



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN  
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON ANTÍGENOS MAGE Y ACTIVADAS  
CON EL PÉPTIDO GK-1 EN RATONES CON MELANOMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015**



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.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN  
DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON ANTÍGENOS MAGE Y ACTIVADAS  
CON EL PÉPTIDO GK-1 EN RATONES CON MELANOMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**GABRIELA PIÑÓN ZÁRATE**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAILA GUTIERREZ KOBEH  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de noviembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **PIÑÓN ZÁRATE GABRIELA** con número de cuenta **98330564** con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON ANTÍGENOS MAGE Y ACTIVADAS CON EL PÉPTIDO GK-1 EN RATONES CON MELANOMA"**, realizada bajo la dirección del **DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ**:

Presidente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER  
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ  
Secretario: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE  
Suplente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Suplente: DRA. LAILA GUTIÉRREZ KOBEH

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.



**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 21 de enero de 2015

*M. del Coro Arizmendi*  
**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco en primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos: beca CONACyT; apoyo CONACyT 50396 y al apoyo a Proyectos de Investigación PAPIIT-DGAPA IN225808 y IN214109.

A los miembros del comité tutorial por su apoyo académico:

- Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez
- Dra. Edda Sciutto Conde.
- Dra. Laila Gutierrez Kobeh

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Agradezco la excelente dirección de este trabajo al Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez.

Asimismo agradezco el excelente apoyo académico y técnico al Dr. Miguel Ángel Herrera Enríquez durante el doctorado.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo técnico y académico de:

- Biol. Beatriz Hernández Téllez
- M. en C. Katia Jarquín Yáñez
- MC. Judith Álvarez Pérez
- M. en C.B Christian Adrián Cárdenas Monroy
- Q.F.B. Carlos Castellanos Barba

## DEDICATORIA

- Dedico con todo mi corazón este trabajo a mi familia: a Monowito Kibir, Bichito Raro y mi querido Fosfolípido, pero sobre todo a mi Werita preciosa que estuvo conmigo en todo momento. Los quiero más que a mi vida.
- También dedico este trabajo a mi niño amado Christian Adrián, el niño que me enseñó a ser feliz, te amo mi niño hermoso.
- Este trabajo también está dedicado al Dr. Castell, porque usted no sólo me adoptó sino que me apoyó en todo momento y me enseñó a luchar en todo sentido. Muchas gracias, lo quiero mucho.
- A mi estimadísimo Miguel!! Eres uno de los mejores amigos que tengo, porque siempre has estado ahí tanto en lo académico como en lo personal!! Mil gracias por todo tu apoyo, te quiero hartoo.
- A mi KAT!! Mana hermosa, mil gracias por todo! Fuimos adoptadas al mismo tiempo y aprendimos todo juntas!!! Mil gracias por tu amistad, por siempre estar ahí!! Te quiero y dedico este trabajo.
- A mis manis hermosa, Mars!! Te quiero muchísimo, mil gracias por siempre estar ahí!!!
- A mi bellisima Cells y a mi queridísimo Bad Person!!!! Los quiero muchísimo, desde que nos conocimos hace años han sido tremendamente importantes para mí!! Los quiero masivo
- A Bety hermosa, porque desde que llegue al lab me enseñaste muchísimas mil cosas, sobre todo a poner atención. Mil gracias por todo tu apoyo durante todos estos años, te quiero un montón.
- A mis compañeros del lab durante los primeros años del doctorado: a Rodri querido, Mi Pau preciosa, a mi Pato... los quiero y extraño mucho.
- Por último dedico este trabajo a mis compañeros del laboratorio: Mitzi, Dulce, Rosita, Cass, Laurita, Pao, Rodri y Dany.

## INDICE

Lista de figuras y tablas	i
1. Resumen	1
2. Abstract	3
3. Introducción	5
3.1. Melanoma	5
3.1.1. Epidemiología del melanoma cutáneo	5
3.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo del melanoma cutáneo	6
3.1.3. Diagnóstico	7
3.1.4. Estadiaje	8
3.1.5. Tratamiento	11
3.2. Antígenos tumorales	11
3.2.1. Antígenos MAGE	13
3.2.1.1. Antígenos MAGE en ratón	14
3.3. Células dendríticas	15
3.3.1. Clasificación de células dendríticas	15
3.3.2. Activación de linfocitos T por células dendríticas	19
3.3.3. Obtención de CDs <i>in vitro</i>	21
3.4. Vacunas contra el cáncer	23
3.4.1. CDs en la inmunoterapia	25
3.4.2. Vacunas de CDs	27
3.4.2.1. Vacunas con distintos tipos de CDs	28
3.4.2.2. Vacunas con CDs cargadas con proteínas tumorales	28
3.4.2.3. Vacunas de CDs maduras con células muertas	30
3.4.2.4. Vacunas de CDs transfectadas con genes	32
3.5. Vía de administración de vacunas con CDs	33
3.6. Adyuvantes e inmunomoduladores	34
3.6.1. Adyuvantes e inmunomoduladores utilizados contra el cáncer	38



3.6.2. Inmunoestimuladores utilizados en la inmunoterapia contra el melanoma	40
3.6.3. GK-1	41
4. Planteamiento del problema	43
5. Hipótesis	43
6. Objetivo general	44
6.1. Objetivos particulares	44
7. Materiales y método	45
8. Resultados	51
8.1. Expansión de células B16F10	51
8.2. Obtención de sobrenadante de células CHO como fuente de factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos	52
8.3. Estudios <i>in vitro</i>	52
8.3.1. Diferenciación de CDs a partir de células precursoras de médula ósea	52
8.3.2. Efecto de GK-1 en la maduración de CDs	54
8.3.2.1. GK-1 induce aumento en la expresión de CD86 en las MOCDs	54
8.3.2.2. GK-1 induce aumento en la concentración de calcio intracelular de MOCDs	58
8.4. Estudios <i>in vivo</i>	59
8.4.1. Sobrevida y crecimiento tumoral en ratones tratados con MOCDs	59
8.4.2. Efecto de la administración de CDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE-AX en linfocitos de ganglio poplíteo y bazo de ratones con melanoma	62
8.4.2.1. Las MOCDs estimuladas con GK-1 indujeron un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$ +, así como en la producción de IFN $\gamma$ tanto en los linfocitos CD4 como en CD8 de ganglio poplíteo	62
8.4.2.2. Las MOCDs estimuladas con GK-1 induce aumento en la proliferación de linfocitos T CD8+ y producción de IFN $\gamma$ en bazo de ratones con melanoma	64

8.5. El examen histopatológico mostró que la administración de MOCDs estimuladas con GK-1 indujo un aumento en las zonas de muerte celular tumoral	66
9. Discusión	69
9.1. Efecto de GK-1 en la maduración de las MOCDs	69
9.2. Efecto de GK-1 en la concentración de calcio citoplásmico en CDs	71
9.3. Efecto de la administración de MOCDs en los linfocitos T CD4 y CD8 de los ratones con melanoma	72
9.3.1. Efecto de la administración de MOCDs en el bazo de los ratones con melanoma	72
9.3.2. Efecto de la administración de MOCDs en el ganglio poplíteo de los ratones con melanoma	73
9.3.3. Histopatología de los tumores de los ratones tratados con MOCDs	77
10. Conclusiones	78
11. Literatura citada	79
12. Apéndice	96

## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### Introducción

- Tabla 1. Clasificación TNF del melanoma 9
- Tabla 2. Estadaje del melanoma de acuerdo al American Join Committee on Cancer 10
- Figura 1. Presentación de antígenos por las CDs y producción de IL-12 17
- Figura 2. Características de las células dendríticas 18
- Figura 3. Presentación de antígenos por las CDs a los linfocitos T 20
- Figura 4. Diferentes tipos de vacunas utilizadas contra el cáncer 25
- Figura 5. Mecanismos de acción de los adyuvantes o inmunoestimuladores en CDs 35

### Resultados

- Figura 6. HPLC de MAGE-AX y GK-1 46
- Figura 7. Morfología y fenotipo de las células de melanoma B16F10 51
- Figura 8. Cultivos de células de médula ósea suplementados con GM-CSF 53
- Figura 9. Fenotipo de MOCDsc después de 10 días de cultivo 54
- Figura 10. Fenotipo de las MOCDs después del tratamiento con LPS, GK-1, TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1 55
- Figura 11. Efecto de GK-1 y/o MAGE-AX con TNF $\alpha$  en el fenotipo de las MOCDs 57
- Figura 12. Producción de IL-12 en MOCDs 58
- Figura 13. Concentración de calcio intracelular en MOCDs 59
- Figura 14. Supervivencia de ratones con melanoma inoculados con MOCDs 60
- Figura 15. Diámetro mayor de los tumores de ratones C57BL/6 61
- Figura 16. Perfil de citocinas en linfocitos T CD4 o CD8 de ganglio poplíteo 63
- Figura 17. Perfil de citocinas en linfocitos T CD4 o CD8 en bazo 65
- Figura 18. Análisis Histopatológico de melanoma de los ratones que recibieron terapia con las MOCDs 67

## 1. RESUMEN

**INTRODUCCIÓN.** El melanoma es un tipo de cáncer de piel caracterizado por la proliferación atípica de melanocitos. Existen varios tratamientos de elección como la cirugía, radiación y quimioterapia; no obstante los resultados no han sido satisfactorios ya que la mayoría de las mueren en pocos meses. Actualmente se está estudiando la posibilidad de utilizar alternativas terapéuticas que induzcan la activación del sistema inmune del paciente, quien generalmente se encuentra inmunosuprimido.

Las vacunas o inmunoterapia basadas en células dendríticas activan a linfocitos T CD4 y CD8 antígeno específicos induciendo una respuesta Th1, la cual ha sido señalada como la más eficaz en la erradicación de las células tumorales. Varias han sido las alternativas para cargar a las células dendríticas, como el uso de lisados tumorales o con antígenos antitumorales de melanoma como gp-100 o tirosinasa. No obstante unos de los antígenos tumorales más usados son las proteínas MAGE, las cuales sólo se localizan en células tumorales así como espermatogonias. Además se ha observado que la inmunoterapia con células dendríticas y cargadas con antígenos MAGE pueden inducir una respuesta Th1. Sin embargo, es necesario aumentar la eficacia de las vacunas con células dendríticas mediante el uso de inmunomoduladores. Por lo que en este trabajo se estudió el efecto del péptido GK-1 en las células dendríticas, el cual a pesar de estar compuesto de 17aa, induce protección contra cisticercosis en cerdos. Aunado a lo anterior, induce una respuesta inmune específica contra la influenza cuando es utilizado como adyuvante. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto terapéutico de las células dendríticas derivadas de médula ósea cargadas con MAGE y estimuladas con GK-1 en ratones con melanoma.

**MATERIAL Y MÉTODO.** Se utilizaron ratones C57BL/6, los cuales fueron inoculados con  $6 \times 10^5$  células de la línea celular de melanoma B16/F10. Por otro lado, se sacrificaron ratones de la misma cepa para la obtención de médula ósea, con el fin de realizar cultivos con GM-CSF para la obtención de células dendríticas. Después de 10 días de cultivo, las células fueron tratadas con: LPS, MAGE-AX, GK-1, MAGE/GK-1,  $TNF\alpha$ ,  $TNF\alpha$ /MAGE-AX,  $TNF\alpha$ /GK-1 y  $TNF\alpha$ /MAGE-AX/GK-1. Se midió la expresión de Moléculas Clase II, CD11c y Moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) en las células dendríticas después de los tratamientos, además del calcio intracelular. Una semana después de haber inducido melanoma, los ratones fueron vacunados con  $1 \times 10^6$  células dendríticas una vez por semana durante tres semanas. Se midió la sobrevivencia de los ratones y el tamaño de los tumores, los cuales tuvieron un estudio histopatológico. Finalmente se obtuvieron los linfocitos del ganglio poplíteo y el bazo de los ratones para ser estimulados con MAGE-AX. Cinco días después de haber sido realizados los ensayos de proliferación, los linfocitos fueron tratados con brefeldina y se realizó la inmunotinción con los anticuerpos anti- CD3, CD4, CD8,  $IFN\gamma$ , IL-4 e IL-10.

**RESULTADOS.** El tratamiento con  $TNF\alpha$  y GK-1 induce un incremento significativo en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad II e IL-12 en células dendríticas. Mientras que el tratamiento con GK-1 en células dendríticas induce incremento en los niveles de calcio intracelular, lo cual está implicado en el incremento en los niveles de CD86 y la producción de IL-12.

En relación con el tamaño tumoral y la sobrevida de los ratones, el tratamiento con células dendríticas TNF $\alpha$ /MAGE/GK-1 indujo la mayor sobrevida y el menor tamaño tumoral en los ratones con melanoma. En cuanto al porcentaje de linfocitos CD4 y CD8 en ganglio y bazo, se observó que los animales que recibieron el tratamiento con MAGE/GK-1 mostraron un mayor porcentaje de linfocitos T CD8 y CD4 IFN $\gamma$  en bazo, mientras que el ganglio poplíteo presentó incremento en los niveles de linfocitos T CD4 y CD8 IFN $\gamma$ . En relación con IL-4, el grupo MAGE/GK-1, fue el que mostró el menor porcentaje de linfocitos positivos a esta citocina. Finalmente a pesar que se constató un aumento en los niveles de IL-10, los niveles de IFN $\gamma$  siempre fueron más altos en el grupo tratado con TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1.

En relación con la histopatología, se observó que el grupo de ratones tratado con CDs estimuladas con TNF $\alpha$ /MAGE/GK-1, TNF $\alpha$ /MAGE, TNF $\alpha$  /GK-1 mostraron numerosas áreas de muerte celular.

**CONCLUSIONES.** El péptido GK-1 indujo aumento en la expresión de CD86 e IL-12 en CDs; mientras que las CDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE-AX incrementaron la sobrevida de ratones con melanoma debido a una respuesta Th1 antígeno específica caracterizada por el aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 productores de IFN $\gamma$ , además de la disminución en la producción de IL-4. Asimismo los resultados histopatológicos se correlacionaron con la sobrevida y tamaño tumoral, dado que los ratones vacunados con CDs estimuladas con GK-1 mostraron abundantes áreas de muerte celular en los tumores. Por lo tanto, CDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE-AX son capaces de inducir el desarrollo de una respuesta Th1 antígeno específica en ratones con melanoma.

## 2. ABSTRACT

**INTRODUCTION.** Melanoma is a very aggressive skin cancer due to its high metastatic capacity. Early diagnosis increases the survival rate of 95 % at 5 years, however, if the diagnosis is delayed the chance of survival decreases to 5% in a year. Surgery, chemotherapy, radiotherapy and combinations of these have been used for the treatment of melanoma, with poor results. Thus, in recent years, new possibilities with different immunotherapy approaches have been explored, like nonspecific immunomodulation based on the use of various cytokines (IL-2, IL-12 and IFN $\gamma$ ), antibodies and TLR ligands, in addition to adoptive transfer.

For over a decade, dendritic cells (DCs) have been used in immunotherapy against different varieties of cancer. The most used DCs are the ones differentiated from bone marrow cells or peripheral blood monocytes; particularly the DCs derived from bone marrow cells (BMDCs) may have a greater capacity to activate T lymphocytes. The use of DCs also enables the possibility to load them with tumor peptides and/or with necrotic or apoptotic tumor cells. Although the results are far from satisfactory, the cells loaded with tumor peptides have been proven the most effective in immunotherapy with DCs.

Despite the efforts made in the area of immunotherapy, the control of advanced melanoma remains a challenge, so in this work we evaluate the possibility of using immunotherapy through the transfer of DCs pretreated with MAGE-AX. MAGE-AX is a highly immunogenic peptide, composed of eight amino acid residues, common to the MAGE A1-3 and A5 tumor proteins, which are located primarily in tumor cells. Furthermore, in order to increase the efficiency of this treatment, we included a synthetic peptide designated GK-1, which is one of the three components of the S3Pvac vaccine against porcine cysticercosis, which has properties that might be useful to increase the antigen-presenting capacity of DCs. Experimental evidence shows that in addition to inducing a specific immune response, GK-1 possesses an adjuvant capacity that increases the efficiency of influenza vaccine in mice and pigs) So the aim of this study was to evaluate the capacity of GK-1 as an immunomodulator in DCs loaded with the MAGE-AX peptide for immunotherapy against melanoma.

**MATERIALS AND METHODS.** C57BL/6 mice were inoculated with  $6 \times 10^5$  B16/F10 melanoma cells. In addition, bone marrow cells obtained from others C57BL/6 were cultivated with GM-CSF during ten days in order to get immature DCs. Furthermore, DCs were treated with: LPS, MAGE-AX, GK-1, MAGE/GK-1, TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1 y TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1,. After treatment the expression of MHCII, CD11c, CD80, CD86 and CD40 were measured in CDs by flow cytometry, and also the intracellular calcium levels. A week after the melanoma induction, mice were inoculated with  $1 \times 10^6$  CDs once a week during three weeks. Mice survivor and tumor size were measured and analyzed. Finally lymphocytes from lymph nodes and spleen were stimulated with MAGE-AX during five days, additionally CD4 and CD8 cells levels and IFN $\gamma$ , IL-4 and IL-10 expression were measured by flow cytometry.

**RESULTS.**  $TNF\alpha$  and GK-1 treatment induced a significant increase in the expression of costimulatory molecules (CD80, CD86 and CD40), MHCII, IL-12, and in the intracellular calcium in DCs, which is involved in the production of CD86 and IL-12.

According with mice survival and tumor size, DCs  $TNF\alpha$ / MAGE-AX/ GK-1 treatment induced the highest survival and the lowest tumor size. While in the CD4 and CD8 percentage, mice that received treatment with MAGE-AX/GK-1 showed high levels in both types of lymphocytes and increased production of  $IFN\gamma$ . Regarding IL-4, the MAGE-AX/GK-1 group showed the lowest percentage of IL-4 positive cells. Finally, although IL-10 level in  $TNF\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 increased,  $IFN\gamma$  level was higher in all groups.

In the histopathology analysis, mice treated with DCs  $TNF\alpha$ /MAGE-AX/GK-1, DCs  $TNF\alpha$ /MAGE-AX or DCs  $TNF\alpha$ /GK-1 showed more tumor cells death areas than control groups.

**CONCLUSIONS.** Our findings demonstrate that the addition of GK-1 to BMDCs loaded with MAGE-AX decreases the rate of tumor growth, increases the survival of mice and the expression of CD86 and IL-12 in the BMDCs, as well as the levels of CD4 and CD8  $IFN\gamma$  producing T cells. The presence of tumor cell death is also evident, indicating that GK-1 can positively immunomodulate a Th1 response that favors tumor growth control. The evidence reported in this study indicates the usefulness of GK-1 not only for the treatment of melanoma, but also preventively; as in the case of people who have undergone cancer surgery and want to prevent the reappearance of a tumor. It is also appropriate to investigate whether GK-1 may be involved in the activation of other cell types associated with immunosurveillance, so that it can be used in the activation of other cell lines that could be used in immunotherapy in the future

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. Melanoma**

Es un tumor derivado de la proliferación de melanocitos atípicos con o sin capacidad de producir pigmento, caracterizado por la gran capacidad metastásica. Se presenta principalmente en la piel, no obstante se puede presentar en otros órganos.

##### **3.1.1. Epidemiología del melanoma cutáneo**

El melanoma cutáneo se define como la transformación de epidérmicos y representa el 4% de todos los tumores malignos de piel, aunque puede presentarse en otros órganos. Es el cáncer de piel más agresivo debido a la alta capacidad de metástasis, se ha descrito que aproximadamente el 80% de las personas con un diagnóstico tardío mueren en los primeros años de la enfermedad (Desmond et al. 2003; Masloski et al. 2008). Mientras que la sobrevivencia de los pacientes con diagnóstico temprano de melanoma pueden tener del 93 al 100% de sobrevivir 10 años después de haber sido detectada la enfermedad. De acuerdo a estimaciones de la International Agency for Research on Cancer la incidencia de melanoma en América Latina que va de 0/100,000 habitantes en Belice, 2/100,000 habitantes en México, hasta 7.6/100,000 habitantes en Uruguay. En México, según las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, la incidencia del melanoma maligno ha aumentado hasta en un 500% en los últimos años; de acuerdo a un estudio retrospectivo basado en los datos del registro Histopatológico de Neoplasias Malignas la incidencia global de melanoma calculada fue de 10.01/100,000 habitantes, 2.4 por cada 100,000 hombres y de 2.21 por 100,000 mujeres (Martínez-Saíd et al. 2004). En relación con la edad, 45 años es la edad promedio de las personas con mayor incidencia del melanoma (Desmond et al. 2003), teniendo un gran impacto en la economía de las personas, ya que se encuentran en una de las etapas más productivas de la vida. El melanoma es poco frecuente en la infancia o en la adolescencia, puesto que del 1 al 4% de nuevos casos ocurre en pacientes menores a 20 años y el 0.3% corresponde a personas



menores de 14 años y se presenta en el contexto de un nevo melanocítico congénito gigante, en el síndrome de nevos displásicos o en el xeroderma pigmentoso (Desmond et al. 2003)

### **3.1.2. Factores de riesgo para el desarrollo de melanoma cutáneo**

En el desarrollo del melanoma participan factores tanto genéticos como ambientales. El principal factor ambiental es la exposición solar crónica, por lo que se recomienda a la población en general la protección física contra la exposición solar. Otro factor importante es el uso de cámaras de bronceado, ya que estudios clínicos controlados han mostrado que el uso de estos dispositivos aumenta un 1.8% el riesgo de desarrollar melanoma (Desmond et al. 2003).

Se ha identificado que las personas de piel clara (fototipo I y II de Fitzpatrick) tienen una incidencia 10 veces mayor de desarrollar melanoma en comparación con las personas de raza negra, y de 7 veces más que la raza indígena y criolla de América Latina (Goldstain y Goldstein. 2001). Mientras que el cabello rojizo, los ojos claros y las efélides aumentan el riesgo 3 veces (Schaffer et al. 2004).

Se calcula que del 10- 15% de los melanomas son familiares, además que algunos pacientes con melanoma familiar presentan nevos displásicos. (Schaffer et al. 2004). Varios de los genes responsables del melanoma familiar y esporádico codifican genes supresores de tumores bien caracterizados: 25% de los pacientes muestran una mutación en el gen CDKN2A, cuyo efecto es el aumento en la proliferación de los melanocitos e inhibición de la senescencia celular inducida por oncogenes (Tsao et al. 2004; Fisher et al. 2008). Otros genes involucrados en el desarrollo del melanoma, y también en otros tipos de cáncer, es la mutación en el gen supresor de tumores p53 (Tsao et al. 2004), en el gen BRAF y RAS (Fisher et al. 2008; Long et al. 2011). Las mutaciones activadoras en BRAF, están presentes en 60-70% de los melanomas; mientras que las mutaciones activadoras de RAS están presentes en un 10- 15% de los tumores. Por razones no claras, los

melanomas que surgen sin exposición solar poseen mucho más probabilidad de presentar mutaciones activadoras en el receptor de tirosina cinasa c-KIT, que es previo tanto a RAS como a BRAF (Long et al. 2011).

### **3.1.3. Diagnóstico**

El diagnóstico de melanoma se realiza por medio de dermatoscopia y otros métodos no invasivos de diagnóstico, no obstante sólo se confirma mediante histopatología (Gutiérrez Vidrio et al. 2007). Macroscópicamente, los melanomas se caracterizan por ser lesiones asimétricas con diversos grados de pigmentación, pueden presentar variaciones de color con tonos negros, marrones, rojos, azules oscuros y grises. En ocasiones aparecen zonas de hipopigmentación blancas o color piel por regresión localizada del tumor. Cualquier cambio en el aspecto de una mancha pigmentada de la piel es un signo de advertencia y de manera sencilla se ha establecido un método diagnóstico temprano conocido como ABCDE (amplitud, bordes, coloración, diámetro y elevación) el cual puede ser utilizado para reconocer fácilmente los datos de malignidad; no obstante no resulta fiable en el caso de melanoma en etapas iniciales. Las lesiones pueden presentar prurito, dolor, ulceración y sangrado, por lo que también son consideradas signos de alerta (Gutiérrez Vidrio et al. 2007).

La biopsia excisional con un margen de 1 a 2 mm, orientados por el examen clínico y dermatoscópico es recomendable en la extirpación de las lesiones pigmentadas; así como el análisis a los ganglios linfáticos regionales para detectar posibles metástasis macroscópicas y el uso de marcajes inmunohistoquímicos para melanoma como el de S100 (altamente sensible pero poco específico) y HMB-45, los que aunados a otros marcadores tales como antígenos de diferenciación melanocítica (Melan A/MAET1, MITF y tirosinasa) y marcadores de proliferación celular (Ki-67) aumentan la sensibilidad y especificidad del estudio histopatológico de los ganglios regionales hasta en un 44% (Brady. 2004).

### **3.1.4. Estadiaje**

En 2001, el “American Joint Committee on Cancer” desarrolló un sistema TNM (tumor primario, ganglios linfáticos regionales, metástasis distantes) de estadiaje del melanoma. De acuerdo a éste, la profundidad en milímetros y la ulceración son los principales determinantes pronósticos en los melanomas localizados (estadios I y II), el número de metástasis ganglionares, la carga tumoral y la ulceración son los predictores más potentes de la sobrevida de los pacientes en estadio III y el sitio anatómico de las metástasis a distancia son el factor pronóstico más significativo en los pacientes del estadio IV (Tabla 1 y 2) (Balch et al. 2001).

En pacientes con melanomas de grosor inferior a 1.01 mm, la supervivencia es del 93%. La sobrevida a 5 años de los pacientes con metástasis ganglionares es de 20% aproximadamente, mientras que en los pacientes con ganglios negativos a melanoma es de 50% (Brady. 2004).

La espalda es el lugar más frecuente de aparición de melanomas en los varones y en las mujeres se divide en partes iguales entre la espalda y la región distal de las extremidades inferiores (Tsao et al. 2004; Masloski et al. 2008).

**Tabla 1.** Clasificación TNM del melanoma 2002.

<b>T</b>	<b>Profundidad</b>	<b>Ulceración</b>
T1	= 1 mm	a: sin ulceración y nivel II/III b: con ulceración o nivel IV/V
T2	1.01-2.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T3	2.01- 4.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T4	>4 mm	a. con ulceración b: sin ulceración
<b>N</b>	<b>No de ganglios</b>	<b>Masa Tumoral ganglionar</b>
N1	1	a: micrometástasis b: macrometástasis
N2	2-3	a: micrometástasis b: macrometástasis c: metástasis en tránsito o sin ganglios positivos
N3	4 o más metástasis en tránsito	a: micrometástasis b: macrometástasis
<b>M</b>	<b>Sitio</b>	<b>LDH sérica</b>
M1a	Piel, subcutis o ganglionar a distancia	Normal
M1b	Pulmonar	Normal
M1c	Cualquier otra metástasis visceral o a distancia	Elevada

**Tabla 2.** Estadiaje del melanoma de acuerdo al “American Joint Committee on Cancer”.

Estadio	Estadiaje		
	T	N	M
O	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a		
IIA	T2b	N0	M0
	T3a		
IIB	T3b	N0	M0
	T4a		
IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	N1	M0
		N2	M0
		N3	M0
IIIA	T1-4 <sup>a</sup>	N1a	M0
	T1-4 <sup>a</sup>	N2a	M0
IIIB	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a/b	N2c	M0
IIIC	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	Cualquier T	N3	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

### **3.1.5. Tratamiento contra el melanoma**

La extirpación quirúrgica completa con margen es el tratamiento de elección para melanoma localizado. Durante la última década ha existido una tendencia a disminuir el margen para la escisión del melanoma primario, basándose en estudios controlados que no muestran diferencias en el pronóstico de los pacientes con melanomas extirpados con márgenes de 4 o más centímetros con respecto a los que fueron extirpados con margen de 2 cm (Bach et al. 2001).

Las modalidades de tratamiento para el tumor primario y la metástasis regional del melanoma a piel: escisión quirúrgica, radioterapia, perfusión aislada de la extremidad, hipertermia local, crioterapia, electrocirugía y curetaje, terapia fotodinámica, quimioterapia local, inmunoterapia local, quimioterapia sistémica, terapia génica, entre otras (Gutiérrez Vidrio, 2007). Las terapias pueden combinarse, con el objetivo de inducir una mayor regresión tumoral, no obstante, en los últimos años, ha aumentado el interés de desarrollar terapias que aumenten la supervivencia de las personas con melanoma, dado que es un problema de salud a nivel mundial, como es el caso de la inmunoterapia.

La inmunoterapia es una estrategia en la que se pueden utilizar antígenos antitumorales, células tumorales lisadas, transferencia adoptiva de linfocitos T o células dendríticas, anticuerpos y citocinas, que induzcan el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral efectiva. La inmunoterapia es utilizada en conjunto con otras alternativas de tratamiento, como las antes mencionadas. Para el uso de la inmunoterapia es importante que se lleve a cabo una respuesta inmune específica, por lo tanto es importante el estudio de antígenos antitumorales. A continuación se mencionarán los principales antígenos tumorales encontrados en el melanoma y otros tipos de cáncer.

### **3.2. Antígenos Tumorales**

Las células provenientes de las células tumorales poseen diversos antígenos con capacidad inmunogénica que pueden ser utilizados de manera efectiva para el tratamiento contra el

cáncer (Renkvist et al. 2001; Lonchay et al. 2004). A continuación se describen los diferentes tipos de antígenos tumorales en diferentes tipos de cáncer y en el melanoma.

- a) **Antígenos de diferenciación:** Son proteínas que se localizan tanto en melanocitos como en células de melanoma; sin embargo su expresión es mayor en las células tumorales. Algunos ejemplos son: gp100, tirosinasa y melan-A/MART-1, los cuales han sido los más utilizados en la inmunoterapia contra melanoma (Jager et al. 2001; Parmiani et al. 2002)
- b) **Antígenos cáncer/testis:** Son antígenos expresados en células tumorales, ya sea melanoma u otro tipo de cáncer como linfomas, y células del conducto seminífero, sitio caracterizado por ser considerado inmunoprivilegiado por no expresar Moléculas del Complejo Mayor de histocompatibilidad I (MHCI). Dado lo anterior, pueden ser reconocidos por células del sistema inmune para inducir una respuesta inmune antitumoral. A este grupo pertenecen los antígenos MAGE y NY-ESO-1 (Fisher et al. 2008).
- c) **Antígenos sobreexpresados:** Son moléculas que se encuentran en células tumorales y células somáticas, como melanocitos. Pueden ser usados en inmunoterapia, debido a que los niveles de expresión en tejidos normales es mucho menor que la encontrada en melanoma. Algunos ejemplos son HER-2/neu y Melan A/MART 1 (Jager et al. 2001; Parmiani et al. 2003).
- d) **Antígenos originados por mutaciones.** Se originan a partir de mutaciones en genes relacionados con supervivencia, proliferación y muerte celular, algunos ejemplos son antígenos derivados de genes de la vía de p53 y RB.
- e) **Antígenos virales.** Por ejemplo EBV y HPV.

Todos los antígenos antes mencionados han sido utilizados en la inmunoterapia contra el melanoma y otros tipos de cáncer, ya sea mediante vacunas con péptidos, virus o por medio de células dendríticas (CDs) cargadas con alguno de los péptidos tumorales. De los antígenos tumorales, las proteínas MAGE son las que han tenido mayor éxito en la inmunoterapia contra melanoma (Parmiani et al. 2003; Godelaine et al. 2003).

### **3.2.1. Antígenos MAGE**

Los antígenos MAGE fueron descubiertos en 1991 en células de melanoma, e inicialmente se denominaron MAGE-A1. Son antígenos que se encuentran exclusivamente en células tumorales, en las espermatogonias y en trofoblastos (Reikvist et al. 2001; Simpson et al. 2005). La familia de genes que codifican para los antígenos MAGE es muy grande y se divide en tres subfamilias: genes codificantes para los antígenos de melanoma (MAGE), genes que codifican para los antígenos G (GAGE) y los genes codificantes de los antígenos del cromosoma X (XAGE) (Feng et al 2010). La subfamilia MAGE está dividida en dos, los genes que codifican para MAGE tipo I y el tipo II. Los genes MAGE tipo I se localizan en el cromosoma X y se dividen en los grupos MAGE A, B y C, que se expresan en testículo, trofoblasto, placenta y en células tumorales. La familia de genes A está formada por 12 miembros localizados en la región q28 del cromosoma X. Los genes de la familia B se encuentra en la región p21 del cromosoma X y la familia C en la región q26-27 del cromosoma X. Del grupo A, MAGE-A1 y MAGE-A3 se han localizado en el 40 al 69% de los melanomas primarios, mientras que MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3 y MAGE-A4 se expresan con más frecuencia en las metástasis, por lo tanto son los antígenos más utilizados durante la inmunoterapia (Zhang et al. 2005; Feng et al. 2010). Los genes MAGE tipo II, que agrupan aproximadamente 15 genes, se expresan en una amplia variedad de tejidos de forma normal y se les ha relacionado con apoptosis y diferenciación neuronal (Espantman et al. 2010).

Los promotores de los genes MAGE tipo I se encuentran metilados en las células somáticas, lo que evita la expresión de proteínas MAGE I. En células tumorales, estos genes son activados mediante la desmetilación de los promotores (Simpson et al. 2005; Miranda 2010; Akers et al. 2010). Diversos estudios han dado a conocer que la función de estos antígenos en las células tumorales, está relacionada con la sobrevivencia, proliferación y metástasis (Yang et al. 2007). La expresión anormal de los antígenos MAGE tipo I han sido observados además del melanoma en cáncer de vejiga, hígado, cerebro, próstata, ovario, piel y tiroides (Miranda et al. 2010; Doyle et al. 2010), por lo que han sido muy estudiados y utilizados en inmunoterapia, dado que su expresión es específica en



células tumorales y los genes MAGE I son presentados vía Moléculas clase I y II a linfocitos T CD8 y CD4 respectivamente, lo cual está implicado en el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral específica. Es importante hacer notar que el uso de los antígenos MAGE en la terapia contra el melanoma ha tenido mayor éxito que el obtenido con otro tipo de antígenos de melanoma (Parmiani et al. 2003; Lonchay et al. 2004; Germeau et al. 2005; Michelalek et al. 2007; Carrasco et al. 2008; Fisher et al. 2008).

Durante la inmunoterapia contra el melanoma, han sido desarrolladas vacunas en las que se utilizan los antígenos MAGE (Lonchay et al. 2004; Germeau et al. 2005; Michalek et al. 2007), por ejemplo, los antígenos MAGE han sido inoculados solos o en combinación con adyuvantes, se han construido virus recombinantes que codifican péptidos MAGE (Van Baren et al. 2005; Zhang et al. 2005) y se han utilizado vacunas basadas en CDs cargadas con antígenos MAGE. (Goldelaine et al. 2003; De Vries. 2003; Cannerotte et al. 2008; Carrasco et al. 2008). Las vacunas basadas en péptidos y en CDs han sido las que han tenido más éxito en la inmunoterapia contra el melanoma, dado que se ha investigado que aproximadamente del 9-20% de los pacientes han tenido regresión del tumor (Turner et al. 1999; Lonchay et al. 2004; De Vries et al. 2005; Van Baren et al. 2005), por lo tanto su uso en la inmunoterapia ha sido exitoso.

### **3.2.1.1. Antígenos MAGE en ratón**

En ratón, se han identificado dos grupos de genes MAGE denominados mMAGE, los cuales, al igual que en los humanos, no se expresan en tejidos adultos, con excepción de los túbulos seminíferos, y algunos de ellos se expresan en células tumorales. Los genes murinos se denominan mMAGE-A y B debido a que las secuencias y puntos isoeléctricos corresponden a las proteínas MAGE-A y B respectivamente, no obstante los genes MAGE-C no han sido identificados en ratones (Chomez et al. 2001). En el 2004, Eggert y cols. construyeron al péptido MAGE-AX (LGITYDGM) como alternativa para el estudio de inmunoterapia contra el melanoma. MAGE-AX contiene una secuencia localizada en los antígenos MAGE A1, A3 y A5 de ratón y está restringido a moléculas K<sup>b</sup> de ratón. Puede

inducir una respuesta antitumoral específica dependiente de linfocitos T CD8+ en ratones con melanoma, cuando CDs aisladas de bazo y posteriormente cargadas con el péptido MAGE-AX son inoculadas en ratones con melanoma. Dado lo anterior, MAGE-AX puede ser considerado como una alternativa muy importante para el estudio de la inmunoterapia contra el melanoma murino (Eggert et al. 2004). Dado lo anterior, en este trabajo se propone realizar una nueva alternativa de vacunas con CDs cargadas con antígenos MAGE, los cuales pueden inducir una fuerte respuesta inmune antitumoral en ratones, además del uso de un inmunomodulador que aumente la respuesta inmune contra el melanoma. Es importante destacar que las CDs son las principales células involucradas en la activación de linfocitos T antígeno específicos, por lo tanto es que en este trabajo se propone el uso de CDs derivadas de médula ósea (MOCDs), las cuales se describen a continuación.

### **3.3. Células dendríticas**

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos más eficientes que inician y regulan la respuesta inmune (Geissman et al. 2010) tanto innata como adaptativa (Joffre et al. 2009; Dhodapkar et al. 2008). Están involucradas en la activación de células NK mediante la interacción célula-célula o por medio de la secreción de citocinas (e.i. IL-12, IL-18 e IFN de tipo I); en la inducción de la respuesta inmune adaptativa con los linfocitos T CD4 y T CD8; y además en la respuesta inmune humoral mediante la activación de linfocitos B (Banchereau y Palucka. 2005; Barreira da Silva y Münz. 2011).

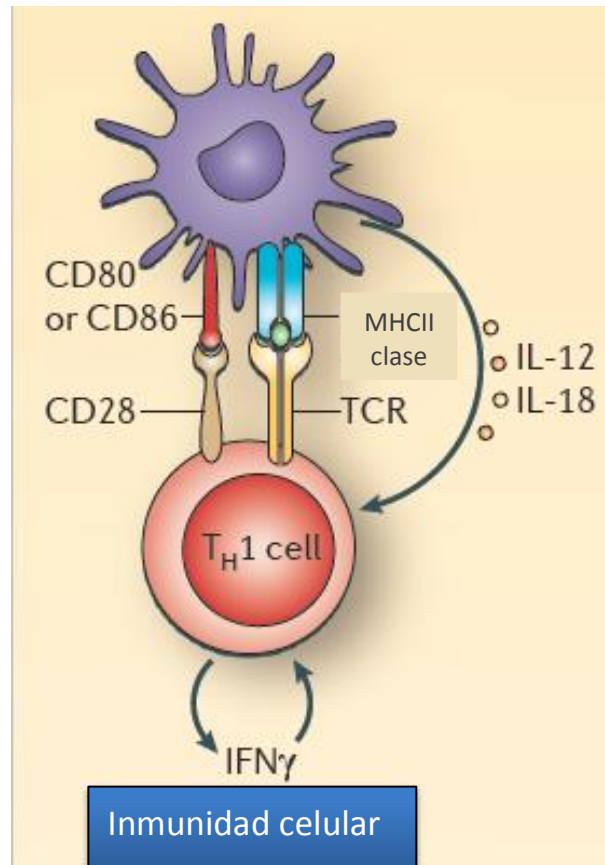
#### **3.3.1. Clasificación de células dendríticas**

De acuerdo a su origen, fenotipo y localización, se pueden clasificar en tres tipos de CDs: las CDs convencionales (cCDs) y las plasmacitoides (pCDs) y las derivadas de monocitos. Las cCDs comprenden a las CDs migratorias y a las CDs residentes de órganos linfoides. Las primeras pueden encontrarse en cualquier tejido ya que, después de haber estado en contacto con un antígeno, migran hacia los órganos linfoides para la presentación de

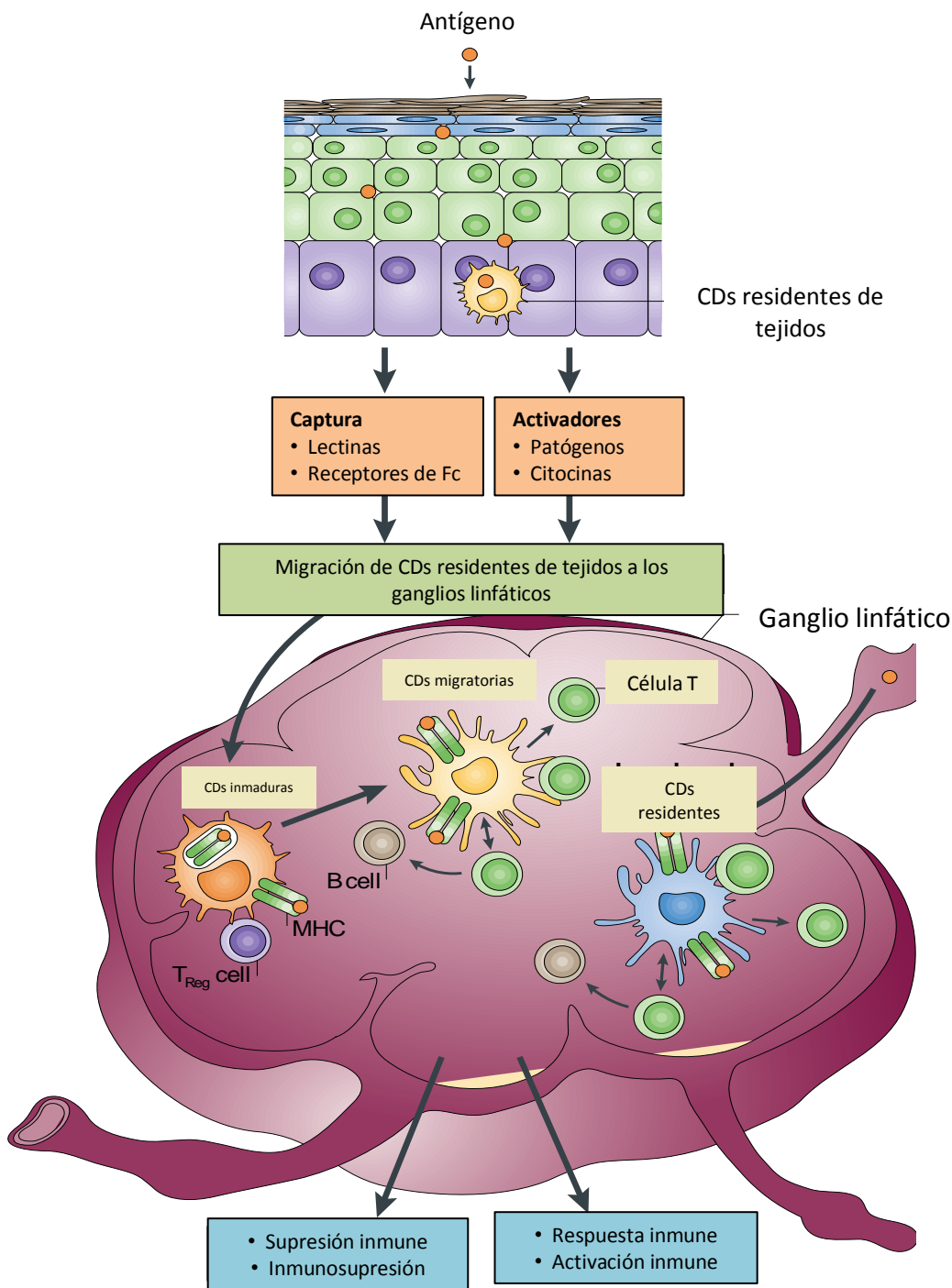
antígenos a los linfocitos T. Las células de Langerhans pertenecen a esta categoría; fueron las primeras CD descritas y se caracterizan por contar, entre otras moléculas, con una fuerte expresión de CD207 (Takeuchi et al. 2007). Las cCDs pueden expresar los receptores tipo Toll (TLR) 1-6 y 8 y pueden secretar altas concentraciones de IL-12 después de su maduración (Villadangos y Schnorrer. 2007; Adams et al. 2009; Liu y Nussenzweig. 2010; Kushwah et al. 2011) (Fig. 1). Las CD plasmacitoides (pCDs) pueden expresar TLR7 y 9 y secretar altas concentraciones de IFN de tipo I; se localizan en sangre y en los órganos linfoides (Geissman et al. 2010). Las CD derivadas de monocitos provienen del Progenitor Mieloide Común (CMP por sus siglas en inglés) y del Precursor de Células Dendríticas y Macrófagos (MDPs) bajo condiciones inflamatorias (Wu y Liu. 2007; Kushwah et al. 2011). Las CD se localizan en epitelios y tejido conjuntivo de casi todo el organismo y en estos sitios poseen un fenotipo inmaduro; es decir, expresan en su membrana moléculas implicadas en el reconocimiento de patógenos y daño celular (señales de daño, antígenos tumorales), entre las que se pueden mencionar a los TLRs, a los receptores Scavenger, a los receptores tipo RIG (Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLRs)) y a los receptores tipo NOD (NRLs) (Zhu et al. 2011), además de moléculas involucradas con macropinocitosis, endocitosis y fagocitosis de patógenos (Fig. 1) (Hackstein y Thomson. 2004). Después de la internalización, los antígenos son procesados a través de una vía endosomal y lisosomal que está implicada en la producción de péptidos derivados de los antígenos, que posteriormente son cargados en Moléculas Clase II. Alternativamente, antígenos exógenos pueden procesados por el proteasoma de las CD para generar péptidos que son transportados hacia el Retículo Endoplásmico Rugoso para cargar a las Moléculas Clase I (Hackstein y Thomson. 2004).

Asimismo, las CD modifican su morfología y fenotipo, inicia la disminución en la expresión de los receptores que promueven la fagocitosis y en la expresión de CD68 e incrementa la expresión de moléculas de adhesión (CD54/ICAM, CD58/LFA), LAMP 3, moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40), moléculas HLA de clase I y II, y la producción de IL-12, la cual está involucrada en inducir la síntesis de IFN $\gamma$ . Además, las CD inician la expresión de CCR7 implicado en la migración de éstas hacia la zona T dependiente de los

órganos linfoides secundarios (Hackstein y Thomson.2004). Todos los cambios antes mencionados en las CDs después de haber estado en contacto con un patógeno se le denomina maduración, y es esencial para que las CDs puedan interactuar con los linfocitos T de los ganglios linfáticos y exista una efectiva presentación de antígenos, mecanismo que da lugar al desarrollo de una respuesta inmune en contra de patógenos o molécula extrañas (Fig. 1 y 2) (Wan y Dupasquier. 2005; Banchereau y Palucka. 2005).



**Figura 1. Presentación de antígenos por las CDs a linfocitos T y producción de IL-12.** Cuando las CDs maduras migran a los órganos linfoides secundarios presentan exitosamente antígeno a los linfocitos T. Asimismo, las CDs secretan citocinas relacionadas con el desarrollo de una determinada respuesta inmunitaria. En el caso de IL-12, esta citocina es capaz de inducir una respuesta tipo Th1 caracterizada por la activación de linfocitos T CD4, CD8 y la producción de IFN $\gamma$ . Dibujo obtenido de Merad. 2011.

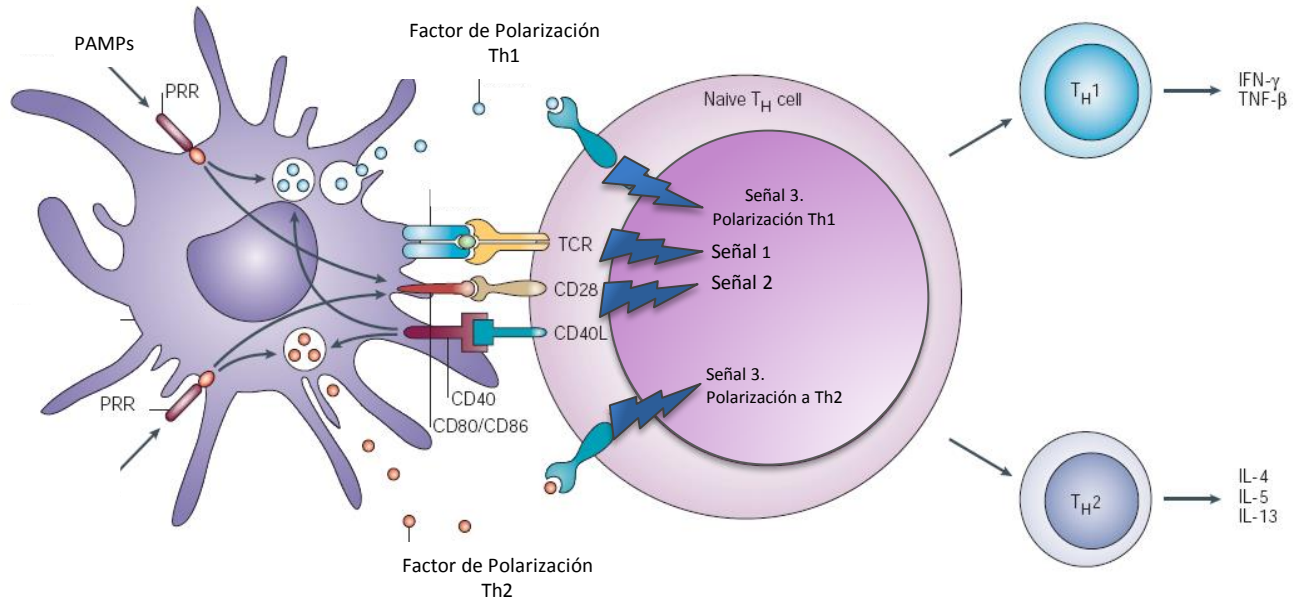


**Figura. 2. Características de las CDs.** Las CDs se localizan en los diversos epitelios de la economía, tejido conjuntivo, sangre y tejidos linfoides. Cuando las CDs reconocen algún patógeno éstas maduran y migran hacia tejidos linfoides secundarios, con el objetivo de inducir la activación antígeno específico de linfocitos T CD4 y CD8. Posteriormente los

linfocitos T tienen la capacidad de migrar hacia el sitio de infección. Dibujo tomado de Palucka y Banchereau. 2012.

### **3.3.2. Activación de linfocitos T por células dendríticas**

Después que el antígeno ha sido reconocido por las CD éstos son procesados con la finalidad de presentar antígeno a los linfocitos para inducir el desarrollo de una respuesta Th y la activación de otras células como las NK y macrófagos mediante la producción de IL-12 e IL-15. Para que lo anterior suceda, se ha desarrollado un modelo en el que se indica que deben existir cuatro señales en las CD para que se lleve a cabo una exitosa presentación de antígenos. Éstas señales se les llaman señal 0, 1, 2 y 3 (Kapsenberg et al. 2003; Guy, 2007; Guy; 2009; Pali-Schöll, 2010). La señal 0 está involucrada en el reconocimiento de patógenos por las CD mediante el reconocimiento de PAMPs por los receptores PRRs o TLRs. Mientras que la señal 1 está implicada con la presentación de antígenos a los linfocitos T por medio de la interacción entre el Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHCII), localizado en las CD, y el Receptor de linfocitos T (TCR) en los linfocitos T. No obstante, si no se presenta otra señal, los linfocitos T pueden sufrir anergia o una respuesta abortiva. Para evitar la anergia, son necesarias señales coestimuladoras las cuales son conocidas como señal 2. Esta señal está implicada entre la interacción entre moléculas coestimuladoras localizadas en las CD y sus ligandos en los linfocitos T, como la interacción entre CD40-CD40L (CD154), OX40 (CD134)-OX40L o CD80 (B7.1)- CD28. Alternativamente, el reconocimiento entre CD80 o CD86 con CD152 (CTLA-4) o entre PD-L1 (B7H1) o PD-L2 (B7DC) inhibe la activación de los linfocitos T. Finalmente la señal 3 está involucrada con las citocinas y quimiocinas en el microambiente que pueden modular la función de las CD e influenciar la respuesta inmune (Kapsenberg et al. 2003; Guy, 2007; Pulendra, et al. 2008; Guy; 2009; Pali-Schöll, 2010) (Fig. 3). Lo anterior puede comprobarse cuando CD's son cultivadas *in vitro* con IL-10 o TGF $\beta$  inducen una respuesta Th2 o reguladora, mientras que CD's cultivadas con IFN $\gamma$  una respuesta Th1 (Steinman y Hemmi. 2006; Bianchi. 2007; Pulendran et al. 2008).



**Figura 3. Presentación de antígenos por las CDs a los linfocitos T.** Para que se lleve a cabo una presentación de antígenos exitosa, las CDs primero deben reconocer antígenos (señal 0), posteriormente deben presentar antígenos a los linfocitos T (señal 1) en conjunto con el reconocimiento de las moléculas coestimuladoras localizadas en las CDs con sus ligandos en los linfocitos T (señal 2). Finalmente la secreción de citocinas induce la inmunomodulación de la respuesta inmune, en la imagen denominan a éstas factores de polarización. Dibujo tomado de Kapsenberg et al. 2003.

Posterior a la presentación de antígenos, pueden activarse los linfocitos T CD4 también conocidos como Linfocitos cooperadores (Th), estos linfocitos a su vez pueden diferenciarse en varios grupos de células efectoras, es decir pueden diferenciarse en células T que puedan secretar ciertas citocinas que induzcan un determinado tipo de respuesta. Los grupos de células efectoras pueden ser Th1, Th2, Th17 o T reguladoras; el tipo de respuesta Th que se desarrolle depende de factores microambientales, por ejemplo el tipo de citocina que se encuentre en el microambiente. La respuesta Th1 está acompañada por la secreción de IL-2 e IFN $\gamma$ , las cuales favorecen respuestas inmunes mediadas por células y la activación de linfocitos T CD8+, además de la generación en ratones de anticuerpos fijadores del complemento (IgG2a e IgG3). La respuesta Th2 se caracteriza por la secreción de IL-4, IL-5 e IL-6, promoviendo la activación de linfocitos B y

la producción de IgG1, IgE e IgA en ratones, y de IgE e IgG4 en humanos. Mientras que la respuesta Th17 está implicada con inflamación contra bacterias, parásitos y autoinmunidad. Por su parte, las células T reguladoras (Tregs) regulan el balance entre la tolerancia y la respuesta inmune mediada por linfocitos T y B, en particular a través de la acción de TGF $\beta$ , IL-10 y CTLA-4 (Parkin y Cohen. 2001; Guy. 2007). Además el desarrollo de las distintas respuestas depende de la expresión de diferentes factores de transcripción como T-bet para Th1, GATA3 para Th2, ROR $\alpha$  para Th17 y Foxp3 para las células T reguladoras (Goldsmid y Trinchieri. 2012).

Para poder conocer más acerca de las CDs es importante su aislamiento u obtención a partir de cultivos tanto de monocitos como de médula ósea como a continuación se describe.

### **3.3.3. Obtención de CDs *in vitro***

Durante las pasadas dos décadas se han estudiado los distintos tipos de CDs, así como sus diversas funciones, ya que se puede obtener una gran cantidad de células mediante cultivos *ex vivo*. En los últimos años se han optimizado los sistemas de cultivo para la producción de las CDs no sólo para estudiarlas sino para ser utilizadas en la inmunoterapia. Las CDs han sido aplicadas desde hace más de una década como una herramienta terapéutica para combatir el cáncer, sobre todo en personas que sufren de metástasis, por su capacidad de inducir la activación de linfocitos T CD8 (Choi et al. 2011; Palucka et al. 2011). Existen dos protocolos para la obtención de CDs: a partir de monocitos o por medio de precursores hematopoyéticos CD34+ de médula ósea, las denominadas células dendríticas derivadas de médula ósea (MOCDs) (Ardavín et al. 2001; Sheng et al. 2005; Takeuchi et al. 2007; Geissman et al. 2010). En ambos casos se obtienen primero CDs inmaduras y el segundo paso es la fase de maduración, en el cual pueden ser utilizados TNF $\alpha$ , prostaglandinas, ligandos de TLRs o moléculas antigénicas (Ardavín et al. 2001).



Las CD<sub>s</sub> derivadas de monocitos se obtienen, a partir del cultivo de monocitos extraídos de sangre periférica estimulados con GM-CSF e IL-4. Se ha observado que la IL-4 es necesaria para la diferenciación de las CD<sub>s</sub>, dado que esta citocina inhibe la diferenciación de los monocitos a macrófagos (Bancheareau y Steinman 1998; Ardavin et al. 2001).

Las CD<sub>s</sub> inmaduras obtenidas pueden ser maduras mediante la adición de TNF $\alpha$  (Liu et al. 2010). La adición de diversas citocinas al cultivo de monocitos puede inducir la diferenciación de un tipo determinado de CD<sub>s</sub>, por ejemplo, en cultivos a los cuales se les añade IL-4 se pueden encontrar CD<sub>s</sub> que secretan IL-4; mientras que si se complementa el cultivo con IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  o IL-15 pueden diferenciarse CD<sub>s</sub> productoras de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-15, respectivamente (Bancheareau et al. 2005). Por otro lado, si al medio se añade TGF $\beta$  se obtienen células de Langerhans, las cuales se ha descrito que son las mejores células presentadoras de antígenos (Wan et al. 2005). A pesar de que las CD<sub>s</sub> derivadas de monocitos son obtenidas con relativa facilidad, se ha descubierto que este tipo de CD necesita de un aporte continuo de GM-CSF e IL-4 para mantener su fenotipo, además de TNF $\alpha$  para preservar su estado de maduración, lo cual debe ser considerado cuando se producen las vacunas antitumorales (Ardavin et al. 2001).

Las CD<sub>s</sub> también pueden obtenerse de precursores hematopoyéticos localizados en médula ósea o sangre de cordón umbilical; sin embargo, se emplean más las células hematopoyéticas derivadas de médula ósea (MOCD<sub>s</sub>) (Sheng et al. 2005). Generalmente se realizan cultivos de precursores hematopoyéticos con GM-CSF, obteniéndose CD<sub>s</sub> inmaduras que posteriormente pueden ser maduras con TNF $\alpha$ , LPS o CD40L. Por otro lado, también se emplea como factor de crecimiento al FLT3L para la diferenciación de CD<sub>s</sub> plasmacitoides a partir de células de médula ósea y precursores de CD<sub>s</sub> plasmacitoides aislados de sangre periférica (Wan et al. 2005); mismos que posteriormente pueden ser inducidos hacia un estado de maduración mediante la adición de IL-3 y CD40L o IL-3 y TNF $\alpha$  (Ardavin et al. 2001). Además, las CD<sub>s</sub> plasmacitoides pueden ser aisladas de sangre, amígdalas u otro órgano linfoide por medio del uso del

marcador BCDA-2, Neurofilina 1 o CD123 (Wan et al. 2005). Para la obtención de un mayor número de CDs puede administrarse FLT3L (Sheng et al. 2005).

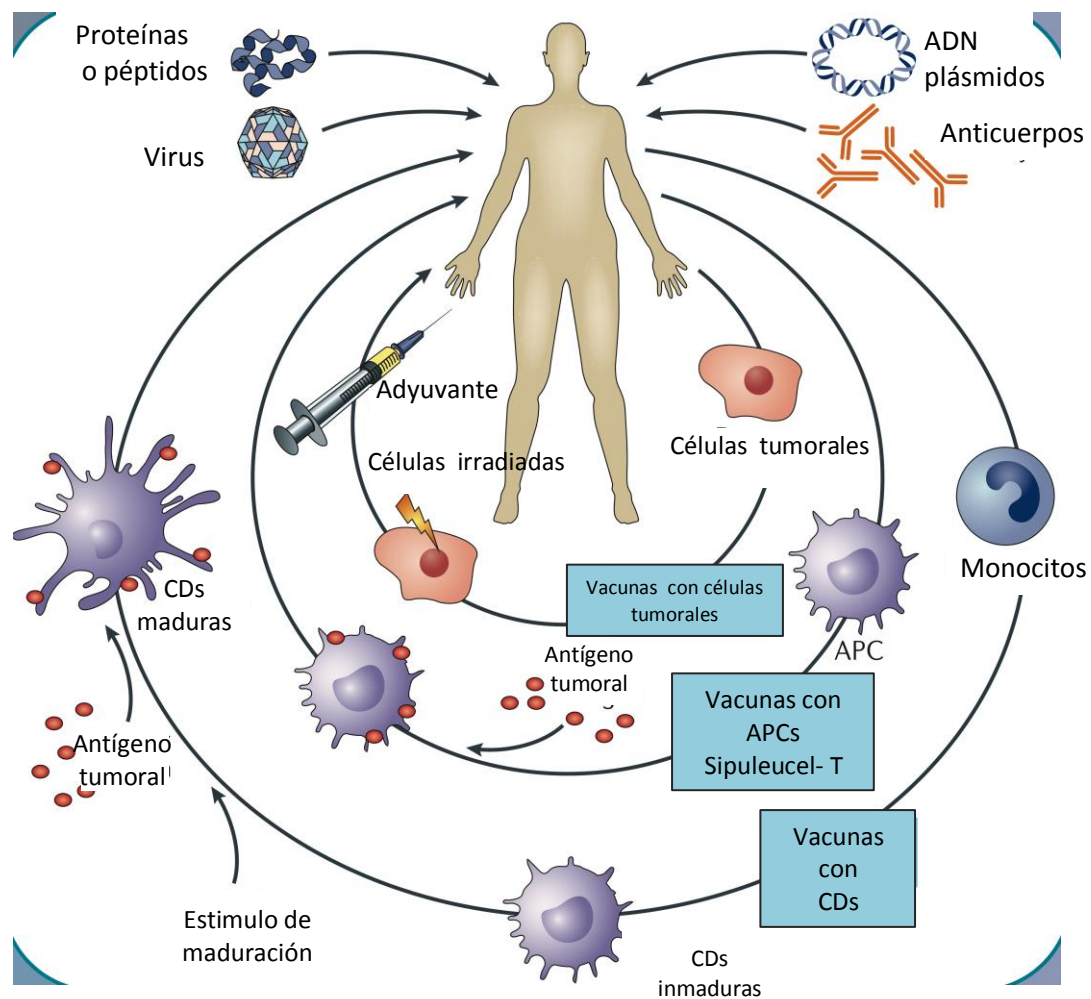
De los protocolos antes mencionados, las CDs derivadas de monocitos son las más utilizadas en la inmunoterapia contra el cáncer, dado la facilidad con la que se obtienen los monocitos de los pacientes; sin embargo, se ha demostrado que las CDs derivadas de precursoras de médula ósea poseen mayor capacidad de activar a linfocitos T (Bai et al. 2002). A pesar de lo anterior, se ha demostrado que aunque se utilicen citocinas *ex vivo* que inducen la maduración de las CDs, estas últimas pueden inhibir la producción de IL-12 la cual junto con IFN $\gamma$ , es de vital importancia para inducir una respuesta inmune antitumoral; por lo que en ocasiones se administra IFN $\gamma$  o algún agonista de TLRs (e.i. CpG) para promover la capacidad de expresión antigénica en las CDs (Mailliard et al. 2004).

#### **3.4. Vacunas contra el cáncer**

Durante muchos años se han empleado las vacunas contra el cáncer tales como: las vacunas de células tumorales alógenas y autólogas, de péptidos tumorales, de DNA, virales o basadas en CDs (Fig. 4). No obstante, los resultados no han sido muy satisfactorios, esto debido a que en algunos casos es muy bajo el porcentaje de las personas que muestran regresión tumoral, mientras que en otros no se muestra disminución en el tamaño tumoral, pero si existe activación del sistema inmunológico (generalmente se observa aumento en los niveles de IFN $\gamma$  y CD8 de sangres periférica) (Parmiani et al. 2003; Zhang et al. 2005; Cannerotte et al. 2008). Como ejemplo de lo anterior, pacientes que presentaban melanoma y que fueron vacunados con el péptido gp-100 no mostraron regresión tumoral a pesar de desarrollar una respuesta antitumoral antígeno específica. Lo mismo ocurrió en otro estudio en el que los pacientes fueron inoculados con MAGE, MART-1 o tirosina, antígenos que se caracterizan por localizarse en el melanoma (Yang et al. 2002; Palucka et al. 2010).

En el caso de cáncer de próstata también se han desarrollado vacunas con péptidos o con vectores virales, plásmidos o liposomas; sin embargo, en estos casos la respuesta no fue la esperada, puesto que muy pocas personas mostraron regresión tumoral (Lubaroff et al. 2009). Mientras que un estudio en donde participaron 765 personas con melanoma que fueron inmunizados con diferentes tipos de vacunas (vacunas de péptidos, de vectores virales y de CDs) mostró resultados muy poco satisfactorios: de los 175 pacientes que recibieron la vacuna de péptidos, sólo el 4% mostró regresión tumoral incompleta; de los 216 pacientes que recibieron vacunas de péptidos virales, ninguno mostró regresión tumoral, pero 7.1% de las personas que fueron inmunizadas con vacunas con CDs mostraron regresión tumoral (Rosenberg et al. 2004). Ahora bien, en otro estudio donde se comparó y evaluó el grado de protección generada por vacunas a base de lisados de células tumorales contra vacunas de CDs, se observó que las segundas inducían regresión tumoral, mientras que las vacunas de células tumorales muertas sólo generaba protección en algunos individuos (Ribas et al. 1999).

Por lo tanto, es necesario desarrollar otros tipos de estrategias de vacunación que induzcan el aumento en la respuesta antitumoral, como es el caso de las vacunas de CDs las cuales han sido un poco más exitosas que los otros tipos de vacunas. Este tipo de inmunoterapia tiene como objetivo la maduración ex vivo de las CDs del paciente, para después inducir una respuesta inmune en contra de las células tumorales; asimismo, se pretende que las células CD8 puedan migrar hacia el estroma tumoral, con el objetivo de que se pueda llevar a cabo una regresión tumoral exitosa y duradera para mejorar el pronóstico de las personas con cáncer (Fig. 4) (Jonuleit et al. 2001; Banchereau y Palucka. 2005).



**Figura 4. Diferentes tipos de vacunas utilizadas contra el cáncer.** En la región superior se ejemplifican algunos tipos de vacuna como las basadas en péptidos, proteínas, virus, DNA o anticuerpos. Mientras que en la parte inferior se ejemplifica como las vacunas pueden ser basadas en células tumorales irradiadas o en CDs. Las CDs pueden ser obtenidas a partir de monocitos o médula ósea, y maduras por medio de señales exógenas como citocinas. Dibujo tomado de Leterhuis y Punt. 2012.

### 3.4.1. CDs en la inmunoterapia

Las vacunas con CDs no sólo inducen el incremento en el número de células T antígeno específicas presentes en las lesiones tumorales, sino también promueven la activación de otro tipo de células involucradas en la respuesta inmune, como es el caso de las células NK, las cuales, como ya se ha mencionado, están implicadas a la inmuno vigilancia contra

las células tumorales (Stagg, et al. 2007; Palucka et al. 2011). Por otro lado, en la actualidad están siendo realizadas estrategias terapéuticas mixtas en las que ya no únicamente se utilizan CDs maduras con antígenos tumorales, sino que actualmente se está tratando de regular la respuesta de los linfocitos T mediante la inactivación de moléculas inhibitorias, ejemplo de ello es el CTLA-4 en los linfocitos T y el PD-L1 en las CDs, lo cual puede reestablecer la función de las células T (Stagg et al. 2007; Palucka et al. 2011; Zhu et al. 2011). Asimismo, ha sido estudiado el efecto de algunas moléculas para mejorar la actividad de las CDs mediante el uso de agonistas de TLRs tales como ácidos nucleicos (CpG), Imiquimod, LPS, Lípido A Monofosforil, BCG, etc., obteniendo resultados satisfactorios (Bhardwaj et al. 2011). Por otro lado, también ha sido utilizada la terapia génica para exacerbar la respuesta contra el tumor, de esta forma se ha tratado de transfectar a las CDs con DNA tumoral; aunado a esto, ha sido inducida la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citocinas mediante la transfección de genes. Los resultados son variados, por lo que se está tratando de utilizar no sólo la inmunoterapia sino también en combinación con otras terapias como la radioterapia y quimioterapia (Xia et al. 2006; Zitvogel et al. 2008).

A pesar de lo anterior, durante la última década numerosos trabajos han demostrado que las CDs además están involucradas en la inducción de tolerancia. Se ha observado que la administración de CDs inmaduras a ratones con cáncer induce la producción altos niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ , las cuales están relacionadas con la inducción de tolerancia y aumento del tamaño tumoral (Schuler et al. 2002; Lande et al. 2010); algo parecido ocurrió cuando a individuos sanos les fueron inoculadas CDs inmaduras, dado que la vacuna indujo la liberación de IL-10 e inhibió la actividad de los linfocitos T CD8 (Dhodapkar, et al. 2001; Bjoern et al. 2011). Por otro lado, las CDs, además de presentar moléculas coestimuladoras, al mismo tiempo pueden expresar moléculas co inhibitorias como B7-H1 y B7-DC, las cuales pueden interactuar con PD-1, molécula co inhibitoria localizadas en los linfocitos T, y esto puede inducir tolerancia en los linfocitos T (Steinman et a. 2003; Dhodapkar et al. 2008; Zhu et al. 2011). Otra señal relacionada con la tolerancia es la ausencia de citocinas inflamatorias o señales de daño. Un estudio realizado por Shankaran

en el 2001, dio a conocer que algunos tumores pueden liberar señales de daño, por lo que puede haber secreción de moléculas proinflamatorias que permitan la adecuada maduración de CD<sub>s</sub>. Si lo anterior sucede, puede ocurrir regresión tumoral; dado que las CD<sub>s</sub> pueden migrar a ganglios linfáticos en donde inducen la activación de los linfocitos T. No obstante, existen tumores que son capaces de secretar moléculas inhibitorias [i.e. IL-10, TGF $\beta$  e indoleamina 2, 3 dioxigenasa (IDO)], y éstas impedir la maduración de CD<sub>s</sub> e iniciar la tolerancia de linfocitos T, los cuales son muy importantes en la respuesta inmune antitumoral, teniendo como resultado el aumento del tamaño tumoral (Shankaran et al. 2001). Con respecto a lo anterior, en biopsias de tumores de seno, pulmón y piel se han encontrado CD<sub>s</sub> plasmacitoides inmaduras, células que han sido implicadas en la generación de células T regs y en la liberación de IL-10; asimismo, se ha demostrado que los ganglios centinela de varios tipos de tumores presentan CD<sub>s</sub> plasmacitoides que expresan IDO, la cual inhibe la respuesta inmune antitumoral (Lande et al. 2010). Por lo tanto, es muy importante saber el tipo y fenotipo de las CD<sub>s</sub> que son utilizadas como vacunas contra el cáncer, dado que las CD<sub>s</sub> tolerogénicas pueden estar involucradas en la presencia de linfocitos T regs y de citocinas inhibitorias, elementos muy importantes para la inducción de tolerancia contra el cáncer.

### **3.4.2. Vacunas de CD<sub>s</sub>**

Existen diversos tipos de vacunas con CD<sub>s</sub>, se pueden dividir de acuerdo al tipo de CD utilizado, así como del estímulo que induce su maduración. Igualmente se han utilizado diferentes vehículos para la entrega de los antígenos tumorales a las CD<sub>s</sub> como: vectores virales, plásmidos y DNA desnudo, RNA, liposomas con ácidos nucleicos o proteínas, lisados tumorales, células apoptóticas y péptidos (Fig. 3) (Bancheareau y Steinman 1998).

#### **3.4.2.1. Vacunas con distintos tipos de CDs**

Con respecto al tipo de CD utilizada, se han observado resultados diferentes de acuerdo al tipo de citocina que haya sido ocupada para la diferenciación de las CDs. Un estudio llevado a cabo en pacientes con melanoma dio a conocer que las CDs diferenciadas con IL-15 indujeron la activación de un mayor porcentaje de linfocitos T CD8 que las CDs diferenciadas con IL-4; sin embargo, la mayoría de los trabajos realizados en la clínica han utilizado CDs derivadas de monocitos y diferenciadas con IL-4 (Palucka et al. 2010). También se han realizado estudios para comparar la eficacia entre las vacunas de CDs derivadas de monocitos y las derivadas de células CD34+, ambas en pacientes con melanoma. A pesar de haberse utilizado los mismos factores de crecimiento para su diferenciación (GM-CSF e IL-4), no se observaron diferencias significativas entre las vacunas empleadas, dado que ambas indujeron la regresión tumoral en no más del 20% de los pacientes, además se encontró una correlación positiva entre la regresión tumoral y el desarrollo de una respuesta inmunológica contra el tumor (Mackensen et al. 2000). Todo lo anterior indica que después de haber inducido la diferenciación de CDs mediante diversos cocteles de citocinas, es muy importante el tipo de CD que se obtenga en cultivo, ya sea derivada de monocitos o de células CD34+. Por consiguiente, es crucial considerar las características de las diferentes tipos de CDs que puedan obtenerse *ex vivo*, con el fin de poder elegir la subpoblación de CDs y antígenos adecuados para que se desarrolle una respuesta inmune apropiada (Palucka et al. 2010).

#### **3.4.2.2. Vacunas de CDs cargadas con proteínas tumorales**

En años recientes, una de las áreas de investigación acerca de la inmunología del cáncer que ha recibido gran atención, corresponde a la búsqueda de marcadores tumorales específicos, cuya característica primordial es que dicha proteína no sea expresada de manera constitutiva en células normales o bien que su expresión sea restringida o mínima en tejidos sanos, lo que ha resultado en la descripción y caracterización de numerosos y diversos antígenos asociados a tumores (AAT), los cuales pueden ser específicos para

algunos tipos de neoplasias, o bien compartidos por distintos tipos cáncer cancerosas. Por ejemplo, algunas proteínas que normalmente se expresan en tejidos embrionarios y germinales se observan frecuentemente en tumores malignos, como la familia de proteínas MAGE y la proteína NY-eso (Parmiani et al. 2003; Miranda. 2010). En un principio, cuando se descubrieron los antígenos tumorales, se utilizaron para desarrollar vacunas antitumorales que contenían a la proteína completa o sólo a alguno de sus péptidos; sin embargo, se observó que la sola presencia de los antígenos tumorales promovía una respuesta de tolerancia por parte del sistema inmunológico y sólo en algunas ocasiones se podía inducir regresión tumoral. Posteriormente, se constató que tanto al poner en contacto las CDs con dichos antígenos tumorales *in vivo* como *in vitro*, se podía inducir en ellas un fenotipo de maduración además de inducir la carga de CDs con antígenos tumorales, promoviendo así la activación antígeno específico del sistema inmunológico, lo que permitió el inicio del uso de antígenos tumorales para el desarrollo de vacunas con CDs contra el cáncer (Rosenberg et al. 2004). En este sentido, algunas de las proteínas que han sido utilizadas en inmunoterapia son las proteínas MAGE (Zhang et al. 2005; Carrasco et al. 2008), gp-100 (Grover et al. 2006), gp70/p15E (Casey et al. 2003), antígeno carcinoembrionario (CEA) (Lesterhuis et al. 2010), antígeno membranal prostático (PMSA) (Maurer et al. 2011), survivina (Trepikak et al. 2010), MUC-1 (Kobukai et al. 2011), HER2/Neu (Napoletano et al. 2009), entre otros.

Las CDs han sido cargadas con uno o varios antígenos tumorales; por ejemplo, en un estudio en pacientes con melanoma se administraron CDs cargadas con varios antígenos específicos de melanoma (gp100 y tirosinasa) con un éxito de regresión del 11% (Craig, et al. 2003); mientras que en otro estudio, en el que se utilizaron los mismos antígenos junto con KLH (key hole hemocyanin), el 57% de las personas que recibieron la terapia mostraron estabilidad en la enfermedad (sin crecimiento tumoral) y sólo el 4 % mostró regresión tumoral completa (De Vries et al. 2005). El éxito de las vacunas con CDs maduras con proteínas o cargadas con péptidos tumorales ha sido moderado; ya que el éxito de regresión tumoral no ha sido mayor al 20% debido a que no es muy alta la proliferación de linfocitos T específicos para los péptidos presentados. No obstante la



inmunoterapia basada en CD8 ha sido más exitosa que otras estrategias de vacunación (por ejemplo, el uso de vacunas basadas en péptidos), dado que, a pesar que la proliferación de linfocitos T no es muy alta si es efectiva en la regresión tumoral (Lonchay et al. 2004). De tal forma, este tipo de vacuna actualmente se aplica en conjunto con otras terapias para aumentar la respuesta inmune antitumoral, además que es necesario que dicha aplicación se realice en pacientes con estadio I y II de desarrollo tumoral para así obtener un mayor éxito, sin embargo la mayoría de los tratamientos con CD8 son aplicados a personas en estadios III y IV de la enfermedad debido a una detección tardía de las lesiones cancerosas (Xia et al. 2006; Lubaroff et al. 2009). Un ejemplo de lo anterior es la vacuna Sipuleucel T, la cual ha sido aceptada por la FDA para ser aplicada en pacientes con cáncer de próstata. Tal vacuna se basa en el uso de monocitos del paciente que posteriormente son incubados con GM-CSF y más tarde son cargados con fosfatasa prostática. La vacuna Sipuleucel T no sólo ha inducido la migración de linfocitos T específicos al tumor en la próstata, sino también una mayor sobrevivencia en los pacientes que la recibieron en comparación a los que recibieron el placebo (Kantoff et al. 2010; Enomoto. 2011).

#### **3.4.2.3. Vacunas de CD8 maduras con células muertas**

En relación con la entrega de los antígenos tumorales a las CD8, las primeras estrategias desarrolladas fueron mediante la interacción de éstas con células tumorales muertas, tanto apoptóticas como necróticas (Fields et al. 1998; Ullrich et al. 2008). Las CD8 pueden fagocitar a las células tumorales por medio de su reconocimiento por receptores específicos; así, las células apoptóticas son reconocidas por la integrina  $\alpha V\beta 5$ , CD36 o por medio del receptor de fosfatidil serina (Dhodapkar et al. 2008); mientras que las células necróticas son reconocidas por CD91, TLR-2 y TLR4 (Apetoh et al. 2004; Dhodapkar, et al. 2008). Una de las grandes ventajas de utilizar células tumorales muertas es que las CD8 pueden presentar antígenos por medio de moléculas Clase I y así activar mediante una presentación cruzada a linfocitos T CD8+; conjuntamente el haplotipo por medio del cual

son presentados los antígenos es independiente a la respuesta, por lo que este tipo de vacuna puede ser aplicada a cualquier paciente (Kurts et al. 2010).

El reconocimiento de las células muertas realizado por las CD está relacionado fuertemente con la maduración de estas últimas. Matzinger denominó a lo anterior: maduración de CD por “señales de daño”, las cuales pueden activar al sistema inmune por medio de traumas ocasionados en algún tejido. De esta forma se observa que las células necróticas son un claro ejemplo de daño o trauma que induce la maduración de CD (Zitvogel et al. 2008). Se ha demostrado que tanto en la necrosis como en la apoptosis se liberan moléculas tales como HSP, calreticulina y ácido úrico, las cuales están directamente implicadas con la maduración de CD y en la secreción de citocinas proinflamatorias (Ullrich et al. 2007; Dhodapkar et al. 2008; Zitvogel et al. 2008). Por otro lado, algunos estudios indican que la maduración de CD con cuerpos apoptóticos induce tolerancia del sistema inmune, pero otros muestran que sí puede inducirse una respuesta antitumoral efectiva. Un estudio realizado en un modelo de melanoma murino dio a conocer que la maduración de CD con cuerpos apoptóticos de células de melanoma inducía un aumento en la liberación de IL-10, lo cual apunta al desarrollo de una respuesta inmune tolerogénica (Matheoud, et al. 2011). Resultados muy parecidos se han obtenido en pacientes que han recibido CD maduras con células apoptóticas, dado que se observó un aumento en los niveles de células Tregs, además que no todas las personas desarrollaban inmunidad contra el tumor (Palucka et al. 2010). Aunado a esto, también se ha comprobado que existe un determinado tipo de apoptosis llamado apoptosis inmunogénica inducida por radiación o antraciclinas; este tipo de muerte está implicada en la expresión de calreticulina y HSP en los primeros estadios de muerte, mientras que en la apoptosis tardía se expresa una proteína denominada HMGB1, molécula reconocida por TLR4. La expresión de éstas moléculas induce la maduración y migración de CD, las cuales, a su vez, promueven un respuesta inmune antitumoral (Apetoh et al. 2007; Cornforth et al. 2011), tal y como lo demostró un estudio en donde se utilizaron células de mieloma irradiadas, las cuales indujeron presentación cruzada por parte de las CD y una mayor lisis de células tumorales que la provocada por linfocitos T activados por CD

madurados con antígenos tumorales (Dhodapkar et al. 2002). Las vacunas desarrolladas mediante esta estrategia han promovido una respuesta antitumoral contra el melanoma, cáncer renal, carcinoma paratoroideo y cáncer de seno (Xia et al. 2006). Igualmente se ha demostrado que este tipo de vacunas pueden inducir la activación de células T CD4 y CD8 específicas del tumor; como lo demostró un estudio de 13 pacientes con melanoma, en donde tres mostraron regresión tumoral y uno mostró aumento en los niveles de IFN $\gamma$  (Palucka et al. 2006). Por lo tanto, es importante conocer qué tipo de apoptosis es inducida en las células tumorales, para así llevar a cabo una exitosa respuesta inmune antitumoral mediada por CDs maduras con células apoptóticas. Aunado a lo anterior, también es importante que se lleven a cabo terapias mixtas, dado que ciertos fármacos utilizados en la quimioterapia (antraciclinas), así como en la radiación, inducen apoptosis inmunológica y esto daría lugar a la activación de CDs *in situ*, lo cual a su vez induciría una mayor activación de la respuesta inmune antitumoral y con ello la erradicación del tumor.

#### **3.4.2.4. Vacunas de CDs transfectadas con genes**

Así como las CDs pueden ser cargadas con antígenos tumorales, lisados de células tumorales o células muertas, también pueden ser pulsadas o transfectadas con RNA tumoral. Las CDs que han sido transfectadas exitosamente pueden presentar proteínas tumorales por medio de diferentes moléculas HLA, de manera que puede haber activación de un gran número de clonas de linfocitos T CD8 (Boczkowski et al. 2000; Nair et al. 2002). También en el campo de la terapia génica, se ha tratado de transfectar a las CDs con genes que codifican antígenos tumorales específicos, citocinas o moléculas coestimuladoras (Ribas et al. 1999). Un ejemplo de este tipo de terapia es la transferencia del gen de GM-CSF a células precursoras de CDs; el cual es de gran ayuda, dado que el GM-CSF generalmente es adicionado a los cultivos para la diferenciación de CDs, en este tipo de terapia tal adición no es necesaria (Liu et al. 2000). En relación con la transfección de genes de antígenos tumorales específicos, se ha inducido la expresión de MAGE, gp-100, MART-1, hTRP2, p53 o MUC1; los resultados han sido moderadamente satisfactorios

puesto que se observó el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral comprendida por la presencia de linfocitos T CD8 y secreción de IFN $\gamma$  (Narvaiza et al. 2000; Feldman et al. 2002). Aunado a lo anterior, se ha comprobado que este tipo de vacunas no sólo estimula la proliferación y activación de células NK, sino además induce la disminución en los niveles de células Tregs, en pacientes con carcinoma hepatocelular (Bray et al. 2011). A pesar de lo anterior, no siempre se consiguen buenos resultados, debido a que es baja la eficacia en la transfección de células, además de que se ha registrado baja viabilidad en las CDs. En cuanto a la expresión génica, ésta es corta; igualmente algunos virus han sido utilizados en este tipo de terapias, sin embargo estos pueden interferir con la función y maduración de las CDs dependiendo de la naturaleza del vector (Sheng et al. 2005).

### **3.5. Vía de administración de las vacunas de CDs**

Otro factor importante en la eficacia de la inmunoterapia con CDs es la vía por medio de la cual se inoculan las CDs. En varios modelos animales se ha observado que la administración de CDs vía subcutánea e intralinfática induce una respuesta antitumoral Th1 (Grover et al. 2006), mientras que la inoculación intravenosa desarrolla una respuesta Th2, la cual es considerada deletérea en las personas enfermas de cáncer. Además, se ha observado tanto en modelos de melanoma murino como en estudios en pacientes también con melanoma, que la administración subcutánea incluso inducía la presencia de células T de memoria, generando protección contra posibles amenazas de cáncer; por otro lado, en un estudio en el que la administración fue intravenosa se observó que no se indujo el aumento de células T de memoria (Ribas et al. 1999; Mullins . 2003). Lo anterior puede ser explicado porque generalmente los ganglios subcutáneos son los encargados de la respuesta inmune antitumoral contra el melanoma, por lo que las células inyectadas vía subcutánea pueden migrar más fácilmente hasta estos órganos linfoides. Ahora bien, la vía intranodal también puede ser exitosa, dado que las CDs no tienen la necesidad de migrar, empero se ha indicado que en algunas ocasiones la inoculación de CDs destruye la arquitectura de los órganos. Por otro lado, se ha subrayado en diversos estudios con

pacientes con metástasis visceral, que la mejor vía de administración de las vacunas con CDs es la vía intravenosa; en contraste con las metástasis no viscerales, en donde la mejor vía de administración es la subcutánea (Figdor, et al. 2004).

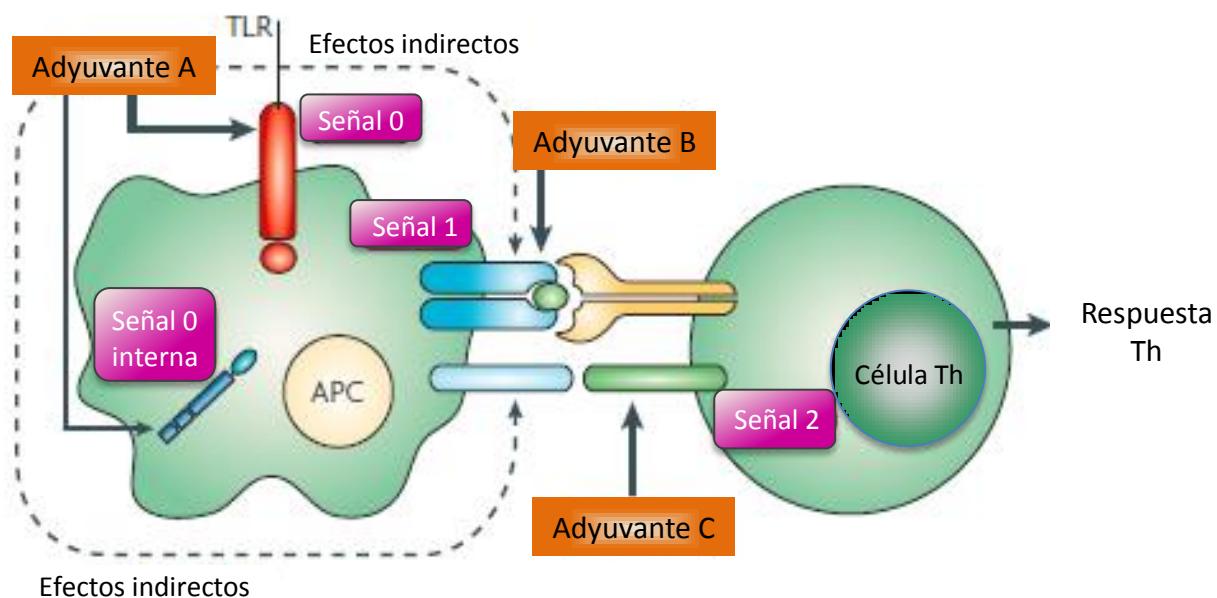
Por otro lado, cuando se inoculan CDs en conjunto con citocinas como  $TNF\alpha$  o  $IFN\gamma$ , e incluso con ligandos de TLR, éstas pueden madurar y migrar hacia los ganglios linfáticos. Además se ha observado que el uso de éstas moléculas pueden ayudar al desarrollo de una respuesta inmune específica cuando se inoculan antígenos que no sean inmunogénicos. Por lo tanto el uso de este tipo de moléculas es importante para el desarrollo de vacunas y la inmunoterapia, por lo que se describen a continuación.

### **3.6. Adyuvantes e Inmunomoduladores**

Los adyuvantes son compuestos que mejoran la respuesta inmune contra antígenos inoculados. El objetivo de un adyuvante es la de generar una intensa respuesta inmune. Los adyuvantes pueden ser usados para varios propósitos: mejorar la inmunogenicidad de antígenos recombinantes o purificados; para reducir la concentración de antígenos o el número de inmunizaciones requeridas para inducir una respuesta inmunológica; para mejorar la eficacia de vacunas en recién nacidos personas de edad avanzada o inmunocomprometidas; como un sistema que ayuda a la entrega de antígenos en la mucosa.

Los adyuvantes se definen como compuestos que pueden incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno. Se requiere el uso de un adyuvante para varios propósitos, como: mejorar la inmunogenicidad de antígenos recombinantes o purificados; para reducir la concentración de antígenos o el número de inmunizaciones requeridas para inducir una respuesta inmunológica; para mejorar la eficacia de vacunas en recién nacidos personas de edad avanzada o inmunocomprometidas y como un sistema que ayuda a la entrega de antígenos mucosas (Aguilar y Rodríguez. 2007).

En ocasiones el término adyuvante es usado como sinónimo de inmunoestimulante, no obstante, los inmunoestimulante son conocidos por ser una sola molécula con propiedades inmunomoduladoras, mientras que los adyuvantes son un conjunto de moléculas con distintas propiedades, funciones y actividades, incluidos el de acarrear o depositar antígenos e incluso el de inmunomodular al sistema inmune. Desafortunadamente la acción de los adyuvantes se correlaciona con incremento en la toxicidad, por lo que el desarrollo de inmunomoduladores o adyuvantes que puedan ser seguros y que posean propiedades sinérgicas para inducir la respuesta inmune deseada (Aguilar y Rodríguez. 2007; Guy 2007).



**Figura 5. Mecanismos de acción de los adyuvantes o inmunoestimuladores en las CDs.** Para que se lleve a cabo una adecuada respuesta inmunológica, es necesario que se activen tres señales en las células presentadoras de antígenos. La señal 0 está implicada en la activación de las células dendríticas o macrófagos, la señal 1 está relacionada con el mejoramiento en la presentación de antígenos y la señal 2 en el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras. Dibujo obtenido de Guy. 2007

La respuesta inmune está mediada por la activación de linfocitos T después de la presentación de antígenos mediada por macrófagos o CD, para que después se obtengan linfocitos T CD4 activados que liberan citocinas que modulan la actividad de los linfocitos T CD8, B y NK. Para poder modular la respuesta inmune, Gill et al. en 1996 propuso la teoría de las dos señales para la activación de linfocitos T. Esta hipótesis indica que se necesitan de dos señales para la activación de linfocitos T: la señal 1 es la interacción entre el TCR de los linfocitos T con las Moléculas Clase II, mientras que la señal 2 se trata de la interacción entre moléculas coestimuladoras entre los linfocitos T y las Células Presentadoras de Antígenos (APCs) (Guy. 2007; Brunner et al. 2010). Posteriormente Janeway y Matzinger introdujeron el término de la señal 0, la cual está involucrada con el reconocimiento de antígenos por las APCs (Janeway. 1989; Matzinger. 1997). En general los adyuvantes poseen varios mecanismo efectores, de manera que si éstos actúan en la señal 0 se les denomina Adyuvantes A; si los adyuvantes o inmunomoduladores basan su efecto en la amplificación de la señal 1 se les denominan adyuvantes de tipo B. Mientras que si los adyuvantes son reconocidos por las APCs e inducen el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras se les denomina adyuvantes tipo C (Fig. 5) (Schijns et al. 2001; Guy. 2007; Brunner et al. 2010). Para que se lleve a cabo una respuesta Th es necesaria la presencia de las tres señales en las células presentadoras de antígenos, referidas como las señales 0, 1 y 2; los adyuvantes pueden actuar en alguna de las tres señales para modular la respuesta inmune.

Algunas moléculas agonistas de TLRs, como el Monofosforil Lipid A, pueden ser considerados como los adyuvantes de tipo A, los cuales actúan en la señal 0 y de forma indirecta en la señal 2, al inducir la activación de células presentadoras de antígeno e inducir la secreción de IL-12. Además, los agonistas de TLR pueden actuar sobre la señal 1 favoreciendo la presentación de antígenos administrados. Los adyuvantes que tienen como blanco a las células presentadoras de antígeno y pueden inducir una mejora en la captación de antígenos y en la señal 1, es decir, su efecto está implicado en el mejoramiento de la presentación de antígenos a linfocitos T. Los liposomas, microesferas y algunas emulsiones se encuentran en esta categoría. En algunas ocasiones, la señal 1 no

es suficiente, por lo que es recomendable administrar una molécula inmunomoduladora para inducir una respuesta inmunológica óptima. Este tipo de moléculas se les conoce como adyuvantes tipo C y están involucrados mejorar directamente la señal 2. El adyuvante TNG1412 (anti-CD28) es un ejemplo de adyuvante tipo C. Es importante mencionar que estos compuestos deben ser utilizados con precaución (Fig. 5) (Guy. 2007)

Los adyuvantes pueden tener diferentes propiedades, algunos pueden acarrear o depositar antígenos, otros son inmunoestimuladores y acarreadores, mientras que algunos son considerados inmunoestimulantes. Las sales como el aluminio, las emulsiones y los complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) son conocidos por ser acarreadores e inmunoestimulantes que pueden inducir una respuesta celular mediada por linfocitos T CD8 o mediada por anticuepos (Sanders et al. 2005). En contraste, los liposomas y las micropartículas son acarreadores inertes que pueden ser utilizados para depositar inmunoestimulantes como los ligandos de PRRs o ligandos de TLRs, los cuales dependiendo de su naturaleza son capaces de inducir el desarrollo de una respuesta Th1 o Th2, asimismo pueden ser utilizados para transportar antígenos y cargar a células presentadoras de antígeno (Reddy. 2006).

Para inducir una respuesta antígeno específico, se han utilizado herramientas como los anticuerpos para poder cargar a las CDs de forma específica. Tal es el caso del uso de un anticuerpo que reconoce a CD205, el cual ayuda que un determinado antígeno sea fagocitado por células CD205+, no obstante en el estado basal esta herramienta causa tolerancia (Bonifaz et al. 2002). Para inducir la maduración de las CDs es necesario el uso de un anticuerpo que reconoce a CD40, lo cual induce la estimulación de las señales 0 y 2 (Fig. 5) por lo tanto se induce una activación exitosa de las CDs (Boscardin. 2006).

También se ha estudiado el efecto de agonistas de TLR con el objetivo de activar células presentadoras de antígeno de forma efectiva e inducir una respuesta Th1 antígeno específica. Algunos agonistas son CpGs bacterianos y oligonucleotidos, los cuales son agonistas de TLR9; lipopeptidos los cuales son ligandos de TLR2; así como imidazoquinolinas que son ligandos de TLR7/TLR8 (Kaisho et al. 2002).



### **3.6.1. Adyuvantes e inmunomoduladores utilizados contra el cáncer**

Dado que el éxito de la inmunoterapia con CD<sub>s</sub> no es alto mostrando un rango de eficacia de entre el 9.5% y el 20%, al menos en pacientes con melanoma (Banchereau y Palucka. 2005), se requieren terapias alternativas o en combinación con la administración de CD<sub>s</sub> para aumentar la supervivencia de personas enfermas de cáncer. Por ejemplo, en un estudio de pacientes con melanoma, primero se inhibieron las células Tregs por medio de la administración de ciclofosfamida, y posteriormente los pacientes fueron vacunados con CD<sub>s</sub> maduras con lisados de células tumorales. El resultado de este estudio arrojó el desarrollo de inmunidad en contra del tumor (Berd et al. 1998). Ahora bien, adicionalmente se han utilizado citocinas para inducir un ambiente inflamatorio antes de la llegada de las CD<sub>s</sub>; y, como antes ya se había explicado, la presencia de citocinas inflamatorias induce la migración de CD<sub>s</sub> a los ganglios linfoides, además de que ayudan a la maduración de las CD<sub>s</sub> y a la secreción de otras citocinas (Shankaran et al. 2001). También se ha administrado TNF $\alpha$  antes de la vacunación con CD<sub>s</sub> en personas con melanoma, lo cual indujo su migración a ganglios linfoides; igualmente se ha utilizado IL-2 e IFN $\alpha$ , las cuales inducen la proliferación de linfocitos T y la activación de macrófagos (Banchereau y Palucka. 2005). Aunado a esto, un estudio en pacientes con cáncer renal dio a conocer que IFN $\alpha$  puede inducir el decremento en los niveles de células Tregs (Bracci et al. 2007). IFN $\alpha$  también ha sido usada en vacunas con CD<sub>s</sub> transfectadas con diversos antígenos de melanoma (MAGE A3, gp-100 y tirosinasa), lo que resultó en una respuesta parcial y sólo 5 personas tratadas con este esquema fueron reportadas con enfermedad estable (Wilgenhof et al. 2011); lo cual muestra que sería importante continuar con el estudio acerca del uso de esta citocina en otros tipos de cáncer (Bracci et al. 2007). En relación con el ambiente tolerogénico tumoral, éste ha despertado gran interés en el campo de la inmunoterapia, dado que ahora no sólo se requiere activar al sistema inmune, sino que además se necesita inhibir el ambiente tolerogénico que el tumor pueda inducir. En la actualidad, se está estudiando el uso de anticuerpos anti-CTLA-4 y anti-GITR, los cuales ayudan a la activación del sistema inmune y a la regresión tumoral con muy buenos resultados en personas enfermas de melanoma, cáncer de próstata o de riñón,

por lo que la FDA ha permitido su aplicación (Hodi et al. 2010; Pruitt et al. 2011). Los tumores también pueden secretar altas concentraciones de Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), el cual induce angiogénesis que a su vez está implicada con un aumento de metástasis. Hoy en día se están utilizando medicamentos que inhiben a este factor de crecimiento junto con terapia de CD4 en personas con cáncer renal con resultados satisfactorios (Enomoto. 2011)

Asimismo, se ha tratado de utilizar agonistas de TLRs para inducir un aumento en la respuesta antitumoral. Los TLRs pueden encontrarse en un gran número de células como granulocitos, linfocitos y CD4; en estas últimas los agonistas de TLRs inducen el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras así como la liberación de citocinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, en diversos tipos de cáncer han sido utilizadas moléculas reconocidas por TLRs para inducir no sólo la maduración de CD4 sino la de otros tipos de células relacionadas con la respuesta inmune (Adams. 2009; Lubaroff et al. 2009). En el caso de cáncer de próstata, se han manejado vacunas de CD4 derivadas de médula ósea transfectadas con adenovirus que expresan al antígeno específico prostático (PSA), y cultivadas en presencia de CpG, el cual es un ligando de TLRs. Lo anterior indujo un aumento en la respuesta inmune mediada por linfocitos T CD8 contra el tumor, por lo tanto la adición de CpG ayuda a la presentación antigénica de los péptidos tumorales, lo cual a su vez puede inducir una respuesta específica antitumoral (Lubaroff et al. 2009). En otro estudio se utilizó LPS para inducir aumento en la maduración de las CD4, en el cual personas enfermas con carcinoma fueron vacunadas con CD4 pulsadas con Her2 y activadas con LPS. En este caso se observó regresión tumoral y una respuesta específica a Her2 mediada por linfocitos T (Czerniecki, et al. 2007). Por lo que se ha descrito, los ligandos de TLRs son una alternativa importante para ser utilizados en las vacunas en contra del cáncer; no obstante, es importante elegir perfectamente el agonista que se utilizará en la terapia, dado que existen reportes de vacunas que no han aportado resultados satisfactorios en pacientes; tal es el caso de la administración de ácido poliribonucleico-poliribocitidílico junto con CD4 (Adams et al. 2009). Asimismo, se sabe que los ligandos de TLR2 inducen la formación de Tregs; de tal forma, este tipo de ligando

no debe ser utilizado durante el tratamiento de inmunoterapia contra el cáncer (Palucka et al. 2010).

Por lo tanto, en estos momentos las vacunas de CDs son administradas junto con otro tipo de moléculas, dado que, como ya se mencionó, el uso de un solo tipo de vacunas induce un éxito clínico limitado, puesto que sólo un bajo porcentaje de pacientes han mostrado una regresión tumoral completa y en la mayoría de las ocasiones las personas han manifestado enfermedad estable. A pesar de ello, la continua investigación ha ayudado a conocer que se necesita de moléculas que modulen la respuesta no sólo de los linfocitos T CD8, sino de las demás moléculas y células que componen al sistema inmunitario.

### **3.6.2. Inmunoestimuladores utilizados en la inmunoterapia contra melanoma**

A pesar de que se ha tenido un éxito relativo en la utilización de la inmunoterapia con células dendríticas cargadas con MAGE (se ha observado 20% de regresión del tumor en las personas con melanomas), se ha demostrado que se necesita de diversos inmunoestimuladores que ayuden a incrementar la respuesta inmune en contra de las lesiones tumorales. Hasta ahora se han utilizado citocinas como IFN $\gamma$  e IL-2, (Van der Eertwegh et al. 2006; Zitvogel et al. 2008), LPS (Gabriele et al. 2004) y BCG (Berd et al. 2004), con relativo éxito, sin embargo se ha observado efectos secundarios (Ferrantini et al. 2008) que impiden su empleo de manera continua. Por todo lo anterior, se justifica investigar acerca de otros inmunoestimuladores tales como GK-1, el cual ha sido usado como inmunoestimulante en la vacuna contra la influenza e induce protección contra la cisticercosis sin el uso de adyuvantes. Es entonces que se propone el uso de GK-1 como inmunomodulador de CDs utilizadas en la inmunoterapia antitumoral.

### 3.6.3. GK-1

La cisticercosis ha sido desde hace décadas un problema sanitario, dado que actualmente miles de cerdos están infectados con *Taenia solium*. El grupo de investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas liderado por la Dra. Edda Sciutto mostró que antígenos obtenidos de *Taenia crassiceps* indujeron en algunos cerdos protección contra *T. solium* (Manoutcharian et al. 1996). Posteriormente se identificaron cuatro antígenos inmunodominantes denominados KETc1, 4, 7 y 12, los cuales les conferían a ratones diferentes niveles de resistencia a cisticercosis murina (Manoutcharian et al. 1996). Después se analizó a KETc7 para detectar posibles epítomos inmunológicamente activos, se encontraron tres posibles regiones inmunológicamente activas denominadas GK-1, GK-2 y GK-3 (Gevorkian, et al. 1996). De los tres péptidos contra *T. crassiceps* en ratones, sólo GK-1 indujo protección contra la cisticercosis murina (Toledo et al. 1999). Posteriormente se realizó una vacuna que no sólo contenía GK-1 sino otros dos péptidos más KETc1 y KETc2 (Sciutto et al. 2007). De todos los péptidos utilizados, GK-1 es el que induce una mayor respuesta inmune: se ha observado que GK-1 induce la producción de IFN $\gamma$  por cultivos de esplenocitos (Toledo et al. 1999), mientras que estudios en cerdos han demostrado que la administración de GK-1 induce la liberación de IgGs, IL-2 e IFN $\gamma$  (Díaz et al. 2003). Asimismo, se ha observado que el péptido tiene naturaleza adyuvante dado que sólo la administración de GK-1 indujo protección contra la cisticercosis murina, además cuando se administró GK-1 en conjunto con la vacuna contra la influenza produjo una alta respuesta inmune específica contra antígenos específicos de influenza (Segura Velázquez et al. 2006). Por otro lado, se ha observado que GK-1 inhibe el crecimiento de glioblastoma en ratas Wistar e induce aumento en la expresión de CD40, CD80 y MHCII en células dendríticas derivadas de médula ósea (MOCDs), lo cual se considera resultado del reconocimiento del péptido por TLR-3. (Segura et al 2009), no obstante investigaciones recientes indican que GK-1 posiblemente pueda ser reconocido por receptores tipo Scavenger lo cual posiblemente pueda inducir la liberación de citocinas proinflamatorias (Fragoso et al. 2011). Finalmente, dado las características de GK-1, es posible que su uso

induzca el aumento en la respuesta inmune en contra del melanoma al utilizarse como inmunoestimulador durante la inmunoterapia con CDs cargadas con MAGE-AX.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Varias han sido las alternativas para el tratamiento del melanoma, si bien ha habido regresión tumoral en algunos casos, en la mayoría la terapia inmunológica ha tenido un éxito limitado. En el caso de la inmunoterapia con células dendríticas, es posible utilizar otras herramientas que induzcan el aumento en la respuesta inmune antitumoral, como los inmunoestimuladores. En la actualidad, el estudio de estas moléculas promete que la inmunoterapia sea una mejor herramienta terapéutica contra el cáncer. Por lo tanto, es necesario explorar las características inmuno potenciadoras del péptido GK-1 en las CD, para su posterior utilización en la clínica. Así, el objetivo del presente estudio es utilizar células dendríticas cargadas con proteínas MAGE-AX y estimuladas con el péptido GK-1 como tratamiento contra melanoma de ratón. De manera que la pregunta fundamental de este estudio es: ¿existirá alguna diferencia entre las CD derivadas de médula ósea tratadas con GK-1 y las no tratadas con relación a la capacidad de inducir una mayor respuesta inmune antitumoral, sobrevida y menor tamaño tumoral?

#### **5. HIPÓTESIS**

La administración de células dendríticas derivadas de médula ósea maduras con  $TNF\alpha$ , cargadas con MAGE A-X y tratadas con el péptido GK-1 inducirán un aumento en la respuesta inmune celular contra melanoma, que causará la disminución en el tamaño tumoral y el aumento de la sobrevida de ratones con melanoma.

## **6. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto terapéutico y la respuesta inmune inducida por las células dendríticas derivadas de médula ósea maduras con  $TNF\alpha$  pulsadas con MAGE-AX y tratadas con GK-1 en ratones con melanoma.

### **6.1. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el efecto de GK-1 en CDMO cargadas con MAGE-AX a través de la presencia de marcadores de maduración (MHCII, CD80, CD86 y CD40) y en la concentración de calcio intracelular.
- Evaluar el efecto de las CDMO maduras con  $TNF\alpha$ , cargadas con MAGE-AX y tratadas con GK-1 en el crecimiento de tumores y supervivencia de ratones C57BL/6.
- Analizar los cambios histológicos en melanomas de ratones después de la administración de CDMO maduras con  $TNF\alpha$ , cargadas con MAGE-AX y tratadas con GK-1.
- Evaluar el efecto de las CDMO maduras con  $TNF\alpha$ , cargadas con MAGE AX y tratadas con GK-1 en la respuesta inmune contra el melanoma a través del estudio de las poblaciones de linfocitos T (CD4 y CD8) y las citocinas producidas (IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10)

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### Ratones

Para cada grupo experimental se incluyeron 60 ratones machos C57BL/6 (H2K<sup>b</sup>) de 6 a 8 semanas de edad, mismos que se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad y temperatura controladas, y alimentados *ad libitum* en el Bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

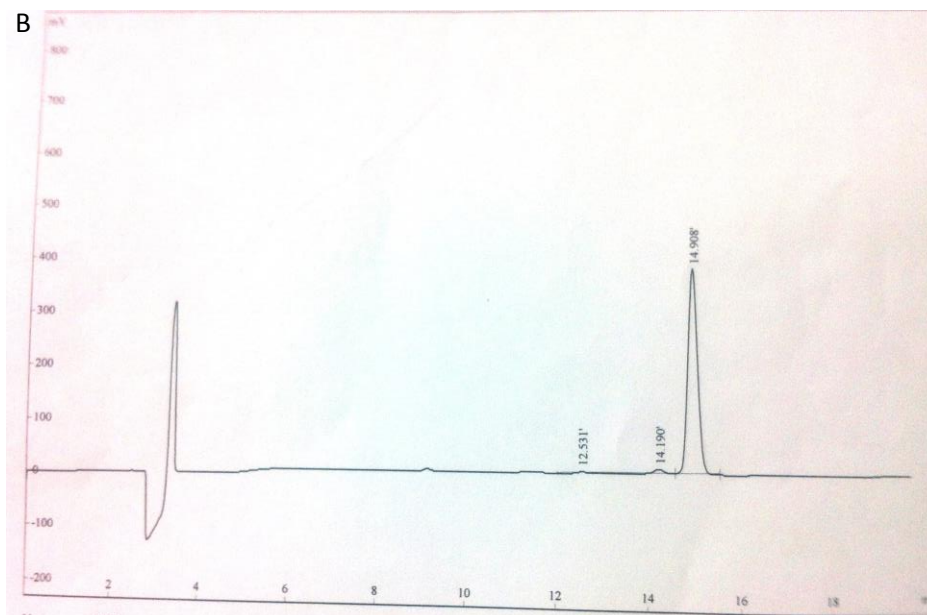
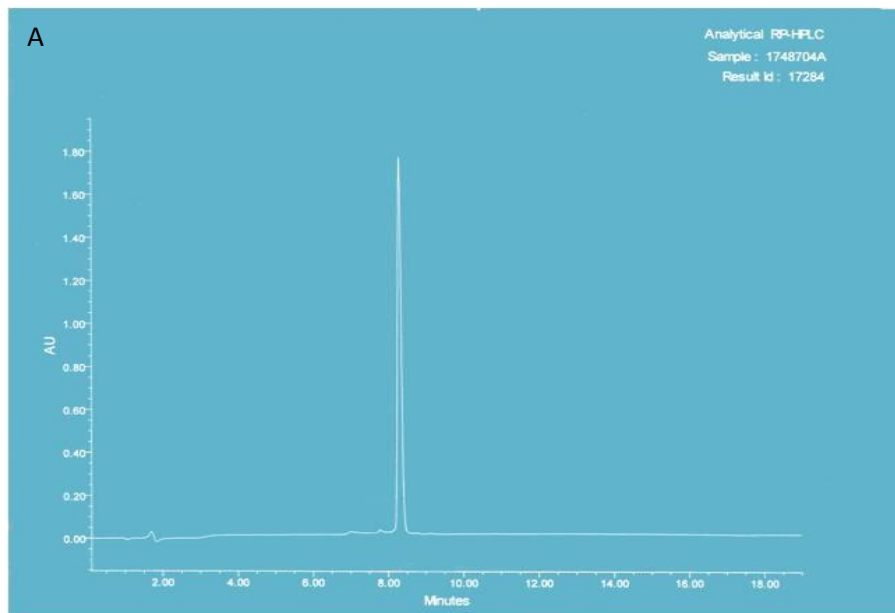
### Reactivos

Los anticuerpos monoclonales para la caracterización de las CDs y linfocitos mediante citometría de flujo fueron: anti-CD3biotina, anti-CD4-aloficocianina, anti-CD8-cycrome, anti-CD11c-aloficocianina, anti-CD40-biotina, anti-CD86-biotina, anti-Ia/Ie-ficoeritrina, anti-IL-12-biotina, anti-IFN $\gamma$ -biotina, anti-IL-4-biotina e anti-IL-10-biotina, fueron hechos en rata y adquiridos en Pharmingen, BD Bioscience, USA. La línea celular B16/F10 de melanoma murino con haplotipo H-2K<sup>b</sup> fue adquirida en The American Type Culture Collection, USA. La línea celular de carcinoma de Ovario de Hamster Chino (CHO) transfectada con el gen del Factor de Crecimiento de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) fue gentilmente donada por la Dra. Edda Sciutto del Instituto de Investigaciones Biomédicas. El medio de cultivo RPMI-1640 y el medio F12 (Ham) fueron adquiridos en GIBCO, USA.

### Péptidos

El péptido MAGE-176 (LGITYDGM) fue sintetizado por Research Genetics (Invitrogen, Leiden, Holanda), con una pureza del 94%. El péptido GK-1 (GYYPSPDPNTFYAPPSA) con una pureza de 96.11% fue sintetizado por Alpha Diagnostics International, San Antonio, Texas (Fig. 6). Ambos péptidos fueron almacenados a -70°C. Mediante el ensayo Limulus Amebocyte Lysate (LAL) de Thermo Lab se corroboró la ausencia de endotoxina bacteriana en ambos péptidos.





**Figura 6. HPLC de MAGE-AX y GK-1. A.** HPLC de MAGE-AX, se observa un elevado grado de pureza en el péptido (94%). **B.** HPLC de GK-1 se observa un grado de pureza de 96.11%.

### **Diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea (MOCDs)**

Para la diferenciación de MOCDs, se utilizó la metodología previamente descrita (Lutz et al. 1999; Inaba et al. 1992) con algunas modificaciones. Se obtuvo el fémur y la tibia de tres ratones C57BL/6, el músculo fue removido y los huesos desinfectados mediante lavados continuos con etanol al 70% por 2 min. Posteriormente para obtener la médula ósea, las epífisis de los huesos fueron removidas y las diáfisis perfundidas con PBS (0.4 g/L fosfato de potasio, 0.726 g/L de fosfato de sodio y 9 g/L de cloruro de sodio, Sigma). Las células de médula ósea fueron inoculadas en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomina (100µg/ml, Sigma), L- glutamina (2mM Sigma), mercaptoetanol (50µM) y 10% de suero bovino fetal (Biowest, USA) en botellas de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> a una concentración de 5 x 10<sup>5</sup> células por ml. El medio completo fue suplementado al 20% con sobrenadante de la línea celular CHO, el sobrenadante contenía aproximadamente 200 U/ml de Factor de Crecimiento de Granulocitos y Macrófagos (GM-SCF). Cada tercer día se reemplazó el medio con RPMI complementado con GM-SCF y al décimo día de cultivo, las células fueron tratadas con 1µg/ml de LPS o 50 ng/ml de TNF $\alpha$  como control, 25mg/ml de MAGE-AX y/o 10 µg/ml GK-1 durante 24 horas, por lo que se formaron los siguientes grupos: 1) sin tratamiento, 2) LPS, 3) TNF $\alpha$ , 4) MAGE-AX, 5) GK-1, 6) TNF $\alpha$ /MAGE-AX, 7) TNF $\alpha$ /GK-1, 8) TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1. El grado de maduración de las MOCDs se evaluó a través de la expresión de moléculas MHCII, CD86, CD80, CD40 por citometría de flujo.

### **Caracterización del fenotipo de MOCDs**

El fenotipo de las CDs se caracterizó mediante citometría de flujo. Las suspensiones celulares fueron teñidas a 4°C con los siguientes anticuerpos: CD11c-aloficocianina, Ia/Ie-isotiocianato, CD40-biotina, CD80-biotina, CD86-biotin, IL-12- biotina. Las MOCDs tratadas con LPS, TNF $\alpha$ , GK-1 y TNF $\alpha$ /GK-1 fueron incubadas con 1µg/ml de Brefeldina A durante 4 horas, posteriormente las células fueron fijadas con el buffer BDCitofix<sup>TM</sup> y permeabilizadas con el buffer BD Perm/Wash<sup>TM</sup> de BD Bioscience, USA. Después las MOCDs fueron teñidas con anti-IL-12 y estreptavidina conjugada con ficoeritrina. Las

muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BD Bioscience FACScalibur y analizadas con el programa Flow Jo.

### **Niveles en la concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular de CDs**

Después de haber cargado a las CDs con MAGE-AX y haberlas estimulado con LPS o GK-1 durante 24hrs, las células fueron teñidas con el colorante FURA-1 e incubadas por treinta minutos a 37 C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente fueron lavadas y colocadas en un fluorómetro del laboratorio de Biomembranas del Departamento de Farmacología para poder analizar su concentración de Ca<sup>++</sup> intracelular.

### **Inducción de melanoma**

Para la inducción de melanoma se inocularon vía subcutánea 60,000 células de la línea de melanoma B16/F10 a cada uno de los 50 ratones C57BL/6 en la región abdominal. Después de una semana de inducción del tumor, se inició la terapia con MOCDs maduras con TNF $\alpha$ , cargadas con antígenos MAGE- AX y tratadas con GK-1.

### **Grupos experimentales y protocolo de inmunización**

Para los distintos tratamientos se formaron cinco grupos de diez ratones cada uno, uno sin tratamiento y 4 recibieron inoculación subcutánea de  $1 \times 10^6$  MOCDs maduras con TNF $\alpha$  y estimuladas o no con GK-1 y cargadas o no con MAGE-AX como a continuación se describe: 1) 300 $\mu$ l de PBS (Sin tratamiento), 2) MOCDs/ TNF $\alpha$ , 3) MOCDs/ TNF $\alpha$ / MAGE-AX, 4) MOCDs/ TNF $\alpha$ / GK-1 y 5) MOCDs/ TNF $\alpha$ / MAGE-AX/ GK-1. El tratamiento fue administrado una vez por semana durante tres semanas, después de haber realizado diferentes protocolos de inmunización y curvas de concentración de células.

### **Sobrevivencia de los ratones con melanoma y determinación del tamaño del tumor**

Desde el momento en que los grupos de ratones recibieron los distintos tratamientos, se registró la supervivencia de los ratones y se midió cada dos días el diámetro mayor de los tumores utilizando un Vernier.

### **Evaluación de cortes de melanoma teñidos con hematoxilina y eosina por microscopía fotónica**

Para la evaluación histopatológica de los melanomas siguiendo los procedimientos previamente descritos (Kumar et al. 2010), los tumores disectados fueron fijados en solución de Zamboni (Solución saturada de ácido pícrico y formol amortiguado 4%) durante 24 horas. A continuación los tumores fijados fueron incluidos en parafina. Posteriormente, se realizaron hasta 10 cortes histológicos de aproximadamente 5 $\mu$ m cada uno, que fueron teñidos con hematoxilina y eosina para su estudio histopatológico. El registro del estudio histológico fue realizado mediante fotomicrografías que mostraban un área de 1,093,456.9  $\mu^2$ , es importante mencionar que fueron tomadas fotomicrografías en la totalidad del área de cada uno de los 10 cortes histológicos, con un objetivo de 20x en un microscopio Nikon Eclipse 80i. Para obtener el porcentaje del área de muerte celular en cada fotomicrografía, se registró el área de muerte celular (regiones acidófilas con abundantes células con núcleo picnótico) por medio del programa Motic Images Plus 2.0.

### **Caracterización del perfil de citocinas en linfocitos de ganglio poplíteo y bazo de los ratones con melanoma**

Con el propósito de identificar el tipo de respuesta inmune, el ganglio poplíteo y el bazo de los ratones fueron disectados y posteriormente disgregados con la ayuda de una malla con un tamaño de poro de 200 $\mu$ m, con el objetivo de separar los linfocitos del tejido conjuntivo y obtener una solución rica en linfocitos.  $1 \times 10^6$  células/ml del ganglio poplíteo y los bazos de los grupos de ratones con distintos tratamientos fueron estimuladas con 25mg/ml de MAGE-AX durante 5 días (Clay et al. 2001), a continuación los cultivos fueron tratados con 1 $\mu$ g/ml de Brefeldina A (BD Bioscience, USA) durante 5 horas. Posteriormente, las células fueron teñidas a 4°C con anti-CD3 biotina, anti-CD4-alofococianina, anti-CD8-cycrome y estreptavidina- isotiacianato, luego fijadas con el buffer BDCitofix<sup>TM</sup> y permeabilizadas con el buffer BD Perm/Wash<sup>TM</sup>, todos de BD Bioscience. USA. Finalmente las células fueron teñidas con los anticuerpos anti-IL-4 biotina, anti-IFN $\gamma$  biotina, anti-IL-10 biotina y estreptavidina conjugada con ficoeritrina (BD

Bioscience. USA). Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo BD Bioscience FACScalibur y analizadas en el programa Flow Jo.

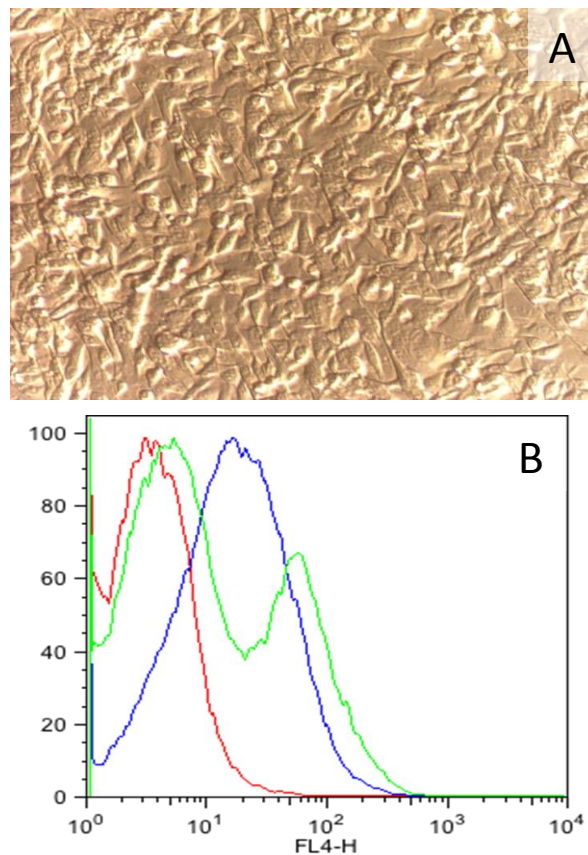
### **Análisis Estadístico**

Se realizó un ensayo ANOVA y luego una prueba de Tukey para evaluar la significancia del efecto de los diferentes tratamientos realizados. Una  $P < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa. Todos los análisis fueron realizados en el programa GraphPad Prim 6 y las gráficas con el programa Sigma Plot 12.3.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Expansión de células B16F10

Las células B16F10 fueron expandidas con medio RPMI 1640 hasta confluencia. Posteriormente, las células fueron tripsinadas y utilizadas para la posterior inducción de tumores en ratones C57BL/6. En relación con su morfología, las células se caracterizan por ser fusiformes y sin patrón de ordenamiento en la caja (Fig. 7A). Asimismo, se constató la expresión de Moléculas Clase I (MHCI) en las células tumorales mediante citometría de flujo. Se corroboró que las células fueran positivas a MHCI (Fig. 7B), para constatar que las células tumorales pudieran presentar antígenos a los linfocitos T CD8.



**Figura. 7. A. Morfología y fenotipo de las células de melanoma B16F10.** Las células son alargadas y crecen sin un orden establecido. **B.** Histograma de la expresión de moléculas clase I en las células B16F10. Se observa que las células B16F10 son positivas a MHCI. Línea roja: control de isotipo. Línea verde: esplenocitos de ratones C57BL/6. Línea azul: células de la línea B16F10.

## **8.2. Obtención del sobrenadante de células CHO como fuente de Factor de Crecimiento de Granulocitos y Macrófagos**

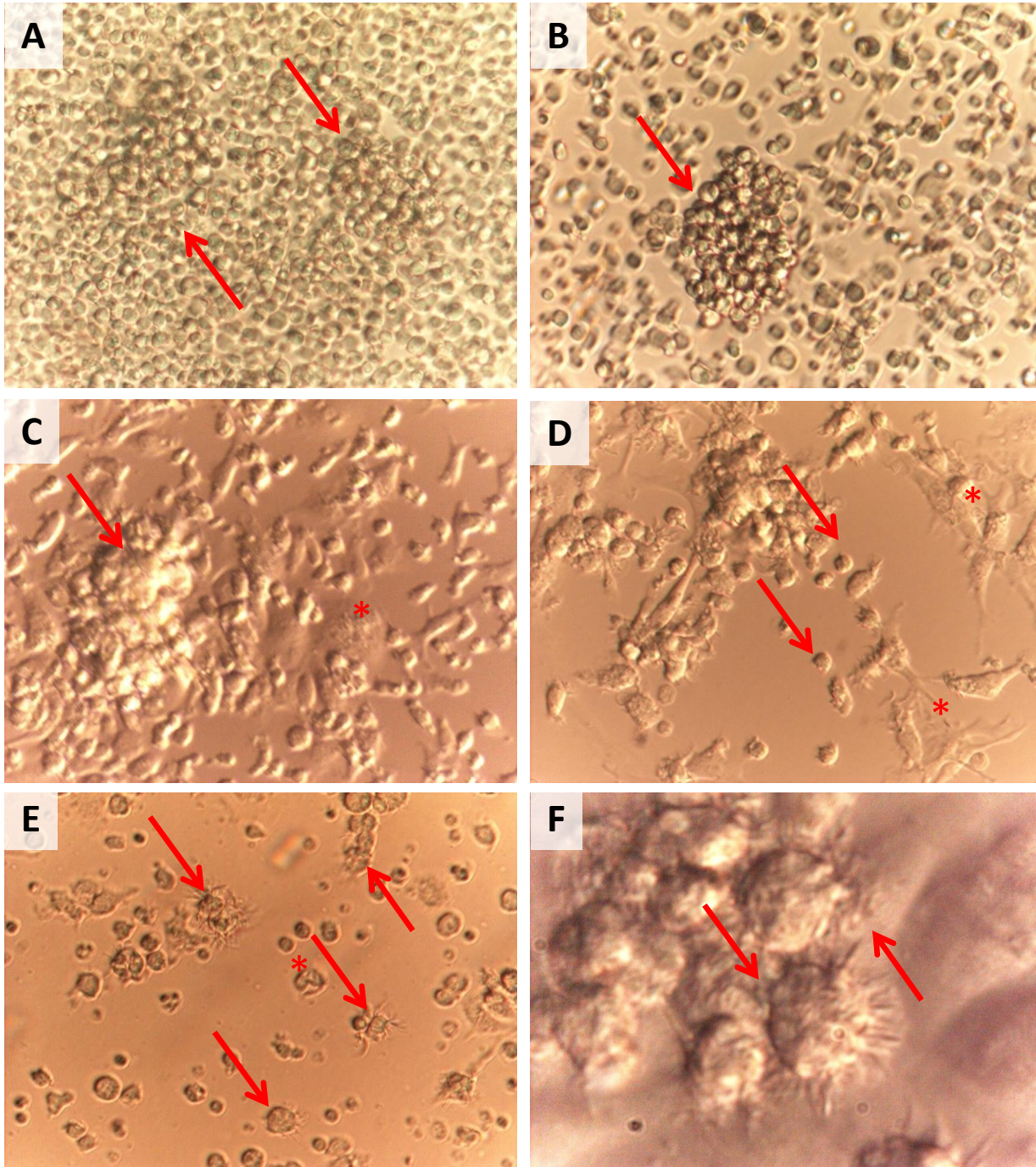
Se realizó la expansión de la línea celular CHO transfectada con el gen murino del GM-CSF, posteriormente se obtuvo el sobrenadante de los cultivos como fuente de GM-CSF, el cual fue utilizado para inducir la diferenciación de células dendríticas derivadas de médula ósea *in vitro*.

## **8.3. Estudios *In vitro***

### **8.3.1. Diferenciación y caracterización de CDs a partir de células precursoras de médula ósea**

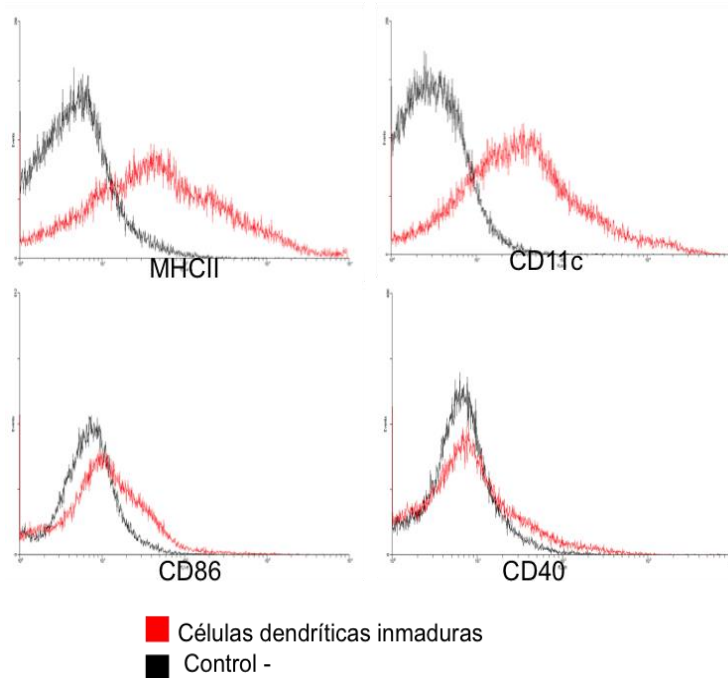
Las células precursoras de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron sembradas con GM-CSF al 20% durante 10 días. Los primeros días se observó que se encontraban dos poblaciones celulares: células adherentes denominadas células estromales, y células semiadherentes hematopoyéticas que formaban cúmulos por arriba de las células adheridas a la caja (Fig.8 B, C y D). Aproximadamente en el día 6 de cultivo, las células semiadherentes se desprenden y cambian su morfología al presentar abundantes extensiones citoplásmicas. Al día 10 de cultivo aproximadamente el 90% de las células presentaban la morfología antes mencionada (Fig.8 E, F)

Posteriormente al día 10 de cultivo las CDs fueron teñidas con anticuerpos anti- CD11c y anti- Moléculas Clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad para conocer el grado de diferenciación inducido por el sobrenadante obtenido del cultivo de células CHO. Mientras que para conocer el grado de maduración de las CDs las células también fueron teñidas con anti- CD86 y anti- CD40. Se observó que aproximadamente el 90% de las células fueron CD11c, MHCII+, además de poseer bajos niveles de CD86 y CD40 (Fig. 9), fenotipo característico de CDs diferenciadas e inmaduras.



**Figura 8. Cultivos de células de médula ósea suplementado con GM-CSF.** **A** Cultivo al día 1, se observa como las células semiadherentes empiezan a formar cúmulos (flecha). **B y C.** Cultivo de 5 y 7 días respectivamente, se observa como las células semiadherentes forman cúmulos (flecha) y las células adherentes al fondo de la caja (\*). **D y E.** En D se aprecian las células adherentes en el fondo de la caja y en E se ven las células dendríticas libres en el medio de cultivo (flecha). **E.** Se observan células dendríticas semiadheridas al cúmulo de células (flecha).



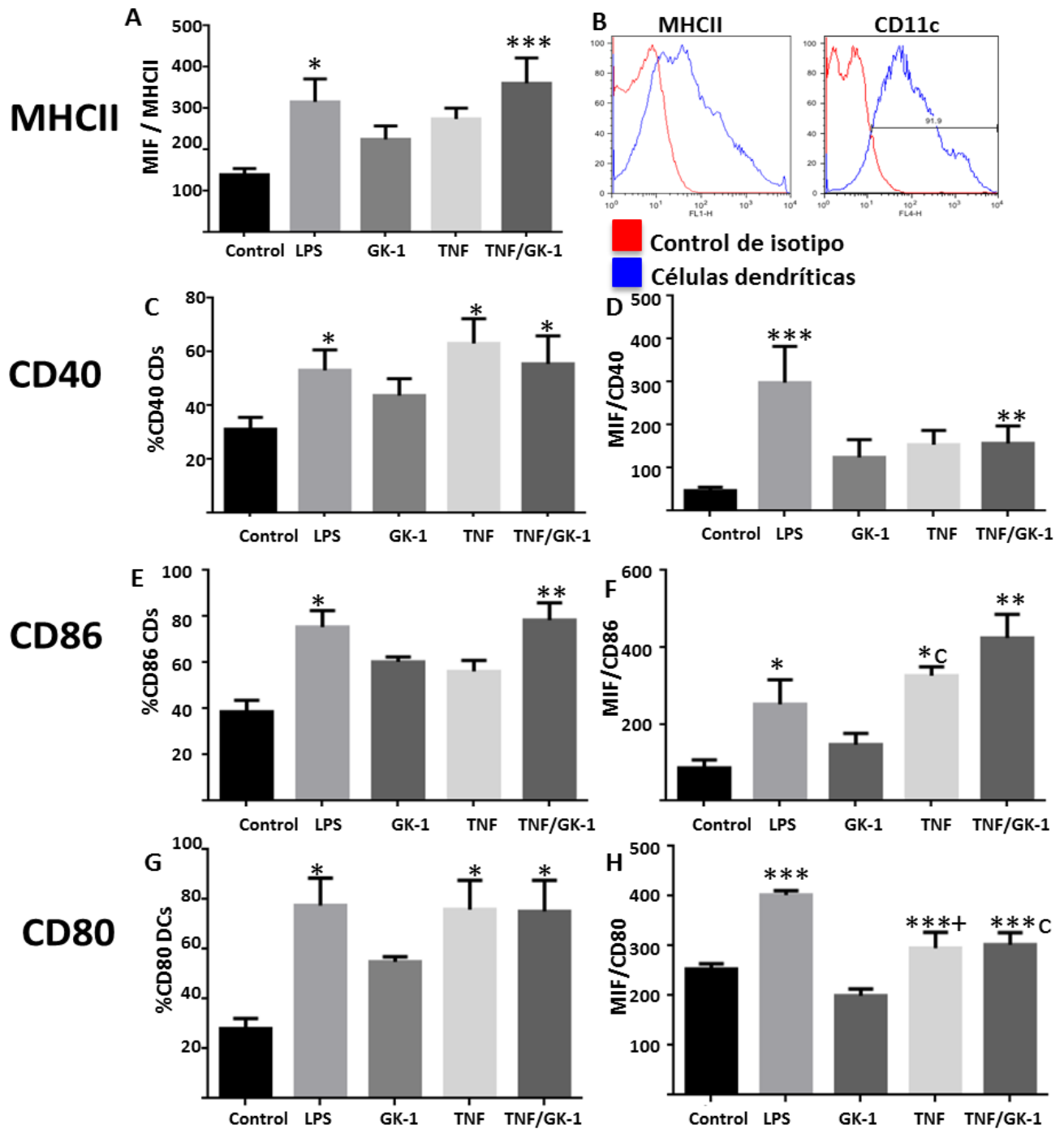


**Figura 9. Fenotipo de las MOCDs después de diez días de cultivo.** Se puede observar que las células se caracterizaron por ser MHCII+, CD11c+, CD86low y CD40low.

### 8.3.2. Efecto de GK-1 en la maduración de las CDs

#### 8.3.2.1. GK-1 induce aumento en la expresión de CD86 en las MOCDs

Después que las MOCDs fueron diferenciadas, y para corroborar el efecto de GK-1 en la maduración, las MOCDs fueron tratadas con GK-1,  $TNF\alpha$  o  $TNF\alpha/GK-1$ . El tratamiento con GK-1 indujo un ligero aumento en la expresión de MHCII, CD40, CD80 y CD86, sin embargo sólo la adición de  $TNF\alpha$  indujo un incremento significativo (Fig. 10). Además, se analizó si GK-1 podía inducir cambios en el porcentaje de MOCDs positivas a MHCII, CD40, CD80 y CD86. El comportamiento de los grupos de CDs con diferentes tratamientos fue semejante tanto en el porcentaje de células positivas a MHCII y moléculas coestimuladoras como en la media de intensidad de fluorescencia (MIF). El estímulo con  $TNF\alpha$  o  $TNF\alpha/GK-1$  generó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de MOCDs positivas a las moléculas MHCII, CD40, CD80 o CD86 (Fig.10).

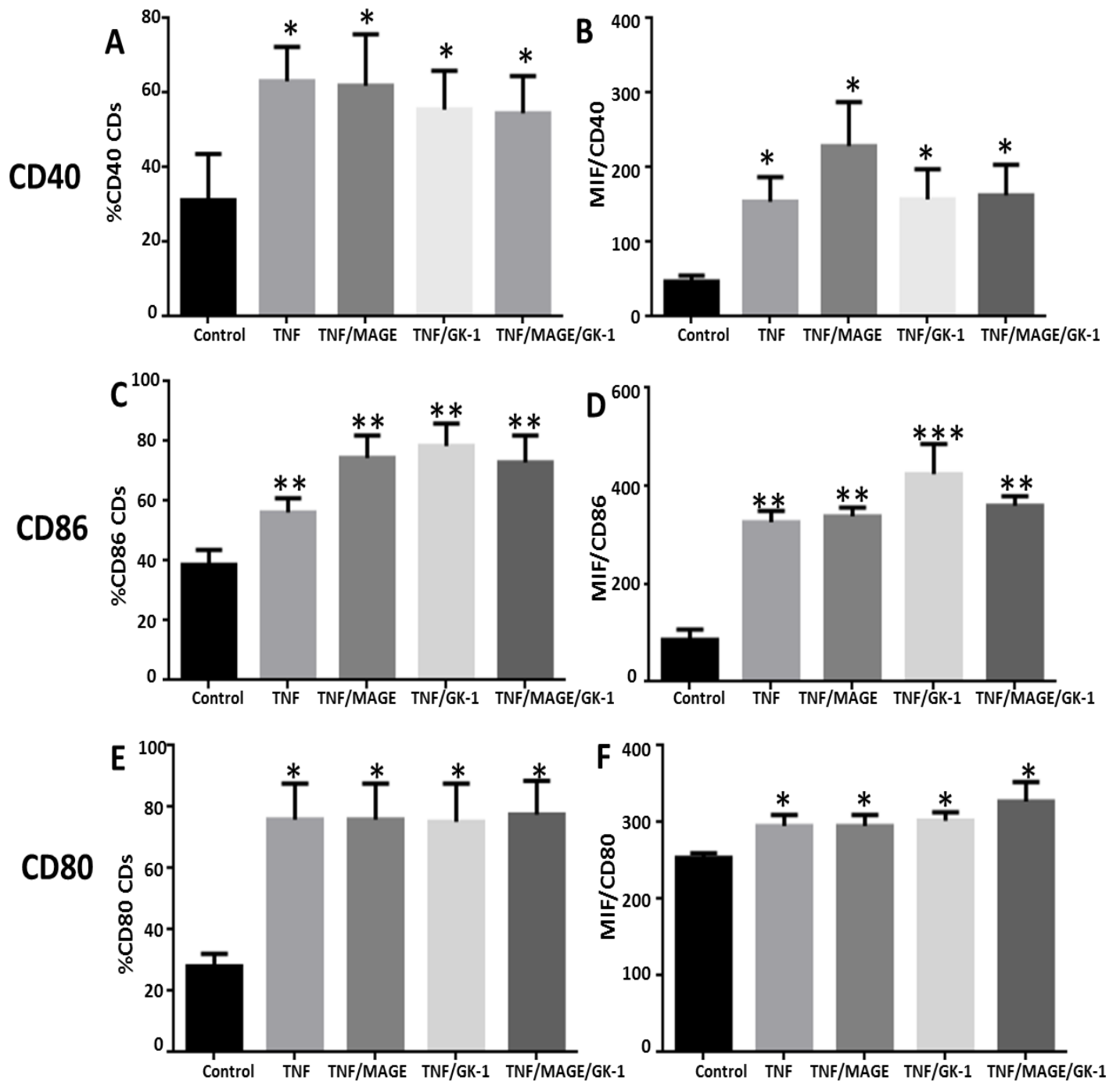


**Figura 10. Fenotipo de las MOCDs después del tratamiento con LPS, GK-1, TNF $\alpha$  y TNF $\alpha$ /GK-1. A.** Media de intensidad de fluorescencia (MIF) de MHCII, CD40, CD80 e CD86 en MOCDs con diferentes tratamientos: Control (sin tratamiento), LPS, GK-1, TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1. El tratamiento con LPS, TNF $\alpha$  y TNF $\alpha$ /GK-1 induce el incremento en la expresión de MHCII, CD40, CD80 y CD86. **A** Media de intensidad de Fluorescencia (MIF) de MHCII. \*P<0.05, \*\*\*P< 0.001. **B.** Fenotipo de las MOCDs después de 10 días de diferenciación. Se indujo el 91.9% de diferenciación (91.9% de células CD11c+). Las MOCDs expresaban una mediana concentración de MHCII. Rojo. Control de isotipo. Azul.

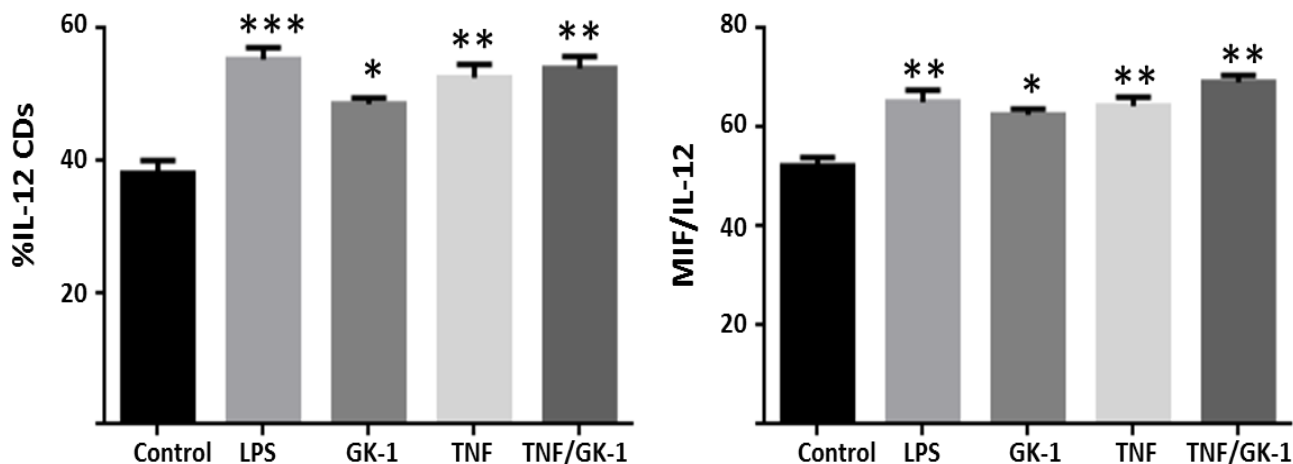
MOCDs. **C.** Porcentaje de MOCDs CD40+. \*P<0.05. **D.** MIF de CD40 en MOCDs. \*\*P<0.001, \*\*\*P< 0.0001. **E.** Porcentaje de MOCDs CD86+. \*P< 0.05. **F.** MIF de CD86 en MOCDs. \*<0.05, \*\*P<0.001, cP< 0.05 vs GK-1 **G.** Porcentaje de MOCDs CD80+. \*P<0.05. **H.** MIF de CD80 en MOCDs. \*\*\*P<0.0001, c P<0.001 TNF $\alpha$ /GK-1, +P<0.0001 TNF $\alpha$  vs GK-1.

Se empleó MAGE-AX como antígeno tumoral para inducir una respuesta específica contra el melanoma, por lo que también se verificó si la exposición a MAGE-AX podría inducir algún cambio en la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras. El tratamiento con MAGE-AX a las MOCDs maduras con TNF $\alpha$  y cultivadas con o sin GK-1 no mostró cambios significativos en la MIF de moléculas coestimuladoras ni en el porcentaje de MOCDs positivas a esas moléculas (Fig. 11).

Para evaluar la producción de IL-12 en MOCDs, las células obtenidas fueron tratadas con TNF $\alpha$ , GK-1 o TNF $\alpha$ /GK-1 durante 24 horas, posteriormente se incubaron con Brefeldina A durante 5 horas y finalmente se determinó la producción de IL-12. Se constató el aumento en la expresión y en el número de células positivas a IL-12 en los grupos de células estimulados con TNF $\alpha$ , GK-1 o TNF $\alpha$ /GK-1 en comparación con el grupo control. Es importante mencionar que la producción de IL-12 por MOCDs tratadas con GK-1 fue la misma que las MOCDs tratadas con TNF  $\alpha$  (Fig. 12).



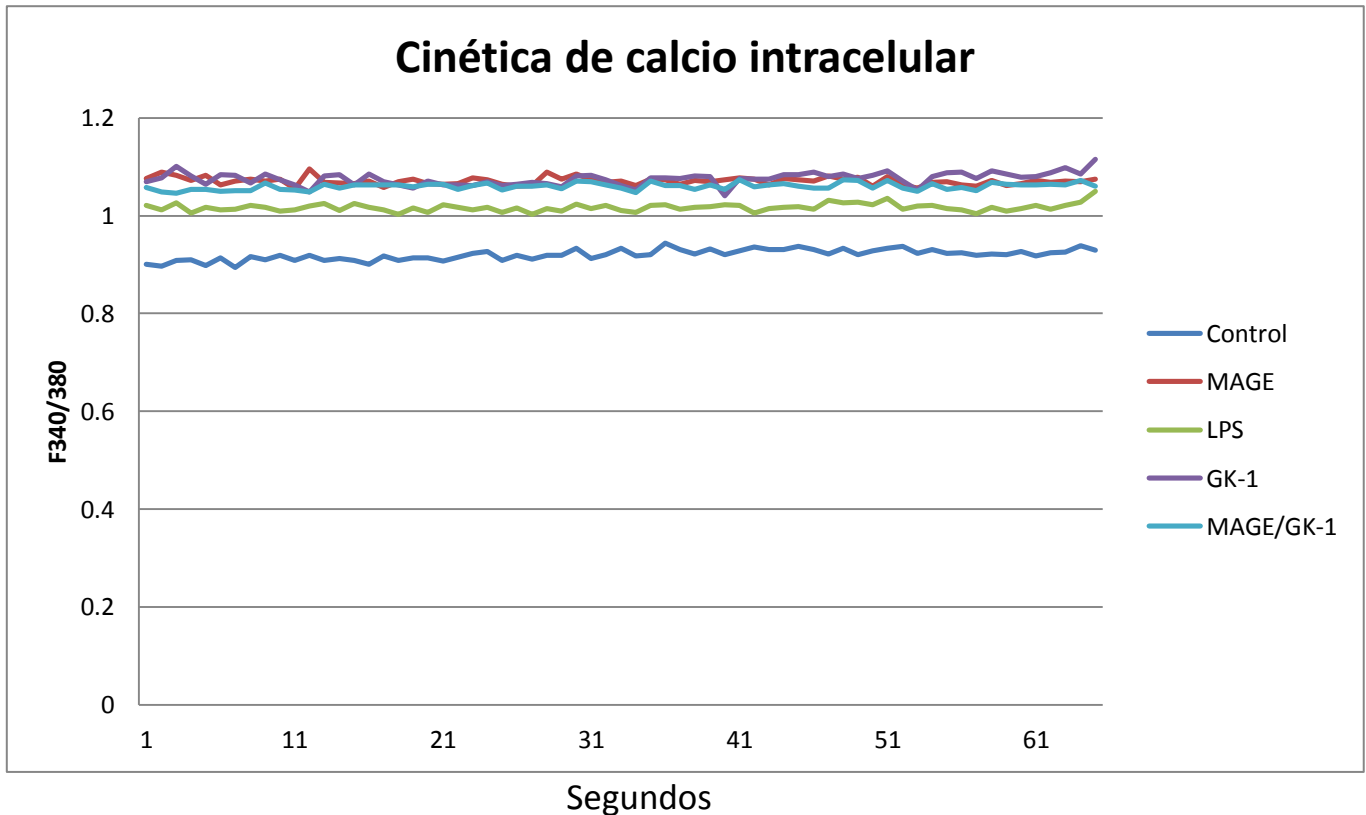
**Figura 11. Efecto del GK-1 y/o MAGE-AX con TNF $\alpha$  en el fenotipo de las MOCDs.** Tratamiento con MAGE-AX no indujo cambios en el fenotipo de las MOCDs (A). Porcentaje de MOCDs CD40+. \*P<0.05. (B). MFI de CD40 en MOCDs. \*P<0.05. (C). Porcentaje de MOCDs CD86+. \*\*P<0.001. (D). MFI de CD86 en MOCDs. \*\*P<0.05, \*\*\*P<0.001. (E). Porcentaje de MOCDs CD80+. \*P<0.05. (F). MFI de CD80 en MOCDs. \*P< 0.05. Media  $\pm$  SEM  $n \geq 3$ .



**Figura 12. Producción de IL-12 en las MOCDs.** Niveles de IL -12 fueron medidos después de diferentes tratamientos: Control, LPS, GK- 1, TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1. Todos los tratamientos indujeron aumento en el número de células IL-12+ así como en la MIF de IL-12. GK-1 induce la producción de IL-12 tanto como TNF $\alpha$  y LPS. **A.** Percentage of IL-12+ MOCDs. **B.** MFI of IL -12 in MOCDs. \*P< 0.05, \*\*P<0.001, \*\*\*P< 0.0001 Media  $\pm$  SEM n $\geq$  3.

### 8.3.2.2. GK-1 induce aumento en la concentración de calcio intracelular de MOCDs

Además de estudiar el fenotipo de las CDs después de haber sido estimuladas con GK-1 y/o MAGE-AX, se estudió el cambio en la concentración de calcio intracelular después de estimular a las CDs con LPS, GK-1, MAGE-AX y MAGE-AX/GK-1. Se conoce que el aumento en la concentración de calcio intracelular da a conocer de forma indirecta, el grado de maduración de las CDs. Al igual que lo observado con las moléculas coestimuladoras, los grupos GK-1, MAGE-AX y MAGE-AX/GK-1 mostraron niveles similares de calcio intracelular, no obstante los mismos grupos mostraron mayores niveles de calcio en comparación con el grupo control y el grupo LPS (Fig. 13). Lo anterior es muy importante, dado que se ha observado que las CDs con altas concentraciones de calcio muestran una mejor activación, migración y producción de IL-12.



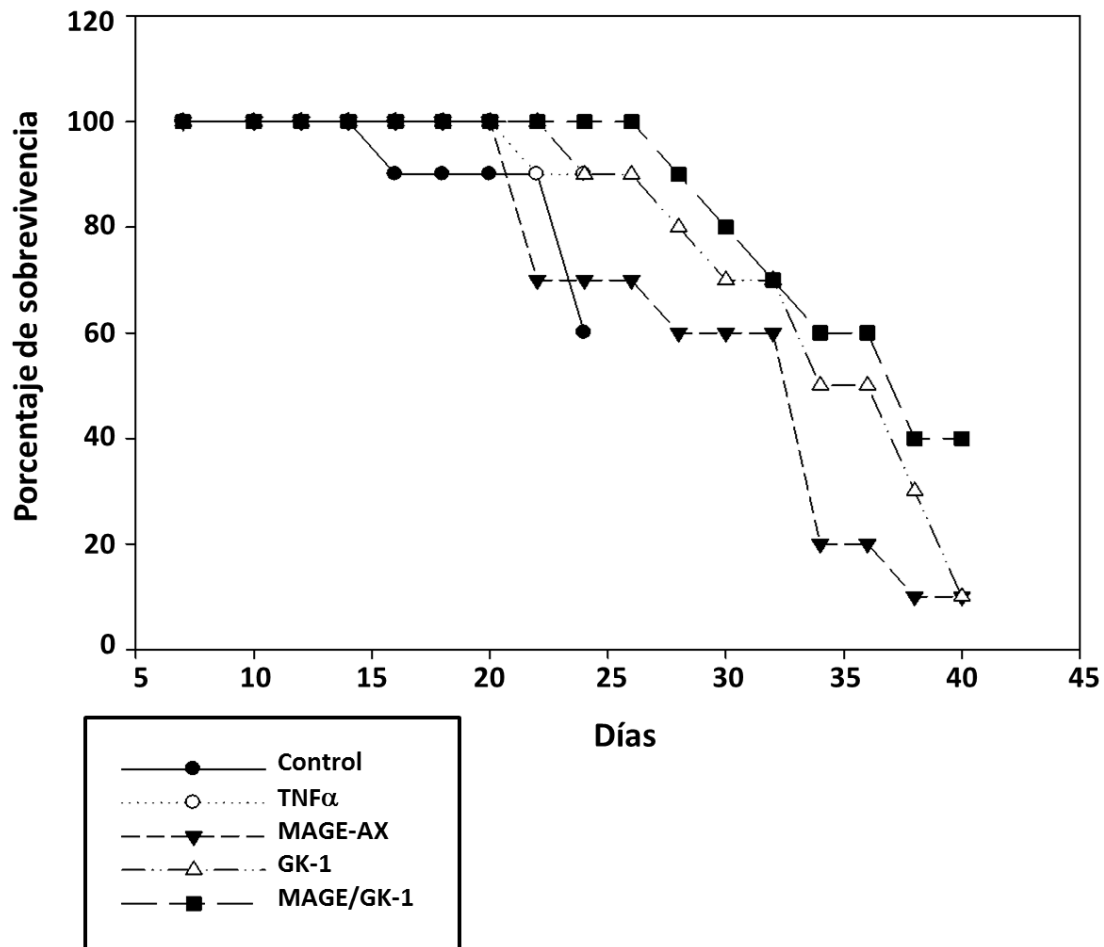
**Figura 13. Concentración de calcio intracelular en las MOCDs.** Los grupos MAGE-AX, GK-1 y MAGE-AX/GK-1 mostraron niveles parecidos de calcio intracelular. El grupo LPS mostró mayor concentración de calcio que el grupo control.

#### 8.4. Estudios *in vivo*

##### 8.4.1. Sobrevida y tasa de crecimiento tumoral en ratones tratados con MOCDs

Todas las MOCDs utilizadas en la inmunoterapia fueron maduras con  $\text{TNF}\alpha$  y tratadas con 1) GK-1, 2) MAGE o 4) MAGE-AX/GK-1. La terapia con las MOCDs inició una semana después de inocular  $6 \times 10^5$  células B16F10. Los ratones que recibieron las MOCDs tratadas con MAGE-AX y GK-1 mostraron la mayor sobrevida en relación con los grupos control. Los ratones que no recibieron terapia así como los que recibieron las MOCDs/ $\text{TNF}\alpha$  mostraron la menor supervivencia (100% de muerte a los días 24-25). 10% de los ratones tratados con MOCDs con  $\text{TNF}\alpha$ / MAGE-AX o GK-1 sobrevivieron a los 40 días después de haber sido inoculados con melanoma, alcanzando 100% de muerte entre los días 41-45. En contraste el 40% de los ratones que recibieron el tratamiento con las

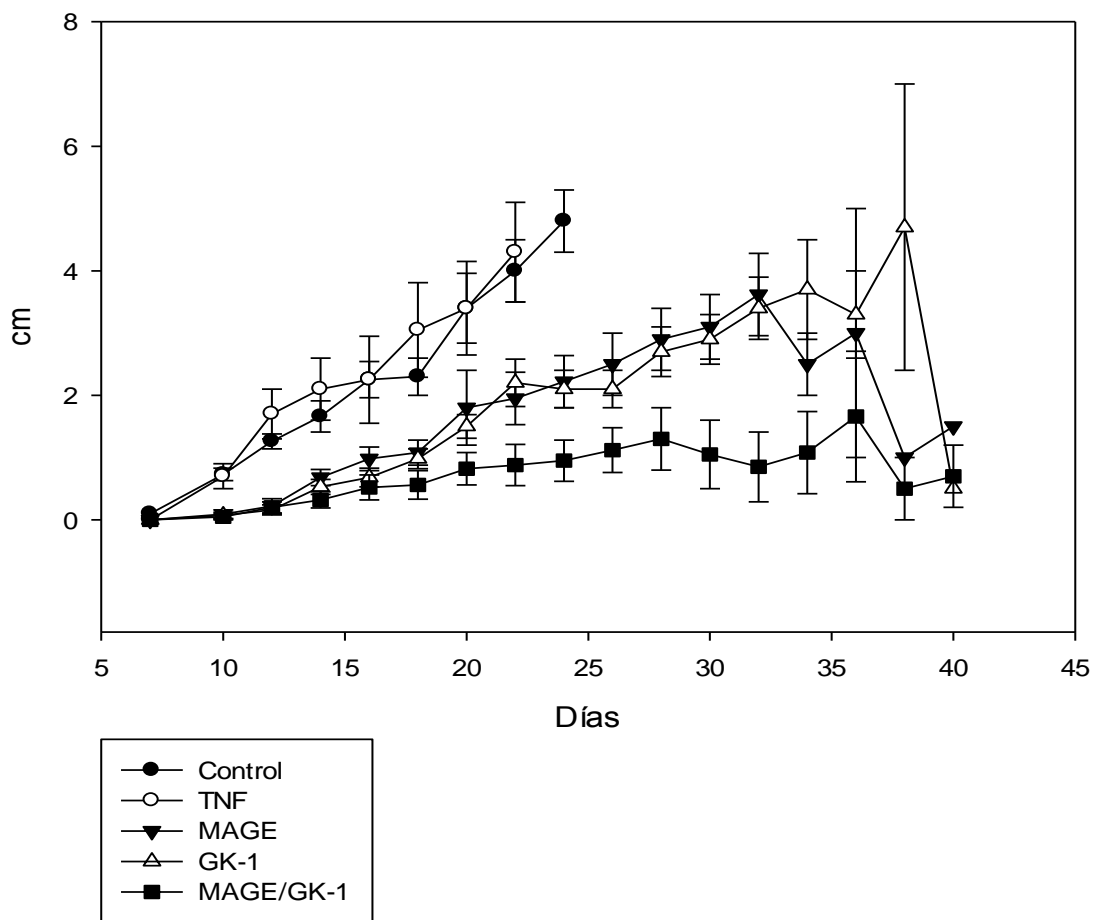
MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 alcanzaron una supervivencia del 40% 1.5 años después de haber sido inoculados con melanoma (Fig. 14). Es importante destacar que estos ratones tuvieron regresión tumoral después del tratamiento.



**Figura 14. Supervivencia de ratones con melanoma inoculados con las MOCDs.** EL grupo MAGE-AX/GK-1 fue el que mostró un mayor nivel de supervivencia: 40% 1.5 años después de haber sido inoculados con las MOCDs. Le siguen los grupos GK-1, MAGE-AX, TNF $\alpha$  y el grupo control.

Por otro lado, el diámetro mayor de los tumores fue medido cada dos días. Los grupos tratados con MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX o GK-1 mantuvieron un tamaño similar durante todo el tratamiento, mientras que los ratones sin tratamiento así como los inoculados con MOCDs/TNF $\alpha$  mostraron una mayor tasa de crecimiento tumoral en comparación con los

demás grupos. Es importante hacer notar que el grupo de ratones que recibió MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 conservó la menor tasa de crecimiento tumoral desde que inicio del tratamiento (Fig. 15).



**Figura 15. Diámetro mayor de los tumores de ratones C57BL/6.** Tamaño tumoral de los ratones inoculados con MOCDs maduras con TNF $\alpha$  y tratadas con MAGE-AX, GK-1 o MAGE-AX/GK-1. Desde el día 22 al 24 el grupo tratado con MAGE/GK-1 MOCDs mostró menor crecimiento tumoral en comparación con todos los grupos. Desde el día 26, no se observa crecimiento tumoral en el grupo TNF $\alpha$  y el grupo sin tratamiento, debido a que la tasa de supervivencia fue 0%. El crecimiento tumoral de los grupos MAGE-AX y GK-1 fue similar. Media  $\pm$  SEM n $\geq$ 3. \*P<0.05 MAGE/GK-1 vs MAGE, ^P<0.05 MAGE/GK-1 vs GK-1, +P<0.001MAGE/GK-1vs TNF,  $\alpha$ P<0.001 MAGE/GK-1 vs WT.



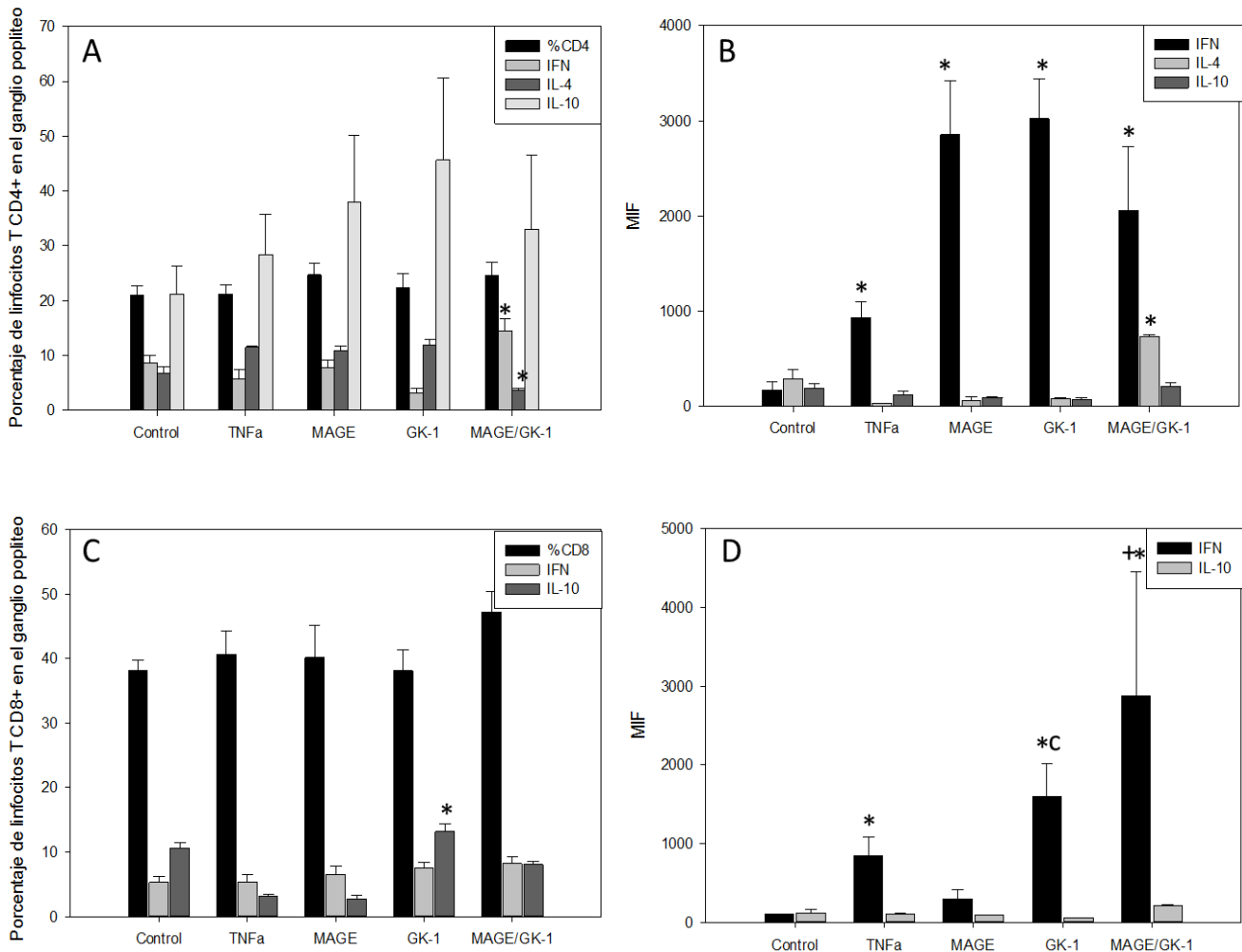
#### **8.4.2. Efecto de la administración de las CDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE-AX en linfocitos de ganglio poplíteo y bazo de ratones con melanoma.**

##### **8.4.2.1. Las MOCDs estimuladas con GK-1 indujeron un aumento el porcentaje de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$ +, así como en la producción de IFN $\gamma$ tanto en los linfocitos CD4 como en los CD8 del ganglio poplíteo**

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4 o CD8 en el ganglio poplíteo de los ratones con melanoma, sin embargo si se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células T CD4 IFN $\gamma$ + en el grupo MOCDs TNF $\alpha$ / MAGE-AX/ GK-1 en comparación con todos los grupos (Fig. 16A). En cuanto a la producción de citocinas, en el caso de IFN $\gamma$ , los linfocitos T CD4 mostraron una mayor producción de IFN $\gamma$  en los grupos que recibieron MOCDs estimuladas con TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1 y TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 en comparación con el grupo control, aunque los grupos MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX, GK-1 y MAGE-AX/GK-1 tuvieron mayor producción de IFN $\gamma$  que el grupo MOCDs TNF $\alpha$  (Fig. 16B). En los linfocitos T CD8, los grupos TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1 y TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 revelaron mayor producción de IFN $\gamma$  en comparación con el grupo control y MOCDs TNF $\alpha$ / MAGE-AX, no obstante los grupos tratados con MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 y TNF $\alpha$ /GK-1 tuvieron mayor producción de IFN $\gamma$  que el grupo MOCDs TNF $\alpha$  (Fig. 16D).

En el caso de IL-4, el grupo tratado con MOCDs TNF $\alpha$ / MAGE-AX/GK-1 tuvo el porcentaje más bajo de linfocitos T CD4 IL-4+ en comparación con todos los grupos (Fig. 16A), sin embargo demostró la mayor MIF de IL-4 en comparación con los demás tratamientos (Fig. 16B). Por último, en el caso de IL-10 los linfocitos de los ratones inoculados con MOCDs tratados con GK-1 mostró un aumento significativo en el porcentaje de células T CD8 IL-10+ en comparación con los grupos MOCDs estimulados con TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1 y TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 (Fig. 16C). No se observaron cambios en la MIF IL-10 en los linfocitos T CD8+ o CD4+ ni el porcentaje de linfocitos T CD4 IL-10+ (Fig. 16B y 16D). Es importante destacar que tanto en los linfocitos T CD4+ como en los CD8+ la síntesis de

IFN $\gamma$  fue mayor (Fig. 16B y 16D) en comparación con las demás citocinas, a pesar que el grupo tratado con MOCDs TNF $\alpha$ /GK-1 demostró un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos T CD8 IL-10+ (Fig. 9C) y el grupo MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 indujo aumento en la producción de IL-4 en comparación con los demás grupos (Fig. 16B).



**Figura 16. Perfil de citocinas en los linfocitos T CD4 o CD8 de ganglio poplíteo.** Porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8, así como la producción de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en ganglio poplíteo de ratones con melanoma inoculados con MOCDs maduras con TNF $\alpha$  y tratadas con MAGE-AX, GK-1 o MAGE-AX/GK-1. Los ratones tratados con MOCDs MAGE-AX/GK-1 mostraron un incremento en los niveles de IFN $\gamma$  en linfocitos CD8+. **A.** Porcentaje de linfocitos T CD4 totales y productores de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10. \*P<0.05, \*\*P< 0.001. **B.** MIF de IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 en linfocitos T CD4. \*P<0.05, \*\*P<0.001. **C.** Porcentaje de linfocitos T CD8

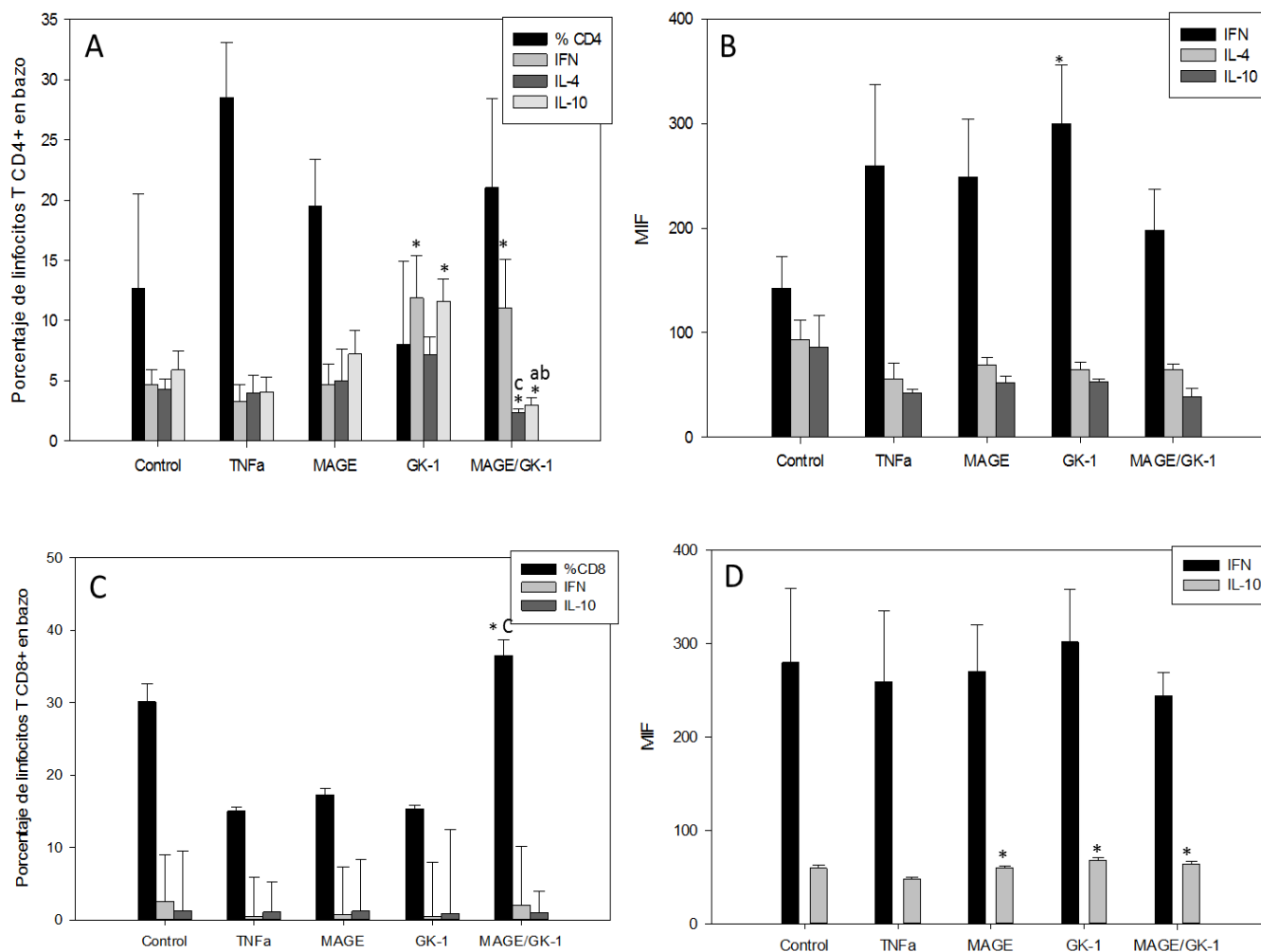
totales, y productores de IFN $\gamma$  e IL-10. \*P<0.05 GK-1 vs todos los grupos. **D.** MFI de IFN $\gamma$  e IL-10 en linfocitos T CD8. \*P<0.05, c P<0.05 GK-1 vs MAGE, +P<0.05 MAGE/GK-1 vs MAGE. Media $\pm$  SEM n $\geq$ 3.

#### **8.4.2.2. Las MOCDs estimuladas con GK-1 inducen aumento en la proliferación de linfocitos T CD8+ y producción de IFN $\gamma$ en bazo de ratones con melanoma**

Para conocer el mecanismo de acción de las MOCDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE AX, los bazos y el ganglio poplíteo de los ratones con melanoma que recibieron la terapia fueron removidos. Las células totales de bazo fueron cultivadas con MAGE-AX durante 5 días; y se analizó los niveles de linfocitos T CD4+ o CD8+ y el nivel de expresión de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10.

La respuesta observada fue diferente entre el bazo y el ganglio. En el bazo se encontró un aumento en la proliferación de linfocitos T CD8+ en el grupo que recibió MOCDs MAGE-AX/GK-1 (Fig 17C), aunque en relación con la producción de citocinas en los linfocitos T CD8, se observó una mayor producción de IL-10 en los grupos MOCDs MAGE AX, GK-1 y MAGE-AX/GK-1 que en el grupo TNF $\alpha$ . No obstante, es importante mencionar que, la producción de IFN $\gamma$  en todos los grupos fue mayor que la de IL-10 (Fig. 17D). En relación con los linfocitos T CD4+ se encontraron diferencias en los grupos GK-1 y MAGE-AX/GK-1 (Fig. 17A y B). En relación con el porcentaje de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$ +, los grupos que recibieron MOCDs tratadas con TNF $\alpha$ , MAGE-AX y MAGE AX/GK-1 mostraron el mayor porcentaje en comparación con los otros grupos (Fig. 17A); la media de intensidad de fluorescencia de IFN $\gamma$  mostró una tendencia positiva, aunque sólo el grupo que recibió MOCDs GK-1 mostró un cambio significativo (Fig. 17B). Con relación a los linfocitos T CD4 productores de IL-4, se observó que en el grupo que recibió MOCDs MAGE AX/GK-1 disminuyó el porcentaje de células positivas a IL-4 con respecto al grupo GK-1, en contraste GK-1 fue el grupo que mostró mayor porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IL-4 (Fig. 17A). Por otro lado no se observaron cambios significativos en la media de intensidad de fluorescencia para IL-4 (Fig. 17B). Por último el grupo GK-1 fue el que mostró mayor porcentaje de linfocitos T CD4 IL-10+, mientras que el grupo MAGE

AX/GK-1 fue el del menor porcentaje (Fig. 17A). En la media de intensidad de fluorescencia de IL-10 no se observaron cambios.

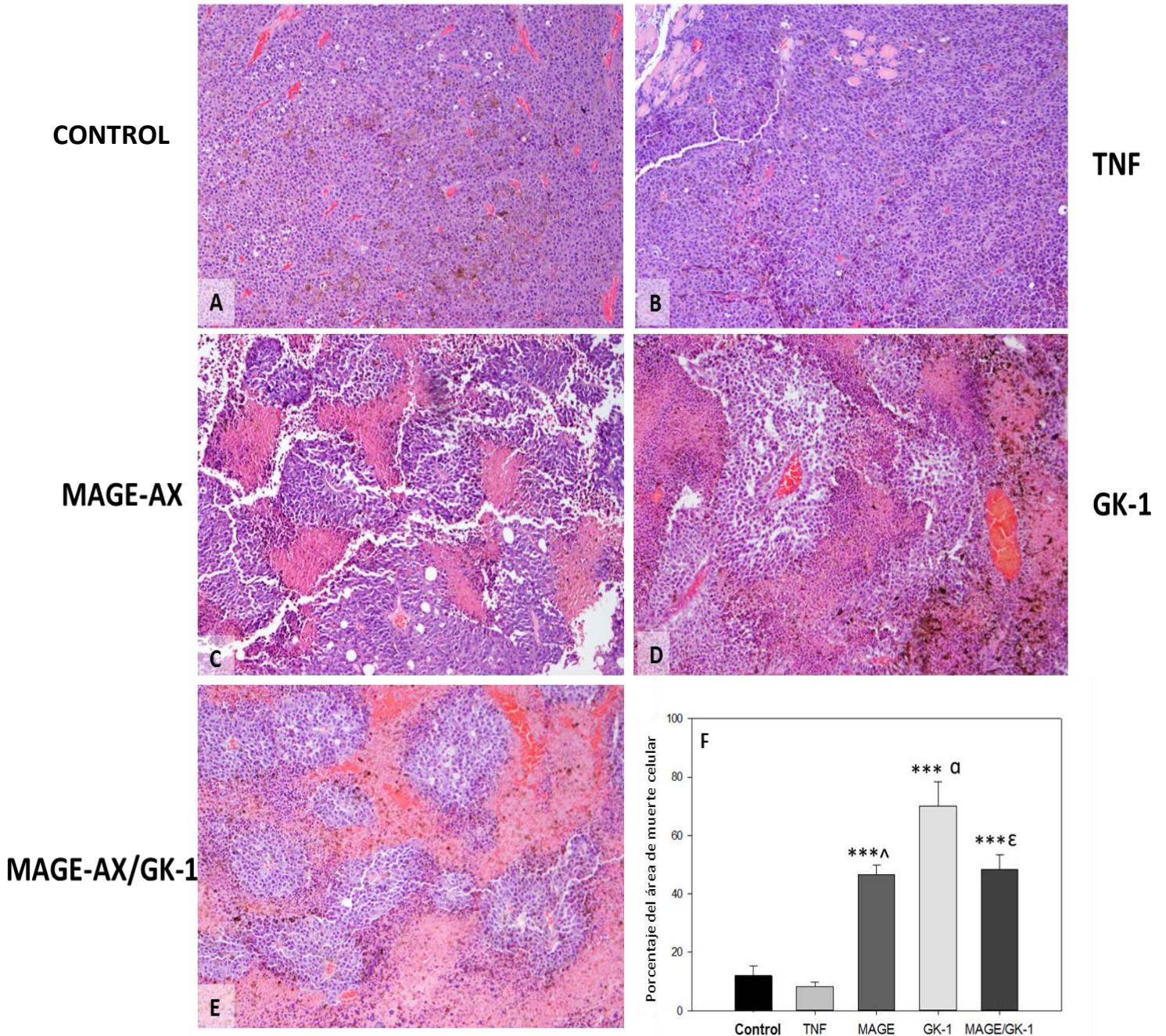


**Figura 17. Perfil de citocinas en los linfocitos T CD4 o CD8 totales de bazo.** Porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8, así como la producción de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10 en ganglios linfáticos de ratones con melanoma inoculados con MOCDs maduras con TNF $\alpha$  y tratadas con MAGE-AX, GK-1 o MAGE-AX/GK-1. Los ratones tratados con MOCDs MAGE-AX/GK-1 mostraron un incremento en los niveles linfocitos T CD8+ totales y en la producción de IFN $\gamma$  e IL-10, y disminución en la producción de IL-10 por linfocitos T CD4+. **A.** Porcentaje de linfocitos T CD4 totales y productores de IFN $\gamma$ , IL-4 e IL-10. \* P<0.05, c P<0.001 MAGE/GK-1 vs TNF, GK-1, a P< 0.05 TNF vs GK-1, b P< 0.05 MAGE/ GK-1 vs MAGE, GK-1. **B.** MIF de IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10 en linfocitos T CD4. \*P<0.05 **C.** Porcentaje de linfocitos T CD8

totales, y productores de IFN $\gamma$  e IL-10 \*P<0.05, c P<0.001 MAGE/GK-1 vs TNF, MAGE, GK-1. D. MFI de IFN $\gamma$  e IL-10 en linfocitos T CD8 \*P<0.05 TNF vs MAGE, GK-1, MAGE/GK-1. Media $\pm$  SEM n $\geq$ 3.

#### **8.4.3. El examen histopatológico mostró que la administración de MOCDs estimuladas con GK-1 indujo un aumento en las zonas de muerte celular tumoral.**

El análisis histopatológico de los tumores de los ratones control y los que recibieron MOCDs tratadas con TNF $\alpha$  mostraron abundantes nidos de células epitelioides, caracterizadas por la presencia de numerosos núcleos con abundante eucromatina, lo cual es indicativo de una gran actividad celular. Asimismo, se observaron numerosos vasos sanguíneos entre los nidos de células epitelioides (Fig. 18A y B). Ambos parámetros están relacionados con tumores con un alto índice de crecimiento (Kumar. 2010). Por otro lado, los cortes de los tumores en ratones que recibieron el tratamiento con las MOCDs con MAGE AX, GK-1 o MAGE AX/GK-1 mostraron menos zonas con células epitelioides y numerosas áreas de muerte celular que los cortes de los ratones control y TNF $\alpha$ . Las áreas de muerte celular se caracterizaron por poseer regiones eosinófilas formadas por restos celulares y células con núcleos picnóticos (Fig. 18C, D y E). Después se tomaron fotos de la totalidad del área tumoral, con el propósito de evaluar el porcentaje del área de muerte celular en los tumores (Fig. 18F). Se observó que los tumores de los ratones sin tratamiento y los que recibieron la terapia con las MOCDs TNF $\alpha$  fueron tumores sólidos con escasas áreas de muerte celular, en cambio los tumores de los ratones que recibieron la terapia con las MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1 o TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 mostraron áreas de muerte celular mayores que los ratones de los grupos control y los que recibieron MOCDs TNF $\alpha$ . No se encontraron diferencias significativas entre los grupos TNF $\alpha$ /MAGE, TNF $\alpha$ /GK-1 y TNF $\alpha$ /MAGE/GK-1 (Fig. 18F).



**Figure 18. Análisis histopatológico de melanoma de los ratones que recibieron terapia con las MOCDs.** Fotomicrografías de secciones histológicas de tumores tratados con MOCDs maduras con  $TNF\alpha$  y tratadas con MAGE-AX, GK-1 o MAGE-AX/GK-1. Grupos MAGE-AX, GK-1 y MAGE-AX/GK-1 mostraron abundantes áreas de muerte celular tumoral. **A.** Sin tratamiento (WT). Se observan abundantes células tumorales así como vasos sanguíneos. **B.**  $TNF\alpha$ . Se observaron las mismas características histológicas que en los tumores de los ratones sin tratamiento: abundantes células tumorales y vasos sanguíneos. **C.** MAGE-AX. **D.** GK-1. **E.** MAGE-AX/GK-1. En figuras (C), (D) and (E), fueron observadas áreas eosinofílicas compuestas por células muertas, además de áreas basófilas

caracterizadas por la presencia de células tumorales muy activas. **F.** Gráfica que muestra los cambios en las áreas de muerte celular inducida en los tumores tratados con BMDCs estimuladas con TNF $\alpha$ , MAGE-AX, GK-1 or MAGE-AX/GK-1. \*\*\*P<0.001, ^P<0.001 MAGE vs TNF,  $\alpha$ P<0.001 GK-1 vs TNF,  $\epsilon$ P<0.001 MAGE/GK-1 vs TNF. Media  $\pm$  SEM n $\geq$ 3.

## **9. DISCUSIÓN**

En el presente trabajo demostramos que las MOCDs cargadas con MAGE-AX disminuyen significativamente el crecimiento tumoral a través de un incremento en la respuesta inmune antitumoral contra melanoma inducido (Fig. 16 y 17) que resulta en un aumento del área de muerte celular en los tumores (Fig. 18) y en el tiempo de supervivencia de los ratones con melanoma (Fig. 14). Además, el tratamiento adicional con GK-1 de las MOCDs cargadas con MAGE-AX aumentó significativamente la eficiencia de la inmunoterapia (Fig. 9, 10, 12).

### **9.1. Efecto de GK-1 en la maduración de las MOCDs**

El efecto de GK-1 sobre la expresión de marcadores de activación y maduración de las MOCDs amerita comentarios especiales. GK-1 aumentó significativamente la expresión de CD86 y la producción de IL-12 en MOCDs. CD86 es una molécula involucrada en la sinapsis inmunológica, con mayor afinidad por CD28 que CD80, por lo tanto su aumento puede considerarse como un incremento en la capacidad presentadora de antígenos de las MOCDs que resulte en la activación de linfocitos T específicos contra el tumor (Inaba et al., 1992; Sheng et al., 2005; Wan and Flavell, 2009; Mitsui et al., 2010). Por otro lado, IL-12 puede inducir el desarrollo de una respuesta Th1 así como un aumento en la producción de IFN $\gamma$ . Tanto IL-12 como IFN $\gamma$ , están involucrados en la inmunovigilancia contra células tumorales (Smyth, 2000; Janeway, 2001; Dunn et al., 2004; Diamond, 2011); asimismo se ha demostrado que la administración exógena de IL-12 en ratones con tumores inducidos, puede promover la disminución en el tamaño tumoral por medio del aumento en la activación de linfocitos T CD8+ y NKs, los cuales son los responsables de inducir apoptosis en células tumorales. (Narvaiza et al., 2000; Trinchieri, 2013). El empleo de MOCDs con un fenotipo maduro y con la capacidad de producir IL-12 es de vital importancia para obtener resultados eficaces en la inmunoterapia antitumoral, puesto que se ha demostrado que las CDs inmaduras, caracterizadas por una baja expresión de moléculas coestimuladoras, pueden inducir una no respuesta inmune tumoral, tolerancia o incluso ausencia de memoria inmunológica en pacientes con melanoma (Toungouz et



al., 2001). Por otro lado, el empleo de las CDs maduras puede inducir memoria inmunológica así como una respuesta inmunológica efectiva caracterizada por una respuesta dependiente de linfocitos T CD8 (Figdor et al., 2004; Lande and Gillet, 2010).

En este trabajo se observó que el GK-1 moduló de forma positiva la maduración de las MOCDs al inducir un incremento en la expresión de CD86 e IL-12. Esto puede explicar la disminución en el crecimiento tumoral, el desarrollo de una respuesta Th1 y la muerte celular observada en la histopatología en este trabajo. GK-1 es una molécula cuyas propiedades físicas y químicas ayudan a que sea reconocida por receptores tipo Scavenger, promoviendo la presentación de antígeno y la liberación de citocinas proinflamatorias (Toledo, et al. 1999; Fragoso et al. 2011). Además, los resultados obtenidos aumentan la posibilidad del empleo de moléculas como GK-1 para inducir la inmunomodulación de CDs *in vitro* que posteriormente sean utilizadas en la inmunoterapia no sólo contra el melanoma, sino para otro tipo de cáncer. Aunado a lo anterior, GK-1 además de inmunomodular la respuesta de las CDs, se cree que puede ser reconocido por otros tipos de células, como los macrófagos, e inducir la producción de citocinas como TNF $\alpha$ , la cual puede inducir la maduración de las CDs. Por lo tanto, también sería posible utilizar a GK-1 como adyuvante en la inmunoterapia basada en las CDs, con el objetivo de inducir la producción de citocinas que ayuden a la activación de otro tipo de células como las NK, macrófagos o incluso las CDs localizadas en los tejidos para que se lleve a cabo una respuesta inmune antitumoral efectiva.

Si bien las MOCDs estimuladas con el GK-1 indujeron un incremento en la respuesta inmune antitumoral, el uso de las MOCDs MAGE-AX produjo una respuesta específica en contra del tumor casi de la misma intensidad que la inducida por GK-1. Además, es importante mencionar que la adición de MAGE-AX a los cultivos de MOCDs no provocó cambios adversos en la activación de las células, por lo tanto las MOCDs pudieron ser utilizadas con éxito en la inmunoterapia. Previamente se han utilizado los antígenos MAGE en la inmunoterapia, los resultados han sido heterogéneos, dado que la respuesta inmune

desarrollada no ha sido efectiva y la regresión tumoral ha sido esporádica. No obstante, cuando se utilizan las CDs cargadas con MAGE-AX se ha observado aumento en la supervivencia, disminución del tamaño tumoral en ratones con melanoma y desarrollo de una respuesta inmune específica dependiente de linfocitos T CD8 y producción de IFN $\gamma$  (Eggert et al., 2004; Connerotte et al., 2008; Herrera et al. 2015). Además, los antígenos MAGE pueden encontrarse en otros tipos de cáncer, como cáncer de vejiga, leucemia y glioblastoma. En el presente trabajo, fue utilizado MAGE-AX, la cual es una molécula que se expresa en ratones, por lo que sería importante desarrollar una molécula que tuviese una secuencia consenso con las moléculas MAGE humanas, con el objetivo de ser utilizada en la inmunoterapia contra el cáncer en personas enfermas con melanoma u otro tipo de cáncer. Por lo tanto, MAGE es una buena opción para ser utilizado en la inmunoterapia, dado que es capaz de inducir una respuesta inmune específica y efectiva, además de poder ser usado en el tratamiento contra distintos tipos de cáncer (Connerotte et al., 2008).

## **9.2. Efecto de GK-1 en la concentración de calcio citoplásmico en las MOCDs**

Por otro lado, también fue medida la concentración de Ca<sup>++</sup> citosólico en las MOCDs después de haber sido tratadas con GK-1. Las respuestas mediadas por calcio en las MOCDs están menos caracterizadas que en los linfocitos. Cuando las MOCDs llevan a cabo eventos relacionados con migración y maduración/ activación, por ejemplo cuando las MOCDs reconocen a algún patógeno, el calcio localizado en el retículo endoplásmico liso o en el medio extracelular ingresa al citoplasma de las MOCDs para mediar varios pasos involucrados en la señalización celular. (Salter y Walkinks. 2009). Ya ha sido demostrado que el tratamiento con LPS de MOCDs induce aumento en la concentración de calcio intracelular, así como el incremento en la expresión de CD86 (Shumilina et al. 2007), mientras que la exposición de CDs a vitamina D induce disminución en la migración, en la concentración de calcio citoplásmico, de CD86 y de IL-12 respuesta típica de MOCDs tolerogénicas (Gauzzi et al. 2005). En el presente trabajo, se demostró que los grupos de MOCDs tratados con GK-1 y MAGE-AX/GK-1 (Fig. 13) mostraron una mayor concentración

de calcio intracelular en comparación con el grupo control y el grupo LPS, por lo que podemos considerar que las MOCDs utilizadas durante la inmunoterapia estaban en óptimas condiciones para migrar y presentar antígenos exitosamente. Estos resultados se pueden correlacionar con el fenotipo mostrado por las MOCDs, dado que observamos que las MOCDs mostraron un aumento en la expresión de CD86 e IL-12 cuando fueron expuestos a GK-1, por lo tanto las MOCDs tratadas con GK-1 mostraron aumento en la concentración de calcio citosólico, indicando óptimas condiciones de maduración y capacidad de migración para la posterior activación de linfocitos T antígeno específicos.

### **9.3. Efecto de la administración de MOCDs en los linfocitos T CD4 y CD8 de los ratones con melanoma.**

Para evaluar el efecto de la inmunoterapia basada en MOCDs en la inmunidad específica anti-tumoral se evaluaron los niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el ganglio poplíteo y en el bazo de los ratones con melanoma. La vía de inoculación de MOCDs fue subcutánea, por lo que se estudió la respuesta en el ganglio poplíteo el cual fue el órgano linfoide más cercano al tumor; además que se ha observado que la administración subcutánea de CDs induce una respuesta Th-1 por linfocitos de ganglios periféricos al tumor (Thomas et al., 1999), mientras que la administración de CDs vía intravenosa induce una respuesta dependiente de linfocitos de bazo (Ribas et al., 1999; Mullins, 2003). En nuestro modelo, se observó una respuesta en los ganglios linfáticos periféricos al tumor como se discute a continuación.

#### **9.3.1. Efecto de la administración de MOCDs en el bazo de ratones con melanoma**

En el caso del bazo, se mostró un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$ + en el grupo tratado con MOCDs con respecto al grupo control y TNF $\alpha$  (Fig. 6A), mientras que sólo el grupo tratado con MOCD GK-1 mostró un aumento significativo en la media de intensidad de fluorescencia para IFN $\gamma$  (Fig. 17B). Asimismo, el grupo de ratones tratado con MOCDs MAGE-AX/GK-1 manifestó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4 IL-4+ o IL-10+ (Fig. 6A). En el caso de los linfocitos T CD8, el grupo tratado con MOCDs

MAGE-AX/GK-1 obtuvo un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD8 totales en el bazo (Fig. 17C) y en la producción de IL-10 por linfocitos T CD8 (Fig. 17D). Lo anterior es de notar, dado que IL-10 está involucrada con tolerancia inmunológica (Rabinovich et al. 2007) no obstante si se observa la figura 6D, es mayor la producción de IFN $\gamma$  que de IL-10 en los ratones tratados con MOCDs MAGE-AX/GK-1, lo cual es muy importante dado que IFN $\gamma$  está involucrada con el desarrollo de la respuesta Th1 (Narvaiza et al. 2000; Shankaran et al. 2001). El hecho de que se haya desarrollado una respuesta en el bazo es muy importante, dado que indica que las MOCDs no sólo indujeron una respuesta inmune local sino también una respuesta inmune sistémica (Mullins 2003). Lo que sugiere que la inoculación de MOCDs con MAGE-AX/GK-1 puede inducir una respuesta Th-1 sistémica, caracterizada por la proliferación de linfocitos T CD8 y CD4 productores de IFN $\gamma$  así como la disminución en la producción de IL-4, citocina característica de una respuesta inmune Th2 (Dranoff. 2004; Stagg et al. 2007), la cual es sinónimo de mal pronóstico en pacientes enfermos de cáncer (Stagg et al. 2007; Zhu et al. 2011). Además el trabajo realizado por Herrera y colaboradores en el cual, ratones con melanoma fueron tratados con MOCDs o Células de Langerhans cargadas con MAGE-AX y maduras con GM-CSF mostró que la terapia inducía una mayor producción de IFN $\gamma$  por linfocitos T CD4 en bazo, además de aumento en la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8 de bazo con respecto al control, no obstante la sobrevida obtenida fue menor (Herrera, et al. 2015); por lo que el uso de GK-1 no sólo indujo una respuesta en el bazo caracterizada por la producción de IFN $\gamma$  y la disminución en la producción de IL-4, sino que la terapia indujo una sobrevida de hasta 1.5 después de haber sido inoculados con melanoma. Así, es claro que el tratamiento MOCDs MAGE-AX/GK-1 indujo una respuesta inmune Th1 efectiva.

### **9.3.2. Efecto de la administración de MOCDs en el ganglio poplíteo de ratones con melanoma**

Los ganglios linfáticos de los ratones que recibieron el tratamiento con MOCDs fueron analizados para estudiar la respuesta desarrollada por el tratamiento. El grupo TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 mostró los niveles más altos de linfocitos T CD4+ y CD8+ en

comparación con los otros grupos (Fig. 16a y b). Este hecho es importante, ya que una respuesta inmune antitumoral exitosa es mediada por linfocitos T (Palucka et al. 2011). Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> son los responsables de inducir muerte celular tumoral, mientras que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> están implicados en la secreción de citocinas que pueden inducir la activación tanto de linfocitos T como de otras células del sistema inmune como macrófagos, células NK e incluso células NKT. Trabajos en los que se ha inhibido la producción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en ratones con cáncer, han demostrado que los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son esenciales para que exista una correcta activación tanto de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> así como de células NK, las cuales están implicadas en la citotoxicidad contra células tumorales; además, ratones deficientes de linfocitos desarrollan tumores, por lo que la activación tanto de linfocitos T CD4 como CD8 son esenciales para que se lleve a cabo una respuesta inmune antitumoral efectiva (Bai et al. 2003; Dunn et al. 2004; Barrera da Silva y Münz. 2011). El hecho que las MOCDs estimuladas con GK-1 hayan inducido la activación de linfocitos T en el ganglio poplíteo es importante, dado que es posible que éstos hayan migrado hacia el tumor y ocasionado la muerte de células tumorales, lo cual también explica el hecho que los ratones tratados con MOCDs con MAGE-AX/GK-1 hayan tenido una sobrevida de hasta 40%.

Nuestros datos demuestran que existe una estimulación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> cuando ratones con melanoma son tratados con MOCDs estimuladas con GK-1 y cargadas con MAGE-AX. Es importante destacar esta situación, dado que MAGE-AX es un péptido restringido a Moléculas MHC I. En previos estudios en un modelo murino y porcino de cisticercosis, y en un modelo murino de influenza, Scitutto et al (Scitutto et al. 2007; Segura-Velazquez, et al. 2006) mostraron que tanto la administración subcutánea como oral del péptido GK-1 induce incremento en el número de linfocitos T CD4/CD25/CD69<sup>+</sup> además de producción de IFN $\gamma$  en ganglios linfáticos; sin embargo, no se detectaron altos niveles de linfocitos T CD8 (Scitutto et al. 2007; Segura-Velázquez et al. 2006; Segura-Velázquez et al. 2009; Fragoso et al. 2011). Nosotros observamos que células de ganglios linfáticos de ratón con melanoma que previamente habían recibido MOCDs estimuladas con GK-1 y

cargadas con MAGE-AX y estimuladas in vitro con MAGE-AX mostraron un incremento en el número de linfocitos T CD4 IFN $\gamma$  y en la MIF de IL-4 e IFN $\gamma$  en las mismas células (Fig. 16). Además, se constató el incremento en el número de linfocitos T CD8 IL-10+. Es importante hacer notar que a pesar que el porcentaje de linfocitos T CD8 IL-10+ incrementó, la MIF de IFN $\gamma$  fue mayor que la MIF de IFN $\gamma$  en las mismas células. La inesperada estimulación de los linfocitos T CD4+ obtenidos de los ratones tratados con MOCDs estimuladas con MAGE-AX/GK-1 puede ser explicado a través del efecto que GK-1 haya tenido sobre las MOCDs. GK-1 es una molécula cuyas propiedades físicas y químicas ayudan a promover su reconocimiento por receptores tipo Scavenger en la membrana de las MOCDs, promoviendo así la presentación de antígenos por medio de Moléculas clase II y la liberación de citocinas proinflamatorias, situación ya constatada en CDs tratadas con GK-1, promoviendo así la activación de linfocitos T CD4 (Fragoso et al. 2011). Aunado a lo anterior, en el presente trabajo, también se observó que los ratones tratados con MOCDs con MAGE-AX, GK-1 o ambos poseían tumores con extensas áreas de muerte celular, por lo que es posible que los antígenos tumorales llegaran hasta el ganglio poplíteo, fueran reconocidos por APCs y posteriormente fueran presentados a linfocitos T CD4 y CD8. Lo anterior es relevante dado que la activación de los linfocitos T, tanto CD4 como CD8, de ganglios linfáticos es muy importante para que se lleve a cabo una respuesta inmune antitumoral, además que la activación de células T CD4 es primordial para la activación no sólo de linfocitos T CD8, sino de otras células. Así, en nuestro modelo no sólo se observó la activación de linfocitos T CD8 (respuesta esperada por utilizar MOCDs cargadas con MAGE-AX) sino de CD4. Por lo tanto, el empleo de GK-1 coadyuvó al incremento de la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T localizados en el ganglio poplíteo, mientras que MAGE-AX propició que esa respuesta fuese específica contra el melanoma

No sólo se observó proliferación de linfocitos T en los ganglios de los ratones tratados con MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1, también se mostró un aumento en la producción de IFN $\gamma$ , mientras que en la producción de IL-10 e IL-4 no se mostraron cambios notables (Fig. 5). IFN $\gamma$  es una citocina relacionada con una respuesta inmune antitumoral efectiva

caracterizada por la proliferación de linfocitos T CD8+ citotóxicos, activación de macrófagos, inducción de apoptosis e incremento en la expresión de Moléculas Clase I y II (Narvaiza et al., 2000; Shankaran et al., 2001; Bracci et al., 2007), mientras que IL-4, cuyos niveles fueron más bajos que los de IFN $\gamma$ , está implicada con una respuesta Th2, la cual es sinónimo de mal pronóstico en pacientes enfermos de cáncer (Stagg et al. 2007; Zhu et al. 2011). El hecho que la producción de IFN $\gamma$  fuera mayor que la de IL-4 es muy importante, dado que IFN $\gamma$  es la citocina que puede inducir mayores efectos sobre las células tumorales, dado que no sólo puede inducir la activación de células implicadas en la fagocitosis (i.e. macrófagos), sino que puede estar implicada con la muerte de células tumorales, como lo observamos en nuestro modelo (Fig. 18). Asimismo, es posible que el aumento de IFN $\gamma$  haya sido inducida por la secreción de IL-12 por las MOCDs (Trinchieri et al. 2003), puesto que se observó que GK-1 estimuló el aumento en la producción de esta citocina (Fig. 12). Se conoce que IL-12 puede estimular células T, NK y NKT para la producción de IFN $\gamma$  (Smyth, 2000; Trinchieri, 2003; Barreira da Silva et al., 2011), de manera que estos hechos también pudieron haber sucedido en nuestro modelo., sin embargo se requieren estudios posteriores para corroborar si la producción de IL-12 por las MOCDs tratadas con GK-1 pudo inducir la activación de estas células.

En el caso de la IL-10, sólo los linfocitos T CD8+ mostraron incremento en el porcentaje de células productoras de IL-10, no obstante si se observa la MIF, no se muestran cambios significativos, además también es notable que los niveles de producción de IFN $\gamma$  es mucho mayor que de IL-10 (Fig. 16). En el caso de IL-10, varios estudios han dado a conocer que personas con cáncer presentan altas concentraciones de IL-10, por lo que su aumento ha sido correlacionado con un mal pronóstico (Steinman et al. 2003). También se ha descrito que esta citocina induce una ambiente tumoral inmunosupresor (Ravinovich et al. 2007; Stagg et al. 2007), lo cual ocasiona inhibición de células como macrófagos, CD4 y linfocitos (Roncolo et al. 2001; Steinman et al. 2003; Dranoff. 2004). Es importante observar que los ratones control y los inoculados con MOCDs con TNF $\alpha$  indujeron una mayor producción de IL-10 que de IL-4 e IFN $\gamma$  en los linfocitos T CD4 del ganglio poplíteo, asimismo fueron

estos grupos lo que mostraron la menor supervivencia, mayor tamaño tumoral y menores áreas de muerte celular, por lo que es posible que lo anterior haya ocurrido por mayor producción de IL-10 que de IFN $\gamma$  o IL-4. Es de destacar el hecho que las MOCDs cargadas con MAGE-AX estimuladas con GK-1 no indujeron cambios notables en la producción de IL-10 y de IL-4, pero si promovieron la producción de IFN $\gamma$  tanto en linfocitos T CD4+ o CD8+ en el ganglio poplíteo, por lo que la supervivencia de ratones, las abundantes áreas de muerte celular y el tamaño de los tumores en los ratones vacunados con MOCDs MAGE-AX/GK-1 fue reflejo de las células activadas y de la producción de IFN $\gamma$  en el ganglio poplíteo de los ratones con melanoma.

En relación con los linfocitos y los niveles de las citocinas tanto en bazo como en ganglio poplíteo se concluye que la inmunoterapia basada en MOCDs estimuladas con GK-1 puede inducir la activación de linfocitos T CD4+ como CD8+ y la producción de IFN $\gamma$ , principales componentes implicados en la respuesta inmune antitumoral, por lo que se sugiere el uso de GK-1 como inmunomodulador de CDs para su posterior uso en las inmunoterapias.

### **9.3.3. Histopatología de los tumores de ratones con melanoma tratados con MOCDs**

Los datos antes mencionados se correlacionaron con los hallazgos histopatológicos, en la supervivencia y en la tasa de crecimiento tumoral. El tratamiento con MOCDs MAGE-AX/GK-1 mostraron tumores con abundantes áreas de muerte celular (Fig. 18), bajo crecimiento tumoral (Fig. 15) y una supervivencia de hasta 1.5 años después de haber sido inducido el melanoma (Fig. 14). Es importante recordar que en el ganglio de los ratones que recibieron MOCDs TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 se encontró un aumento en los niveles de linfocitos T CD8, los cuales están implicados en la inducción de muerte de células tumorales (Yee. 2002; Wan y Flavell. 2009), así es muy probable que el aumento en el área de muerte celular, así como la disminución en el crecimiento tumoral y aumento en la supervivencia haya sido causado por la activación de linfocitos T CD8. En el trabajo realizado por Herrera y colaboradoras en 2015, se observó mediante inmunohistoquímica la presencia de linfocitos T CD8+ en los melanomas de ratones tratados con MOCDs



cargadas con MAGE-AX (Herrera et al. 2015); en el presente modelo los ratones fueron también tratados con MOCDs cargadas con MAGE-AX, por lo que la muerte de células tumorales también pudo haber sido propiciada por linfocitos T CD8.

No obstante es importante mencionar que otras células del sistema inmune pueden inducir muerte celular, como es el caso de las células NK las cuales son activadas por IL-12 (Trinchieri. 2003; Barreira da Silva y Münz. 2011), citocina inducida por GK-1 (Fig. 12). Por otro lado, se ha estudiado que la muerte celular tumoral también ayuda al aumento en la repuesta inmune contra el tumor, puesto que los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) pueden ser reconocidos por APCs, inducir su maduración y la posterior migración a ganglios linfáticos para la activación de linfocitos T (Ravanovich et al. 2007), por lo tanto es posible que la muerte celular inducida por la vacuna de MOCDs cargadas con MAGE-AX y estimuladas con GK-1 incremente la respuesta inmune antitumoral contra melanoma.

## **10. CONCLUSIONES**

Nuestros hallazgos demuestran que la adición de GK-1 a MOCDs cargadas con MAGE-AX disminuye el crecimiento tumoral, aumenta la sobrevivencia de ratones, la expresión de CD86 e IL-12 en MOCDs y los niveles de linfocitos T CD4 y CD8 productores de IFN $\gamma$ , así como la presencia de muerte de células tumorales, lo que indica que GK-1 puede inmunomodular positivamente una respuesta Th1 favoreciendo el control del crecimiento tumoral. Las evidencias reportadas en este trabajo señalan la utilidad de GK-1 no sólo durante el tratamiento contra el melanoma, sino también de forma preventiva; como en el caso de personas con cáncer que han sufrido cirugía y que desean prevenir la aparición de un tumor. Asimismo, es conveniente investigar si GK-1 pueda estar involucrado en la activación de otros tipos celulares relacionados con la inmunovigilancia, de manera que se pueda utilizar en la activación de otras extirpes celulares que puedan ser utilizadas en el futuro en la inmunoterapia.

## 10. LITERATURA CITADA

- [1] Adams S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 2009; 1: 949–964.
- [2] Akers SN, Odunsi K y Karpf AR. Regulation of cancer germline antigen gene expression: implications for cancer immunotherapy. *Future Oncology* 2010; 6: 717–732.
- [3] Apetoh L, Ghiringheli F, Tesnieres A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri C, Ullrich E, saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Berraf FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira JP, Chompret A, Joulin V, Clavel- Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G y Zitvigeck L. Toll loke receptor 4 dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature Medicine* 2006; 13: 1051-1060.
- [4] Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature Reviews* 2003; 3: 1-9.
- [5] Bai L, Feuerer M, Beckhove P, Umanski V, Schirmmacher V. Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: Bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo. *International Journal of Oncology* 2003; 103: 73-83.
- [6] Balch CM, Soong SJ, Gershenwald, JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N y cols. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients; validation of the American Joint Commettee on Cancer Melanoma Staging System. *Journal of Clinical Oncoly* 2001; 19: 3622-34.
- [7] Banchereau J and Palucka K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 296-306.
- [8] Banchereau, J. and Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245–252.

- [9] Barreira da Silva R, Münz C. Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2011; 68: 3505- 18.
- [10] Berd D y Mastrangelo MJ. Effect of low dose of cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: depletion of CD4, 2H4 suppressor –induced T cells. *Cancer Research* 1988; 48: 1671-1675.
- [11] Bhardwaj N, Gnjatic S, Sawhney NB. TLR AGONISTS: Are They Good Adjuvants?. *Cancer Journal* 2010; 16: 382–391.
- [12] Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; 81: 1–5.
- [13] Bjoern J, Brimnes MK, Andersen MH, P. Straten P y Svane IM. Changes in Peripheral Blood Level of Regulatory T cells in Patients with Malignant Melanoma During Treatment with Dendritic Cell Vaccination and Low-dose IL-2. *Scandinavian Journal of Immunology* 2011; 73: 222- 233.
- [14] Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lysterly HK, Gilboa E (2000) Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res* 60:1028–1034
- [15] Bonifaz, L. et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196: 1627–1638.
- [16] Boscardin, S. B. et al. Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203; 599–606.
- [17] Bracci L, Proietti E, Belardelli F. IFN- $\alpha$  and novel strategies of combination therapy for cancer. *Annual. N. Y Academy of Science* 2007; 1112: 256–68.
- [18] Brady MS. Sentinel lymph node mapping in patients with cutaneous melanoma. *Dermatology and Surgery* 2004; 30:272-8.

- [19] Bray SM, Vujanovic L y Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Vaccines Positively Impact Natural Killer and Regulatory T Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 1-11
- [20] Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll. The ABC of clinical and experimental adjuvants—A brief overview. *Immunology Letters* 2010; 128: 29–35
- [21] Cannerotte T, Van Pel A, Godelaine D, Tartourt E, Schuler –Thurner B, Lucas S, Thielemans K, Schuler G y Coulie PG. Funtions od Anti-MAGE T cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities. *Cancer Research* 2008; 68: 3931- 3941.
- [22] Carrasco J, Van Pel A, Neys B, Lethé B, Brasseur F, Renkvist N, Van der Bruggen O, Van Baren N, Paulus R, Thielemans K, Boon T y Godelaine D. Vaccination of a melanoma patient with matured dendritic cells with MAGE- 3 petides triggers the activity of nonvaccine anti- tumor cells. *The Journal of Immunology* 2008; 180: 3585- 3593.
- [23] Casey DG, Lysaght J, Tharappel J, Bateman A, Melcher AA y Todryk SM. Heat shock protein derived from a non-autologous tumour can be used as an anti-tumour vaccine. *Immunology* 2003; 110: 105-111.
- [24] Choi KD, Vodyanik M, Slukvin II. Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nature protocols* 2011; 6: 296-313.
- [25] Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T y Lucas S. An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family. *Cancer Research* 2001; 61: 5544-5551.
- [26] Clay, T.M, Hobeika, A.C., Mosca, P. Assay for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 1127-1135.
- [27] Cohen B y Parkin J. An overview if the immune system. *Immunology* 2001; 357: 1777-1787.

- [28] Cornforth AN, Fowler AW, Carbonell DJ, Fan E, Dillman RO. Characterization of interferon- $\gamma$ -treated melanoma tumor cells for use in dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals*. 2011; 26: 345-351.
- [29] Craig L. Slingluff Jr, Gina R. Petroni, Galina V. Yamshchikov, Donna L. Barnd, Shannon Eastham, Holly Galavotti, James W. Patterson, Donna H. Deacon, Sarah Hibbitts, David Teates, Patrice Y. Neese, William W. Grosh, Kimberly A. Chianese-Bullock, Elizabeth M.H. Woodson, Catherine J. Wiernasz, Priscilla Merrill, Jennifer Gibson, Maureen Ross, and Victor H. Engelhard. Clinical and Immunologic Results of a Randomized Phase II Trial of Vaccination Using Four Melanoma Peptides Either Administered in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Adjuvant or Pulsed on Dendritic Cells. *Journal of Clinical Oncology* 2003; 21: 4016-4026.
- [30] Czerniecki BJ, Koski GK, Koldovsky U, et al. Targeting HER-2/v in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Research* 2007; 67: 1842–1852.
- [31] De Vries J, Bersen MR, Lesterhuis J, Scharenborg NM, Strijk PS, Gerritsen MJP, Ruiter DJ, Figdor CG, Punt CJA y Adema GJ. Immunomonitoring tumor specific T cells in Delayed – type hypersensitivity skin biopsies after dendritic cell vaccination correlates with clinical outcome. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23: 5779-5787.
- [32] Desmond RA, Soong SI, Epidemiology of malignant melanoma. *Surgical Clinical of North America* 2003; 83: 1-29.
- [33] Dhodapkar K, Krasovsky J, Williamson B y Dhodapkar MV. Antitumor Monoclonal Antibodies Enhance Cross-Presentation of Cellular Antigens and the Generation of Myeloma-specific Killer T Cells by Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195: 125-133.
- [34] Dhodapkar M, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C y Bhardwaj N. Antigen-specific Inhibition of Effector T Cell Function in Humans after Injection of

- Immature Dendritic Cells. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 193: 233–238.
- [35] Dhodapkar MV, Dhodapkar KM y Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 39-50.
- [36] Diamond, M.S. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *Journal of Experimental Medicine* 2011; 208: 1989–2003.
- [37] Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gomez Conde E, Hernández P, Larralde C, Sciotto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pogs vaccinated against *Taenia solium* cisticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2003; 93: 81-90.
- [38] Doyle, J.M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., and Potts, P.R. (2010). MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell* 2010; 39: 963–974.
- [39] Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148.
- [40] Eggert, A.O., Andersen, M.H., Voigt, H., Schrama, D., Kämpgen, E., Thor Straten, P. Characterization of mouse MAGE-derived H-2K<sup>b</sup>-restricted CTL epitopes. *European Journal of Immunology* 2004; 3: 3285-3290.
- [41] Enomoto Y. Exploring immune therapy for renal cancer. *International Journal of Urology* 2011; 18: 412–421.
- [42] Espantman KC y O’Shea CC. aMAGEing new players enter the RING to promote ubiquitylation. *Molecular Cell* 2010; 39: 835–837.
- [43] Feldman AL, Friedl J, Lans TE. Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts. *International Journal of Cancer* 2002; 99:149-153.

- [44] Feng Y, Gao J y Maojun Y. When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGA proteins. *Protein Cell* 2010; 2: 7-12.
- [45] Ferrantini M, Capone I, Belardelli F. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2008; 19: 93-107.
- [46] Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 1998; 95: 9482-9487.
- [47] Figdor CG, de Vries JM1, Lesterhuis WJ y Melief CJM. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine* 2004; 10: 475-480.
- [48] Fisher D, Medrano E, McMahon M, Soengas MS, Schuchter L, Wolchok J y Merlino G. meeting Report: Fourth Interational Congress of the Society for Melanoma Reasearch. *Pigment Cell Melanoma Research* 2008; 21: 15-26.
- [49] Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, et al. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clinical Vaccine Immunology*; 2011: 1067-76.
- [50] Gabriele L, Borghi P, Rozera C, Sestili P, Andreotti M, Guarini A. IFN $\gamma$  promotes the rapid differentiation of monocytes from patients with chronic myeloid leukemia into activated dendritic cells tuned to undergo full maturation after LPS treatment. *Blood* 2004; 103: 980-987.
- [51] Gauzzi, M. C., Purificato, C., Donato, K., Jin, Y., Wang, L., Daniel, K. C., Maghazachi, A. A., Belardelli, F., Adorini, L., and Gessani, S. (2005) Suppressive effect of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *Journal of Immunology* 2005; 174: 270–276.
- [52] Geissman F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M y Ley K. Development of Monocytes, Macrophages and Dendritic cells. *Science* 2010; 327: 656-661.
- [53] Germeau C, Ma W, Schiavettu F, Lurquin C, Henry E, Vigneron N, Brasseur F, Lethé B, De Plaen E, Velu T, Boon T, Coulie PG. High frequency of antitumor T

- cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *The Journal of Experimental Medicine* 2005; 201: 249-257.
- [54] Gevorkian, G., K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernández, J. C. Almagro, M. Viveros, J. Sotelo, E. Garcia, and E. Sciutto. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunology Letters* 1996; 49:185–189.
- [55] Gill RG, Coulombe M, Lafferty KJ. Pancreatic islet allograft immunity and tolerance: the two-signal hypothesis revisited. *Immunol Rev* 1996: 74–96.
- [56] Godelaine D, Carrasco J, Lucas S, Karanikas V, Schuler-Thurner B, Coulie PG, Schuler G, Boon T y Van Pel A. CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with MAGE-3-A1. *The Journal of Immunology* 2003; 171: 4893-4897.
- [57] Goldstein BG, Goldstein A. Diagnosis and management of malignant melanoma. *American Family Physician* 2001; 63:1359-68.
- [58] Grover A, Kim GJ, Lizée G, Tsochi M, Wang G, Wunderlich JR, Rosenberg SA, Hwang ST y Hwu P. Intralymphatic Dendritic Cell Vaccination Induces Tumor Antigen– Specific, Skin-Homing T Lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5801–5808.
- [59] Gutierrez Vídrio RM y Cortés Lozano N. Confrontando el melanoma en el siglo XXI. *Educación Médica Continuada* 2007; 35: 3-13.
- [60] Guy B. Strategies to Improve the Effect of Vaccination in the Elderly: the Vaccine Producer’s Perspective. *Journal of Comparative Pathology* 2010; 142: S133eS137.
- [61] Guy B. The perfect Mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 505- 517.
- [62] Hackstein H y Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature Reviews Immunology* 2004; 4: 24-33.



- [63] Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 2010; 363: 711–23.
- [64] Inaba K, Romani N, Schuler G, Mirza A, Steinman RM. Generation of dendritic cells from proliferating mouse bone marrow progenitors. In: Coico, R Ranz, A Kruisbeek, AM. 1998. *Current Protocols in Immunology*. Wiley, New York.
- [65] Jäger D, Jäger E, Knuth A. Immune responses to tumour antigens: implications for antigen specific immunotherapy of cancer. *Journal of Clinical Pathology* 2001; 54: 669–674.
- [66] Janeway C. Immunogenicity signals 1,2,3..., and 0. *Immunol Today* 1989; 10: 283–6.
- [67] Janeway, C.A. Jr. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 2001; 98: 7461–7468.
- [68] Joffre O, Martijn A. Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 2009; 227: 234–247.
- [69] Jonuleit H, Giesecke- Tuettenberg A, Ting TT, Thurner-Schuler B, Stuge B, Kandemir A, Lee P, Schuler G, Knop J, Enk A. A comparison of Two types of dendritic cell as adjuvants for induction of melanoma-specific T cell responses in humans following intranodal injection. *International Journal of Cancer* 2001; 93: 243-251.
- [70] Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1589: 1–13.
- [71] Kantoff PW, Higano CS, Shore ND. IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *New England Journal of Medicine* 2010; 363: 411–22.
- [72] Kapsenberg, ML: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews of Immunology* 2003; 3:984–993.

- [73] Kobukai S, Kremers GJ, Cobb JG, Baheza R, Xie J, Kuley A, Zhu M. Induction of Antitumor Immunity by Dendritic Cells Loaded with Membrane- Translocating Mucin 1 Peptide Antigen. *Translational Oncology* 2011; 4: 1–8.
- [74] Kumar, V., 2010. *Robbins and Cotran Pathology Basis of Disease*, Saunders Elsevier; 956 pp.
- [75] Kurts C, Robinson BW y Knolle PA. Cross- priming in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2010; 10: 403-414.
- [76] Kushwah R y Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host. *Immunology* 2011; 133: 409–419.
- [77] Lande R y Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Annals of the New York Academy Sciences* 2010; 1183: 89–103.
- [78] Lesterhuis WJ, De Vries IJ, Schreiber G, Schuurhuis DH, Aarntzen EH, De Boer A, Scharenborg NM, Van De Rakt M, Hesselink EJ, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ. Immunogenicity of dendritic cells pulsed with CEA peptide or transfected with CEA mRNA for vaccination of colorectal cancer patients. *Anticancer Research* 2010; 30: 5091-5097.
- [79] Liu K y Nussenzweig MC, Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 2010, 234: 45–54.
- [80] Liu Y, Santin AD, Mane M, et al. Transduction and utility of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into monocytes and dendritic cells by adeno-associated virus. *Journal of Interferon Cytokine Research* 2000; 20:21-30.
- [81] Lonchay C, Van der Bruggen, Cannerotte T, Hanagiri T, Coulie P, Colau D, Lucas S, Van Pel A, Thielemans K, Van Baren N y Boon T. Correlation between tumor regression and T cell responses in melanoma patients vaccinated with a MAGE antigen. *PNAS* 2004; 101: 14631- 14638.
- [82] Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, Hughes TM, Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Prognostic and clinicopathologic

associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *The Journal of Clinical Oncology* 2011; 29:1239-46.

- [83] Lubaroff DM y Karan D. CpG oligonucleotide as an adjuvant for the treatment of prostate cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2009; 61: 268–274.
- [84] Lutz MB, Kukutch N, Ogilvie AL, Robner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 1999; 223: 77-92.
- [85] Mackensen A, Herbst B, Chen JL, Kohler G, Noppen C, Herr W, Spagnol GC, Cerundolo V, y Lindemann A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD24 hematopoietic progenitor cells. *International Journal of Cancer* 2000; 86; 385-392.
- [86] Mailliard RB, Wankowicz-Kalinska A, Cai Q, Wesa A, Hilkens CM, Kapsenberg ML, Kirkwood JM, Storkus WJ, Kalinski P. *Cancer Research* 2004; 64: 5934.
- [87] Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L. F. Rodarte, and E. Sciotto. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* 1996; 82 :250–254.
- [88] Martínez-Saíd H, Cuéllar-Hubbe M, Barrón-Velasquez E, Padilla RA, Herrera-Gómez A, López-Graniel CM. Epidemiology of cutaneous melanoma in Mexico (1982-2002). *European Journal of Surgery and Oncology* 2004;30:163.
- [89] Masloski JE, Piat GL, Lujan AM, De la Rosa JC. Melanoma. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina* 2008; 183: 9-16.
- [90] Matheoud D, Baey C, Vimeux L, Tempez A, Valente M, Louche P, Le Bon A, Dendritic Cells Crosspresent Antigens from Live B16 Cells More Efficiently than from Apoptotic Cells and Protect from Melanoma in a Therapeutic Model. *PLoS ONE* 2011; 6:e19104.
- [91] Matzinger P. The immune system's role in graft loss: theoretic considerations. *Transplant P* 1997;29.

- [92] Maurer T, Pournaras C, Aguilar-Pimentel JA, Thalgott M, Horn T, Heck M, Heit A, Kuebler H, Gschwend JE, Nawroth R. Immunostimulatory CpG-DNA and PSA-peptide vaccination elicits profound cytotoxic T cell responses. *Urology and Oncology* 2011.(Epub ahead of print).
- [93] McKinnon JG, Yu XQ, McCarthy WH, et al: Prognosis for patients with thin cutaneous melanoma. *Cancer* 2003; 98: 1223-31.
- [94] Michalek J, Kocak I, Fait V, Zaloudik J y Hajek R. Detection and long term in vivo monitoring of individual tumor specific T cell clones in patients with metastatic melanoma. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 6789- 6795.
- [95] Miranda EI. MAGE, biological functions and potential clinical applications. *Leukemia Research* 2010; 34: 1121–1122.
- [96] Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa L, y Lyerly HK. Induction of Tumor-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Patients by Autologous Tumor RNA-Transfected Dendritic Cells. *Annals of Surgery* 2002; 4: 540-549.
- [97] Napoletano C, Rughetti A, Landi R, Pinto D, Bellati F, Rahimi H, Spinelli GP, Pauselli S, Sale P, Dolo V, De Lorenzo F, Tomao F, Benedetti-Panici P, Frati L, Nuti M. Immunogenicity of allo-vesicle carrying ERBB2 tumor antigen for dendritic cell-based anti-tumor immunotherapy. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2009; 22: 647-658.
- [98] Narvaiza I, Mazzolini G, Barajas M, et al. Intratumoral co injection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN-gamma-inducible protein-10 and another encoding IL- 12, results in marked antitumoral synergy. *Journal of Immunology* 2000; 164: 3112-3122.
- [99] Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, Fay J, Banchereau J. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *Journal of Immunotherapy* 2006; 29:545–557.

- [100] Palucka K, Ueno H, Roberts L, Fay J y Banchereau J. Dendritic Cells; Are they clinically relevant?. *Cancer Journal* 2010; 16: 318–324.
- [101] Palucka, K., and Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer* 2012; 12: 265-277.
- [102] Palucka, K., Ueno, H., Fay, J., Banchereau, J. Dendritic cells and immunity against cancer. *Journal of International Medicine* 2011; 269: 64–73.
- [103] Parmiani G, Castelli C, Rivoltini L, Casati C, Tully GA, Novellino L, Patuzzi A, Tosi D, Anichiani A, Santinami M. Immunotherapy of melanoma. *Seminars in Cancer Biology* 2003; 13: 391-400.
- [104] Pruitt SK, Boczkowski D, de Rosa NN, Haley R, Morse MA, Tyler DS, Dannull J, Nair S. Enhancement of Anti-Tumor Immunity Through Local Modulation of CTLA-4 and GITR by Dendritic Cells. *European Journal of Immunology* 2011: 1-11.
- [105] Pulendran B, Tang H y Denning T. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cells subsets. *Current Opinion in Immunology* 2008; 20: 61-67.
- [106] Rabinovich GA, Gabrilovich D y Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual Review of Immunology* 2007; 25: 267-296.
- [107] Reddy, S. T, Swartz, M. A. y Hubbell, J. A. Targeting dendritic cells with biomaterials: developing the next generation of vaccines. *Trends of Immunology* 2006; 27: 573–579.
- [108] Renkvist N, Castelli C, Robbins P, Parmiani G. A listing of tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 2001; 49: 3-15.
- [109] Ribas A, Butterfield LH, William H. McBride WH, Dissette VB, Koh A, Vollmer CM, Hu B, Chen AY, Glaspy JA y Economou JS. Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells. *Cancer Gene Therapy* 1999; 6: 523–536.

- [110] Romina S Goldszmid y Giorgio Trinchieri. The price of immunity. *Nature Immunology* 2012; 10: 932-938.
- [111] Roncarolo MG., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M. K. Type 1T regulatory cells. *Immunology. Reviews* 2001; 182: 68–79.
- [112] Rosenberg SA, Yang JC y Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine* 2004; 10: 909–915.
- [113] Salter RD y Watkins SC. Dendritic cell altered states: what role for calcium? *Immunological Reviews*; 2009: 278-288.
- [114] Sanders, M. T., Brown, L. E., Deliyannis, G. & Pearse, M. J. ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunology and Cell Biology* 2005; 83: 119–128.
- [115] Sang M, Wang L, Ding C, Zhou X, Wang B, Wang L, Lian Y y Shan B. Melanoma-associated antigen genes – An update. *Cancer Letters* 2011; 302: 85–90
- [116] Schaffer JV, Rigel DS, Kopf AW, Bolognia JL. Cutaneous melanoma- Past, present and future. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2004; 51: S65-9.
- [117] Schijns, V. E. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Critical Reviews of Immunology* 2001; 21: 75–85.
- [118] Schuler T. Rapid induction of tumor specific type 1T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved peptide loaded monocyte derived dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 195: 1279-1288.
- [119] Sciutto E, Rosas G, Hernandez M, Morales J, Cruz Revilla C, Toledo A, et al. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 1368-78.
- [120] Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16: 1338–43.

- [121] Segura-Velazquez R, Perez Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 1073-80.
- [122] Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White M, Swanson PE, Old LJ y Schreiber RD. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature* 2001; 410: 1107-1111.
- [123] Sheng, K.C., Pietersz, G.A., Wright, M., Apostolopoulos, V. Dendritic Cells: activation and maturation, application for cancer immunotherapy. *Current Medicine Chemistry* 2005; 12: 1783-1800.
- [124] Shumilina, E., N. Zahir, N. T. Xuan, and F. Lang. 2007. Phosphoinositide 3-kinase dependent regulation of Kv channels in dendritic cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 20: 801–808.
- [125] Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., and Old, L. J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature Review Cancer* 2005; 5: 615–625.
- [126] Smyth, M. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *Journal of Experimental Medicine* 2000; 191: 661–668.
- [127] Stagg J, Johnstone R y Smyth M. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunological Reviews* 2007; 220: 82-101.
- [128] Steinman RM, Hawinger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahke K. Dendritic cell function *in vivo* during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Annual NY Academy of Science* 2003; 987: 15-25.
- [129] Steinman RM. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology* 2007; 37: S53-60.
- [130] Steinman, R. M. y Hemmi, H. Dendritic cells translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiology and Immunology* 2006; 311: 17–58.
- [131] Takeuchi S y Furue M. Dendritic cells, Ontogeny. *Allergology International* 2007; 56: 215-223.
- [132] Thomas, R., Chambers, M., Boytar, R., Barker, K., Cavanagh, L.L., Andersen, J.

Immature human monocyte-derived dendritic cells migrate rapidly to draining lymph nodes after intradermal injection for melanoma immunotherapy. *Melanoma Research* 1999; 9: 474-481.

- [133] Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D y Von den Driesch. Vaccination with MAGE 3A1 peptide- pulsed mature, monocyte derived dendritic cells expands cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *Journal of Experimental Medicine* 1999; 190: 1669-1678.
- [134] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López Casillas F, Kubli Garfias C, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an Epitope Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Protects Mice against Experimental Cysticercosis. *Infection and Immunity* 1999; 2522-2530.
- [135] Toungouz, M., Libin, M., Bulte, F., Faid, L., Lehmann, F., Duriau, D. Transient expansion of peptide-specific lymphocytes producing IFN after vaccination with dendritic cells pulsed with MAGE peptides in patients with mage-A1/A3-positive tumors. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 69: 937-943.
- [136] Trepiaakas R, Berntsen A, Reker Hadrup S<sup>1</sup>, Bjørn J, Geertsen PF, Straten PT, Andersen MH, Pedersen AE, Soleimani A, Lorentzen T, Johansen JS y Svane IM. Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results from a phase I/II trial. *Cytotherapy* 2010; 12: 721-734.
- [137] Trinchieri, G. Interleukin 12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews of Immunology* 2003; 3: 133-146.
- [138] Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *The New England Journal of Medicine* 2004; 351: 998-1012.
- [139] Ullrich E, Ménard C, Flament C, Terme M, Mignot G, Bonmort M, Plumas J, Chaperot L, Chaput N y Zitvogel L. Dendritic cells and innate defense against tumor cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2008; 19: 79-92.



- [140] Van Baren N, Bonnet MC, Creno B, Khammari A, Dorval T, Piperno- Neumann S, Liènard D, Speiser D, Marchand A, Brichard VG, Escudier B, Négrier S, Dietrich PY, Maraninchi D, Osanto S, Meyer RG, Ritter G, Moingeon P, Tartaglia J, Van der Bruggen P, Coulie P y Boon T. tumoral and immunological response after vaccination of melanoma patients with an alvac virus encoding MAGE antigens recognized by T cells. 2005; 23: 9008- 9021.
- [141] Van der Eertwegh AJM, Lensen RJ, Scheper RJ, Giacome G, Meijer CJLM, Bontkes HJ, Grujil TD, Hooijberg E. ASCO Meeting Abstract 2006; 24: 2530.
- [142] Villadangos JA y Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7: 543- 555.
- [143] Wan H y Dupasquier M. Dendritic Cells in vivo and in vitro. *Cellular and Molecular Immunology* 2005; 2: 28-35.
- [144] Wan YY and Flavell RA. How Diverse—CD4 Effector T Cells and their Functions. *Journal of Molecular Cell Biology* 2009; 1-16.
- [145] Wilgenhof S, Van Nuffel AM, Corthals J, Heirman C, Tuytaerts S, Bentejn D, De Coninck A, Van Riet I, Verfaillie G, Vandeloo J, Bonehill A, Thielemans K, Neyns B. Therapeutic vaccination with an autologous mRNA electroporated dendritic cell vaccine in patients with advanced melanoma. *Journal of Immunotherapy*. 2011; 34: 448-56.
- [146] Wu Li y Liu YJ. Development of Dendritic-Cell Lineages. *Immunity Reviews* 2007; 6: 741-750.
- [147] Xia D, Moyana T, Xiang. Combinational adenovirus- mediated gene therapy and dendritic cell vaccine in combating well-established tumors. *Journal of Cell Research* 2006; 16: 241-259.
- [148] Yang B, O'Herrin SM, Wu J, Reagan-Shaw S, Ma Y, Bhat KM, Gravekamp C, Setaluri V, Peters N, Hoffmann FM. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form com- plexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE- positive cell lines. *Cancer Research* 2007; 67: 9954–9962.

- [149] Yang S, Linette GP, Longerich S y Haluska FG. Antimelanoma Activity of CTL Generated from Peripheral Blood Mononuclear Cells After Stimulation with Autologous Dendritic Cells Pulsed with Melanoma gp100 Peptide G209-2M Is. *Journal of Immunology* 2002; 169: 531-539.
- [150] Yee C. Adoptive T cell therapy using antigen- specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proceedings of National Academy of Science USA* 2002; 99: 16168–16173.
- [151] Zhang Y, Sun Z, Nicolay H, Meyer RG, Renkvist N, Stroobant V, Corthals J, Monitoring of anti-vaccine CD4 T cell frecuencies in Melanoma patients vaccinated with MAGE-3 protein. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 2404-2411.
- [152] Zhu Y, Yao S y Chen L. Cell Surface Signaling Molecules in the Control of Immune Responses: A Tide Model. *Cell Press, Immunity* 2011; 34: 466-478.
- [153] Zytvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F y Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews of Immunology* 2008; 8: 59- 73.

# Apéndice

## Research Article

# GK-1 Improves the Immune Response Induced by Bone Marrow Dendritic Cells Loaded with MAGE-AX in Mice with Melanoma

Gabriela Piñón Zárate, Miguel Ángel Herrera Enriquez, Beatriz Hernández Téllez, Katla Jarquín-Yáñez, and Andrés Ellú Castell-Rodríguez

Laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México Edificio A, Sexto Piso, Ciudad Universitaria, Avenida Universidad No. 3000, Ciudad de México 04510DF, Mexico

Correspondence should be addressed to Andrés Ellú Castell-Rodríguez; [castell@unam.mx](mailto:castell@unam.mx)

Received 21 August 2014; Accepted 29 September 2014; Published 30 October 2014

Academic Editor: Jacek Tabarkiewicz

Copyright © 2014 Gabriela Piñón-Zárate et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The aim of dendritic cell (DC) vaccination in cancer is to induce tumor-specific effector T cells that may reduce and control tumor mass. Immunostimulants that could drive a desired immune response are necessary to be found in order to generate a long lasting tumor immune response. GK-1 peptide, derived from *Taenia crassiceps*, induces not only increase in TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , and MCP-1 production in cocultures of DCs and T lymphocytes but also immunological protection against influenza virus. Moreover, the aim of this investigation is the use of GK-1 as a bone marrow DCs (BMDCs) immunostimulant targeted with MAGE antigen; thus, BMDC may be used as immunotherapy against murine melanoma. GK-1 induced in BMDCs a meaningful increment of CD86 and IL-12. In addition, the use of BMDCs TNF $\alpha$ /GK-1/MAGE-AX induced the highest survival and the smallest tumors in mice. Besides, the treatment helped to increase CD8 lymphocytes levels and to produce IFN $\gamma$  in lymph nodes. Moreover, the histopathological analysis showed that BMDCs treated with GK-1/TNF $\alpha$  and loaded with MAGE-AX induced the apparition of more apoptotic and necrotic areas in tumors than in mice without treatment. These results highlight the properties of GK-1 as an immunostimulant of DCs and suggest as a potential candidate the use of this immunotherapy against cancer disease.

## 1. Introduction

Melanoma is a very aggressive skin cancer due to its high metastatic capacity [1, 2]. Early diagnosis increases the survival rate of 95% at 5 years; however, if the diagnosis is delayed the chance of survival decreases to 5% in a year. Surgery, chemotherapy, radiotherapy, and combinations of these have been used for the treatment of melanoma, with poor results [2, 3]. Thus, in recent years, new possibilities with different immunotherapy approaches have been explored [4], like nonspecific immunomodulation based on the use of various cytokines (IL-2, IL-12, and IFN $\gamma$ ), antibodies, and TLR ligands [5–7], in addition to adoptive transfer [8]. Among them, the use of antibodies recognizing CTLA-4 and PD-1 stands out, in an attempt to reverse the inhibition of lymphocyte activation and the adoptive transfer of autologous T cells activated *ex vivo*, although their success has been limited [9–11].

For over a decade, dendritic cells (DCs) have been used in immunotherapy against different varieties of cancer [4, 12, 13]. The most used DCs are the ones differentiated from bone marrow cells or peripheral blood monocytes [14]; particularly the DCs derived from bone marrow cells (BMDCs) may have a greater capacity to activate T lymphocytes [10]. The use of DCs also enables the possibility to load them with tumor peptides and/or with necrotic or apoptotic tumor cells [15, 16]. Although the results are far from satisfactory, the cells loaded with tumor peptides have been proven the most effective in immunotherapy with DCs [17–20]. Also recently, molecules like TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , prostaglandins, alpha galactosylceramides, or TLR ligands have been used. These have increased the activation and antigen-presenting capacity of DCs [21, 22].

Despite the efforts made in the area of immunotherapy, the control of advanced melanoma remains a challenge, so in this work we evaluate the possibility of using immunotherapy through the transfer of DCs pretreated with MAGE-AX.

MAGE-AX is a highly immunogenic peptide, composed of eight amino acid residues, common to the MAGE A1-3 and A5 tumor proteins, which are located primarily in tumor cells [23]. Furthermore, in order to increase the efficiency of this treatment, we included a synthetic peptide designated GK-1, which is one of the three components of the S3Pvac vaccine against porcine cysticercosis [24], which has properties that might be useful to increase the antigen-presenting capacity of DCs [24, 25]. Experimental evidence shows that, in addition to inducing a specific immune response, GK-1 possesses an adjuvant capacity that increases the efficiency of influenza vaccine in mice and pigs [25, 26]. On the other hand, it has been shown that coimmunization of GK-1 with the influenza vaccine increases the specific lymphocyte proliferative capacity against influenza induced by an increase in the activity of DCs [25]. Recently, it has been reported that subcutaneous administration of GK-1 in mice with melanoma induces regression of the tumor mass and increases survival. So the aim of this study was to evaluate the capacity of GK-1 as an immunomodulator in DCs loaded with the MAGE-AX peptide for immunotherapy against murine melanoma.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Ethics Statement.** The study was approved by the Faculty of Medicine, UNAM ethical review board, and was performed in accordance with the Mexican Official Norm NOM 062-ZOO-1999.

**2.2. Mice.** 60 male C57BL/6 (H2K<sup>b</sup>) aged six to eight weeks old mice were included in each experiment. They were kept in controlled light-dark and temperature conditions and fed *ad libitum* in the animal facilities of the Department of Cell and Tissue Biology from the Faculty of Medicine, UNAM.

**2.3. Reagents.** Monoclonal antibodies for staining of cells analyzed by flow cytometry, CD3-biotin, CD8-CyChrome, CD11c-allophycocyanin, CD40-biotin, CD86-biotin, Ia/Ie-phycoerythrin, IL-12-biotin, IFN $\gamma$ -biotin, and IL-10-biotin, were purchased from Pharmingen, BD Bioscience, USA. The B16/F10 murine melanoma cell line with the H-2K<sup>b</sup> haplotype was acquired from the American Type Culture Collection, USA. The carcinoma cell line of Chinese hamster ovary (CHO) transfected with the granulocyte-macrophage growth factor gene (GM-CSF) was kindly donated by Dr. Edda Scutto from the Institute for Biomedical Research, UNAM. The RPMI-1640 and F12 (Ham) culture media were purchased from GIBCO, USA.

**2.4. Peptides.** The MAGE-AX (LGITYDGM) protein was synthesized by Research Genetics (Invitrogen, Leiden, Holland), with a 94% purity. The GK-1 peptide (GYYPSPDP-NTFYAPPSA), with 96.11% purity, was synthesized by Alpha Diagnostics International, San Antonio, TX, USA. Both peptides were stored at -70°C. Using the Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay from Thermo Lab, the absence of bacterial endotoxin in both peptides was confirmed.

**2.5. Differentiation of Dendritic Cells Derived from Bone Marrow (BMDCs).** For the differentiation of BMDCs, the methodology previously described [27, 28] was used with some modifications. The femur and tibia of three C57BL/6 mice were obtained, the muscle was removed, and the bones sanitized by continuous washing with 70% ethanol for 2 min. Thereafter, to obtain the bone marrow, the epiphyses of the bones were removed and the diaphysis perfused with PBS (0.4 g/L potassium phosphate, 0.726 g/L sodium phosphate and 9 g/L sodium chloride, Sigma). The bone marrow cells were inoculated in RPMI-1640 medium supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL, Sigma), L-glutamine (2 mM, Sigma), mercaptoethanol (50  $\mu$ M), and 10% fetal bovine serum (BioWest, USA), in 75 cm<sup>3</sup> culture flasks at a concentration of  $5 \times 10^5$  cells per mL. The complete medium was supplemented at 20% with supernatant of the CHO cell line, and the supernatant contained approximately 200 U/mL of GM-CSF. Every third day the GM-CSF supplemented RPMI medium was replaced. At the tenth day of growth, the cells were treated with 1  $\mu$ g/mL LPS or 50 ng/mL TNF $\alpha$ , 25 mg/mL MAGE-AX, and/or 10  $\mu$ g/mL GK-1 for 24 hours, so that the following groups were formed: (1) without treatment (WT), (2) LPS, (3) TNF $\alpha$ , (4) MAGE-AX, (5) GK-1, (6) TNF $\alpha$ /MAGE-AX, (7) TNF $\alpha$ /GK-1, and (8) TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1. The degree of maturation and activation of BMDCs was assessed by monitoring the expression of MHCII, CD86, CD80, and CD40 molecules by flow cytometry.

**2.6. Phenotype Characterization of BMDCs.** The BMDCs phenotype was characterized by flow cytometry. Cell suspensions were stained at 4°C with the following antibodies: CD11c-allophycocyanin, Ia/Ie-isothiocyanate, CD40-biotin, CD80-biotin, CD86-biotin, and IL-12-biotin. The BMDCs treated with LPS, TNF $\alpha$ , GK-1, and TNF $\alpha$ /GK-1 were incubated with 1  $\mu$ g/mL Brefeldin A for 4 hours; then the cells were fixed with BD Cytfix buffer and permeabilized with BD Perm/Wash buffer from BD Bioscience, USA. Afterwards, the BMDCs were stained with anti-IL-12 and streptavidin conjugated to phycoerythrin. Samples were acquired on a BD Bioscience FACScalibur flow cytometer and analyzed with the Flow Jo software.

**2.7. Tumor Induction.** For melanoma induction 60,000 B16/F10 cells were inoculated subcutaneously in 30 C57BL/6 mice for each of the tests performed. After a week of tumor induction, therapy with BMDCs matured with TNF $\alpha$ , loaded with MAGE-AX antigens, and stimulated with GK-1 was carried out.

**2.8. Immunization Protocol.** For each of the different treatments five groups of ten mice each randomly assigned were formed, one received no treatment and four received subcutaneous inoculation of  $1 \times 10^6$  BMDCs matured with TNF $\alpha$ ; groups were formed according to presence or absence of GK-1 stimulation and MAGE-AX load, as follows: (1) 300  $\mu$ L of PBS (WT), (2) BMDCs/TNF $\alpha$ , (3) BMDCs/TNF $\alpha$ /MAGE-AX,

(4) BMDCs/TNF $\alpha$ /GK-1 and (5) BMDCs/TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1. The treatment was administered once a week for three weeks. The experiment was repeated, and data were pooled.

**2.9. Survival and Tumor Size.** From the moment in which the groups of mice received the various treatments, the mice survival was recorded, and every other day the largest diameter of the tumors was measured using a vernier caliper.

**2.10. Staining of Histological Sections with Hematoxylin and Eosin.** The histopathological evaluation of the melanomas was carried out following previously described procedures [29]. The dissected tumors were fixed in Zamboni solution (picric acid saturated solution and 4% buffered formalin) for 24 hours. The fixed tumors were embedded in paraffin afterwards. Subsequently, up to 10 histological sections were performed, of about 5  $\mu$ m each, which were stained with hematoxylin and eosin for histological examination. The record of the histological study was performed using photomicrographs, showing an area of 1,093,456.9  $\mu^2$ . It is important to mention that photomicrographs were taken in the entire area of each of the 10 histological sections, with a 20x objective on a Nikon Eclipse 801 microscope. In order to obtain the area percentage of cell death in each photomicrograph, the area of cell death (acidophilic regions with abundant cells with pyknotic nuclei) was recorded through the use of the Motic Images Plus 2.0 software.

**2.11. Cytokine Profile Characterization.** In order to identify the type of immune response,  $1 \times 10^6$  cells/mL of peritumoral lymph nodes, obtained from the groups of mice with different treatments, were stimulated with 25 mg/mL of MAGE-AX for 5 days [30]; then the cultures were treated with 1  $\mu$ g/mL Brefeldin A (BD Bioscience, USA) for 5 hours. Subsequently, the cells were stained at 4°C with anti-CD3-biotin, anti-CD8-cycrome, and streptavidin-isothiocyanate; afterwards they were fixed with BD CitoFix buffer and permeabilized with BD Perm/Wash buffer, all from BD Bioscience, USA. Finally, the cells were stained with anti-IFN $\gamma$  biotin, anti-IL-10 biotin, and phycoerythrin conjugated streptavidin antibodies (BD Bioscience, USA). The samples were acquired on a BD Bioscience FACScalibur flow cytometer and analyzed with the Flow Jo software.

**2.12. Statistical Analysis.** Data are shown as means and SEM. Repeated measures analysis of variance test (ANOVA) and Tukey post hoc test was performed in order to evaluate the significance of the effects of the different treatments. A *P* value < 0.05 was considered statistically significant. All analyzes were performed in the GraphPad Prism 6 software, and all graphs were built with the Sigma Plot 12.3 software.

### 3. Results

**3.1. GK-1 Induces an Increment in CD86 and IL-12 Expression in BMDCs.** The BMDCs were differentiated from bone marrow cultures of C57BL/6 mice with GM-CSF. 90% of the

differentiated cells expressed the CD11c/MHCII<sup>+</sup> phenotype (Figure 1(b)).

To corroborate the effect of GK-1 in maturation and activation, the BMDCs were treated with GK-1, TNF $\alpha$ , or TNF $\alpha$ /GK-1. Treatment with GK-1 induced a slight increase in the expression of molecules of the major histocompatibility complex II (MHCII), CD40, CD80, and CD86; however, only the addition of TNF $\alpha$  induced a significant expression (Figure 1). In addition, we analyzed whether GK-1 could induce changes in the percentage of BMDCs positive to MHCII, CD40, CD80, and CD86. The trend percentage of cells positive to MHCII and costimulatory molecules was similar to the trend of the mean fluorescence intensity (MFI). Stimulation with TNF $\alpha$  or TNF $\alpha$ /GK-1 resulted in a statistically significant increase in the percentage of positive BMDCs to MHCII, CD40, CD80, or CD86 molecules (Figure 1).

MAGE-AX was used as a tumor antigen to induce a specific response against melanoma, so also it was verified whether exposure to MAGE-AX could induce a change in the expression of MHCII and costimulatory molecules. The BMDCs phenotype matured with TNF $\alpha$  with or without GK-1 and MAGE-AX showed no significant changes in the MFI of costimulatory molecules or in the percentage of positive BMDCs to these molecules (Figure 2).

To assess IL-12 production in the BMDCs, the obtained cells were treated with TNF $\alpha$ , GK-1, or TNF $\alpha$ /GK-1 for 24 hours and then incubated with Brefeldin A for 5 hours and finally IL-12 production was determined. An increase was noted in the expression and number of cells positive to IL-12 in the groups of cells stimulated with TNF $\alpha$ , GK-1, and TNF $\alpha$ /GK-1 in comparison with the control group (WT). The presence of TNF $\alpha$  did not induce a higher production of IL-12 than GK-1 (Figures 1(i) and 1(j)).

**3.2. Increased Survival and Reduced Tumor Growth Rate in Mice Treated with BMDCs Loaded with MAGE-AX and GK-1 Stimulated.** All BMDCs used in the immunotherapy were matured with TNF $\alpha$  and treated with (1) GK-1, (2) MAGE, or (3) MAGE-AX/GK-1. BMDC therapy started one week after inoculation of  $6 \times 10^5$  B16F10 cells. Mice receiving BMDCs loaded with MAGE-AX and stimulated with GK-1 showed a higher survival rate relative to the control groups. Mice that received no therapy as well as those who received the BMDCs/TNF $\alpha$  treatment showed the lowest survival rate (100% death at days 24-25). The BMDCs groups treated with TNF $\alpha$ /MAGE-AX or GK-1 had a survival of at least 10% at day 40, while 40% of the mice that received the BMDC treatment with TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 achieved a 40% survival rate up to 1.5 years after being inoculated with melanoma (Figure 3).

On the other hand, the largest diameter of the tumor was measured every other day. The groups treated with TNF $\alpha$ /MAGE-AX or GK-1 BMDCs remained similar in size throughout the treatment, whereas untreated mice and those inoculated with TNF $\alpha$  BMDCs showed an increased tumor growth rate compared to the other groups. It is important to note that the group of mice that received TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 BMDCs retained the lowest rate of tumor growth since the beginning of the treatment (Figure 4).

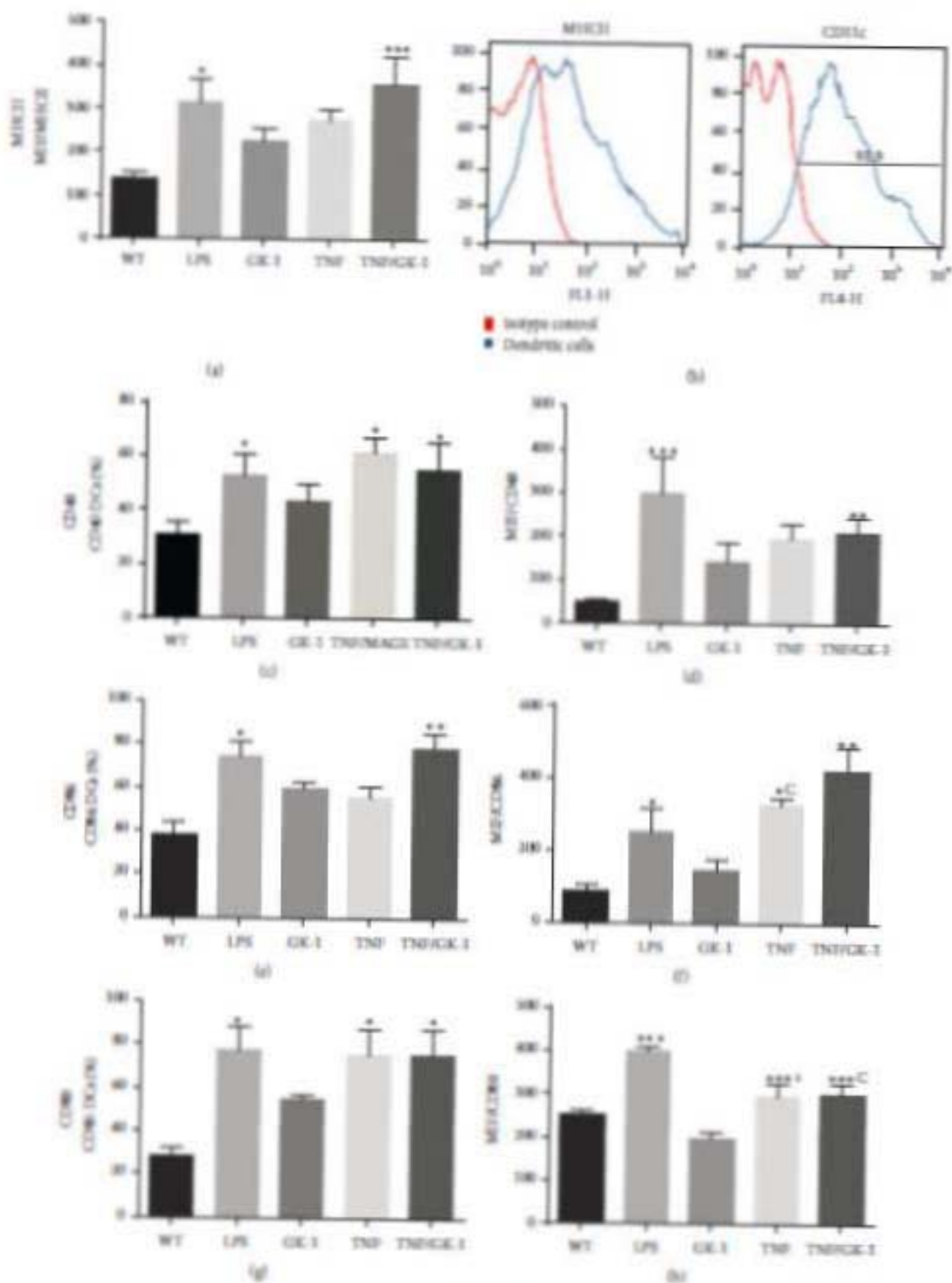
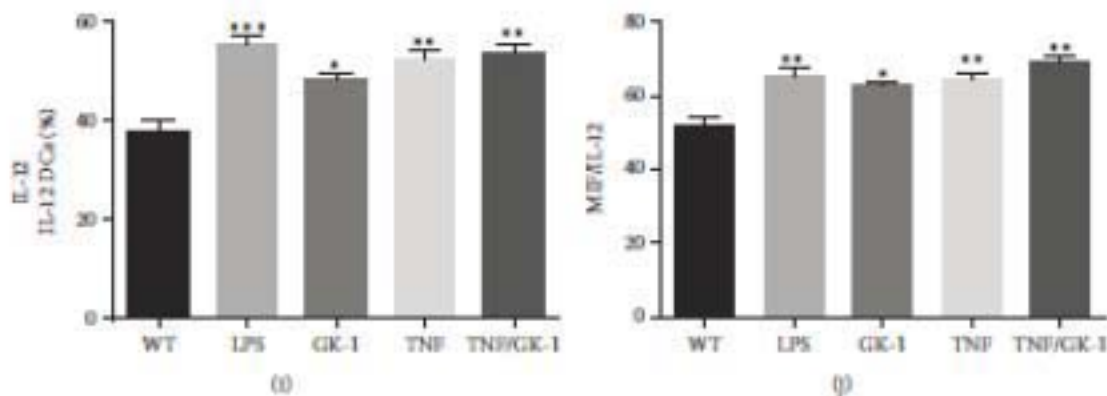


FIGURE 1 | 100



**FIGURE 1: BMDCs phenotype.** Levels of molecules of the major histocompatibility complex II (MHCII), CD40, CD80, CD86, and IL-12 in BMDCs were measured after different treatments: control (without treatment: WT), LPS, GK-1, TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1. Treatment with LPS, TNF $\alpha$ , and TNF $\alpha$ /GK-1 induces increased expression of MHCII, CD40, CD80, and CD86. When BMDCs were treated only with GK-1 an increase in the production of IL-12 was found. (a) Mean fluorescence intensity (MFI) of MHCII. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . (b) BMDCs phenotype after 10 days of differentiation. 91.9% differentiation was induced (91.9% of CD11c+ cells). Red: isotype control. Blue: BMDCs. (c) Percentage of CD40+ BMDCs after treatment. \* $p < 0.05$ . (d) MFI of CD40 in BMDCs. \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . (e) Percentage of CD86+ BMDCs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ . (f) MFI of CD86 in BMDCs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$  TNF $\alpha$  versus GK-1. (g) Percentage of CD80+ BMDCs. \* $p < 0.05$ . (h) MFI of CD80 in BMDCs. ANOVA, Tukey. \*\*\* $p < 0.0001$ , \* $p < 0.0001$  TNF/GK-1 versus GK-1, \* $p < 0.0001$  TNF versus GK-1. (i) Percentage of IL-12+ BMDCs. (j) MFI of IL-12 in BMDCs. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ . Mean  $\pm$  SEM  $n \geq 3$ .

**3.3. GK-1 Stimulated BMDCs Induced an Increase in the IFN $\gamma$  and IL-10 Production for CD8 Lymphocytes from Lymph Nodes.** No significant differences were found in the percentage of CD8 T lymphocytes in lymph nodes peripheral to the tumor (Figure 5(a)). In terms of cytokine production, in CD8 T lymphocytes, the TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ /GK-1, and TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 groups showed increased production of IFN $\gamma$  compared to the WT group and TNF $\alpha$ /MAGE-AX BMDCs; however, groups treated with TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 and TNF $\alpha$ /GK-1 BMDCs showed a higher IFN $\gamma$  production than the TNF $\alpha$  group (Figure 5(b)). Finally, in the case of IL-10, the GK-1 group showed a significant increase in the percentage of CD8 IL-10+ T cells in comparison to the TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1, and TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 groups (Figure 5(a)). No changes were observed in the IL-10 MFI (Figure 5(b)). It is important to note that the higher levels of fluorescence were showed by IFN $\gamma$  in CD8+ T lymphocytes (Figure 5(b)), in comparison with IL-10, although the group treated with TNF $\alpha$ /GK-1 BMDCs showed a significant increase in the percentage of CD8 IL-10+ T lymphocytes in comparison to the other groups (Figure 5(a)).

**3.4. Histopathological Examination Showed That the Administration of GK-1 Stimulated BMDCs Induced an Increase in the Areas of Tumor Cell Death.** The histopathological examination of the tumors of the WT mice and from those who received BMDCs treated with TNF $\alpha$  showed abundant epithelioid cell nests, characterized by the presence of many nuclei with abundant euchromatin, which is indicative of a great cellular activity. Also numerous blood vessels between the nests of epithelioid cells were observed (Figures 6(a)-6(b)). Both parameters are related to tumors with a high growth rate [29]. While sections of the tumors from mice that received treatment with MAGE-AX, GK-1, or

MAGE-AX/GK-1 BMDCs showed numerous areas of cell death and fewer areas with epithelioid cells than control group, the areas of cell death were characterized by showing eosinophilic regions formed by cellular debris and cells with pyknotic nuclei (Figures 6(c), 6(d), and 6(e)). Afterwards, photographs were taken of the total tumor area, in order to evaluate the percentage of the area of cell death in the tumors (Figure 6(f)). It was observed that the tumors from WT mice and from those who received treatment with TNF $\alpha$  BMDCs were solid tumor masses with few areas of cell death, whereas the tumors from the mice that received therapy with the TNF $\alpha$ /MAGE-AX, TNF $\alpha$ /GK-1, or TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 BMDCs showed larger cell death areas than those from the mice in the control groups and those that received TNF $\alpha$  BMDCs. No significant differences between the TNF $\alpha$ /MAGE, TNF $\alpha$ /GK-1, and TNF $\alpha$ /MAGE/GK-1 groups were found (Figure 6(f)).

## 4. Discussion

In the present study we show that BMDCs loaded with MAGE-AX significantly decrease the rate of tumor growth through an increase in the specific antitumor immune response against induced melanoma (Figures 4 and 5), which results in an increase of the area of cell death in tumors (Figure 6) and in the survival time of mice with melanoma (Figure 3). Furthermore, the additional treatment with GK-1 of BMDCs loaded with MAGE-AX significantly increased the efficiency of the immunotherapy.

The effect of GK-1 on the expression of activation markers and BMDCs maturation deserves special comment. GK-1 significantly increased CD86 expression and IL-12 production in BMDCs (Figure 1). CD86 is a molecule involved in the immunological synapse; therefore, the increase can



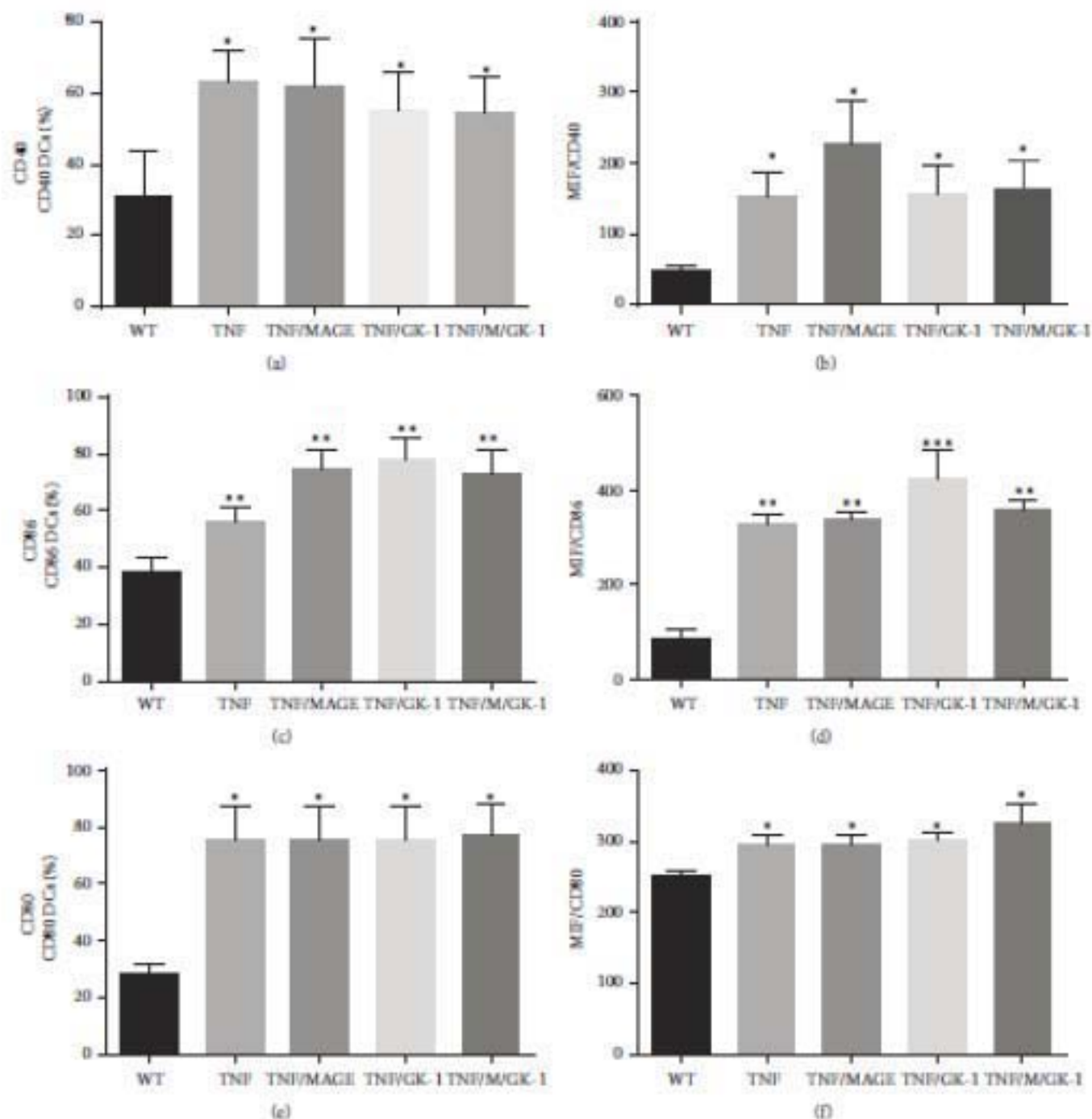
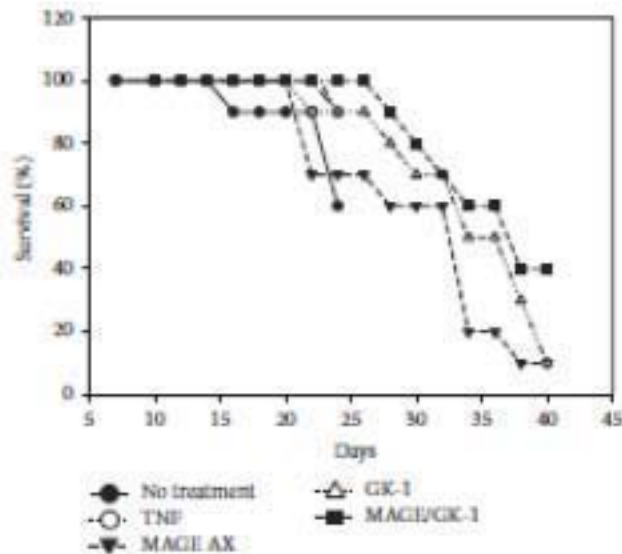


FIGURE 2: Effect of GK-1 and/or MAGE-AX with TNF $\alpha$  in the BMDCs phenotype. Treatment with MAGE-AX did not induce changes in the phenotype of BMDCs. (a) Percentage of CD40<sup>+</sup> BMDCs. \* $P < 0.05$ . (b) MFI of CD40 in BMDCs. \* $P < 0.05$ . (c) Percentage of CD86<sup>+</sup> BMDCs. \*\* $p < 0.001$ . (d) MFI of CD86 in BMDCs. \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . (e) Percentage of CD80<sup>+</sup> BMDCs. \* $P < 0.05$ . (f) MFI of CD80 in BMDCs. \* $P < 0.05$ . Mean  $\pm$  SEM  $n \geq 3$ .

be seen as an increase in antigen-presenting capacity of BMDCs that results in the activation of specific T cells against tumors [22, 28, 31, 32]. On the other hand, IL-12 can induce the development of a Th1 response as well as an increase in IFN $\gamma$  production. Both IL-12 and IFN $\gamma$  are involved in immunosurveillance against tumor cells [33–36]. Likewise, it has been shown that exogenous administration

of IL-12 in mice with induced tumors may promote the reduction in tumor size by increasing the activation of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, which are responsible for inducing apoptosis in tumor cells [37, 38]. The use of BMDCs with a mature phenotype and the ability to produce IL-12 is vital for effective results in antitumor immunotherapy, since it has been demonstrated that immature DCs, characterized

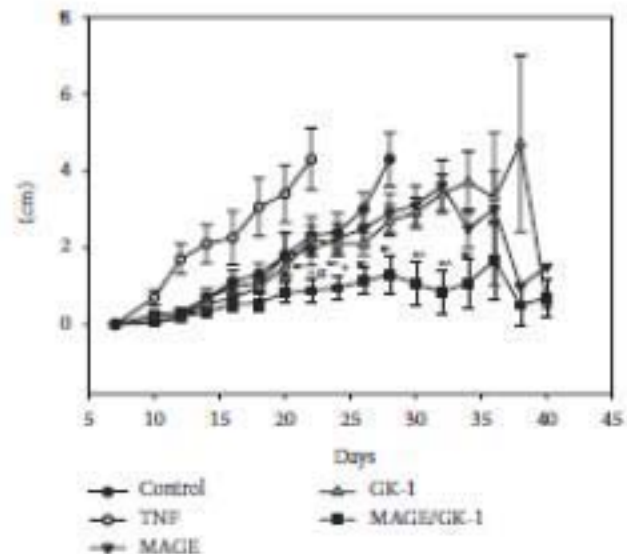


**FIGURE 3: Mice survival.** Survival of mice with melanoma inoculated with BMDCs matured with TNF $\alpha$  and treated with MAGE-AX, GK-1, or MAGE-AX/GK-1. The MAGE-AX/GK-1 group was the one which had a higher survival rate, 40% up to 15 years after being inoculated with the BMDCs. It is followed by the GK-1, MAGE-AX, TNF $\alpha$ , and untreated group (WT), respectively.

by low expression of costimulatory molecules, can induce a tumor immune nonresponse, tolerance, or even absence of immunological memory in patients with melanoma [39]. Furthermore, the use of mature and active DCs can induce immunological memory as well as an effective immune response characterized by a CD8 T lymphocytes-dependent response [40, 41].

In this work, it was observed that GK-1 positively modulated BMDCs activation by inducing an increased expression of CD86 and IL-12. This may explain the decrease in the rate of tumor growth, the development of a Th1 response, and the cell death observed in the histopathology of this study. GK-1 is a molecule whose physicochemical properties can improve its recognition by scavenger receptors on the membrane of BMDCs, promoting tumor antigen presentation and releasing proinflammatory cytokines, situation already observed in DCs treated with GK-1 [42]. Furthermore, the obtained results increase the likelihood of the use of immunotherapy mediated by DCs transfer and the use of immunomodulators, such as GK-1, in both curative and preventive controls of melanoma in those individuals who have had their tumor resected.

Even though GK-1 stimulated BMDCs induced an increase in the antitumor immune response, the use of MAGE-AX BMDCs produced a specific response against the tumor of almost the same intensity as that induced by GK-1. Furthermore, it is noteworthy that the addition of MAGE-AX to BMDCs cultures caused no adverse changes in cell activation (Figure 2); therefore, BMDCs could be used in immunotherapy. MAGE antigens have been used already in immunotherapy; the results have been mixed, since the developed immune response has not been effective and



**FIGURE 4: Tumor development.** Tumor size in mice inoculated with BMDCs matured with TNF $\alpha$  and treated with MAGE-AX, GK-1, or MAGE-AX/GK-1. From day 22 to day 24 the group treated with MAGE/GK-1 BMDCs had less tumor growth in comparison with all groups. From day 26 no tumor growth was shown in the TNF $\alpha$  and untreated groups, because the survival rate was 0%. Tumor growth of the MAGE-AX and GK-1 groups was similar. Without treatment (WT). Mean  $\pm$  SEM  $n \geq 3$ , \* $P < 0.05$  MAGE/GK-1 versus MAGE, <sup>a</sup> $P < 0.05$  MAGE/GK-1 versus GK-1, <sup>b</sup> $P < 0.001$  MAGE/GK-1 versus TNF, <sup>c</sup> $P < 0.001$  MAGE/GK-1 versus WT.

tumor regression has been sporadic. However, when DCs loaded with MAGE-AX were used, there has been increase in survival, a reduction of tumor size in mice with melanoma, and development of a specific immune response dependent on CD8 T cells and IFN $\gamma$  production [23, 43]. Furthermore, MAGE antigens can be found in other types of cancer, like bladder cancer, leukemia, and glioblastoma. However, MAGE-AX is a molecule that can be located in mice, which may be the reason why it would be important to develop a molecule with a consensus sequence in relation to MAGE human molecules, in order to be used in cancer immunotherapy in patients with melanoma or other types of cancer. Therefore, MAGE is a good choice for use in immunotherapy, since it is able to induce a strong specific immune response and can be used in the treatment against various types of cancer [43].

To evaluate the effect of BMDCs transfer in specific antitumor immunity, the levels of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in lymph nodes of treated and untreated mice with melanoma were measured (Figure 5). The route of BMDCs inoculation was subcutaneous, so that the response was studied in peritumoral lymph nodes, as it has been studied that the subcutaneous administration of DCs induced a Th-1 response by lymphocytes from peritumoral lymph nodes [44], while the intravenous administration of DCs induces a response dependent on spleen lymphocytes [45, 46]. In our model, a response was observed in the peritumoral lymph nodes as discussed below.

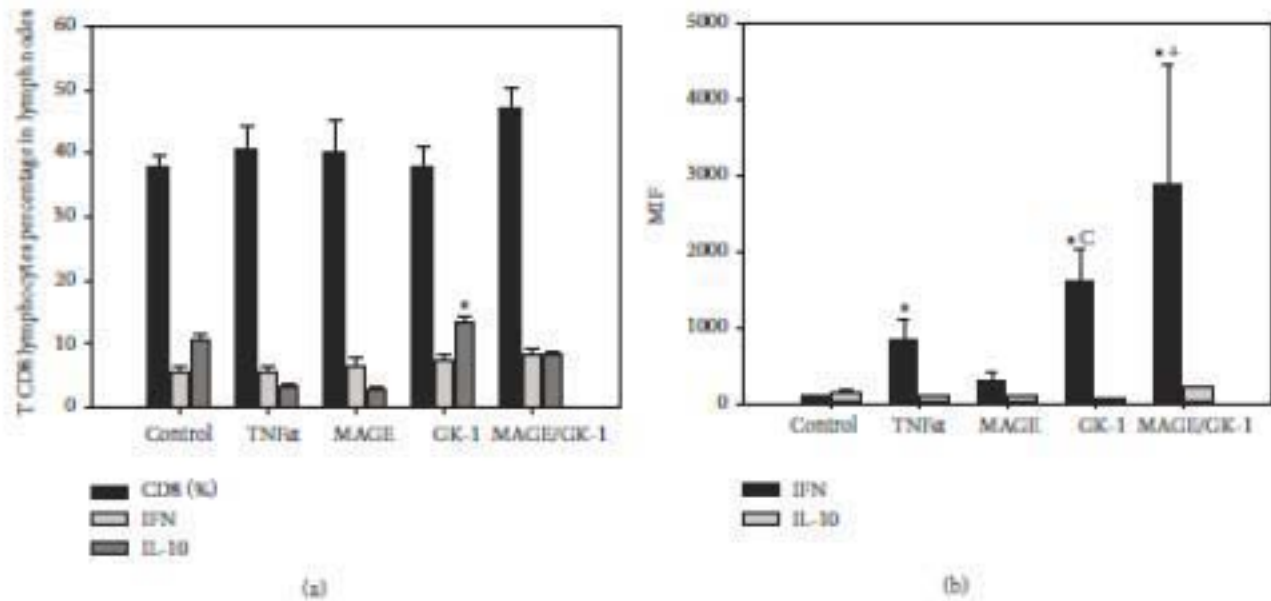


FIGURE 5: Cytokine profile. Percentage of total CD8 T cells and IFN $\gamma$  or IL-10 producing CD8 cells, in peritumoral lymph nodes of mice with melanoma inoculated with BMDCs matured with TNF $\alpha$  and treated with MAGE-AX, GK-1, or MAGE-AX/GK-1. Mice treated with BMDCs MAGE/GK-1 showed increased levels of IFN $\gamma$  in CD8 $^{+}$  lymphocytes. (a) Percentage of total CD8 T cells and IFN $\gamma$  and IL-10 producers. \* $p < 0.05$  GK-1 versus all groups. (b) MIF of IFN $\gamma$  and IL-10 in CD8 T lymphocytes. \* $p < 0.05$ , <sup>C</sup> $p < 0.05$  GK-1 versus MAGE, \*\* $p < 0.05$  MAGE/GK-1 versus MAGE. Without treatment (WT). Mean  $\pm$  SEM  $n \geq 3$ .

The lymph nodes of the mice that received treatment with BMDCs were analyzed to study the response developed by the treatment. The TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 group showed the highest levels of CD8 $^{+}$  T lymphocytes as compared to the other groups (Figure 5(a)). This is important, since a successful antitumor immune response is mediated by T lymphocytes [43, 47]. CD8 $^{+}$  T lymphocytes are responsible for inducing tumor cell death and the secretion of cytokines, which can induce the activation of both T lymphocytes and other immune cells [13, 46]. Therefore, the use of GK-1 contributed to the increase in the antitumor response mediated by T cells located in lymph nodes, whereas MAGE-AX promoted that such response was specific against melanoma.

Our data demonstrates there was increased amount of T CD8 IL-10 $^{+}$  lymphocytes and IFN $\gamma$  MIF when mice with melanoma were treated with BMDCs stimulated with GK-1 and loaded with MAGE-AX. It is highly remarkable to mention that although the percentage of CD8 IL-10 $^{+}$  was increased, the MIF of IFN $\gamma$  was higher than IL-10 MIF in T CD8 lymphocytes. IFN $\gamma$  is a cytokine associated with a Th1 antitumor effective immune response, characterized by proliferation of cytotoxic CD8 $^{+}$  T cells and macrophage activation [37, 48, 49]. It is possible that the increase of IFN $\gamma$  has been induced by IL-12 secretion by BMDCs [38], since it was observed that GK-1 stimulated the increase in the production of this cytokine (Figures 1(i) and 1(j)). It is known that IL-12 can stimulate T cells to produce IFN $\gamma$  [33, 38, 50], so these events also could have happened in our model.

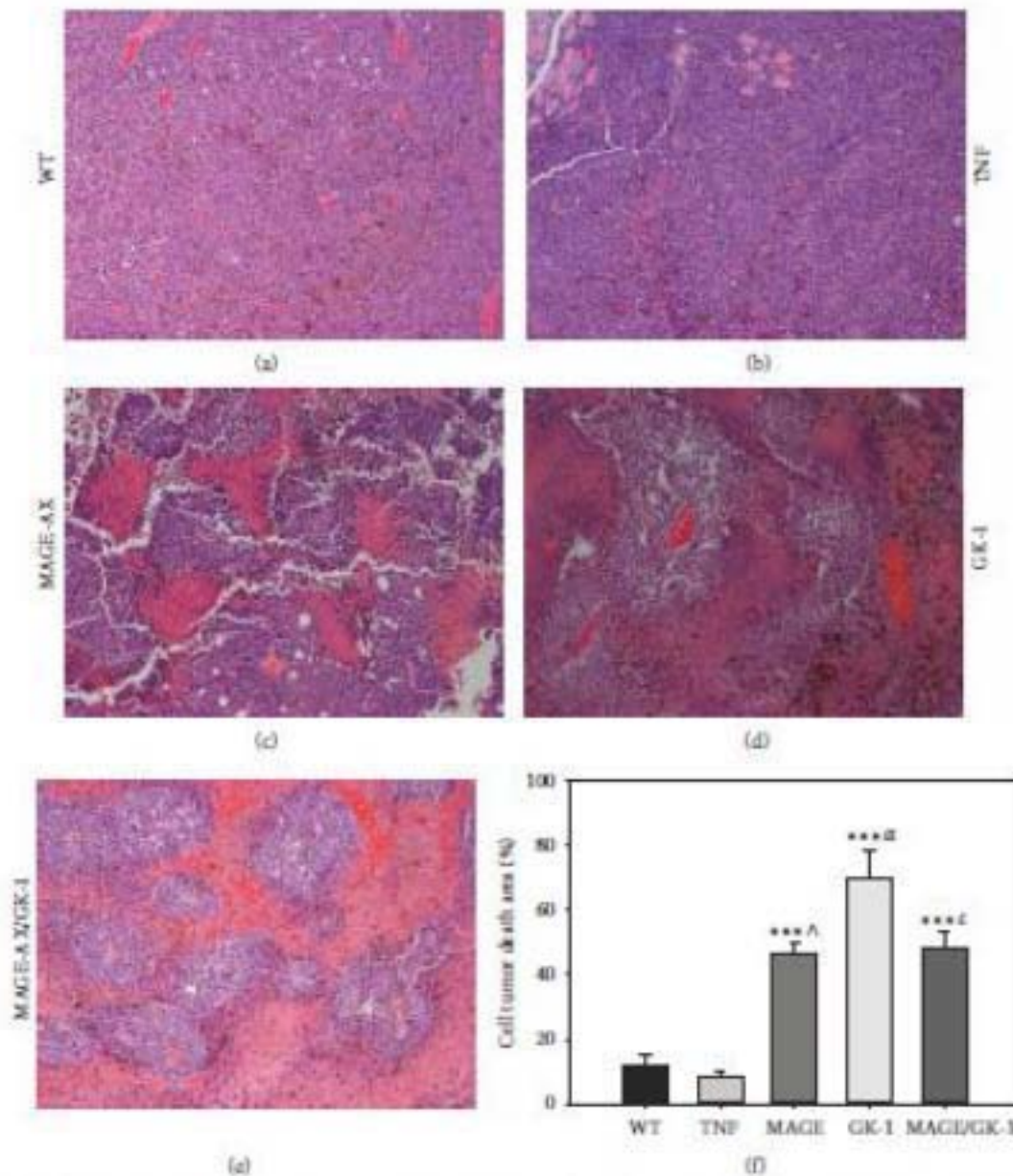
In the case of IL-10, several studies have reported that patients with cancer present high IL-10 concentrations, which may be the reason why its increment has been correlated with a poor prognosis [51]. It has also been described

that this cytokine induces an immunosuppressive tumor environment, resulting in the inhibition of cells such as macrophages, DCs, and lymphocytes [52]. It is therefore noteworthy that BMDCs loaded with MAGE-AX and stimulated with GK-1 did not induce significant changes in IL-10, but they promoted high IFN $\gamma$  levels in CD8 $^{+}$  T lymphocytes in peritumoral lymph nodes (Figure 5), vital signs for an effective Th1 antitumor response to be carried out, which is hoped for in cancer patients.

The aforementioned data were correlated with the histopathological findings, the survival and the tumor growth rate. Treatment with the MAGE-AX/GK-1 BMDCs showed tumors with abundant areas of cell death (Figure 6), low tumor growth (Figure 4), and a survival rate of up to 1.5 years after the melanoma being induced (Figure 3). It is important to remember that in the lymph node of mice receiving TNF $\alpha$ /MAGE-AX/GK-1 BMDCs, increased levels of CD8 T lymphocytes were found, which are involved in the induction of tumor cell death [9, 30], so it is very likely that the increase in the area of cell death as well as the decrease in tumor growth and survival gain were caused by the activation of CD8 T cells. On the other hand, it has been studied that tumor cell death also increases the immune response against the tumor [5]; therefore it is possible that cell death induced by the vaccination with BMDCs loaded with MAGE-AX and stimulated with GK-1 helps to increase the antitumor immune response in this model.

## 5. Conclusions

Our findings demonstrate that the addition of GK-1 to BMDCs loaded with MAGE-AX decreases the rate of tumor



**FIGURE 6: Histopathological analysis.** Photomicrographs of histological sections of tumors from mice vaccinated with BMDCs matured with TNF $\alpha$  and treated with MAGE-AX, GK-1, or MAGE-AX/GK-1. Groups MAGE-AX, GK-1, and MAGE-AX/GK-1 showed plentiful tumor cell death areas. (a) No treatment (WT). Abundant tumor cells and blood vessels were observed. (b) TNF $\alpha$ . The same characteristics as those observed in untreated mice were observed: abundant tumor cells and blood vessels. (c) MAGE-AX. (d) GK-1. (e) MAGE-AX/GK-1. In (c), (d), and (e), pink areas (eosinophilic), composed of dead cells, were observed in addition to purple areas (basophilic), composed of very active tumor cells. (f) A graph showing the change in the areas of cell death in tumors from mice that were treated with BMDCs and which were stimulated with TNF $\alpha$ , MAGE-AX, GK-1, or MAGE-AX/GK-1. \*\*\* $P < 0.001$ , <sup>a</sup> $P < 0.001$  MAGE versus TNE, <sup>b</sup> $P < 0.0001$  GK-1 versus TNF $\alpha$ , <sup>c</sup> $P < 0.001$  MAGE/GK-1 versus TNE. Mean  $\pm$  SEM,  $n \geq 3$ .

growth and increases the survival of mice and the expression of CD86 and IL-12 in the BMDCs, as well as the levels of CD8 IFN $\gamma$  producing T cells. The presence of tumor cell death is also evident, indicating that GK-1 may positively immunomodulate a Th1 response that favors tumor growth control. The evidence reported in this study indicates the usefulness of GK-1 not only for the treatment of melanoma,

but also preventively, as in the case of people who have undergone cancer surgery and want to prevent the reappearance of a tumor. It is also appropriate to investigate whether GK-1 may be involved in the activation of other cell types associated with immunosurveillance, so that it can be used in the activation of other cell lines that could be used in immunotherapy in the future.

## Abbreviations

IL:	Interleukin
IFN $\gamma$ :	Interferon gamma
TNF $\alpha$ :	Tumor necrosis factor alpha
TLR:	Toll like receptor
CTLA-4:	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DCs:	Dendritic cells
BMDCs:	Bone marrow dendritic cells
MAGE-A3:	Melanoma-associated antigen A3
GM-CSF:	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
MFI:	Mean fluorescence intensity

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This research was partially supported by project PAPIIT-DGAPA IN225805 and IN214109, UNAM, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) 50396. The first author is a student of Ph.D. Program "Posgrado en Ciencias Biológicas" of the Universidad Nacional Autónoma de México and acknowledges the scholarship and financial support provided by CONACYT, UNAM, Programa de Investigación para el Desarrollo y Optimización de Vacunas, Alérgenos y Métodos Diagnósticos del IIR, and Instituto Panamericano de Profesionales Científicos. The authors thank Sara Judith Alvarez and Raquel Guerrero Alujara for expert technical assistance, Christian Cardenas-Monroy for language technical advice, and Nancy Carolina Pison-Zarate for providing Spanish-English translation and helpful technical advice.

## References

- [1] S. W. Krause, C. Neumann, A. Scuri, S. Mayer, J. H. Peters, and R. Andriessen, "The treatment of patients with disseminated malignant melanoma by vaccination with autologous cell hybrids of tumor cells and dendritic cells," *The Journal of Immunotherapy*, vol. 25, no. 5, pp. 423-428, 2002.
- [2] D. E. Fisher, E. E. Madram, M. McMahon et al., "Meeting report: fourth international congress of the Society for Melanoma Research," *Pigment Cell and Melanoma Research*, vol. 21, no. 1, pp. 15-26, 2008.
- [3] G. Ferrarini, C. Castelli, L. Sivolini et al., "Immunotherapy of melanoma," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 13, no. 6, pp. 394-400, 2003.
- [4] K. Polacka and J. Banchereau, "Cancer immunotherapy via dendritic cells," *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, no. 4, pp. 265-277, 2012.
- [5] G. Dranoff, "Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 1, pp. 11-22, 2004.
- [6] S. Adams, "Toll-like receptor agonists in cancer therapy," *Immunotherapy*, vol. 1, no. 6, pp. 949-964, 2009.
- [7] N. Bhardwaj, S. Cijacic, and N. B. Saperstein, "TLR agonists: are they good adjuvants?" *The Cancer Journal*, vol. 16, pp. 382-390, 2010.
- [8] S. A. Rosenberg, N. P. Restifo, I. C. Yang, R. A. Morgan, and M. E. Dudley, "Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 4, pp. 299-308, 2008.
- [9] C. Yee, I. A. Thompson, D. Byrd et al., "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 25, pp. 16768-16773, 2002.
- [10] L. Bai, P. Beckhous, M. Fincher et al., "Cognate interactions between memory T cells and tumor antigen-presenting dendritic cells from bone marrow of breast cancer patients: bidirectional cell stimulation, survival and antitumor activity in vivo," *International Journal of Cancer*, vol. 103, no. 1, pp. 73-83, 2003.
- [11] J. Sagg, R. W. Johnston, and M. J. Smyth, "From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy," *Immunological Reviews*, vol. 220, no. 1, pp. 82-101, 2007.
- [12] J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature*, vol. 392, no. 6673, pp. 245-252, 1998.
- [13] A. K. Polacka, H. Ueno, J. Connolly et al., "Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8<sup>+</sup> T-cell immunity," *Journal of Immunotherapy*, vol. 29, no. 5, pp. 545-557, 2006.
- [14] E. D. Choi, M. Vodyanik, and I. I. Stakivi, "Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells," *Nature Protocols*, vol. 6, no. 3, pp. 296-303, 2011.
- [15] R. C. Fields, K. Shimizu, and I. I. Mudd, "Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 16, pp. 9482-9487, 1998.
- [16] A. N. Cornilith, A. W. Fowler, D. J. Carbonell, E. Fan, and R. O. Dillman, "Characterization of interferon- $\gamma$ -treated melanoma tumor cells for use in dendritic cell-based immunotherapy," *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, vol. 26, no. 3, pp. 345-351, 2011.
- [17] A. Mackensen, B. Herbst, L.-L. Chen et al., "Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells," *International Journal of Cancer*, vol. 89, no. 2, pp. 385-392, 2000.
- [18] E. Schuler-Thurner, E. S. Schults, T. G. Berger et al., "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," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 10, pp. 1279-1288, 2002.
- [19] C. I. Singhal Jr., G. B. Petroni, G. V. Yarnochikov et al., "Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 21, no. 21, pp. 4036-4038, 2003.
- [20] R. Trypiakas, A. Serivson, S. R. Haldrup et al., "Vaccination with autologous dendritic cells pulsed with multiple tumor antigens for treatment of patients with malignant melanoma: results

- from a phase I/II trial," *Cytotherapy*, vol. 12, no. 6, pp. 721-734, 2010.
- [21] S.-I. Fujii, K. Shimizu, C. Smith, I. Bonifaz, and R. M. Steinman, "Activation of natural killer T cells by  $\alpha$ -galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells *in vivo* and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 2, pp. 267-279, 2003.
- [22] K.-C. Sheng, G. A. Pietersz, M. D. Wright, and V. Apostolopoulos, "Dendritic cells: activation and maturation—applications for cancer immunotherapy," *Current Medicinal Chemistry*, vol. 12, no. 15, pp. 1783-1800, 2005.
- [23] A. O. Eggert, M. H. Andersen, H. Voigt et al., "Characterization of mouse MAGE-derived H-2K<sup>b</sup>-restricted CTL epitopes," *European Journal of Immunology*, vol. 34, no. 11, pp. 3285-3290, 2004.
- [24] E. Sciatto, G. Rosas, M. Hernández et al., "Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine," *Vaccine*, vol. 25, no. 8, pp. 1368-1378, 2007.
- [25] R. Segura-Velázquez, A. Pérez-Torres, G. Rosas et al., "A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine," *Vaccine*, vol. 24, no. 8, pp. 1073-1080, 2006.
- [26] R. Segura-Velázquez, G. Fragoso, E. Sciatto, and A. Sarukhan, "Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 16, no. 9, pp. 1338-1343, 2009.
- [27] M. B. Lutz, N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie et al., "An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow," *Journal of Immunological Methods*, vol. 223, no. 1, pp. 77-92, 1999.
- [28] K. Inaba, M. Inaba, N. Romani et al., "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor," *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 176, no. 6, pp. 1693-1702, 1992.
- [29] V. Kumar, *Robbins and Cotran Pathology Basis of Disease*, Saunders Elsevier, 2010.
- [30] T. M. Clay, A. C. Hobeika, P. J. Mosca, H. K. Lyerly, and M. A. Morse, "Assays for monitoring cellular immune responses to active immunotherapy of cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no. 5, pp. 1127-1135, 2001.
- [31] Y. Y. Wan and R. A. Flavell, "How diverse-CD4 effector T cells and their functions," *Journal of Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 20-36, 2009.
- [32] I. Mitsui, H. Nishikawa, D. Muraoka et al., "Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 10, pp. 2781-2791, 2010.
- [33] M. J. Smyth, K. Y. T. Thia, S. E. A. Street et al., "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 191, no. 4, pp. 661-668, 2000.
- [34] C. A. Janeway Jr., "How the immune system works to protect the host from infection: a personal view," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 13, pp. 7461-7468, 2001.
- [35] G. P. Dunn, I. J. Old, and R. D. Schreiber, "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting," *Immunity*, vol. 21, no. 2, pp. 137-148, 2004.
- [36] M. S. Diamond, M. Kinder, H. Matsushita et al., "Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 10, pp. 1989-2003, 2011.
- [37] I. Narvaiza, G. Mazzolini, M. Barajas et al., "Intratumoral coinjection of two adenoviruses, one encoding the chemokine IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 and another encoding IL-12, results in marked antitumoral synergy," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 6, pp. 3112-3122, 2000.
- [38] G. Trinchieri, "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 2, pp. 133-146, 2003.
- [39] M. Younggotz, M. Libin, F. Bulté et al., "Transient expansion of peptide-specific lymphocytes producing IFN- $\gamma$  after vaccination with dendritic cells pulsed with MAGE peptides in patients with mAGE-A1/A3-positive tumors," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 69, no. 6, pp. 937-943, 2001.
- [40] C. G. Figdor, J. M. de Vries, W. J. Lesterhuis, and C. J. M. Melief, "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way," *Nature Medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 475-480, 2004.
- [41] R. Lande and M. Gilliet, "Plasmacytoid dendritic cells: Key players in the initiation and regulation of immune responses," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1183, pp. 89-103, 2010.
- [42] G. Fragoso, F. Esquivel-Guadarrama, M. A. Santana et al., "Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticercus induces protective immunity," *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 18, no. 7, pp. 1067-1076, 2011.
- [43] T. Connerotte, A. Van Pel, D. Godelaine et al., "Functions of anti-MAGE T-cells induced in melanoma patients under different vaccination modalities," *Cancer Research*, vol. 68, no. 10, pp. 3931-3940, 2008.
- [44] R. Thomas, M. Chambers, R. Boytar et al., "Immature human monocyte-derived dendritic cells migrate rapidly to draining lymph nodes after intradermal injection for melanoma immunotherapy," *Melanoma Research*, vol. 9, no. 5, pp. 474-481, 1999.
- [45] A. Ribas, I. H. Butterfield, W. H. McBride et al., "Characterization of antitumor immunization to a defined melanoma antigen using genetically engineered murine dendritic cells," *Cancer Gene Therapy*, vol. 6, no. 6, pp. 523-536, 1999.
- [46] D. W. Mullins, S. I. Sheasley, R. M. Ream, T. N. J. Bullock, Y.-X. Fu, and V. H. Engelhard, "Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 7, pp. 1023-1034, 2003.
- [47] K. Palucka, H. Ueno, J. Fay, and J. Banchereau, "Dendritic cells and immunity against cancer," *Journal of Internal Medicine*, vol. 269, no. 1, pp. 64-73, 2011.
- [48] V. Shankaran, H. Ikeda, A. T. Bruce et al., "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity," *Nature*, vol. 410, no. 6832, pp. 1107-1111, 2001.
- [49] L. Bracci, E. Proietti, and F. Belandelli, "IFN- $\alpha$  and novel strategies of combination therapy for cancer," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1112, pp. 256-268, 2007.
- [50] R. Barreira da Silva and C. Münz, "Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 21, pp. 3505-3518, 2011.

- [51] R. M. Steinman, D. Hawiger, K. Liu et al., "Dendritic cell function *in vivo* during the steady state: a role in peripheral tolerance," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 987, pp. 15–25, 2003.
- [52] G. A. Rabinovich, D. Gabrilovich, and E. M. Sotomayor, "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 25, pp. 267–296, 2007.