos caracterizados mediante métodos genéticos y bioquímicos. La primera categoría está constituida por el antígeno tumor-específico, entre los que destaca la familia de genes MAGE (Thurner *et al.*, 2002).

**Antígeno tumoral MAGE-AX.** La identificación de antígenos tumorales reconocidos por células T y por CD8, ha sido crucial para el desarrollo de inmunoterapias anti-tumorales. Recientemente, fue reportado que las CD8 maduras cargadas con múltiples péptidos de melanoma restringidos a MHC clase I y clase II, inducían una respuesta Th1 rápida y específica, esta respuesta se caracterizó por producir grandes cantidades de IFN- $\gamma$  y así iniciar una respuesta específica contra algunos péptidos tumorales, como es el caso de las proteínas de la familia MAGE (Thurner *et al.*, 2002). Posteriormente, Eggert y colaboradores realizaron una secuencia consenso con diferentes tipos de proteínas de la familia MAGE-A, se seleccionó estas proteínas ya que están presentes en el 80% de las células tumorales de melanoma, y además son altamente reconocidas por MHC clase I de las CD8 (Eggert *et al.*, 2004).

En el laboratorio, donde se realizó el presente trabajo, se evaluó la eficacia del Ag tumoral MAGE-AX sobre la activación y proliferación de linfocitos T citotóxicos. En este ensayo, se estimularon células de Langerhans con MAGE durante 48 horas, posteriormente las CD8 previamente estimuladas se pusieron en contacto con



linfocitos T CD8+ citotóxicos durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se evaluó la capacidad que poseen las CDs para presentar dicho Ag, así como qué tanta capacidad de proliferación posee en comparación con CDs activadas con células tumorales completas. Se comprobó en éste estudio, que cuando los linfocitos se estimulan con moléculas pequeñas como MAGE-AX, hay una respuesta proliferativa cuatro veces mayor que cuando se usan células completas, además de que se induce a una respuesta inmune-específica (Herrera, 2013).

**GK-1 como inmunoestimulante** En los tratamientos inmuno-terapéuticos, se ha vuelto recurrente el uso de adyuvantes y/o inmunoestimulantes, ya que estos pueden incrementar y dirigir la respuesta inmunológica inducida (Israeli *et al.*, 2009). GK-1 es un ejemplo de inmunoestimulante que ya ha sido usado anteriormente en la vacuna contra la influenza (Segura Velázquez *et al.* 2006).

GK-1 es un péptido de 18 aminoácidos (**GYYYPSDPNTFYAPPYSA**) que se encuentra en el parásito *Taenia cressiceps cysticersi* (Manoutcharian *et al.*, 1996). Se ha demostrado que el péptido GK1 induce la protección contra la cisticercosis incluso en ausencia de un adyuvante, ya que es capaz de interactuar con las células T CD8+ T CD4+ y estimular su proliferación, además se ha demostrado que el GK-1 induce una alta producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T, favoreciendo así una respuesta Th1. (Toledo *et al.*, 1999).

Ya que GK-1 es un péptido que puede ser rápidamente eliminado por el cuerpo, lo que lo hace un buen inmunoestimulante para diversos tratamientos, ya que no posee efectos indeseables. Aunque aún no se conoce el mecanismo completo por el cual GK-1 actúa, por los estudios realizados en la vacuna anti-influenza, se mostró que el inmunoestimulante GK-1 tiene un efecto proliferativo sobre linfocitos T CD4+ antígeno-específicos, lo cual es de vital importancia en su uso como inmunoestimulante en tratamientos dirigidos (Segura-Velázquez, 2009).

Además, se mostró que el GK-1 tiene un efecto sobre las CDs, ya que en presencia del inmunoestimulante las CDs aumentaron la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, así como la expresión de MHC II. En combinación con LPS, el GK-1 aumenta la inducción de la secreción de CCL2, una citocina proinflamatoria que atrae monocitos y células NK. Esta producción de CCL2, junto con otras citocinas proinflamatorias, se traduce en un posible aumento en la presentación de antígenos y la amplificación de la respuesta inmunológica. Se observó además, el efecto que posee sobre la producción de citocinas inflamatorias como TNF $\alpha$  y INF $\gamma$ , las cuales son altamente benéficas en la terapia anti-tumoral (Segura-Velázquez, 2009).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a la capacidad de las células dendríticas para activar una respuesta inmune específica y de memoria, se propone probar un tratamiento dirigido específicamente a contrarrestar el desarrollo tumoral de melanoma, con el fin de disminuir la probabilidad de desarrollar un tumor secundario en pacientes que previamente desarrollaron melanoma. Dicho tratamiento sentará sus bases en el reconocimiento, del péptido MAGE-AX, por las CDs y en el ambiente inflamatorio favorable que inducirá el inmunoestimulante GK-1, conduciendo a las CDs a una presentación de Ags y activación exitosa de linfocitos T, así como a la formación de memoria inmunológica contra el melanoma.

## **HIPÓTESIS**

Si GK-1 favorece la modulación de la respuesta inmune inducida en ratones C57BL/6, por la inoculación de células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con MAGE AX en ratones inoculados con melanoma murino B16/F10, entonces:

- Se inducirá memoria inmunológica contra el tumor.
- Se incrementará el porcentaje de linfocitos T CD8+ y CD4+, así como la producción de IFN- $\gamma$ .
- Se disminuirá la secreción de IL-4 e IL-10.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto preventivo del tratamiento con GK-1 y CDs pulsadas con MAGE-AX contra el melanoma inducido en ratones C57 BL/6, postinducción del tumor. En contexto del desarrollo tumoral y la respuesta inmune.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Medir sobrevida y tamaño tumoral en los ratones.
- Cuantificar niveles de linfocitos CD4+ y CD8+ en bazo, y ganglios linfáticos.
- Cuantificar la producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 en linfocitos T CD4+ y CT8+ en bazo y ganglios linfáticos.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Animales.** Se utilizaron ratones de la cepa C57 BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, dichos ratones se mantuvieron en el bioterio del departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, en ciclos constantes de luz-oscuridad con duración de 12 horas, a una temperatura de 23°C. Se alimentaron *ad libitum* con pelets para ratón Rodent Lab Chow 5001 de Purina.

**Péptidos.** Péptido GK-1 (aa: GYYYPSPDNTFYAPPYS [A]) fue sintetizado por Alphadiagnostics International, San Antonio, Texas con el 96.11% de pureza. Se utilizó a una concentración de 10 µg/mL.

El péptido MAGE-AX (aa: LGITYDGM) fue sintetizado por Research Genetics (*Invitrogen, Leiden, Holanda*) con una pureza del 90%. Se utilizó a una concentración de 25µg/mL.

Por medio del Ensayo Limulus Amebocte Lysate (LAL) de Thermo Lab, se corroboró que ambos péptidos estuvieran libres de endotoxinas.

**Línea celular.** Para la inducción de melanoma se utilizó la línea celular B16F10 de melanoma murino (European Collection of cell cultures U.K.), cultivada con medio DMEM (Gibco) con 20% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibiótico Penicilina/Streptomicina (Gibco)

**Anticuerpos.** Anticuerpo APC Rat Anti-Mouse CD4, Per CP-Cy 5.5 Rat Anti-Mouse CD8a, PE Rat Anti-Mouse CD86, FITC Rat Anti-Mouse I-A/I-E, Anti-mouse Interleukin-4 (IL-4), Anti-mouse Interleukin-10 (IL-10), Anti-mouse Interferon-gamma (IFN-g), PE Streptavidin. Todos los anticuerpos fueron de BD Biosciences (Pharmingen, USA), con excepción del anticuerpo APC anti-mouse CD11c de BioLegend,

### **Obtención de GM-CSF a partir de células CHO**

La diferenciación de las CDs a partir de médula ósea *ex vivo* requiere de la adición del factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF se obtuvo de células de ovario de hámster chino (CHO), estas células poseen el plásmido pCDNA3 que contiene el gen recombinante para producir GM-CSF. Las células CHO obtenidas de viales congelados, fueron descongeladas a baño María a 37°C y sembradas en una caja de 25 cm<sup>2</sup> en medio de selección F12 /SBF (Gibco) 10%/ geneticina 1 mg/ml (medio F12 S), el cultivo se mantuvo en estas condiciones hasta alcanzar el 90% de confluencia. Posteriormente, se agregó tripsina (0.05%)/EDTA (0.02%) al cultivo con el fin de seleccionar las células con mayor adhesión celular. Las células que quedaron adheridas se les volvió a colocar medio F12S; el procedimiento de selección se repitió tres veces. Después del proceso de selección las células CHO fueron transferidas a una caja de 75cm<sup>2</sup>, con medio de crecimiento F12 /SFB10% (F12C). Se mantuvieron con F12C hasta alcanzar 90% de confluencia, momento en el cual las células se desprendieron con tripsina y se sembraron en 6 cajas de 75 cm<sup>2</sup> con medio F12C. Una vez que el cultivo alcanzó 90% de confluencia se lavaron con la solución salina HBSS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+NaHCO<sub>3</sub>+NaCl+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+KCl+Glucosa) y se adicionó medio F12 plano (F12 P). Entre 48 y 72 horas después de la adición de F12 P al cultivo, el medio fue recolectado, filtrado (con filtro de 0.22 µm) y congelado a -20°C. Este procedimiento de producción-crecimiento se repitió 4 veces.

Es importante mencionar que el sobrenadante obtenido, que contiene GM-CSF, se debe mantener congelado a -20 °C hasta su uso. Como el GM-CSF se degenera con el tiempo, es necesario mantener una línea de producción constante y no almacenar por más de dos meses el sobrenadante obtenido por esta metodología.

### **Diferenciación y activación de CDs**

La obtención de CDs se realizó a partir de la diferenciación de células precursoras provenientes de la médula ósea (MO) de fémur y tibia de ratones C57BL/6.

La extracción de huesos se realizó inmediatamente después del sacrificio por dislocación cervical de los ratones C57 BL/6. Se retiró el tejido muscular de los huesos y éstos últimos se colocaron en HBSS frío hasta el momento de obtener las células de MO. Los huesos fueron desinfectados con etanol al 70% durante 60 segundos, posteriormente se lavaron tres veces con HBSS.

Bajo condiciones completamente estériles, los huesos se colocaron en una caja Petri con 10 ml de DMEM suplementado (DMEM/SFB 20%/ antibiótico). Se cortaron la epífisis de cada hueso y con ayuda de una jeringa cargada de DMEM se extrajo el contenido celular de los huesos, la jeringa se colocó entre la diáfisis y se forzó la salida de las células con la presión del medio al salir.

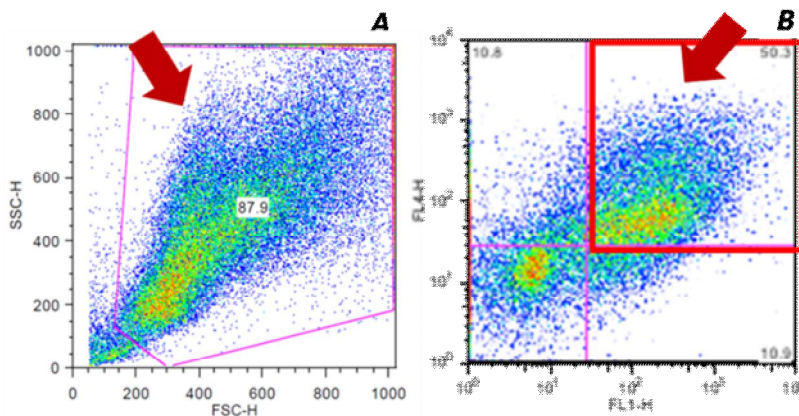
Las células obtenidas se centrifugaron a 120 rpm durante 10 minutos. Para eliminar los eritrocitos del botón celular, se adicionó 1 ml de Buffer de lisis y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos, transcurrido dicho tiempo se detuvo el efecto de la tripsina, adicionando 1 ml de medio DMEM y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Finalmente las células obtenidas fueron sembradas en cajas Petri a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, con medio DMEM suplementado

El cambio de medio se realizó cada tercer día. Al decimo día de diferenciación, una parte de las CDs obtenidas se pulsaron durante 24 horas con el péptido MAGE-AX. Las DCs restantes no fueron pulsadas, con el objetivo de utilizarse como controles.

### **Fenotipo de las CDs**

El fenotipo de las CDs diferenciadas de MO fue analizado mediante una triple tinción con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD86 y anti-MHCII. Posteriormente se realizó el análisis, por citometría de flujo, de la población celular obtenida. A continuación se muestra un *Dot blot* que muestra la población total obtenida (Fig. 5, A), en este *Dot blot* se trazó el área, aproximada, correspondiente a la población

de CDs. El segundo *Dot blot* fue tomado de la primera población seleccionada (Fig. 5, B), en el recuadro señalado (flecha) se muestra la población celular correspondiente a las CDs (CD11c+, MHCII+).



**Fig. 5. Fenotipo de las CDs diferenciadas de médula ósea.** Las CDs diferenciadas de MO se mantuvieron en cultivo en presencia de GM-CSF durante 10 días. Antes de ser inoculadas fueron marcadas con anticuerpos (anti-CD11c y anti- MHCII) y analizadas por citometría de flujo. **A, Tamaño y granularidad.** El *dot blot* muestra, en el área señalada (flecha), las células obtenidas que probablemente sean CDs, dejando fuera del área a los detritos celulares. **B, Fenotipo de las células diferenciadas de MO.** El *Dot blot* muestra la expresión de CD11c y de MHCII, el área marcada (flecha) muestra el porcentaje de DCs que expresan MHCII.

### Preparación de vacunas

Al onceavo día de cultivo se recolectaron las CDs, en tubos falcon de 15 ml., y se centrifugaron a 120 rpm durante 10 min para recuperar el mayor número posible de células. El botón celular obtenido con la centrifugación se resuspendió en 1 ml de DMEM y se realizó un conteo celular con la Cámara de Neubauer. Cada vacuna constó de  $5 \times 10^5$  CDs que se suspendieron en 100  $\mu$ l de PBS para luego ser inoculadas vía subcutánea en los ratones C57BL/6.

**Inoculo de GK-1.** 10  $\mu$ g/ml de GK-1 fue inoculado vía subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones C57BL/6, de acuerdo a Segura, 2006.

### Esquema de vacunación

Con el fin de evaluar la respuesta inmunológica antitumoral de la vacunación con CDs pulsadas con el péptido MAGE-AX en ratones inoculados con GK-1, se formaron cuatro grupos con diferentes esquemas de vacunación, conformados de tres ratones cada uno. El primer grupo recibió un primer inoculo del

inmunoestimulante GK-1 y 24 horas después se inoculó con CDs pulsadas con MAGE-AX; el segundo grupo recibió un inóculo de CDs pulsadas con MAGE-AX; el tercer grupo recibió un inóculo de CDs sin pulsar; el último grupo no recibió tratamiento. Los ratones fueron inoculados cada semana durante un mes, con una dosis total de cuatro inóculos por ratón.

**Inducción de melanoma.** Un mes después de haber recibido la primera dosis de CDs, los ratones fueron inoculados vía subcutánea en el flanco izquierdo con  $1 \times 10^5$  células de la línea celular B16F/10 de melanoma murino por ratón.

### **Evaluación de respuesta post-inducción de melanoma**

#### **Desarrollo tumoral.**

Dos semanas después de la inducción de melanoma se comenzó a medir el tamaño tumoral aproximado, en caso de presentarlo, las mediciones fueron realizadas semanalmente con ayuda de un vernier, se tomó en cuenta el diámetro del tumor formado.

**Evaluación de la respuesta inmunológica post vacunación.** Para evaluar la respuesta inmune, los ratones fueron sacrificados a las 2, 4 y 8 semanas después de la inducción de melanoma, posteriormente se disectaron los ganglios linfáticos y el bazo para la obtención de linfocitos.

**Obtención de linfocitos.** Se extrajo el bazo y ganglios linfáticos. Los órganos extraídos fueron colocados en una caja de Petri con 10 ml. de medio DMEM suplementado, posteriormente los órganos fueron perfundidos con ayuda de una jeringa de 100  $\mu$ l para la obtención de un sobrenadante rico en linfocitos.

El contenido celular obtenido se mantuvo en cultivo durante 24 hrs con medio DMEM suplementado y con 25 mg/ ml de MAGE-AX. Una vez transcurrido dicho

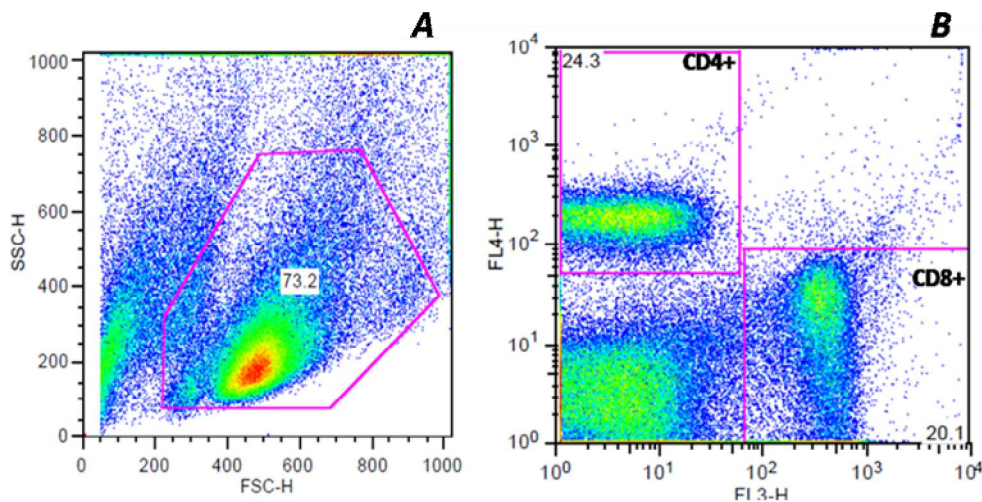


periodo de exposición, las células fueron tratadas con 1µl/mL de Brefeldina A durante 4 horas.

### Tinción y análisis de linfocitos.

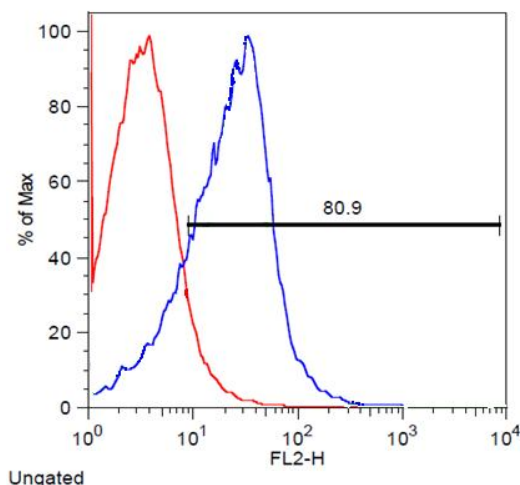
**Tinción.** Una vez transcurrido el tiempo de acción de la Brefeldina A, las células fueron teñidas con los anticuerpos anti-CD8a, anti-CD4, y anti- IL-10, IL-4 o INFγ. Posterior a la tinción, las células fueron colocadas en tubos con 500 µl de PBS de fijación (PBS y paraformaldehído al 0.1%) y se colocaron en refrigeración con completa oscuridad hasta el momento de ser analizadas en un citómetro de flujo.

**Citometría de Flujo.** Para analizar las poblaciones de linfocitos obtenidas, primero se seleccionó el área (recuadro rosa) correspondiente al tamaño y granularidad que poseen los linfocitos (Fig.6, A), tomando las células que están dentro del área seleccionada se hizo un segundo *Dot blot*, donde se observan las poblaciones que son linfocitos CD4+ (FL4-H) y las que son linfocitos CD8+ (FL3-H), así como la población que es negativa a éstas dos marcas (Fig.6, B).



**Fig. 6. Fenotipo de linfocitos.** Los linfocitos obtenidos de bazo y ganglio, se estimularon durante 24 horas con MAGE-AX. Posteriormente se realizó una tinción para identificar los linfocitos T CD4+ y T CD8+. A, **Tamaño y granularidad.** El *Dot blot* muestra, en el área señalada, las células correspondientes a la población de linfocitos, dejando fuera del área a otras poblaciones como macrófagos y a los detritos celulares. B, **Fenotipo de Linfocitos T CD8+ y T CD4+.** *Dot blot* que muestra las poblaciones de linfocitos separadas. Se muestran dos recuadros, uno corresponde a la población T CD4+ (superior izquierda) y el segundo corresponde a la población T CD8+ (inferior derecha).

Se seleccionó el área correspondiente a los linfocitos CD4+ y se obtuvo un tercer análisis que correspondió a un histograma donde muestra el nivel de citocina (INF $\gamma$ , IL-4 o IL-10) secretada por dichas células (Fig.7). El mismo análisis se realizó con el área correspondiente a los linfocitos T CD8+.



**Fig. 7. Producción de citocinas por los linfocitos T.** Después de estimular a los linfocitos, obtenidos de bazo y ganglio, durante 24 horas con MAGE-AX, se realizó una triple tinción, para identificar los linfocitos T CD4+ y T CD8+, así como la cantidad de linfocitos productores de citocinas (INF $\gamma$ , IL- e IL-10) y la MIF de estas mismas. La línea azul muestra la cantidad de linfocitos T CD4+ productores de la citocinas INF- $\gamma$ , la línea roja es el control isotipo.

### Citometría de flujo

Todos los análisis de citometría de flujo fueron realizados en el equipo FACScalibur (BD Biosciences, USA) del Instituto de Biomédicas, UNAM. El análisis de la citometría se realizó en el programa Flow Jo 8.7

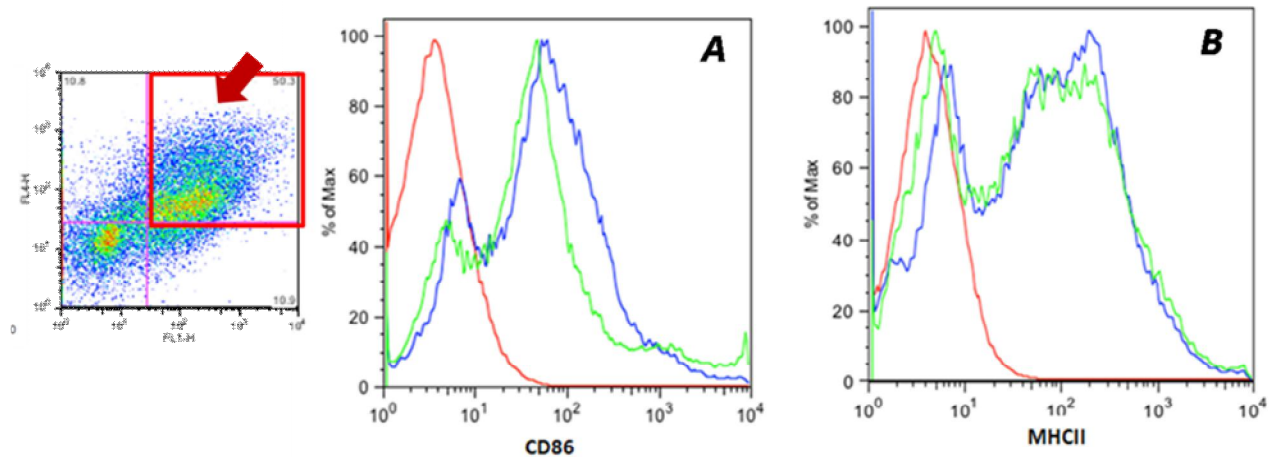
### Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media  $\pm$  SE. Para evaluar el comportamiento de las respuestas inducidas en cada uno de los tratamientos se realizó un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. Una  $P < 0.05$  fue considerada como significativa. Para dichos análisis se utilizaron los programas GraphPad Prism 6 y SigmaPlot 12.5.

## RESULTADOS

### Fenotipo de las CDs diferenciadas de medula ósea

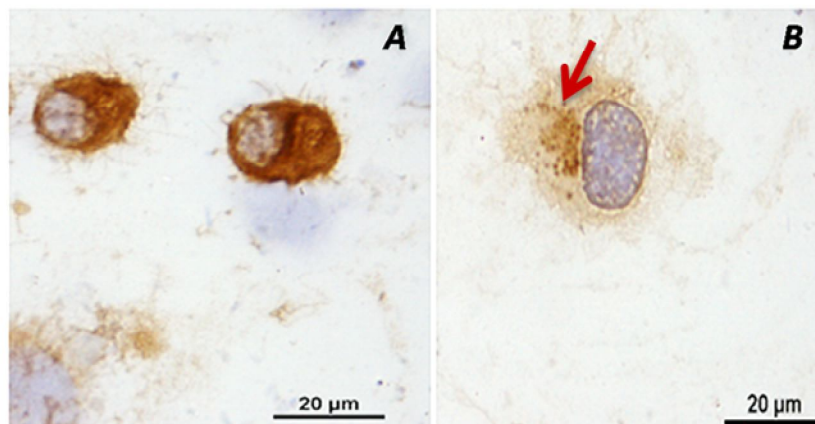
Por citometría de flujo se evaluó la presencia de células CD11c positivas, dado que es un marcador localizado en todas las CDs. Se obtuvo un grado de diferenciación del 50% (Fig.8, A). Además, se evaluó la expresión de los marcadores MHCII y CD86 que son esenciales para una buena presentación de Ag's, así como para una buena sinapsis inmunológica. Se registró aumento en la expresión de MHCII, así como en la molécula coestimuladora CD86 (MHCII y CD86 *high*) en las DCs que fueron estimuladas con MAGE-AX (Fig.8, A y B).



**Fig. 8. Fenotipo de las CDs diferenciadas de MO.** Las CDs diferenciadas de MO se mantuvieron en cultivo por 10 días en presencia del Factor de diferenciación de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), al día 10 un grupo de CDs se pulsaron con MAGE-AX durante 24 hrs (para los tratamientos DCs/ MAGE-AX Gk-1 y DCs/MAGE-AX), el resto de las células se dejaron sin estímulo. Antes de ser inoculadas fueron marcadas con anticuerpos (anti-CD86 y anti- MHCII) y analizadas por citometría de flujo. A, **Expresión de CD86 en CDs.** El histograma muestra la expresión *high* de CD86 en CDs expuestas a MAGE-AX, así como la expresión levemente *low* de ésta misma molécula cuando no fueron pulsadas. La línea verde muestra la media de intensidad (MIF) de fluorescencia de CD86 en CDs sin pulsar, la línea azul muestra la MIF de CD86 de CDs pulsadas con MAGE y la línea roja muestra la MIF de CD86 del control de isotipo. B, **Expresión del MHCII en CDs.** El histograma muestra la expresión *high* de MHCII en DCs expuestas a MAGE-AX, así como la expresión levemente *low* de ésta misma molécula cuando no fueron pulsadas. La línea verde muestra la media de intensidad (MIF) de fluorescencia de MHC II en CDs sin pulsar, la línea azul muestra la MIF de MHC II de CDs pulsadas con MAGE y la línea roja muestra la MIF de MHC II del control de isotipo. El análisis descrito se realizó tomando la población marcada (flecha) en la imagen del lado izquierdo, que corresponde a CDs.

Gracias a la colaboración del Biólogo Rodrigo Jiménez Sandoval (Sandoval, 2012) se obtuvo una microfotografía de las CDs diferenciadas de MO a los 10 días de

diferenciación, donde por Inmunocitoquímica se muestra la presencia de MHCII en la membrana celular de CDs (Fig.9, A y B).



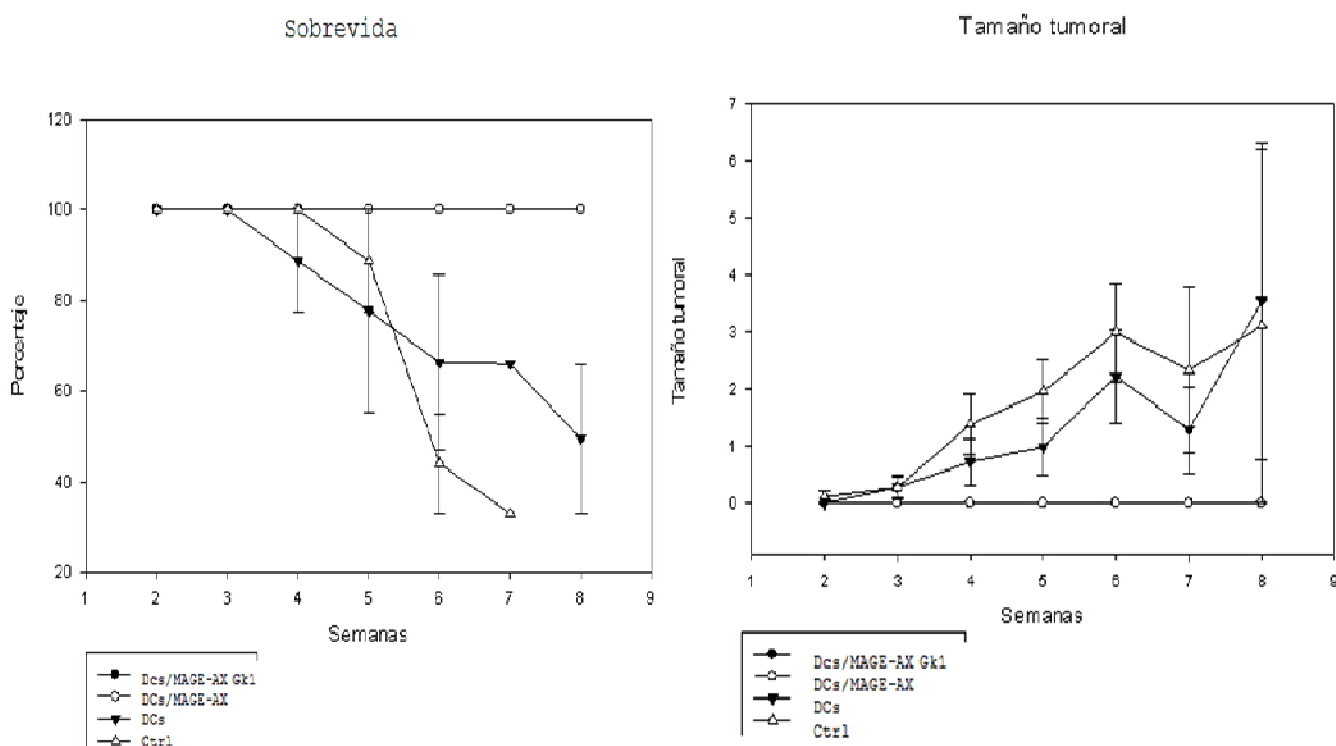
**Fig.9 A y B, Inmunocitoquímica de CDs a los diez días de diferenciación.** Fotomicrografía de CDs diferenciadas con GM-CSF durante 10 días. Inmunocitoquímica de CDs donde se revela la presencia de moléculas MHCII, las muestras fueron contrañeñidas con hematoxilina. Las CDs positivas para MHCII se observan de color café, con núcleos color azul claro. Puede observarse la presencia de MHCII cerca del núcleo, ver flecha (B). Las fotomicrografías fueron tomadas en el Microscopio Nikon Eclipse 80i en campo claro.

## 8.2. Sobrevida y tamaño tumoral

La eficiencia del tratamiento antitumoral con CDs cargadas con MAGE-AX en ratones inoculados con el inmunoestimulante GK-1, fue comparada con los otros tratamientos administrados y con el control (Ctrl).

Los datos del tamaño tumoral, obtenidos a lo largo de 8 semanas (Fig. 10, B) muestran que los tratamientos que incluyeron un inóculo con CDs pulsadas con el Ag tumoral MAGE-AX (CDs/ MAGE-AX + GK-1, y CDs/MAGE-AX) tienen una respuesta favorable, ya que se observó una constante en la ausencia de tumor en ambos grupos, al contrario de lo que pasó en el grupo de CDs sin pulsar (CDs) y en el Control (Ctrl). Es importante remarcar que en el grupo que no recibió tratamiento alguno, el tumor fue visible a las 2 semanas (Fig. 10, B).

Además de medir el desarrollo tumoral, se tomó en cuenta la sobrevivida de los individuos. Se observó que en los grupos CDs y Ctrl el porcentaje de sobrevivida disminuye a través del tiempo, mientras que en los grupos de DCs/ MAGE-AX + GK-1 y DCs/MAGE-AX se observa una constante de 100% de sobrevivida, incluso a las 8 semanas (Fig. 10, A). Por lo tanto observamos una relación directa entre el desarrollo tumoral y la sobrevivida, así mientras el tamaño tumoral aumenta, la sobrevivida disminuye.



**Fig.10. Protección contra el desarrollo tumoral después de la vacunación con el inmunoestimulante GK-1 y CDs pulsadas con el péptido MAGE-AX.** Los ratones (3-5/grupo) fueron inoculados con: el inmunoestimulante GK-1 y CDs pulsadas con MAGE-AX (CDs/MAGE-AX GK-1), CDs pulsadas con MAGE-AX (CDs/MAGE-AX), CDs sin pulsar (CDs) o no recibieron inoculo alguno (Ctrl). El esquema de tratamiento fue administrado semanalmente durante un mes. Un mes después de la última vacunación se inoculó  $1 \times 10^5$  células tumorales de melanoma murino a cada ratón. **A, Sobrevivida.** A partir de la segunda semana *post*-inoculación de células tumorales se registró el porcentaje de sobrevivencia en cada grupo. **B, Tamaño tumoral.** Se tomaron las medidas aproximadas del tumor (cm) a partir de la segunda semana después de la inducción de melanoma. Los experimentos se realizaron por triplicado, tomando la media y el error estándar (SD) de cada grupo. El SD obtenido muestra un incremento conforme transcurre el tiempo, este dato arroja evidencia de un cambio drástico en el comportamiento de la protección contra melanoma entre los diferentes tratamientos.

### Respuesta Inmunológica

Para comprender mejor el efecto de los diferentes tratamientos sobre el desarrollo tumoral y la sobrevivida, se evaluó el tipo de respuesta inmunológica. Al analizar la

presencia de memoria inmunológica y la actividad de las células T CD4+ y CD8+ de bazo y ganglio peri-tumoral, después de la inducción de melanoma. Al sacar los esplenocitos y las células de ganglio, éstas fueron estimuladas durante 24 horas con MAGE-AX, de acuerdo al protocolo usado por Eggert, 2004.

Con el fin de obtener el panorama de la actividad inmunológica inducida a nivel periférico, se evaluaron dos poblaciones de linfocitos T en bazo, linfocitos T CD4+ cooperadores totales (%CD4+) y linfocitos T CD8+ citotóxicos totales (%CD8+). Los porcentajes de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ productores de citocinas también se tomaron en cuenta, así como la producción de citocinas (MIF) de cada una de las subpoblaciones analizadas.

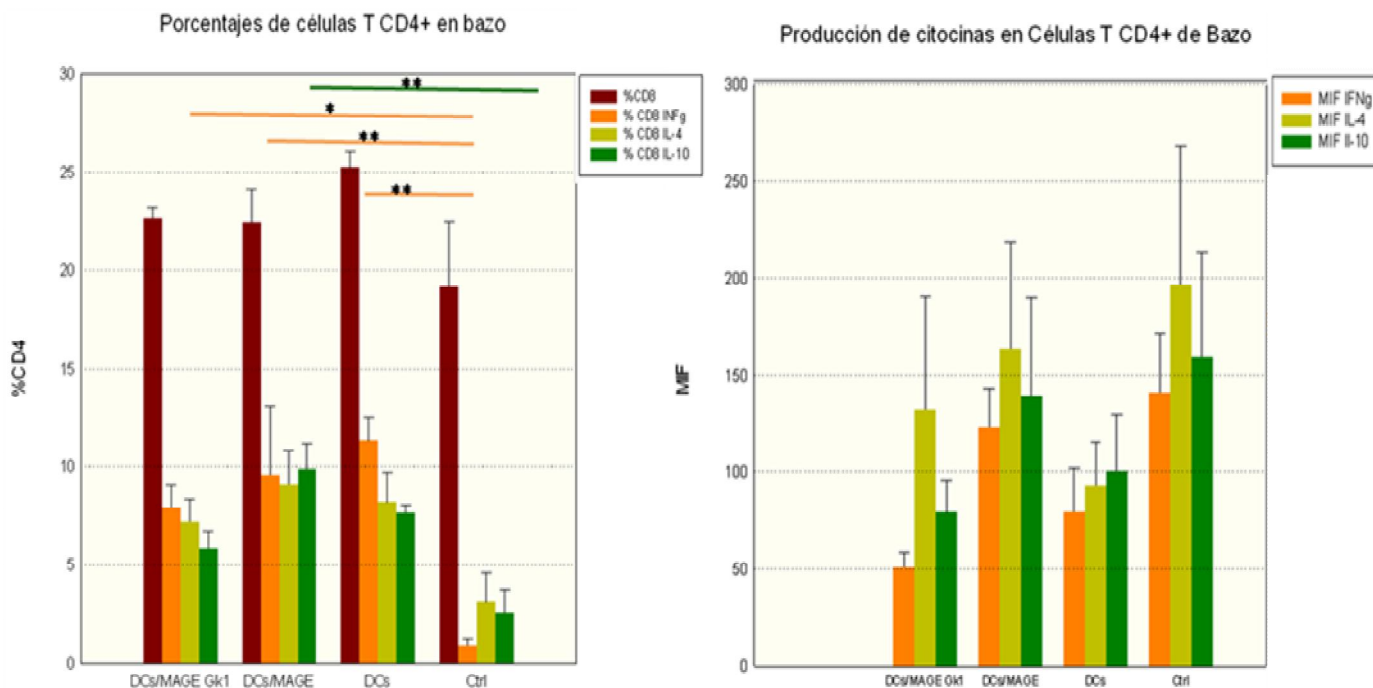
### **Comportamiento de las células T CD4+ de bazo**

#### **Porcentajes de linfocitos T CD4+ y producción de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en bazo.**

En el análisis de porcentaje general de linfocitos T CD4+ (Fig.11, A), es importante destacar que a pesar de que no hay variaciones entre los porcentajes totales de linfocitos T CD4+ (%CD4) de los distintos tratamientos, sí se observan cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas. Los grupos tratados con CDs/MAGE-AX + GK-1, CDs/MAGE-AX y CDs inmaduras presentaron aumento en los niveles de linfocitos productores de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en comparación con el grupo control, (ver Fig.11, A). No obstante, sólo los niveles de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$ + aumentaron significativamente en los grupos (MAGE-AX+ GK-1, MAGE-AX y CDs) respecto al control, lo cual sugiere la polarización de una respuesta inmunológica Th1 en dichos grupos (Fig.11, A).

El análisis de la producción de citocinas se realizó para observar la actividad de las poblaciones de linfocitos T CD4+ obtenidas de bazo (Fig.11, B). No se observaron cambios significativos en la producción de citocinas, no obstante, se observó una tendencia en el aumento de la producción de IL-4 en los grupos CDs

con MAGE-AX + GK-1, CDs con MAGE-AX y control con respecto al grupo con CDs sin pulsar. Las demás citocinas no mostraron cambios aparentes.



**Fig.11. Comportamiento de las células T CD4+ de bazo.** Los linfocitos obtenidos del bazo fueron estimulados durante 24 hrs con MAGE-AX. Se realizó el análisis de los linfocitos T por citometría de flujo analizando porcentajes celulares y producción de citocinas. A, **Porcentaje total de linfocitos T CD4+ en bazo.** Se presenta el porcentaje de linfocitos totales (%CD4), así como el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de INF- $\gamma$  (%CD4 INF- $\gamma$ ), IL-4 (%CD4 IL-4) o IL-10 (%CD4 IL-10). B, **Producción total de citocinas por linfocitos T CD4+ de bazo.** Se tomó sólo el porcentaje de linfocitos T CD4+ que fueran productores de citocinas (%CD4 INF- $\gamma$ , %CD4 IL-4, %CD4 IL-10) y se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de cada grupo. Los datos usados corresponden a la media  $\pm$ SD del total de ratones por cada tratamiento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001.

En resumen en el bazo, uno de los cambios relevantes a nivel periférico es el aumento de porcentajes de linfocitos T CD4+ productores de INF- $\gamma$  al inocular CDs con o sin MAGE-AX (Tabla 3). Sin embargo, al analizar la producción de INF- $\gamma$  no presentó ningún incremento significativo, lo cual sugiere que los cambios en la población de linfocitos T CD4+ no se vieron reflejados en la producción de citocinas, pero sí en el aumento de células productoras.



	CDs/MAGE-AX GK-1	CDs/MAGE-AX	CDs	Ctrl
CDs/MAGE-AX GK-1				
CDs/MAGE-AX	↑ %CD4 INF- $\gamma$ + **			
CDs	↑ %CD4 INF- $\gamma$ **			
Ctrl	↑ %CD4 INF- $\gamma$ + *	↑ %CD4 IL-10+**		

**Tabla 3, Resumen comparativo, de linfocitos T CD4+ de bazo, entre los diferentes tratamientos.** Comparación de datos obtenidos entre grupos, los datos que muestra la tabla solamente son los significativos. Las flechas indican un incremento o decremento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001

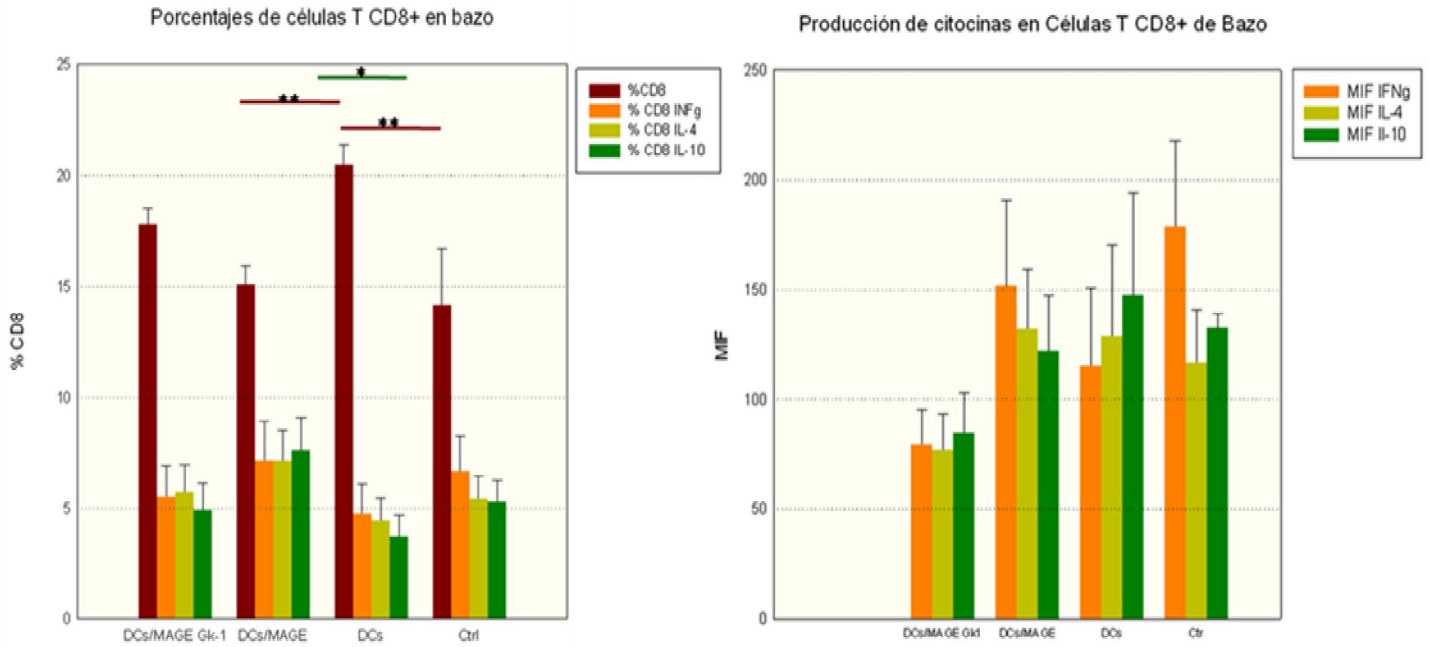
### Comportamiento de las células T CD8+ de bazo

#### Porcentajes de linfocitos T CD8+ y producción de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en bazo.

En el análisis del porcentaje de células T CD8+ totales, se observó que presentan un aumento significativo en el grupo de CDs sin pulsar (CDs) con respecto al control y al grupo CDs/MAGE-AX. Sin embargo, cuando se analizó el porcentaje de células productoras de citocinas (INF- $\gamma$ , IL-4, e IL-10) no se encontraron cambios entre los grupos (Fig.12, A).

Para conocer la actividad de las poblaciones, se analizaron los niveles de citocinas producidas (Fig.12, A). Se encontró que entre los grupos no hay variación en la producción de citocinas.





**Fig.12. Comportamiento de las células T CD8+ de bazo.** Los linfocitos obtenidos del bazo fueron pulsados durante 24 hrs con MAGE-AX. Se realizó el análisis de los linfocitos T por citometría de flujo. A, **Porcentaje total de linfocitos T CD8+ de bazo.** Se presenta el porcentaje de linfocitos totales (%CD8) de cada uno de los grupos, así como el análisis donde se muestra el porcentaje de CD8+ que producen INF- $\gamma$  (%CD8 INF- $\gamma$ ), IL-4 (%CD8 IL-4) o IL-10 (%CD8 IL-10). Los datos usados corresponden a la media  $\pm$ SD del total de ratones por cada tratamiento. B, **Producción total de citocinas por linfocitos T CD8+ de bazo.** Se tomaron los porcentajes de linfocitos T CD8+ positivos para citocinas (%CD8 INF $\gamma$ , %CD8 IL-4, %CD8 IL-10) y se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de cada grupo. El MIF de cada grupo fue separado por tiempos (2, 4 y 8 semanas). Los datos usados en la grafica de producción total (A) corresponden a la media  $\pm$ SD del total de ratones por cada tratamiento

La tabla 4, muestra un resumen de los resultados obtenidos en la población de células T CD8+ de bazo, donde se compara los resultados que son significativos estadísticamente, entre los diferentes tratamientos.

	CDs/MAGE-AX GK-1	CDs/MAGE-AX	CDs	Ctrl
CDs/MAGE-AX GK-1				
CDs/MAGE-AX			↑ %CD8+ **	
CDs		↑ %CD8 IL-10+ *		
Ctrl			↑ %CD8+ **	

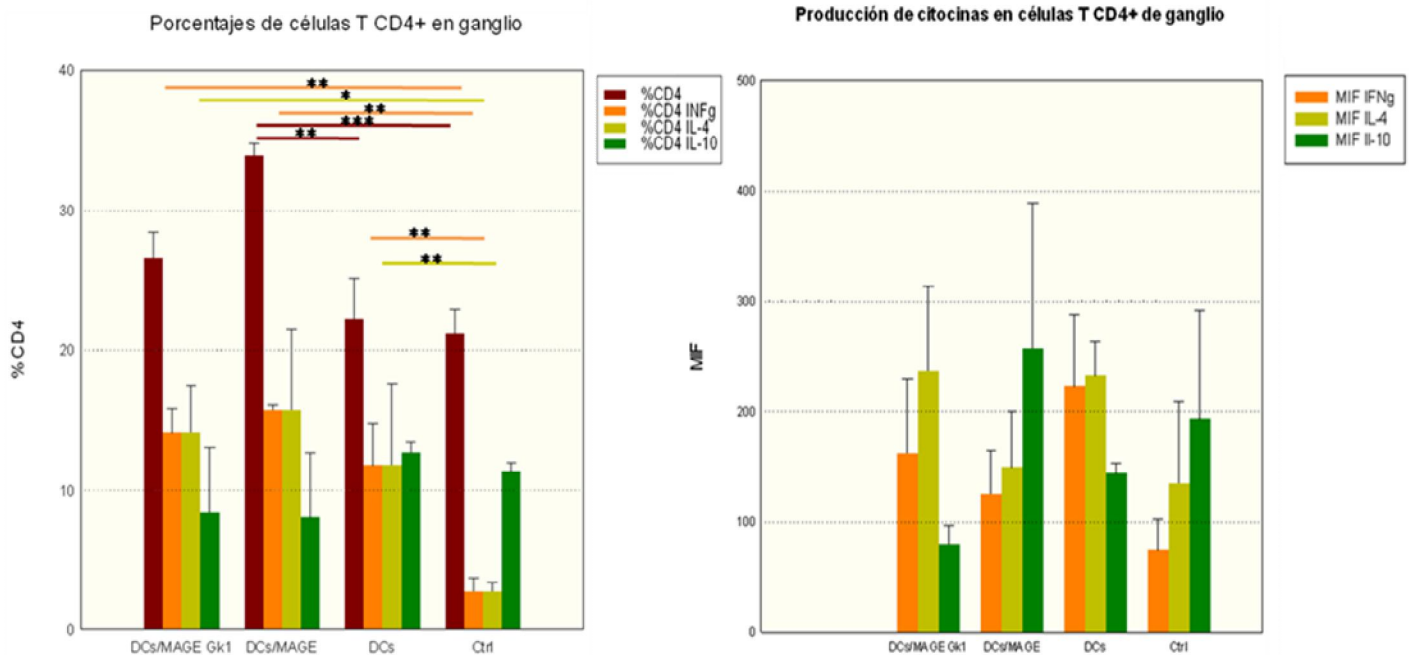
**Tabla 4, Resumen comparativo, de linfocitos T CD4+ de bazo, entre los diferentes tratamientos.** Comparación de datos obtenidos entre grupos, los datos que muestra la tabla solamente son los significativos. Las flechas indican un incremento o decremento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001

### **Comportamiento de las células T CD4+ de ganglio.**

Se obtuvieron y analizaron los linfocitos de ganglio para tener evidencia del tipo de respuesta inmunológica a nivel local que fue inducida con los diferentes tratamientos. Se evaluaron los mismos aspectos que en el bazo.

**Porcentajes de linfocitos T CD4+ y producción de INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en ganglio.** Al evaluar el porcentaje total de linfocitos T CD4+ de ganglio, se observó un aumento significativo en el total de linfocitos T CD4 (% CD4) en el grupo de CDs pulsadas con MAGE-AX (CDs/MAGE-AX) con respecto al grupo de CDs sin pulsar (CDs) y al Control (Ctrl). En cuanto al porcentaje de linfocitos T productores de citocinas se observó un aumento estadísticamente significativo en los linfocitos T CD4+ productores de INF- $\gamma$ , en los grupos CDs/MAGE-AX GK-1, CDs/MAGE-AX y CDs con respecto al control (Fig.13, A). Asimismo, se observó un cambio en los porcentajes de linfocitos productores de IL-10, aunque no significativo estadísticamente, sí muy relevante en cuanto a tendencias. La disminución en los porcentajes de linfocitos T CD4+ productores de la citocina inhibitoria IL-10 se observó en los grupos CDs/MAGE-AX GK-1 y CDs/MAGE-AX con respecto al grupo control (Fig.13, A). En relación a IFN- $\gamma$ , todos los grupos mostraron un aumento en los niveles de linfocitos T CD4 INF- $\gamma$  + con respecto al grupo control, no obstante no se encontraron cambios entre los grupos MAGE-AX, MAGE-AX +GK-1 y CDs (Fig. 13, A)

La producción de citocinas por parte de los linfocitos T CD4+ nos indica que el tratamiento con CDs/MAGE-AX GK-1 tiende a disminuir la producción de IL-10. No se encontraron cambios en la producción de IL-4 e INF- $\gamma$



**Fig. 13. Comportamiento de las células T CD4+ de ganglio.** Los linfocitos obtenidos del ganglio de cada ratón, fueron puestos en cultivo y pulsados durante 24 hrs con MAGE-AX. Se realizó el análisis de los linfocitos T por citometría de flujo analizando porcentajes celulares y producción de citocinas. A, **Porcentaje total de linfocitos T CD4+ en ganglio.** Se presenta el porcentaje de linfocitos totales (%CD4) de cada uno de los grupos, así como el análisis de dicha población donde se muestra el porcentaje de CD4+ que producen INF- $\gamma$  (%CD4 INF- $\gamma$ ), IL-4 (%CD4 IL-4) o IL-10 (%CD4 IL-10). B, **Producción total de citocinas por linfocitos T CD4+ de ganglio.** Se tomaron los porcentajes de linfocitos T CD4+ positivos para citocinas (%CD4 INF-g, %CD4 IL-4, %CD4 IL-10) y se analizó la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de cada grupo. Los datos usados en la grafica de producción total (A) corresponden a la media  $\pm$ SD del total de ratones por cada tratamiento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001.

En resumen, hay evidencia de un efecto altamente favorable a nivel local llevado a cabo por la activación de linfocitos T CD4+ , caracterizado por el incremento de linfocitos T CD4 INF- $\gamma$ + (Tabla 5). En cuanto a las tendencias, se observó que hay una disminución en los porcentajes de linfocitos T CD4+ productores de IL-10, cuando se inocula un tratamiento con CDs activadas. Además, en la producción de citocinas hay indicios de que el inmunestimulante GK-1 ayuda a disminuir la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4+.

	CDs/MAGE-AX GK-1	CDs/MAGE-AX	CDs	Ctrl
CDs/MAGE-AX GK-1				
CDs/MAGE-AX				
CDs	↑ %CD4 INF-γ ** ↑ %CD4 IL-4+**	↑ % CD4+ **		
Ctrl	↑ % CD4 INF-γ+ ** ↑ % CD4 IL-4+ *	↑ %CD4 INF-γ+** ↑ % CD4+ ***	↑ % CD4 INF-γ+ ** ↑ % CD4 IL-4+ *	

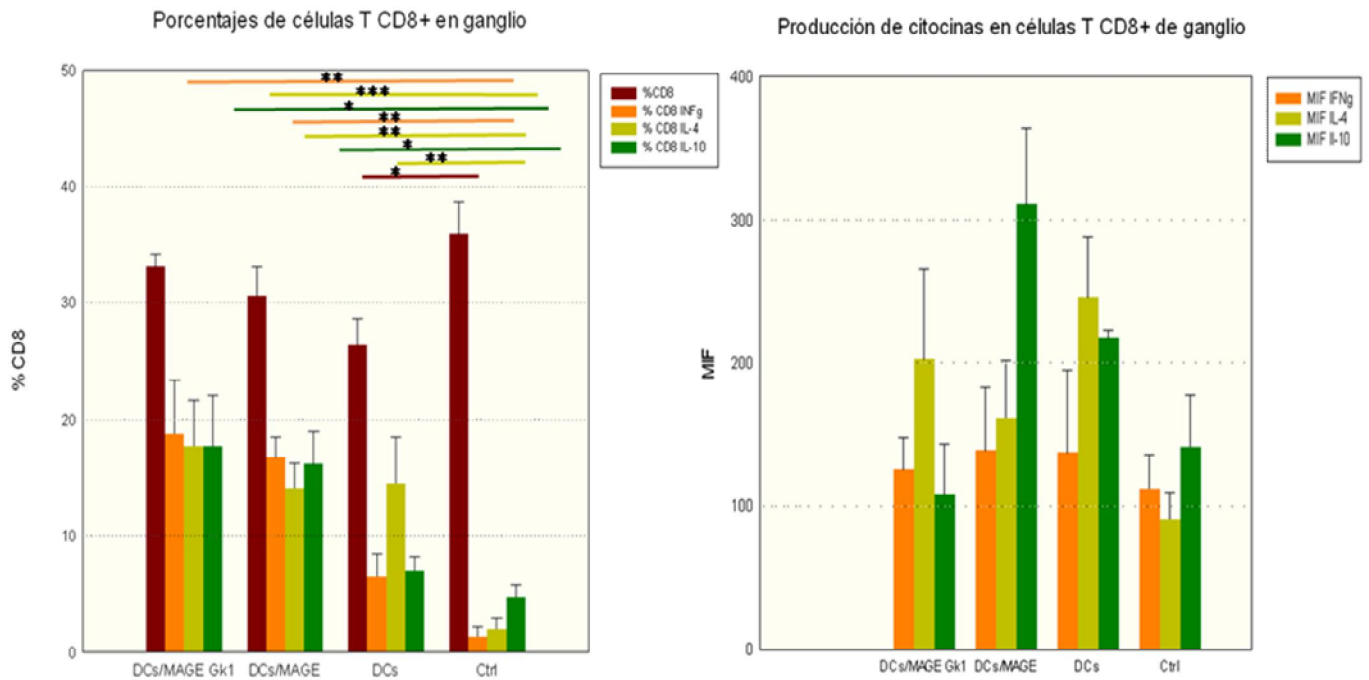
**Tabla 5, Resumen de resultados obtenidos en la población de Linfocitos T CD4+ de ganglio.** Comparación de datos obtenidos entre grupos, los datos que muestra la tabla solamente son los significativos. Las flechas indican un incremento o decremento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001

### Comportamiento de las células T CD8+ de ganglio.

Se evaluó la actividad citotóxica local mediada por linfocitos T CD8+ en el ganglio peri- tumoral del ratón.

**Porcentajes de linfocitos T CD4+ y producción de INF-γ, IL-4 e IL-10 en ganglio.** Se observó una disminución en el porcentaje total de linfocitos T CD8 en los grupos MAGE-AX, MAGE-AX +GK-1 y CDs en comparación al grupo control. No obstante, cuando observamos los porcentajes de linfocitos T CD8+ productores de citocinas (%CD8 INF-γ, %CD8 IL-4 e %CD8 IL-10), los grupos tratados con CDs, CDs MAGE-AX, o MAGE-AX+ inoculo de GK-1 mostraron los porcentajes más altos de células productoras (Fig.14, A). Una vez más observamos que el aumento en el porcentaje de linfocitos totales no está ligado al aumento en linfocitos productores de citocinas. En los grupos tratados con CDs MAGE-AX+ GK-1 o MAGE-AX los porcentajes de células productoras de IL-4, IL-10 o INF-γ fue similar.

La producción de citocinas totales (Fig.14, B) indica que el tratamiento con CDs/MAGE-AX y GK-1 tuvo un efecto en los linfocitos T CD8+ en cuanto a la disminución de Interleucina 10 (MIF IL-10). Se observa claramente, una disminución considerable en la producción de la citocina inhibitoria IL-10, con el tratamiento que incluyó el inmunoestimulante GK-1, ya que los demás tratamientos poseen niveles elevados de IL-10. En cuanto a la producción de otras citocinas, no se observó ningún cambio entre grupos.



**Fig. 14. Comportamiento de las células T CD8+ de ganglio.** Los linfocitos obtenidos del ganglio fueron pulsados durante 24 hrs con MAGE-AX. **A, Porcentaje total de linfocitos T CD8+ de ganglio.** Se presenta el porcentaje de linfocitos totales (%CD8) de cada uno de los grupos, así como el análisis de esta población, donde se muestra el porcentaje de CD8+ que producen INF- $\gamma$  (%CD8 INF- $\gamma$ ), IL-4 (%CD8 IL-4) o IL-10 (%CD8 IL-10). **B, Producción total de citocinas por linfocitos T CD8+ de ganglio.** Se tomaron los porcentajes de linfocitos T CD8+ positivos para citocinas (%CD8 INF-g, %CD8 IL-4, %CD8 IL-10) y se analizó la MIF de cada grupo. Los datos usados corresponden a la media  $\pm$ SD del total de ratones por cada tratamiento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001

Sin duda, la evaluación de las células T CD8+ de ganglio, nos brindan información muy importante, ya que nos indican qué tipo de respuesta inmunológica polarizamos. En términos generales se observó la disminución en los porcentajes de células productoras de IL-10, así como disminución en la producción de esta misma citocina al inocular GK-1 (Fig. 14, A y B). Asimismo, se registró un aumento en los porcentajes de células productoras de INF- $\gamma$  en los tratamientos que incluyeron DCs pulsados con MAGE-AX (MAGE-AX +GK-1, MAGE-AX). Dichos resultados son muy alentadores, ya que observamos la activación de una respuesta Th1, principalmente a nivel local, ver tabla 6.

	CDs/MAGE-AX GK-1	CDs/MAGE-AX	CDs	Ctrl
CDs/MAGE-AX GK-1				
CDs/MAGE-AX				
CDs				↑ %CD8+ *
Ctrl	↑ %CD8 INF-g+ **	↑ %CD8 INF-g+ **		
	↑ %CD8 IL-4+ ***	↑ %CD8 IL-4+ ***		
	↑ %CD8 IL-10+ *	↑ %CD8 IL-10+ *	↑ %CD8 IL-4+ **	

**Tabla 6, Resumen de resultados obtenidos en la población de Linfocitos T CD8+ de ganglio.** Comparación de datos obtenidos entre grupos, los datos que muestra la tabla solamente son los significativos. Las flechas indican un incremento o decremento. \*P<0.05; \*\* P< 0.01; \*\*\*P<0.001

## **DISCUSIÓN**

Actualmente no existen tratamientos dirigidos a evitar la formación de tumores. Dichos tratamientos preventivos podrían parecer una utopía, así todas las personas que recibieran este tipo de tratamientos, evitarían el posible desarrollo de cáncer a lo largo de su vida. Lejos de este panorama, se ha recurrido a modelos de tratamientos preventivos con el fin de reducir la probabilidad de una posible, y muy frecuente, reincidencia en pacientes que previamente desarrollaron un tumor, en este caso de melanoma maligno. En el presente trabajo se demostró que la administración subcutánea de la vacuna antitumoral con CDs activadas con el péptido MAGE-AX en ratones inoculados previamente con GK-1 induce el incremento en la supervivencia de los ratones, así como la disminución de la tasa de desarrollo tumoral. Además, aumenta la síntesis de INF- $\gamma$  y disminuye los niveles de IL-4 e IL-10. Por lo tanto, se mostró que dicho tratamiento activa y modula una respuesta inmunológica tumor específica de larga duración contra el melanoma inducido en ratones.

La inmunoterapia adoptiva antitumoral con CDs, se fundamenta en los registros obtenidos por diversos trabajos, donde se ha demostrado que CDs cargadas adecuadamente con Ags tumorales inducen una respuesta inmunológica efectora antitumoral en modelos animales (Porgador y Gilboa, 1995; Toes *et al.*, 1998). Los resultados de la inmunoterapia adoptiva con CDs depende de tres factores principales: (a) una correcta activación de CDs, (b) el reconocimiento adecuado del, o de los, Ags tumorales por las CDs (c) y la presencia de un ambiente favorable como el inflamatorio, así como de la disminución del ambiente inmunoinhibitorio creado por el tumor (Banchereau y Steinman, 1998; Lesterhuis y Cornelis, 2012). Dadas las evidencias actuales para lograr una inmunoterapia eficaz contra el melanoma, será necesario lograr una potente inmunización combinada con la reversión de la inmunosupresión en el microambiente tumoral.

**CDs.** Las CDs derivadas de MO, utilizadas en el presente trabajo, fueron completamente diferenciadas con GM-CSF y cargadas con el antígeno tumoral

MAGE-AX. En cuanto al tipo de CDs obtenidas, no se puede hablar de una población específica, ya que con la citocina utilizada (GM-CSF) para la diferenciación de CDs se puede obtener diversos tipos de CDs, como las CDs convencionales y células de Langerhans. Sin embargo, se ha demostrado que las CDs diferenciadas *in vitro* con GM-CSF a partir de MO poseen un fenotipo único, es decir, no son idénticas a alguna población *in vivo*. Las CDs *in vitro* poseen un fenotipo, sino idéntico, sí altamente parecido a las poblaciones de CDs convencionales y este tipo de CDs son las células mejor especializadas en el procesamiento y presentación de antígenos (Belz y Nutt, 2012).

Corroboramos que el fenotipo de las CDs fuera un fenotipo maduro mediante la evaluación de la expresión, en la membrana celular, de moléculas MHCII y de la molécula coestimuladora CD86. Las CDs diferenciadas de MO presentaron un fenotipo maduro, caracterizado por la expresión de moléculas MHCII *high*, así como moléculas CD86 *high* (Fig.8, A y B), dicho fenotipo fue inducido por el GM-CSF. Se ha comprobado en estudios *in vitro* que la adición de GM-CSF al cultivo de CDs induce un incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, moléculas que se encuentran estrechamente relacionadas con la maduración funcional, y la capacidad de las CDs de presentar Ags (Larsen *et al.*, 1994). Es de suma importancia conocer el fenotipo de las CDs empleadas en inmunoterapia, ya que toda la respuesta inmunológica subsecuente dependerá de la activación de las CDs y, por supuesto, de la presentación antigénica. Si la sinapsis inmunológica ocurre cuando las moléculas coestimuladoras son pobremente expresadas, CD86 *low*, se dice que las CDs presentan un fenotipo inmaduro. Las DCs inmaduras, pueden presentar Ags pero pueden inducir una respuesta tolerogénica (Kapsenberg, 2003; Banchereau *et al.*, 2000).

Además de evaluar la maduración y activación de las CDs es importante el reconocimiento de MAGE-AX, ya que gracias al reconocimiento exitoso del Ag tumoral el tratamiento realizado en dicho trabajo pudo ser dirigido y altamente específico. Previamente, se ha observado que MAGE-AX se encuentra en el 80%



de las células tumorales de melanoma, además su reconocimiento es mediado por moléculas MHC clase I (Eggert *et al.*, 2004), dicho reconocimiento es capaz de inducir una respuesta Th1 antígeno específica, caracterizada por la proliferación de células T CD4 productoras de INF- $\gamma$  (Thurner *et al.*, 2002). Con base en los conocimientos previos acerca del antígeno tumoral MAGE-AX, debemos resaltar que los resultados, en cuanto a sobrevida y tamaño tumoral, observados en los ratones que recibieron tratamiento con CDs cargadas con MAGE-AX (Fig.10, A y B) corroboran el reconocimiento exitoso del antígeno tumoral MAGE-AX por parte de las CDs.

### **Vía de inoculación.**

El tratamiento de GK-1 y CDs pulsadas con MAGE-AX se administró por vía subcutánea, ya que la piel es uno de los órganos con mayor cantidad de CDs, por ser la primera barrera contra patógenos. Así pues, la vía de administración subcutánea es un sitio ideal para la administración de tratamientos, ya que permite la inducción de una fuerte respuesta inmunológica con una menor cantidad de Ag, dicho en comparación con las vacunas intramusculares (Kenney *et al.*, 2004).

La ausencia de tumor en los grupos que recibieron tratamiento con GK-1 más CDs pulsadas con MAGE-AX, y CDs pulsadas con MAGE-AX (Fig.10 A y B), arroja evidencia sobre la migración exitosa de las CDs a órganos linfoides secundarios, donde ocurrió la presentación del Ag tumoral a linfocitos T. Segura y colaboradores evidenciaron que el inmunoestimulante GK-1 induce el aumento en la expresión de TNF $\alpha$ , MCP-1 y INF- $\gamma$ . Además, se ha comprobado que la administración de INF $\alpha$  induce un incremento en la migración de CDs, al igual que las moléculas MCP-1 y TNF $\alpha$ , moléculas implicadas directamente en la migración de las CDs al ganglio. Por otro lado, el INF- $\gamma$  induce un ambiente inflamatorio que favorece al reclutamiento de CDs y otros fagocitos (Wan y Flavell, 2009). El lugar de migración fueron los ganglios linfáticos, en específico el ganglio linfático peritumoral, así como al bazo, los cuales se caracterizan por ser los principales órganos linfoides relacionados con la respuesta inmune anti-tumoral.

**Desarrollo tumoral y sobrevida.** Se observó una protección antitumoral en los grupos que recibieron tratamientos con CDs pulsadas con MAGE-AX (CDs/MAGE-AX GK-1, CDs/MAGE-AX), dado que estos grupos no presentaron desarrollo tumoral, incluso a las ocho semanas después de la inducción del tumor. En contraste, los grupos de CDs sin pulsar y el control desarrollaron un tumor visible a las 2 semanas posteriores a la inducción del tumor (Fig.10, *B*). Los resultados obtenidos en cuanto a desarrollo tumoral, concuerdan con la sobrevida que se observó en cada uno de los grupos. En los grupos CDs/MAGE-AX GK-1 y CDs/MAGE-AX se observó una sobrevida de 100 % incluso a las 8 semanas. En contraste, en los grupos CDs y Ctrl la sobrevida disminuye a partir de la tercera semana (Fig.10, *A*). Con estas evidencias de desarrollo tumoral y sobrevida se infiere la inducción de memoria inmunológica antitumoral en los ratones con tratamientos DCs/MAGE-AX GK-1 y DCs/MAGE-AX (Fig.10, *A y B*).

**Linfocitos.** Estos primeros resultados, nos indican que hubo un buen reconocimiento del Ag tumoral MAGE-AX por las CDs, favoreciendo a la activación y modulación de linfocitos T citotóxicos y cooperadores, células encargadas de una respuesta tumor específica exitosa. En estudios previos se ha demostrado que las CDs poseen la capacidad de activar a linfocitos T CD4+ y CD8+, además se ha corroborado la formación de memoria inmunológica antitumoral a partir de la activación de una respuesta Th1, iniciada por la presentación de Ags tumorales por CDs (Goldszmid et al., 2003). Se conoce que los linfocitos T CD4 Th1, por medio de las citocinas IL-12 e INF- $\gamma$ , son capaces de activar una respuesta específica antitumoral por medio de células T citotóxicas, células NK y/o células NKT, las cuales son capaces de contrarrestar el desarrollo tumoral (Dranoff, 2004). Ya que los linfocitos T CD4+ y los T CD8+ son cruciales en la activación de una respuesta inmunológica Th1 antitumoral (Goldszmid *et al.*, 2003; Kapsenberg, 2003) se extrajeron estos linfocitos de los ganglios linfáticos cercanos al tumor y del bazo, con el fin de analizar sus poblaciones, así como su actividad.

Los porcentajes totales de linfocitos T CD4+, no presentaron variación en ninguno de los dos órganos linfoides evaluados. No obstante, el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de citocinas, de bazo y ganglio, mostraron cambios significativos entre los diferentes tratamientos. Aumentó el porcentaje de linfocitos T productores de citocinas IL-10, IL-4 e INF- $\gamma$  en los grupos CDs/MAGE-AX +GK-1, CDs/MAGE-AX y CDs respecto al control (Fig.11, A; Fig.13, A). Estos resultados muestran que las CDs, por sí mismas, resultan buenos adyuvantes en la inmunoterapia adoptiva antitumoral, ya que su presencia aumenta los porcentajes de células Th productoras de citocinas (Kapsenberg, 2003).

**INF $\gamma$ :** Es importante destacar el incremento en los porcentajes de linfocitos T CD4+ y CD8+ productores de INF- $\gamma$  en los grupos CDs/MAGE-AX + GK-1, CDs/MAGE-AX y CDs (Fig.10, A; y Fig.13, A), en el ganglio y bazo en el caso de los linfocitos T CD4+ y en el caso de los linfocitos T CD8+ sólo en los ganglios linfáticos. La presencia de INF- $\gamma$  en el ambiente promueve la diferenciación de células T CD4+ Th1, respuesta involucrada en la diferenciación de células T CD8+ tumor específicas (Wan y Flavell, 2009). Ossendorp y colaboradores (1998) han demostrado que la inducción óptima de linfocitos T CD8+ citotóxicos Ag-específicos, requiere de la activación de linfocitos T CD4+ cooperadores. Se sabe que las células T CD4+ poseen diferentes funciones: ayudan a la infiltración tumoral de linfocitos T CD8+ citotóxicos (Marzo *et al.*, 2000), mantienen las funciones efectoras *in situ* de las células T CD8+ (Stholman *et al.*, 1998), liberan factores que proporcionen resistencia directa contra el tumor, como INF- $\gamma$  (Bohm *et al.*, 1998), y/o reclutan otras células efectoras del sistema inmune innato como CDs, NKs y NKTs (Marzo *et al.*, 2000). Además, el INF- $\gamma$  produce la muerte de células tumorales al inducir mecanismos apoptóticos y antiproliferativos (Shankaran *et al.*, 2001) El INF- $\gamma$ , a su vez, induce la producción de citocinas con capacidad anti angiostática bloqueando la formación de nuevos vasos (Kapsenberg, 2003; Dranoff, 2004). En el presente trabajo, encontramos mayoritariamente linfocitos T CD4+ productores de INF- $\gamma$ , por lo tanto se infiere la

activación de los linfocitos T CD8+ mediada por una respuesta Th1 antígeno específica de memoria.

**IL-4:** A pesar de que se encontró, mayoritariamente, presencia de linfocitos T CD4 INF- $\gamma$ + en el bazo y ganglio, también se observó un aumento significativo en los linfocitos T CD4 IL-4+ de ganglio en los grupos CDs/MAGE-AX+GK1 y CDs (Fig.13, A), así como en los linfocitos TCD8 IL-4+ de ganglio en los grupos CDs/MAGE-AX+ GK-1, CDs/MAGE-AX y CDs con respecto al control (Fig.14, A). Es importante resaltar que los niveles observados de linfocitos T CD4 IL-4+ y TCD4 INF- $\gamma$ + de ganglio fueron similares (Fig. 13, A), no obstante, en los linfocitos TCD8+ de ganglio se observó un aumento ligeramente mayor en los linfocitos productores de INF- $\gamma$  con respecto a los productores de IL-4 (Fig.14, A). El aumento simultaneo en los niveles de TCD4 IL-4+ y de TCD4 INF- $\gamma$ + de ganglio nos sugiere la activación de una respuesta simultanea Th1/Th2, sin embargo, se conoce que la respuesta inmune Th1 y Th2 son mutuamente excluyentes, ya que las citocinas INF- $\gamma$  o IL-4 se inhiben mutuamente (Kapsenberg, 2003). En los niveles de linfocitos TCD8+ de ganglio, se observó que hay un porcentaje mayor de linfocitos productores de INF- $\gamma$  que de linfocitos productores de IL-4, lo anterior prueba que sí hubo polarización hacia una respuesta Th1, ya que las células citotóxicas proliferan en presencia de INF- $\gamma$ . Se ha mostrado que la respuesta inmunológica antitumoral es, principalmente, mediada por una respuesta Th1 que se caracteriza por producir IL-12 así como INF- $\gamma$  producido por células como las T CD4+, NKs y NKTs, éstas últimas células a pesar de que no fueron evaluadas en el presente trabajo probablemente tengan un rol importante en la polarización de la respuesta Th1 observada.

**IL-10:** En la inmunoterapia adoptiva antitumoral con CDs, se busca inducir una respuesta Th1, ya que es la más apropiada para la eliminación del tumor (Kapsenberg, 2003). Sin embargo, las CDs tienen plasticidad, es decir, el tipo de respuesta Th que active dependerá de diferentes factores. Así, por ejemplo, una respuesta Th1 puede convertirse en una respuesta celular Th2, siempre y cuando

en el ambiente existan citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 (Salazar-Onfray, 1999). Además, se conoce que las células tumorales de melanoma secreta citocinas inmunosupresoras como: TGF $\beta$ , IL-16, IL-8, IL-10 (moléculas evaluada en el presente trabajo) y la enzima inmunosupresoraIDO. La producción de estas citocinas genera un microambiente inmunosupresor favorable para el crecimiento tumoral (Dranoff, 2004).

Otro de los principales y más importantes aspectos observados, fue la disminución en la producción de la citocina IL-10 en los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8 + de bazo en el grupo inoculado con GK-1 y tratado con CDs cargadas con MAGE-AX (Fig.11, A; Fig.12, A). En el ganglio peri-tumoral, la respuesta fue más evidente. En los porcentajes de linfocitos T CD4+ se observó una disminución de células productoras de IL-10 en los tratamientos, DCs/MAGE-AX GK-1 y DCs/MAGE-AX, que incluyeron DCs activadas con MAGE-AX (Fig.13, A). En cuanto a la producción de IL-10 por CD8+ de ganglio también se observó un decremento, bastante notable, en el grupo DCs/MAGE-AX GK-1 (Fig. 14, A). La disminución de estos porcentajes y producción de IL-10, aunque no fue estadísticamente significativa, sí nos da bases importantes para plantear una tendencia de la respuesta inmunológica inducida. La disminución de IL-10 es muy importante ya que, con base en trabajos anteriores, se sabe que la inmunización antitumoral se ve dificultada debido al estado de inmunosupresión en que muchos pacientes se encuentran producto de la carga tumoral, de la quimioterapia u otros factores (Salazar-Onfray, 1999). Dicha inmunosupresión incluye la presencia de linfocitos T regulatorios y la modulación de las DCs del microambiente tumoral, influyendo en su maduración y otorgándoles un perfil tolerogénico (Dunn *et al.*, 2002). De hecho, se ha descrito en el tejido tumoral de ganglios linfáticos con metástasis de melanoma, la presencia de CDs inmaduras que expresan moléculas MHC pero no las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y bajos niveles de CD86, todo lo anterior inducido por el aumento en la secreción de IL-10 y TGF $\beta$  (Salazar-Onfray, 1999).

La importantísima disminución en la producción de IL-10, fue observada principalmente en el tratamiento que incluyó el inmunestimulador GK-1 (DCs/MAGE-AX GK-1), lo cual nos sugiere una posible acción del GK1 sobre la disminución en la producción de la citocina inhibitoria IL-10. La razón de dicha disminución, principalmente en el ganglio linfático, quizá tenga sus bases en el tipo de inoculación que se realizó y de la inmunomodulación inducida por el GK-1. GK-1 fue inoculado vía subcutánea, vía que favorece una respuesta ganglio dependiente. Ahora, se sabe que en presencia de GK-1 las DCs incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 y CD80, así como la expresión de MHC II (Segura-Velázquez, 2009). Otro aspecto importante es que GK-1 puede aumentar la respuesta inmune mediante la inducción de la secreción de MCP-1, un quimiocina proinflamatoria que induce la migración de monocitos, células NK y otras DCs, además ayuda a que las células T activadas acudan al sitio de la vacunación (Segura-Velázquez, 2009). Esto, junto con otras citoquinas proinflamatorias, se traduciría en un aumento de la presentación de antígenos y la amplificación de la respuesta inmune. Segura y colaboradores, reportó que el péptido GK-1 favorece a la proliferación de las células T CD4+, que reconocen específicamente un epítipo. En este caso la acción de GK-1 está más ligada a la disminución de IL-10, citocina implicada en la tolerancia inmunológica.

**Respuesta local.** La respuesta inducida con el tratamiento de CDs pulsadas con MAGE-AX en ratones inoculados con GK-1 fue, principalmente, una respuesta Th1 local evidenciada por la presencia de linfocitos T CD4 INF- $\gamma$ + y T CD8 INF- $\gamma$ +. Por otro lado, en el bazo no encontramos evidencia de que el tratamiento administrado cause efectos en la respuesta inmunológica a nivel periférico por células T CD8+ (Fig.12, B), pero sí por linfocitos T CD4+ productores de INF- $\gamma$  (Fig. 11, B). Se sabe que la activación de la respuesta inmune adaptativa se da dentro de las primeras 18 a 24 horas, tiempo en el cual se da la sinapsis inmunológica y se activan los linfocitos T inmaduros llevándolos a una rápida proliferación. Durante el periodo de proliferación y diferenciación de linfocitos T, ellos adquieren funciones efectoras, así como la habilidad de migrar al sitio de lesión tumoral (Cui y Kaech,

2010). Después de eliminar a las células tumorales, la población de linfocitos T efectoras sufren una contracción poblacional, donde la mayoría de los linfocitos T efectoras serán eliminados por apoptosis, aproximadamente del 5 al 10% de ellos se convertirán en células T de memoria. Los linfocitos T de memoria regresarán a los órganos linfoides secundarios más cercanos a la lesión (Cui y Kaech, 2010), en el caso del presente trabajo los linfocitos de memoria migraron al ganglio peritumoral, es por esta razón que la mayor actividad observada fue local.

## CONCLUSIONES

- El tratamiento con GK-1 y CDs cargadas con MAGE-AX induce en ratones posteriormente inoculados con melanoma:
  - Protección inmunológica caracterizada por ausencia del crecimiento tumoral.
  - La respuesta inmunológica anti-tumoral de memoria.
  - Aumento en los niveles de linfocitos T CD4 y CD8 productores de INF $\gamma$  en ganglios linfáticos y aumento en los niveles de linfocitos T CD4 productores de IFN $\gamma$  en bazo, resultados característicos de una respuesta Th1.
  - Disminución de la producción de IL-10, lo cual nos da un buen panorama porque evita la formación de anergia.



## **PERSPECTIVAS**

En el presente trabajo se mostró que la inmunoterapia adoptiva con células dendríticas pulsadas con el antígeno tumoral MAGE-AX es efectiva, además se potencia su efectividad cuando se combina con el inmunomodulador GK-1, por lo tanto dicho esquema terapéutico se podría utilizar en pacientes que tengan altas probabilidades de reincidencia tumoral. Sin embargo, a pesar de que se mostró que dicho esquema de vacunación es exitoso, se debe ahondar en el estudio de un antígeno tumoral efectivo y que esté presente en células tumorales de melanoma humano.

Se mostró que el tratamiento con GK-1 y CDs pulsadas con MAGE-AX activa una respuesta Th1, sin embargo sólo se evaluó la actividad de los linfocitos T CD8+ y T CD4+. Sería importante evaluar el papel que desempeñan otro tipo de células involucradas con la actividad antitumoral, como las células NK y NKTs, en cuanto a la producción de citocinas como INF- $\gamma$ , así como en el papel citotóxico que desempeñan.

Se observó el efecto positivo de GK-1 en los linfocitos T, en cuanto a la disminución de producción de IL-10. No obstante, se desconoce el mecanismo de acción del inmunomodulador GK-1 por lo que sería importante ahondar en el conocimiento de GK-1, así como el tipo de citocinas que están involucradas.

## REFERENCIAS

1. Acosta, A.; Fierro, E.; Velásquez, V.; Rueda, X. 2009. Melanoma: patógenesis, clínica e histopatología. *Rev Asoc Col Dermatol.* 17: 87-108.
2. Alcalá, D.; Cárdenas, A.; Peralta, M.; Valdivia, F. Abordaje Diagnóstico de melanoma Maligno. México: Secretaría de salud, 2010 [en línea]: [http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/547\\_GPC\\_Melanomamaligno/GER\\_MelanomaMaligno.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/547_GPC_Melanomamaligno/GER_MelanomaMaligno.pdf)
3. Balch, M.; Wilkerson, J.; Murad, T.; Soong, S.; Ingalls, A.; Maddox, W. 1980. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer.* Vol. 45:3012-7.
4. Banchereau, J.; Steinman, R. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. (Review) *Nature.* 392: 245-52
5. Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y.; Pulendran, B.; Palucka, K. 2000. Immunology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767:811
6. Belz, G; Nutt, S. 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. (Review) *Nature immunology.* Vol. 12: 101-113.
7. Benuto-Andrade, C.; Oseitutu, A.; Agero, A.; Marghoob, A. 2005. Cutaneous melanoma: surveillance of patients for recurrence and new primary melanomas. *Dermatol Ther.* 18:423-35.
8. Bohm, W.; Thoma, F.; Leithauser, P.; Moller, R.; Schirmbeck,; Reinman, J. 1998. T cell-mediated, INF- $\gamma$  facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J. Immunol.* 161: 897.
9. Boon, T.; Gajewski, T.; Coulie, P. 1995. From defined human tumor antigens to effective immunization *Immunol.* 16: 334-6.
10. Chhajlani, V.; Wikberg, J. 1992. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor Cdna. *Febs Letters.* 309:417-420.
11. Cui, K.; Kaech, S. 2010. Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunological reviews,* 236:151-164.

12. Desmond RA, Soong SJ. 2003. Epidemiology of malignant melanoma. *SurgClin North Am.*83:1-29.
13. Dieu, M.; Vanbervliet, B.; Vicari, A.; Bridon, J.; Oldham, E.; Ait-Yahia, S.; Briere, F.; Zlotnik, A.; Lebecque, S.; Caux, C. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188:373–86
14. Dranoff, G; Vanneman, M. 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews cancer*; 13, 237:244
15. Dranoff, G. 2004. Cytokine in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews*; 4, 11: 21
16. Dunn, G.; Bruce, A.; Ikeda, H; Old, L.; Schreiber, R. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3 (11): 991-8
17. Echeverría, B.; Botella-Estrada, R. 2009. Lesiones melanocíticas (nevus y melanomas) en atención primaria. *JANO*, N° 1 740, 49-59.
18. Gallagher RP, Lee TK. 2006. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *ProgBiophys Mol Biol.*; 92:119-31.
19. Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Microbiology Reviews.* 5: 505-516.
20. Herrera, N.; Aco, A. 2010. El melanoma en México. *Rev. Esp. Med. Quir.* Vol. 15 (3): 161-164.
21. Homsí, J.; Kashani-Sabet, M.; Messina, J.; Daud, A. 2005. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control.*12: 223-9.
22. IARC [En línea]: Lyon, France [fecha de consulta: 26 octubre 2013] Base de datos disponible en el distribuidor GLOBOCAN: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=484>
23. Inaba, K.; Inaba, M.; Romani, N.; Aya, H.; Deguchi, M.; Ikehara, S.; Muramatsu, S.; Steinman, R.1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *JEM* 176 (6): 1693:1702
24. Lein, G; Sjogren, H.; Klein, E.; Hellstrom, K. 1960. Demonstration of resistance against methylcholanthrene- induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20: 1561-72.

25. Kapsenberg, M. 2003. Dendritic cell control of pathogen- driven T-cell plarization. Nature Reviews Immunology. Vol. 3: 984-993.
26. Kawakami, Y.; Eliyahu, K.; Sakaguchi, P.; Robbins, L.; Rivoltini, J.; Yanelli, E. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the Mart-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 180: 347-52.
27. Kawakami, Y.; Eliyahu, K.; Jennings, K.; Sakaguchi, X.; Kang, S.; Southwood, P. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor regression. *J Immunol* 154: 3961-8.
28. Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R. 1994. Regulation of immunostimulatory function and costimulatory molecule (B7-1 and B7-2) expression on murine dendritic cells. *J Immunol.* 152:5208.
29. Lau. L. et al. 1994. Cytotoxic T cell memory with-out antigen. *Nature* 369: 648-652.
30. Leithner, J.; Grabmeier-Pfisterchammer, K.; Steinberger, P. 2010. Receptors and ligands implicated in human T cell coestimulatory process. *Immunology Letters*, Vol. 128: 89-97.
31. Liu, K. & Nussenzweig, M. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 45–54.
32. Liu, G.; Zhang, L.; Zhao, Y. 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells. *Clinical Experimental Immunology*, 160: 168:175.
33. Medzhitov, R.; Jeneway, C. 2000. Innate Immunity. *The new England Journal of Medicine*, Review Articles. 3:338:344.
34. Mackie RM. 2002. Risk factors for the development of primary cutaneous malignant melanoma. *Dermatol Clin.*20:597-600
35. Marzo, A.; Kinnear, R.; Lake, J.; Frelinger, E.; Collins, B.; Robinson, W. y Scott, B. 2000. Tumor-specific CD4+ T cells have a major “post-licensing” role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J. Immunol.* 165:6047.
36. Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Herna´ndez, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L. F. Rodarte, and E. Sciutto. 1996. Cisticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82:250–254.
37. Mayani, H.; Flores-Figueroa, E., Pelayo, R.; Montesinos, J.; Flores-Guzmán, P.; Chávez-González, A. 2007. Hematopoyesis. *Cancerología* 2:95-107.

38. McWilliam, A.; Napoli, S.; Marsh, F.; Pemper, D.; Nelson, C.; Pimm, P.; Stumbles, T.; Wells, P.; Holt. 1996. Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli. *J. Exp. Med.* 184:2429–32
39. Nestle, F.; Alijagic, S.; Gillet, M.; Sun, Y.; Grabes, S.; Dummer, R. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells, *Nature Med* 4:328.
40. Ossendorp, F.; Mengede, E.; Camps, M.; Filius, R.; Melief, C. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 187:693.
41. Porgador, A.; Gilboa, E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 182: 255-60.
42. Rosenberg, S.; Spiess, P.; Lafreniere, R. 1986. A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science.* 233: 1318-21.
43. Ross, M.; Wojciech, P. 2007. *Histología*. Ed. médica Panamericana.
44. Salazar-Onofrey, F. 1999. Interleukin-10: a strategy used by tumors to escape from immunosurveillance. (Review). *Med Oncol* 16: 86-94.
45. Sampedro, E. (2013). Melanocitos. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/atlas2013A/piel/tegumentario.html>
46. Saunders, W. (2002). Esquema de los melanocitos y su función. Recuperado de: [http://medicosenformacion7.tripod.com/14\\_006.jpg](http://medicosenformacion7.tripod.com/14_006.jpg)
47. Segura-Velázquez, R.; Fragoso, G.; Sciutto, E.; Sarukhan, A. 2009. Towards Identification of the mechanism of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology.* 1338-1343.
48. Shankaran et al. 2001. IFN- $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature.* 410: 1107-1111.

49. Soengas, M.; Lowe, S. 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 22:3138-3151
50. Stohlman, A.; Bergman, M; Lin, D.; Cua, J.; Hinton, R. 1998. CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *J. Immunol*. 160:2896.
51. Tanzarella, S.; Russo, V.; Lionello, I.; Dalerba, P.; Rigatti, D.; Bordignon, C. 1999. Identification of a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res*. 59: 2668-74.
52. Thompson, J.; Scolyer, A.; Kefford, R. 2005. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 365:687-701
53. Thurner, B.; Schultz, E.; Berber, T.; Weinlich, G.; Ebner, S.; Woerl, P. 2002. Rapid induction of tumor specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte derived dendritic cells. *J Exp Med*. 195: 1279-88.
54. Toes, R.; Van der Voort, E.; Schoenberger, S.; Drijfhout, J.; Van Blois, L.; Storm, G. 1998. Enhancement of tumor outgrowth through CTL tolerization after peptide vaccination is avoided by peptide presentation on dendritic cells *J Immunol*. 160: 4449-56.
55. Toledo, A., C. Larralde, G. Fragoso, K. Gevorkian G. Manoutcharian, M. Hernández, G. Acero, G. Rosas, F. Lopez-Casillas, C. Kubli-Garfias, R. Vazquez, X. Terrazas, and E. Sciutto. 1999. Towards Taeniasoliumcysticercosis vaccine: an epitope shared by Taeniacrassiceps and Taeniasolium protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun*. 67:2522– 2530.
56. Topalian, S.; Solomon, D.; Rosenberg, S. 1989. Tumorspecific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J Immunol*. 142: 3714-25.
57. Tsao, H.; Atkins, M.; Sober, A. 2004. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med*. 351:998-1012.
58. Tran, K.; Wright, N.; Cockerell, C. 2008. Biopsy of the pigmented lesion, when and how. *J Am AcadDermatol*. 59:852-71.
59. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev. Immunol*. 3, 133–146.
60. Urteaga O, Pack GT. 1966. On the antiquity of melanoma. *Cancer*. 19(5): 607-10

61. Vieira, P. L., de Jong, E. C., Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. & Kalinski, P. 2000. Development of TH1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164, 4507–4512.
62. Wan y Flavell. 2009. How Diverse-CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology.* 19:1-16.
63. Wu, L. *et al.* 2001. Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* 98, 3376–3382.
64. Zimmerman, LM; Vogel, L. Bowden, R. 2010. Understanding the vertebrate immune system. *The Journal of Experimental Biology.* Vol. 213: 661-671.
65. Zitvogel, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Kroemer, G. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 8, 59-73.