



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE HIDROGELES
INYECTABLES DE GE/HA ACOPLADOS A
ANTIGENO MAGE-A5 Y ADYUVANTE CPGS SOBRE
LINFOCITOS T DE RATONES C57BL/6
INOCULADOS CON MELANOMA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

VALENCIA ESCAMILLA ESTHER ALEJANDRA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. KATIA JARQUÍN YAÑEZ
Cd. Mx. 2023**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos:

Al comité evaluador del presente trabajo por aceptar ser parte de este proceso tan importante:

- Dra. Gabriela Piñón Zárate
- Dr. Miguel Santibáñez Andrade
- Dr. Mario Orozco Morales
- M. en C. Jennifer Alcántara Blancarte

Agradezco especialmente a mi tutora, la Dra. Katia Jarquín Yáñez por todo su apoyo a lo largo del proyecto y del desarrollo del escrito, por su disposición, paciencia, consejos, confianza y motivación en todos los momentos.

Agradezco a los miembros del laboratorio de Inmunoterapia e Ingeniería de Tejidos. A la Dra. Gabriela Piñón Zárate por todas sus enseñanzas, su compromiso con el desarrollo del trabajo, consejos y paciencia a lo largo de estos años. Al Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez por permitirme ser parte del laboratorio y por todo su apoyo. A la Bióloga Beatriz Hernández Téllez por brindarme tanto aprendizaje y consejos. Al Dr. Miguel Herrera Enríquez por sus enseñanzas, apoyo y motivación. Y a mis compañeros de laboratorio América, Shammed, Vanessa, Pamela, Michel y Daniela por todos los momentos que compartimos, por su amistad y motivación.

El presente trabajo fue conducido bajo el apoyo del proyecto PAPIIT: IN221419.

Agradezco a mi mamá por siempre creer en mí, ser el mayor apoyo toda mi vida, por todo su amor y sus sacrificios para que podamos salir adelante, por ser una inspiración y una motivación para lograr mis metas. A Laura y Caro por escucharme, siempre creer en mí y todo su apoyo para lograr mis metas. A Mimi por siempre haber estado conmigo y creer en mí, por todo su amor, apoyo y

consejos. A Tirzo y Gabriel por todo su apoyo y cariño. A mi Candy, por desvelarse todas las noches conmigo y acompañarme en todos los momentos y ser una gran motivación desde que llegó a mi vida.

A Teddy por haber confiado en mi desde que lo conocí y por apoyarme y pensar que lograría grandes cosas.

A mis amigos, América por ser mi mejor amiga y todos los momentos que compartimos, por escucharme, aconsejarme, motivarme, apoyarme y recordarme que somos un equipo. A Victor por todos los años de amistad, todos los consejos, momentos y risas que hemos compartido. A Frida, Alan, Jesica y Sebastián por compartir esta etapa conmigo, por apoyarme incondicionalmente y ser tan buenos amigos.

Índice

Marco teórico	9
1. Piel.....	9
1.1 Epidermis	9
1.2 Dermis.....	10
2. Melanoma	12
2.1 Diagnóstico del melanoma.....	13
2.2 Epidemiología del melanoma	15
2.3 Tratamientos clásicos contra el melanoma	15
2.4 Inmunoterapia	17
3. Respuesta inmunológica.....	20
3.1 Respuesta inmunológica innata.....	21
3.2 Respuesta adaptativa.....	23
3.3 Linfocitos T.....	25
4. Respuesta inmunológica antitumoral	28
5. Ingeniería de Tejidos.....	30
5.1 Biomateriales	32
5.2 Hidrogeles	37
6. Inmunoterapia e ingeniería de tejidos.....	39
Antecedentes.....	41
Justificación	44
Objetivos.....	45
Objetivo general.....	45
Objetivos particulares	45
Hipótesis.....	45
Metodología.....	46
Diseño experimental.....	46
Material biológico	46
Construcción de andamios	47
Experimentos <i>in vitro</i>	48
Experimentos <i>in vivo</i>	49
Fabricación de hidrogeles	49
Evaluación del efecto de los hidrogeles de Ge/HA en esplenocitos y células del ganglio de ratones.....	49
Inducción del melanoma y evaluación histológica	50
Análisis de datos.....	51
Resultados y Discusión	52
Construcción del andamio.....	52

Experimentos <i>in vitro</i>	52
Efecto de los andamios en los linfocitos de bazo <i>in vitro</i>	53
Experimentos <i>in vivo</i>	56
Elaboración de los hidrogeles	56
Análisis del efecto de los hidrogeles en linfocitos de ganglio	58
Análisis del efecto de los hidrogeles en linfocitos de bazo	61
Análisis histológico.....	65
Conclusiones	67
Perspectivas	68
Bibliografía	69

Resumen

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que surge de la transformación de los melanocitos, es el tipo de cáncer menos común, pero con mayor mortalidad. Existen diversos tratamientos, dentro de los más novedosos se encuentra la inmunoterapia cuyo objetivo es mejorar o reactivar la respuesta inmunológica del individuo para que pueda producirse una respuesta contra el tumor mediada por las células del sistema inmunológico innato y adaptativo, sin embargo la duración de los elementos de la terapia puede ser poco eficiente, por lo que el uso de biomateriales permite una liberación prolongada de los elementos, la gelatina y el ácido hialurónico (HA) favorecen la migración celular y el desarrollo de un ambiente proinflamatorio que promueve una respuesta inmune. Se han estudiado andamios de Ge/HA para el tratamiento del melanoma donde se encontró reclutamiento de leucocitos, incluidos linfocitos T, células relevantes en el desarrollo de una respuesta antitumoral exitosa. La activación de los linfocitos T depende de las células presentadoras de antígenos, que primero reconocen los PAMP como los CpG y los antígenos asociados a tumores como lo es MAGE. Con base en ello, el objetivo del trabajo fue analizar el efecto de hidrogeles inyectables de Ge/HA acoplados a CpGs y MAGE-A5 en los linfocitos T en un modelo murino de melanoma. Para lo cual, se elaboraron andamios de Ge/HA, Ge/HA/MAGE-A5, Ge/HA/CpGs y Ge/HA/MAGE/CpGs, los cuales se cortaron en fragmentos y se hidrataron con PBS para la elaboración de hidrogeles. Los andamios se analizaron *in vitro* mediante el cultivo con esplenocitos de ratones previamente expuestos a melanoma, los esplenocitos se analizaron mediante citometría de flujo para la identificación de linfocitos colaboradores ($CD3^+CD4^+$) y citotóxicos ($CD3^+CD8^+$). Posteriormente para los experimentos *in vivo*, se evaluó la proliferación y activación de linfocitos $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ en bazo y ganglio de ratones C57BL/6 mediante citometría de flujo posterior a la inyección de los hidrogeles a la semana 1 y 3. Además, para evaluar el efecto de los

hidrogeles se inocularon 60,000 células de melanoma en ratones C57BL/6 posterior a la inyección de los hidrogeles evaluando el crecimiento tumoral y la histología del estroma tumoral. Dentro de los resultados *in vitro* se obtuvo una proliferación alrededor del 60% de células CD3⁺CD4⁺ sin mostrar diferencias significativas entre grupos y una variación del 30% siendo el máximo 40% en linfocitos CD3⁺CD8⁺. Por su parte, en los experimentos *in vivo* en las células de ganglio se obtuvo un aumento de alrededor del 20% en la activación en linfocitos Th sin mostrar diferencias entre tratamientos, además de una proliferación del 15% de linfocitos Tc sin diferencias entre grupos. Por su parte, los esplenocitos mostraron un porcentaje de alrededor del 40% de linfocitos Th, mostrando un aumento del 40% para la tercera semana, sin mostrar una diferencia significativa entre grupos, mientras que los linfocitos Tc mostraron alrededor del 10% para la primera semana y un incremento al 20% para la tercera semana. En cuanto al crecimiento tumoral se pudo observar un crecimiento tumoral reducido en el tratamiento con CpGs, lo cual es coincidente con lo observado en el estroma tumoral donde fue el grupo donde se observó mayor zona de muerte celular. Los resultados obtenidos mostraron que el hidrogel posee propiedades inmunogénicas favoreciendo la proliferación y activación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y al ser acoplado a una de las moléculas coestimuladoras principalmente CpGs incrementa la respuesta generada con respecto al hidrogel de Ge/HA solo, mostrando que la unión y liberación de los adyuvantes fue adecuada.

Marco teórico

1. Piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo, de acuerdo con Ross y Pawlina (2018) constituye del 15% hasta el 20% del peso total del individuo y se divide en dos estratos epidermis y dermis. Sus funciones principales son de protección y barrera contra agentes físicos, químicos y biológicos por su capa queratinizada, termorregulación, monitoreo del medio externo con receptores como las células de Merkel y obtención de información inmunológica mediante las células de Langerhans (Gartner L. P. 2017).

Dependiendo de la región del cuerpo, la piel puede estar expuesta a distintos niveles de fricción, lo cual genera diferencias en el grosor de la epidermis (Ross M. H. y Pawlina W. 2018). Histológicamente, la piel se puede dividir con base en el grosor de la epidermis: se considera piel gruesa cuando el grosor es mayor a 0.5mm y piel delgada cuyo grosor va entre 0.1 y 0.15mm. (Gartner L.P. 2017).

1.1 Epidermis

La epidermis es un derivado del ectodermo compuesta por un epitelio escamoso queratinizado que se divide en 4 ó 5 capas o estratos en la piel delgada y gruesa respectivamente, los cuales son estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo siendo el estrato lúcido el que está presente en piel gruesa (Ross M. H. y Pawlina W. 2018).

El estrato basal es la región más profunda de la epidermis, está compuesta por una capa de células madre de los queratinocitos con alta actividad mitótica, y unidos a la lámina basal mediante hemidesmosomas. Este estrato también contiene melanocitos que se encargan de producir melanina y donarla a los queratinocitos por secreción citócrina en el estrato espinoso, además se encuentran

también las células de Merkel, encargadas de las percepciones sensoriales (Ross M. H. y Pawlina W. 2018; Carneiro, J., y Junqueira, L. C. U. 2022).

El estrato espinoso es la región más gruesa del epitelio, formada de queratinocitos con filamentos de queratina en su citoplasma y prolongaciones citoplasmáticas unidas por desmosomas a otras células. Contiene la mayor concentración de células de Langerhans que se encargan de la presentación de antígenos en la respuesta inmune. Este estrato presenta actividad mitótica y junto con el estrato basal se encarga de la migración continua de células para la renovación (Gartner L. P. 2017; Lowe, J. S., et al. 2015; Ross M. H. y Pawlina W. 2018).

El estrato granuloso es la última región no queratinizada de la epidermis, está compuesto generalmente de 3 capas de queratinocitos unidos por uniones oclusivas que se caracterizan por contener gránulos de queratohialina que contienen cistina e histidina que son precursores de la filagrina, cuyo contenido liberan al espacio intercelular formando una capa protectora e impermeabilizante (Gartner L. P. 2017; Carneiro, J., y Junqueira, L. C. U. 2022).

El estrato lúcido es visible generalmente solo en la piel gruesa, es una región delgada y translúcida, cuyas células no tiene núcleos u orgánulos, pero sí presentan filamentos de queratina envueltos en material electrodense (Carneiro, J., y Junqueira, L. C. U. 2022; Gartner L. P. 2017).

El estrato córneo es la parte más superficial, su grosor varía entre la piel gruesa y delgada siendo más grande en la piel gruesa, está compuesto por células muertas, anucleadas y aplanadas y con filamentos de queratina en su citoplasma (Ross M. H. y Pawlina W. 2018).

1.2 Dermis

La dermis es tejido conjuntivo cuyo grosor puede variar entre 4 a 5mm, su principal función es de soporte mecánico, difusión de nutrientes y gases hacia la epidermis y regulación de la temperatura

mediante la pérdida controlada de calor, esta capa se divide en dos, la dermis papilar y la dermis reticular (Rehfeld, A., et al. 2017).

La unión epidérmica-dérmica se da en forma irregular con protuberancias de tejido conjuntivo en la epidermis llamadas papilas dérmicas que se complementan con las crestas epidérmicas en la dermis, juntas aumentan la superficie de contacto lo que refuerza unión entre ambas capas, por lo que en las regiones donde la tensión mecánica es mayor, las crestas se profundizan (Ross M. H. y Pawlina W. 2018; Carneiro, J., y Junqueira, L. C. U. 2022).

La capa papilar se encuentra debajo de la epidermis y está formada de tejido conjuntivo laxo, con fibrillas de colágeno tipo I y tipo III con terminaciones nerviosas sensoriales y vasos sanguíneos que oxigenan y nutren a la epidermis (Ross M. H. y Pawlina W. 2018; Lowe, J. S., et al. 2015).

La capa reticular es más gruesa y menos celular, con colágeno tipo I y fibras elásticas que forman líneas regulares llamadas líneas Langer, además de tener vasos sanguíneos y linfáticos (Ross M. H. y Pawlina W. 2018; Carneiro, J., y Junqueira, L. C. U. 2022).

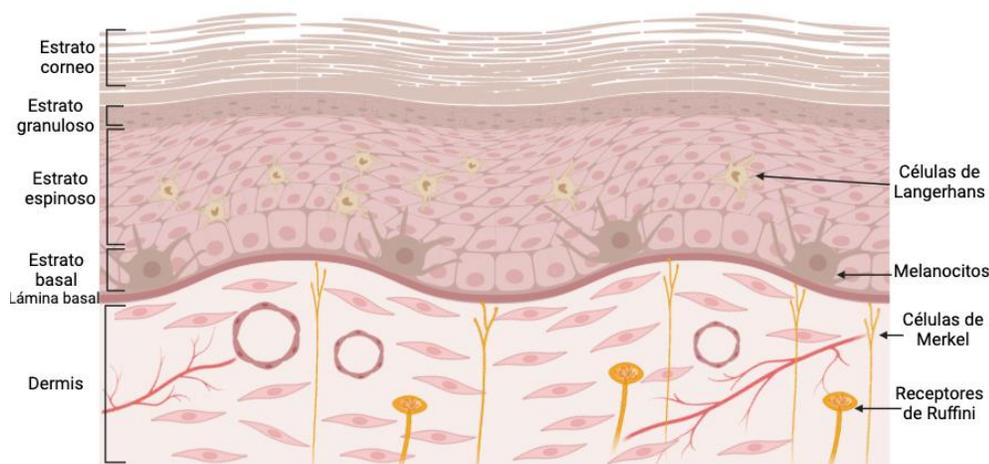


Figura 1. Esquema representativo de los estratos de la piel. Realizada con Biorender.

2. Melanoma

La principal función de los melanocitos de forma normal es la producción de melanina dentro de los melanosomas y la entrega de ésta a los queratinocitos que los rodean, dando pigmentación y para la protección contra el daño al DNA por la radiación UV, esto ocurre por estimulación de la misma radiación UV que genera la producción de α -MSH (hormona estimulante de los melanocitos) que se une a MC1R (melanocortina-1) lo que induce la síntesis de la melanina (Shain, A. H., & Bastian, B. C. 2016; Eddy, K., & Chen, S. 2020).

La melanina es un grupo de pigmentos dividido por sus características químicas en eumelanina y feomelanina, poseen un alto índice de refracción y un alto espectro de absorción de las regiones ultravioleta e infrarroja, protegiendo a los tejidos contra la radiación ionizante al absorber la energía de radiación y disipando en forma de calor, además de neutralizar las moléculas ionizadas en la célula (D'Alba L. & Shawkey M. D. 2018; Cordero R. & Casadevall A. 2020).

El melanoma es un tipo de cáncer de piel, cuyo tumor maligno surge de los melanocitos y de la acumulación estocástica (aleatoria) de mutaciones en estas células (Davis L.E., et al. 2019; Eddy, K., & Chen, S. 2020). El melanoma puede generarse de forma hereditaria o de forma estocástica, se considera que el 12% de casos aproximadamente son hereditarios, cuya mutación más común es CDKN2A, además de mutaciones en CDK4 y MITF. En los casos de melanoma por mutaciones somáticas se han observado mutaciones en la ruta de MAPK como lo es BRAF que se encuentra en el 60% de los casos y NRAS en el 20% de los casos, además de polimorfismos en MC1R y ASIP (Ostrowski, S. M. & Fisher D. E. 2020; Davis L.E., et al. 2019).

Es el tipo de cáncer de piel menos común, pero más agresivo ya que representa el porcentaje más alto de mortalidad debido a su alta capacidad metastásica temprana y su baja prognosis (Schadendorf, D. et al. 2018; Ostrowski, S. M. & Fisher D. E. 2020).

El melanoma se puede dividir por sus características histológicas y clínicas en diferentes variantes: el melanoma cutáneo donde las mutaciones ocurren en melanocitos expuestos a la radiación UV, melanoma de extensión superficial es el subtipo más común compuesto por una sola capa de células intraepidermales; el melanoma nodular se encuentra en grupos de células en la dermis y puede extenderse hacia tejido subcutáneo que se desarrolla rápidamente; el melanoma lentigo maligno surge de una lesión precursora en personas mayores con alta exposición solar que puede progresar a un proceso maligno; el melanoma acral tiene un desarrollo intraepidermal en zonas de baja exposición a la luz solar con un desarrollo rápido; y finalmente los melanomas no cutáneos divididos en melanoma uveal y melanoma mucoso (Ostrowski, S. M. & Fisher D. E. 2020; Rastrelli, M. et al. 2014; Lamb L.A. et al. 2003).

La capacidad de metástasis del melanoma depende de diversos factores como lo son el subtipo específico, las características de las células y del individuo. Algunos ejemplos son el melanoma uveal cuya principal metástasis se da al hígado, o el melanoma lentigo maligno que se puede desarrollar en el pulmón, cerebro, hígado y hueso (Damsky, W. E 2014; Fidler I.J. 1988).

2.1 Diagnóstico del melanoma

El diagnóstico temprano es un factor importante en la disminución del riesgo de mortalidad debido a que el pronóstico de la enfermedad depende de la profundidad de la neoplasia que aumenta con el tiempo (Rastrelli, M. et al. 2014).

La primera forma de detección es la auto examinación de la piel, para la cual, en 1985 se desarrollaron los criterios ABCDE que es el acrónimo para asimetría (A), irregularidad del borde (B), variación de color (C), diámetro mayor a 6mm (D) y evolución de la lesión (E); estos criterios son usados por el público no especialista para identificar casos sospechosos cuando se observa un

nevo y la efectividad para identificar las lesiones se ha visto que va del 57 al 90%; posteriormente se desarrolló la lista de los 7 puntos Glasgow donde se analiza cambio de tamaño, forma, color, cambio sensorial, diámetro de 7mm, inflamación y sangrado, sin embargo, esta clasificación es menos usada debido a su complejidad (Rigel D. S. et al. 2010; Rastrelli, M. et al. 2014).

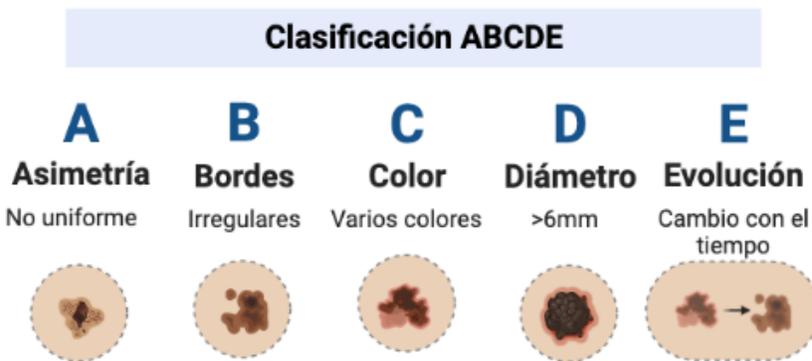


Figura 2. Esquema de la clasificación ABCDE. Realizada con Biorender.

En los años 90's se desarrolló la microscopia de superficie donde se podían observar las lesiones en piel *in vivo*, para ello se han desarrollado dispositivos portátiles ópticos de alta resolución llamados dermatoscopios con los cuales se puede analizar criterios como lo son: cambios en la red pigmentaria, puntos y globos irregulares, estrías irregulares, pigmentación irregular, patrón vascular, un velo azul-blanquecino y estructuras de regresión (Rigel D. S. et al. 2010; Rastrelli, M. et al. 2014). Dentro de la misma dermatoscopia, se encuentran la microscopía confocal de reflectancia que mediante rayo láser permite analizar secciones horizontales que revelan cambios a nivel celular (Rastrelli, M. et al. 2014).

Las biopsias se realizan para confirmar la detección del melanoma, el análisis de las muestras obtenidas se puede realizar con inmunohistoquímica para marcadores de melanocitos, los casos donde no se conoce el origen de una lesión, usando proteínas implicadas en la síntesis de melanina

como Melan-A y MART-1, tirosinasa y SOX10 o marcadores proliferativos para conocer su tasa de proliferación como Ki-67 o PHH3 (Davis L.E., et al. 2019).

2.2 Epidemiología del melanoma

En 2020, en el mundo se diagnosticaron 324,635 casos nuevos de melanoma, 57,043 muertes y una prevalencia de 5 años de 1,092,818 casos; además, se estima que en 2030 se tienen 375,980 casos y 70,064 muertes causadas por esta enfermedad, dando como resultado un incremento del 15,8% y 22,8% respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

En México, en 2020 se registraron 2,051 nuevos casos, 773 muertes causadas por el melanoma con una prevalencia de 5 años de 6,032, se estima que para 2030 se tengan 2,681 nuevos casos y 1,041 muertes, lo que representa un aumento del 30.7% y del 34.7% respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

A lo largo de los años, desde 1985, se ha observado una tendencia de incremento en la mortalidad de los casos de melanoma, además de que las estimaciones muestran que el incremento continuará en el futuro, por lo que la prevención tanto primaria con una exposición controlada a los rayos UV, como secundaria al identificar a las personas con mayor riesgo y un diagnóstico temprano, además de la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas son importantes en el desarrollo y tratamiento del melanoma (GLOBOCAN, 2023; Dzwierzynski W.W. 2021).

2.3 Tratamientos clásicos contra el melanoma

La resección quirúrgica es necesaria en todos los casos, por lo que, la primera forma de terapia es eliminar el tumor primario para evitar la expansión del cáncer y el margen alrededor del tumor; para realizar la resección se realiza con base en los puntos Glasgow antes mencionados, además se

realizan análisis para saber si es necesario retirar los nódulos linfáticos cercanos al tumor (Eddy, K., & Chen, S. 2020; Schadendorf, D. et al. 2018).

La quimioterapia es de los principales tratamientos contra el cáncer, en el caso del melanoma, el principal medicamento utilizado es la dacarbazina, aprobada en 1975 que es un agente alquilante y se encarga de inhibir la síntesis de DNA y RNA mediante la metilación de purinas que lleva a la muerte por apoptosis, necrosis o autofagia, sin embargo, la tasa de respuesta objetiva de este tratamiento es del 15 al 20%. La temozolomida es un agente alquilante análogo de la dacarbazina que posee mayor biodisponibilidad y perfil de toxicidad, además de tener características hidrofóbicas que le permite penetrar en el sistema nervioso central, que es de ayuda en metástasis cerebrales, aún con esto estadísticamente ambos medicamentos son similares (Mishra H. et al. 2018; Koprowska K. & Czyz M. 2011).

La terapia dirigida se encarga de atacar a los impulsores de la carcinogénesis reduciendo la toxicidad del tratamiento, el principal objetivo en el caso del melanoma es la inhibición de BRAF, esto mediante diversos medicamentos como Vemurafenib el cual fue aprobado en 2011 y tiene una respuesta objetiva del 48%, su mecanismo de acción es la inhibición de la hiperactivación de MAPK, la cual es una vía necesaria para la proliferación e inhibición de la apoptosis. Dabrafenib que funciona principalmente con la mutación en BRAF V600E inhibiendo la enzima producida y generalmente se usa en combinación con Trametinib los cuales tienen una respuesta del 55% en estudios, fue aprobado en 2012 y funciona como inhibidor de MEK (Mishra H. et al. 2018; Eddy, K., & Chen, S. 2020; Kim A. & Cohen M.S. 2016).

2.4 Inmunoterapia

La inmunoterapia es una variedad de terapias o cualquier tratamiento que busca manipular la actividad de las células y moléculas del sistema inmunológico con el fin de eliminar las células malignas sin afectar a las células sanas del organismo (Vasquez L. et al. 2020; Varadé J. et al. 2020). En el caso del cáncer se buscan tratamientos que generen una reducción de la carga tumoral y generen memoria (Reyes S. J. et al. 2020).

Existen distintos tipos de inmunoterapia, en la inmunoterapia pasiva, se utilizan células activadas *ex vivo* para estimular el sistema inmunitario contra las células cancerosas como es el caso de la terapia de células adoptivas y los agentes inmunomoduladores, mientras que en la inmunoterapia activa se busca activar las funciones efectoras del sistema inmunológico como es el caso de las vacunas (Akkin S. et al. 2021).

La terapia celular adoptiva es el tipo de inmunoterapia que se encarga de recolectar linfocitos en sangre del paciente para poder seleccionar aquellos con actividad antitumoral, expandirlos y activarlos *in vitro* para regresarlos junto con factores de crecimiento al paciente, obteniendo una respuesta inmunológica contra el cáncer, los principales linfocitos utilizados son los infiltrantes del tumor y células LAK (células natural killer activadas), también se pueden usar linfocitos de sangre periférica modificados con un receptor de antígeno quimérico (CAR-T) (Lugowska I. et al. 2018; Ralli M. et al. 2020).

Los inmunomoduladores buscan estimular el sistema inmunitario de huésped principalmente mediante la estimulación de APCs y células T. En el melanoma los principales inmunoestimuladores y los primeros que fueron aprobados son las citocinas; la IL-2 producida de forma sintética (Aldesleukin) es una linfocina que estimula la proliferación de los linfocitos T; el IFN- α 2B (Intron A) es una citocina que estimula la expresión del complejo mayor de

histocompatibilidad I, aprobada en 1996 como tratamiento adyuvante (Ralli et al. 2020; Mishra H. et al. 2018; Baxevanis, C. N. et al. 2009).

Un tipo de inmunoestimulación incluye a los puntos de control inmunológicos, bloqueando los puntos de control inhibitorios de la proliferación de células T, las principales moléculas utilizadas son CTLA-4 y PD-1. CTLA-4 (proteína 4 asociada a los linfocitos T) es un receptor de proteína que se expresa en células T y que actúa como un coestimulador negativo evitando el ataque en células sanas, por lo que el objetivo del anticuerpo que bloquea CTLA-4 es aumentar la activación de las células T; Ipilimumab fue aprobado en 2011 a una dosis de 3mg/kg mostró una supervivencia de 20% a 3 años; por su parte PD-1 es una molécula de superficie de los linfocitos T que se une a PD-L1 y PD-L2 e inhibe la actividad de los linfocitos, los medicamentos anti PD-1 son nivolumab y pembrolizumab con una supervivencia a un año del 72.9 y 74% respectivamente funcionando en pacientes donde Ipilimumab falló (Lugowska I. et al. 2018; Eggermont et al. 2017; Akkin S. et al. 2021; Baxevanis, C. N. et al. 2009).

Una de las terapias más novedosas para el tratamiento del melanoma que pertenece a la inmunoterapia activa es la terapia con virus oncolíticos, donde los virus selectivamente infectan a las células tumorales y provocan su apoptosis o autofagia, esto se debe a que los virus se unen a células que presentan desproporcionadamente receptores que los virus reconocen; otra manera es inyectando de forma local los virus en el sitio del tumor causando un aumento en la respuesta inflamatoria favoreciendo la infiltración de LT CD8⁺ en el microambiente tumoral, actualmente T-VEC es el único virus aprobado para el tratamiento del melanoma, se trata de un virus de herpes modificado con una respuesta objetiva del 26% con el gen GM-CSF que favorece la producción de granulocitos y macrófagos además de favorecer la apoptosis con una delección de ICP47 que

favorece la presentación de antígenos virales y la apoptosis (Bayan C. Y et al. 2018; Robinson C. et al. 2022).

2.4.1 MAGE

Los antígenos asociados a tumores reciben su nombre ya que son encontrados en una variedad de tumores malignos y se encuentran restringidos en los tejidos normales. Dentro de estos se encuentran los antígenos testiculares del cáncer (CTA) como lo son los antígenos asociados a Melanoma (MAGE) que son antígenos tisulares normales que existen en las células testiculares y desempeñan un papel en la espermatogénesis, su función está relacionada con la regulación del ciclo celular y apoptosis (Sang M. et al. 2011; Sang M. et al. 2011).

MAGE es una superfamilia que se divide en dos familias MAGE-I y MAGE-II; la familia MAGE-I consiste en genes asociados al cromosoma X, divididos en MAGE-A, MAGE-B y MAGE-C. Los genes MAGE-A están formados de 12 miembros localizados en la región q28 y se expresan en muchos tipos de tumores incluido el melanoma, colon, cerebro, pulmón, próstata y mama. (Sang M. et al. 2011; Li S. et al. 2021).

Todos los MAGE tienen un dominio de homología MHD que ayuda en su capacidad de unirse a ligasas de ubiquitina (RING) donde actúan como un sustrato que regula su actividad y desencadena la ubiquitinación y la degradación de una variedad de factores supresores de tumores, como p53, proteína quinasa activada por AMP (AMPK) $\alpha 1$ y ZNF382, además de una regulación positiva de mTOR promoviendo así la aparición de tumores, el crecimiento invasivo y la supervivencia de células cancerosas (Li S. et al. 2021; Weon J.L. & Potts P.R. 2015).

2.4.2 CpGs

El DNA bacteriano es reconocido como PAMP y activa la respuesta inmunitaria innata, específicamente los dinucleótidos CG no metilados son expuestos a TLR9 en células B y dendríticas plasmocitoides en humanos y en células mieloides en ratones. Lo cual puede ser imitado por oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) que son internalizados por PI3K en células diana en el compartimiento endosomal/lisosomal tardío o en endolisosomas estimulando MAP quinasas y factores de transcripción de genes proinflamatorios (Bode C. et al. 2003; Klinman D.M. 2004).

Las células B y pDC estimuladas por CpGs incrementan la producción de CD40, CD80, CD86 y MHC II, IL-6, IL-12, IL-18 y TNF- α , por lo que apoyan indirectamente la maduración, diferenciación y proliferación de células NK, T y macrófagos. La activación del TLR9 por los CpGs promueve una fuerte respuesta tipo Th1 importante durante la respuesta tumoral como IFN- α /b, IL-12 e IFN- γ , activando células NK que secretan IFN- γ favoreciendo una actividad lítica y aumentando los linfocitos citotóxicos (Murad Y. & Clay T.M. 2009; Bode C. et al. 2003)

La terapia con los ODN CpGs como adyuvante es una herramienta inmunoterapéutica que puede acelerar el desarrollo de la respuesta inducida por vacunas, favorece un aumento en la eficacia al usarlo en quimioterapia y promover la inmunogenicidad de antígenos coadministrados en el tratamiento contra cáncer (Klinman D.M. et al. 2004; Murad Y. & Clay T.M. 2009).

3. Respuesta inmunológica

La respuesta inmunológica es la respuesta producida por el organismo tras el reconocimiento de agentes desconocidos, que protege al individuo de infecciones, además de eliminar agentes patógenos, células transformadas y muertas; a las células y moléculas encargadas de esta respuesta

y de la vigilancia de los órganos y tejidos se les conoce como sistema inmunológico (Delves P. et al. 2014; Murphy K. et al. 2009).

El sistema inmunológico se divide en dos sistemas interconectados, el sistema de inmunidad innata y el sistema de inmunidad adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra patógenos, constituye una respuesta rápida e inespecífica ante las amenazas, reconociendo estructuras altamente conservadas en varios grupos de patógenos conocidos como PAMPs o patrones moleculares asociados a patógenos mediante receptores desarrollados para el reconocimiento que son conocidos como PRR o receptores de reconocimiento de patógenos (Murphy K. et al. 2009; Medzhitov R. & Janeway C. 2000; Beutler B. 2004).

3.1 Respuesta inmunológica innata

La respuesta innata está constituida por una barrera externa física y química formada por los epitelios y mucosas que revisten y generan un aislamiento con el mundo exterior sintetizando moléculas, péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana, además de una respuesta celular dada por células mieloides que destruyen patógenos como es el caso de los macrófagos y neutrófilos (Medzhitov R. & Janeway C. 2000).

Los neutrófilos son leucocitos polimorfonucleares producidos ante el estímulo de G-CSF en respuesta a la producción de IL-17 por parte de los linfocitos T e IL-23 producida por macrófagos y células dendríticas. Son las células encargadas de la primera respuesta ante una amenaza, en procesos inflamatorios y tumorigénesis siendo capaces de eliminar patógenos mediante fagocitosis, liberación de sus gránulos de lactoferrina, gelatinasa o metaloproteasas y mediante trampas extracelulares NETs (trampas extracelulares de neutrófilos) los cuales a su vez estimulan

linfocitos Th, además de favorecer la expresión de IFN- γ (Kolaczowska E. & Kubes P. 2013; Liew P.X. & Kubes P. 2019).

Los macrófagos son células inmunes mieloides que se originan durante el desarrollo embrionario, entre sus funciones están la fagocitosis, la presentación de antígenos y la producción de citocinas. Se dividen en macrófagos M1 o clásicamente activados, producidos por la exposición a GM-CSF, LPS, IFN- γ y TNF- α , promoviendo genes de procesamiento y presentación de antígenos y una respuesta proinflamatoria Th1 secretando TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12; y M2 o alternativamente activados por la exposición a MCSF, IL-4, IL-10 e IL-13 importantes para la inmunorregulación, regeneración de tejidos y la respuesta Th2 además de tener la capacidad de volverse macrófagos asociados a tumor que favorecen la progresión tumoral (Shapouri-Moghaddam, A 2018; Anderson N. R. et al. 2021).

Las células dendríticas son las células presentadoras de antígenos profesionales presentes en todo el organismo, son un grupo heterogéneo derivadas de células madre hematopoyéticas pluripotentes que vienen de orígenes mieloides o linfoides, en ambos casos las células expresan un alto nivel de CD11c, MHC-II y moléculas coestimuladoras CD40, CD80, CD83 y CD86 (Balan S. et al. 2019; Zanna M. et al. 2021).

Las células dendríticas se producen en la médula ósea y migran en su forma inmadura a los tejidos donde se encargan de monitorear la presencia de patógenos, al identificar un antígeno mediante sus PRR, éstas fagocitan al antígeno, maduran y migran a los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos a las células T mediante los complejos MHC-I y MHC-II (Zanna M. et al. 2021).

La maduración de las células dendríticas ocurre tras el reconocimiento de PAMPs, citocinas proinflamatorias como IL-1 o TNF- α y la interacción con linfocitos Th mediante la interacción de CD40/CD40L, la maduración incluye una disminución en la expresión de receptores de antígenos

y de la capacidad de internalización, la formación de las dendritas que favorecen sus propiedades migratorias, la redistribución del complejo mayor de histocompatibilidad de los endosomas tardíos a la superficie celular, el incremento de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86 y expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-8, IL-10 e IL-23 y receptores de quimiocinas de los tejidos secundarios a los órganos linfoides (Kotsias F. et al. 2019; Théry C. & Amigorena S. 2001).

Las células dendríticas se encuentran en la piel, superficies mucosas y órganos sólidos donde actúan como centinelas, después de reconocer un patógeno hay un incremento en CCR7, en cual interactúa con CCL21 en las células endoteliales linfáticas guiando mediante haptotaxis hacia y a lo largo de los vasos linfáticos hacia vasos más grandes donde son transportados de forma pasiva por la linfa al seno subcapsular y la paracorteza para posteriormente unirse a las células dendríticas residentes en los ganglios linfáticos donde presentan los antígenos a las células T (Worbs T. et al. 2016; Tiberio L. et al. 2018; de Winde C.M. 2020).

3.2 Respuesta adaptativa

3.2.1 Presentación de antígenos

La presentación de antígenos puede ocurrir mediante el complejo principal de histocompatibilidad de clase I que se encuentra en la mayoría de células nucleadas, está compuesto por dos proteínas, una cadena pesada y una proteína soluble β 2 microglobulina que presenta péptidos de 8 a 11 aminoácidos en un plegamiento de la cadena alfa a los linfocitos T CD8+, generalmente esta presentación ocurre en las células diana por antígenos endógenos producidos por la formación de péptidos en el citosol por proteasomas o en el retículo endoplásmico por aminopeptidasas, que son unidos al MHC I en el retículo endoplásmico tras su translocación mediante TAP gracias al

complejo de cargamento de péptidos PLC (fosfolipasa C), para posteriormente si tiene una afinidad adecuada ser transportados mediante el aparato de Golgi a la membrana celular (Lee M. et al. 2020; Kotsias F. et. al. 2019; de León & Pareja, 2018).

La presentación también puede ocurrir mediante la presentación en el complejo principal de histocompatibilidad clase II que solamente ocurre en células presentadoras de antígenos APCs. MHC II está compuesto por dos proteínas polimórficas α y β asociados a una cadena Ii que permite su estabilización hasta que ocurre su asociación con CLIP para que posteriormente se una al antígeno endocitado y procesado, cuyo largo del péptido es de hasta 30 aminoácidos a los linfocitos T CD4⁺ en el surco formado entre las cadenas α y β (Kotsias F. et. al. 2019; de León & Pareja, 2018).

Existe un tercer tipo de presentación que puede ocurrir llamado presentación cruzada donde las proteínas exógenas son presentadas en el MHC I en células presentadoras de antígeno especializadas, principalmente las células dendríticas; esto ocurre por una vía citosólica dependiente del proteasoma o una vía vacuolar (Lee M. et al. 2020).

En la vía vacuolar los antígenos después de su internalización son degradados por proteasas lisosomales como la catepsina S para ser unidos al MHC I dentro de la vacuola y ser regresados para su presentación en la membrana. En la vía endosomal los antígenos internalizados necesitan ser transportados de los compartimentos endosomales al citosol donde son degradados por el proteasoma, los péptidos derivados son transportados por TAP al retículo endoplásmico donde pueden ser presentados en el MHC I (Embgenbroich M. & Burgdorf S. et al. 2018).

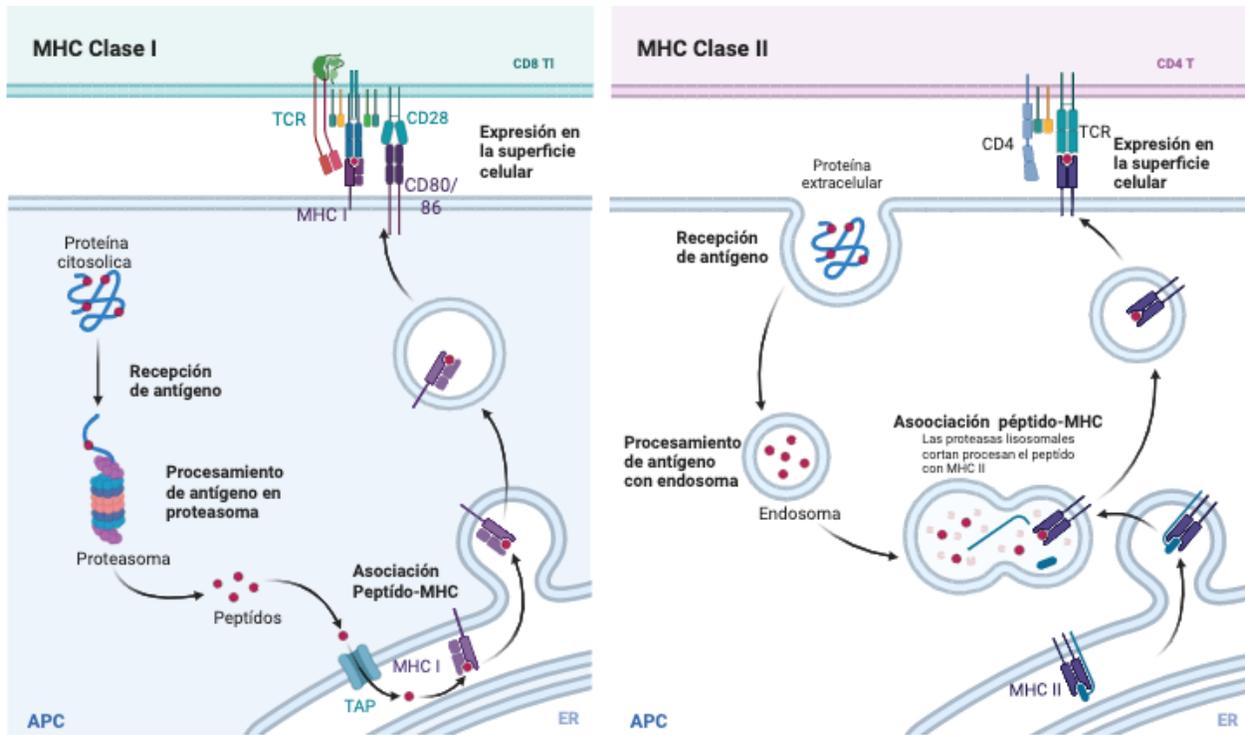


Figura 3. Presentación de antígenos mediante el Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I y Clase II. Creada con Biorender.

3.3 Linfocitos T

Los linfocitos T son células caracterizadas por la expresión en superficie del receptor de células T, que es un ensamblaje octamérico de proteínas dispuestas en módulos, el $\alpha\beta$ TCR de unión a ligandos variables y tres módulos de señalización invariantes $CD3\delta\epsilon$, $CD3\gamma\epsilon$ y $\zeta\zeta$, todo este complejo se encarga del reconocimiento de antígenos. Las células T se originan de las células progenitoras de la médula ósea que migran al timo donde maduran, son seleccionadas y liberadas como células T vírgenes para que reconozcan antígenos nuevos, para que ocurra su activación se requiere de dos señales, la señal antígeno específica y la señal coestimuladora (Kumar B.V. et al. 2018; Sireira R. 2022; Chaplin D.D. 2010).

Para la señal antígeno específica interactúan el MHC con el TCR, las cadenas α y β se asocian con el complejo CD3 compuesto de cadenas invariantes accesorias cuyos dominios citoplasmáticos contienen secuencias ITAM cuya activación favorece la activación de la fosfolipasa C que activa las proteínas G de Ras y Rac que activa genes de proliferación y diferenciación de linfocitos. (Kumar B.V. et al. 2018; Smith-Garvin J.E. et al. 2009).

La asociación con el MHC-I o MHC-II dependen de la glicoproteína correceptora con la que se unan, su función es estabilizar la interacción del TCR y el reclutamiento de Lck al complejo CD3. Los linfocitos T auxiliares unidos al MHC-II se caracterizan por la expresión de CD4, una molécula transmembranal monomérica compuesta de 4 inmunoglobulinas; los linfocitos T citotóxicos que se unen a MHC-I se caracterizan por la expresión de CD8, un dímero compuesto de dos glicoproteínas CD8a y CD8b. (Brenchley & Bosselut, 2014; Mak T.W. et al. 2014).

Las señales coestimuladoras pueden ser positivas como es el caso de CD28 que se asocia con CD80 y CD86 favoreciendo la activación, o negativas como PD-1 que se une a PDL-1 y CTLA-4 que se une a CD80 los cuales inhiben la activación por unión del TCR (Guerder S. & Flavell R.A. 1995). CD137 también conocido como 4-1BB es miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se expresa en células T y NK activadas, su unión con su ligando 4-1BBL expresado en APCs regula positivamente la inmunidad de las células T contribuyendo a la producción de interleucina 2 e $\text{IFN}\gamma$, puede coestimular la activación y proliferación de las células T principalmente Th1 y Tc y mejorar la supervivencia de las células activadas (Halstead, E. et al. 2002; Chester C. et al. 2018; Kim A.M. et al. 2022).

Las células T pueden dividirse en subpoblaciones por la expresión selectiva de CD4 o CD8 después de su proceso de maduración en el timo.

Los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺, durante la infección primaria son activados al reconocer antígenos presentados por las células dendríticas, el TCR induce un incremento en la regulación de CCR7 para retener a las células en los ganglios que los provee de citocinas que favorecen la proliferación por lo que después pasan por una expansión clonal y se convierten en células efectoras que circulan hacia sitios de infección donde se encargan de eliminar a las células; donde IL-12 favorece su citotoxicidad la cual está mediada por la lisis antígeno-específica dada por la exocitosis de gránulos con perforina, granzima A y B, posterior a la eliminación del patógeno las células mueren por apoptosis alrededor del 90% y las células restantes finalmente se generan células T de memoria (Gerritsen, B. & Pandit, A. 2016).

Las células T de memoria, las cuales expresan CD45RO, se dividen en células de memoria central y células efectoras de memoria. Las células de memoria central residen en órganos linfoides secundarios, pueden producir IL-2 y se pueden diferenciar en fenotipos efectores con la estimulación antigénica. Por su parte las células efectoras de memoria se encuentran en los órganos no linfoides y exhiben funciones efectoras producen IFN- γ y TNF (Gerritsen, B. & Pandit, A. 2016).

Los linfocitos T auxiliares o CD4⁺ se dividen en Th1, Th2 y Th17, que activan respuestas humorales o celulares dependiendo del subtipo activado según la naturaleza del patógeno y de las citocinas liberadas.

Los linfocitos Th1 son producidos bajo el estímulo de IL-12 que puede ser producida por PAMPs unidos a TLR4, TLR5 y TLR endosomal en células dendríticas y macrófagos; estos linfocitos producirán linfotóxina α , IFN- γ e IL-2 que activa macrófagos y linfocitos CD8⁺. Los linfocitos Th2 se producen por el estímulo de IL-10, IL-4 e IL-6, producido en linfocitos TNK, basófilos y monocitos por la unión de patógenos a TLR 2/1 y 2/6; estos producirán IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 y

GM-CSF, favoreciendo la proliferación y la actividad de células B y la producción de granulocitos. Cuando se producen las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-23 favorecen la formación de Th17 que secreta citocinas proinflamatorias como IL-17, IL-22 e IL-6 que favorecen la proliferación de neutrófilos (Medzhitov R. & Janeway C. 2000).

Los linfocitos T reguladores o Treg, son linfocitos cuya función principal es contribuir a la tolerancia inmunológica, contribuyen a la homeostasis controlando la respuesta inmunológica y la inflamación. Los Treg pueden ser generados de forma natural induciendo su producción a partir de un precursor por el factor transcripcional FOXP3 o inducidos por el ambiente en el que se desarrollen. Sus principales marcadores son CD4⁺CD25⁺ y las citocinas que producen son principalmente antiinflamatorias (TGF- β , IL-10 e IL-35), además de poder generar una respuesta por glicoproteína A (Delves P. et al. 2014; Villegas V. C. & Ramírez P. D. 2015).

4. Respuesta inmunológica antitumoral

La inmunoección del cáncer es la habilidad de desarrollar una respuesta inmunológica por parte del sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo ante el surgimiento de células tumorales, así como los cambios genéticos que se presentan, previniendo o moldeando la enfermedad al ejercer una presión dentro del ambiente tumoral, es un proceso dinámico que evoluciona a través de tres estados: eliminación, equilibrio y escape (Dunn 2002; Borroni & Grizzi, 2021; Regueiro, J. R. 2015).

La etapa de eliminación implica la inmunovigilancia, identificación y eliminación de las células neoplásicas mediante la cooperación del sistema inmunológico innato y adaptativo. El primer paso es la identificación, por parte del sistema inmune innato del crecimiento de un tumor por el remodelamiento estromal provocando el reclutamiento de neutrófilos tipo 1 los cuales producen NETs, además de TNF- α , IL-1 e IL-6 que activan a los linfocitos T CD8⁺, linfocitos T $\gamma\delta$, células

NK que tienen actividad citotóxica y secretan citocinas proinflamatorias, y macrófagos tipo 1 que fagocitan elementos tumorales y presentan antígenos a los CD4⁺; en general se favorece la producción de IFN- γ que induce la producción de quimiocinas, los cambios en la matriz extracelular producen macrófagos infiltrantes de tumores que producen IL-12 que estimulan a las células NK a producir IFN- γ lo que favorece procesos antiproliferativos y proapoptóticos, mientras que los macrófagos y las NK pueden matar células tumorales por TRAIL y perforina. Los antígenos tumorales producidos en las células son reconocidos y procesados por las células dendríticas reclutadas, las cuales migran a los ganglios linfáticos y son presentados mediante el MHC-I a los linfocitos CD4⁺ Th1 los cuales producen TNF- β , IL-2, IL-12 e IFN- γ las cuales favorecen la expresión del MHC-I, además de funcionar como señales de activación y facilitar el desarrollo de linfocitos CD8⁺ los cuales también reconocen los antígenos del MHC-I por presentación cruzada, al ser activados pueden matar a las células tumorales mediante la secreción de perforina A o granzima B o la inducción de apoptosis mediante Fas-FasL (Dunn G.P. et. al. 2004; Dunn G.P. et. al. 2002; Duharte, A. B. 2003; Sanz et al., 2021; Shankaran et al. 2001).

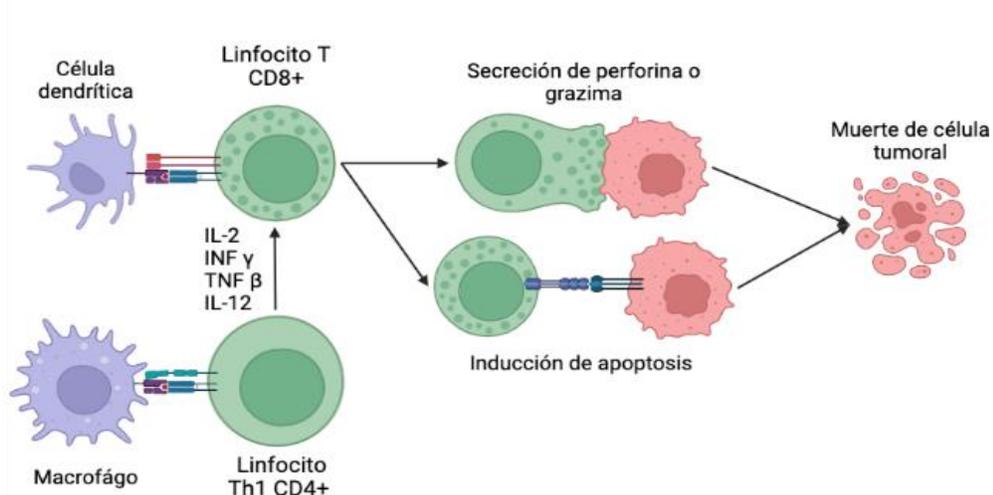


Figura 4. Linfocitos T durante la etapa de eliminación en la respuesta inmune antitumoral. Creada con Biorender

La etapa de equilibrio es la más larga y puede durar años, ocurre de forma dinámica con las células que sobreviven a la fase de eliminación debido a la presión de selección ejercida por los linfocitos y el IFN- γ donde hay una continua eliminación de células tumorales y el surgimiento de nuevas mutaciones que generan variantes resistentes, lo cual provoca que las células tumorales sean contenidas, pero no completamente eliminadas, se modifique su inmunogenicidad y se restrinja su crecimiento (Dunn G.P. et al. 2004; Jacobo V.P.M. et al. 2017; Borroni E.M. & Grizzi F. 2021).

En la etapa de escape las variantes celulares tumorales seleccionadas durante la etapa de equilibrio pueden crecer progresivamente generando un microambiente tumoral inmunosupresor, por citocinas producidas como VEGF, TGF- β , IL-10 y FAS soluble. Las células tumorales también pueden impedir el desarrollo de la respuesta antitumoral mediante modificaciones que pueden impedir su reconocimiento mediante la pérdida de expresión de antígenos, pérdida de complejo mayor de histocompatibilidad I e insensibilización a IFN- γ , además de favorecer el reclutamiento de células T reguladoras (Dunn G.P. et al. 2004; Jacobo V.P.M. et al. 2017).

5. Ingeniería de Tejidos

La ingeniería de tejidos es término definido por Langer R. & Vacanti J. en 1993 como un campo interdisciplinario que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de los tejidos.

Es un campo perteneciente a la medicina regenerativa tisular y es sustentado por disciplinas como la biología celular, la investigación en biomateriales y la ingeniería las cuales han contribuido a los avances de la ingeniería de tejidos (Chaudhari A.A. et al. 2016; Serrato O.D. et al. 2015).

Los principales componentes de la ingeniería de tejidos son las células, los andamios o biomateriales y las señales para estimular el crecimiento (Serrato O.D. et al. 2015; Chang B.P. & Leong K.W. 2008).

Muchos tipos de células se utilizan en la ingeniería de tejidos, siendo las principales las células que derivan del tejido donante o de células troncales. Las células troncales son más utilizadas debido a su alta capacidad proliferativa y su capacidad de diferenciación, son células que pueden ser cultivadas *in vitro* e implantadas en el tejido deseado (Bakhshandeh B. et al. 2018; Berthiaume F. et al. 2011).

Los biomateriales son sustancias diseñadas para incorporarse en sistemas vivos para reemplazar o aumentar la función de un tejido u órgano mejorando la calidad de vida de un individuo. Los biomateriales pueden ser naturales o sintéticos y se utilizan con base en sus características y las funciones deseadas (Marin E. et. al. 2019; Chaudhari A. A. et. al. 2016; Nii, T. & Katayama Y. 2021).

Los factores de crecimiento son moléculas de señalización activadas y solubles que afectan el crecimiento, migración y la diferenciación celular mediante la unión a receptores transmembranales específicos; la selección de los factores de crecimiento adecuados depende de factores como el tamaño de la molécula, la función celular deseada, las consideraciones biológicas, el nivel de expresión requerido y el vehículo de entrega (Atienza-Roca P. et al. 2018; Caballero Aguilar L.M. et al. 2019).

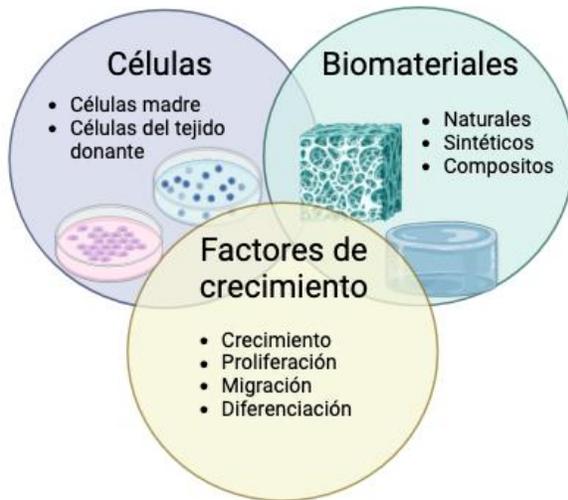


Figura 5. Componentes de la Ingeniería de Tejidos. Creada con Biorender

5.1 Biomateriales

Para la diferenciación y funcionamiento adecuado de las células, en ocasiones se requiere imitar aspectos del tejido nativo o de la matriz extracelular mediante el control de los materiales y el entorno mecánico y químico que pueda fomentar el crecimiento celular y eventualmente la regeneración de tejidos (Chang B.P. & Leong K.W. 2008; Lee E. J. et al. 2014).

Los biomateriales son sustancias puras o combinadas diseñadas sistemática y farmacológicamente para la implantación e incorporación en sistemas vivos que pueden utilizarse en cualquier periodo de tiempo, que reemplace o aumente la función de cualquier tejido u órgano, para mantener o mejorar la calidad de vida del organismo (Marin E. et. al. 2019; Nii, T. & Katayama Y. 2021).

Los biomateriales tienen propiedades que permiten su uso en organismos, las principales son: bioactividad o su capacidad de interactuar con el entorno biológico; biocompatibilidad o capacidad de no generar daño o rechazo en el organismo de forma local o sistémica; biodegradabilidad o descomposición gradual del material en el tiempo requerido y la facilidad para metabolizar sin

generar productos tóxicos, porosidad adecuada que favorezca la proliferación y migración celular; y finalmente propiedades mecánicas como la resistencia mecánica y elasticidad (Reddy M. S. B. et al. 2021).

Existen distintas clasificaciones para los biomateriales, una de las más sencillas es su clasificación por origen, la cual los clasifica en naturales, sintéticos o composites (Chaudhari A. A. et. al. 2016; Marin E. et al. 2019). El uso de los distintos tipos de biomateriales depende de las características que se buscan, el uso de biomateriales naturales favorece la biocompatibilidad y degradabilidad, mientras que los biomateriales sintéticos son fácilmente modificables para las funciones deseadas (Nii, T. & Katayama Y. 2021).

Existen diversas técnicas para la fabricación de andamios formados de biomateriales.

La bioimpresión es un enfoque que emplea la fabricación robótica capa por capa de construcciones tridimensionales depositando agregados celulares y materiales de andamiaje en organizaciones prediseñadas (Burdick & Prestwich, 2011).

El electrohilado es una técnica que aplica el principio electrostático para fabricar nanofibras, se aplica un campo eléctrico para extraer una solución de polímero entre la aguja de inyección y un colector, existen 3 tipos principales: electrohilado de mezcla, coaxial y de emulsión (Zamani R. et al. 2018).

La liofilización es un proceso de secado de una solución a un sólido estable, ocurre mediante el congelamiento de la solución a menos de -70°C para que después mediante un vacío parcial se elimine el hielo por sublimación y posteriormente se elimine por desorción en un secado secundario (Lu et al. 2013).

5.1.2 Gelatina

La colágena es la proteína estructural más abundante, constituye alrededor del 30% del total de proteínas del organismo compuesta por una triple cadena α variable o idéntica dependiendo de la fuente, con alrededor de 1,000 aminoácidos con una estructura Gly-X-Y que proporciona estabilidad a la triple hélice mediante puentes de hidrógeno y la interacción de la glicina la que se encuentra dentro; los aminoácidos X-Y más comunes son la prolina y la hidroxiprolina (Liu D. et al. 2015; Ramshaw J.A.M. et al. 1998).

La gelatina es una mezcla de péptidos derivados de la hidrólisis parcial de la colágena, durante la cual las cadenas α son gradualmente degradadas en péptidos más pequeños que dependen de la enzima utilizada, la fuente de origen y las condiciones de hidrólisis (Liu D. et al. 2015; Yue K. et al. 2015).

La gelatina posee ventajas sobre la colágena como una mayor solubilidad y menor antigenicidad, además de contener muchas secuencias arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que promueve a unión celular, son ligandos de adhesión reconocidos por diversas integrinas que favorecen la proliferación celular, la compatibilidad de tejidos y en algunos casos pueden tener funciones antiangiogénicas, así como secuencias diana de MMP importantes para la remodelación celular (Ionescu et al. 2021; Liu D. et al. 2015; Ruoslahti E. 1996; Fu S. et al. 2018).

La gelatina se ha estudiado para la fabricación de hidrogeles debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, a su capacidad de imitar a la matriz extracelular nativa, además de ser no citotóxica y no inmunogénica (Yue K. et al. 2015).

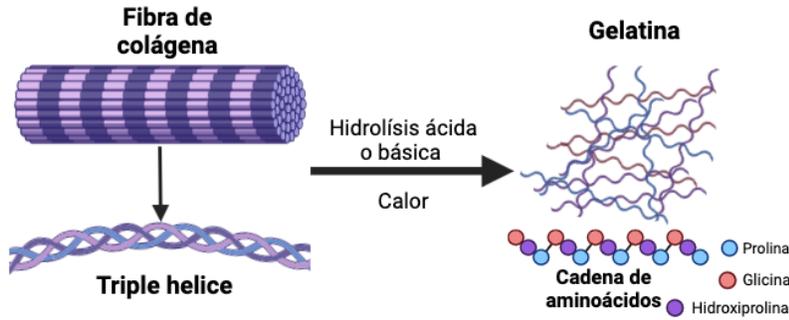


Figura 6. Estructura de la gelatina. Creada con Biorender

5.1.3 Ácido Hialurónico

Es un glicosaminoglicano no sulfatado, no ramificado, hidrófilo, con carga negativa, compuesto por la repetición de unidades de disacáridos de ácido β -1,4- D-glucurónico y β -1,3-N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos (Figura 7), es componente de la matriz extracelular producido por hialuronato sintasas (HAS-1, 2 y 3) en células mesenquimales y fibroblastos principalmente (Chircov C. et al. 2018; Stern R. et al. 2007; Zhu Z et al. 2017).

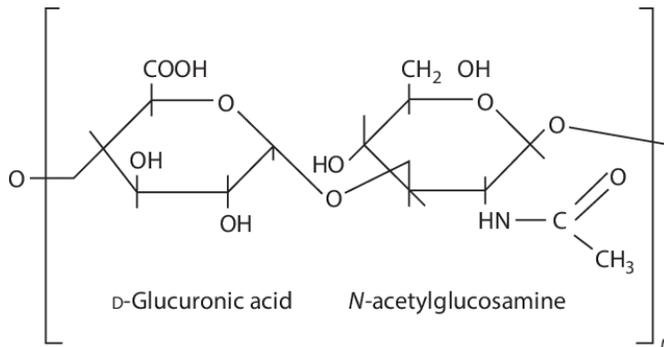


Figura 7. Estructura del ácido hialurónico. Modificada de Sirisha, V.L. & D'Souza, J. 2016

Las propiedades del ácido hialurónico dependen de su peso molecular; de manera nativa en tejidos su peso molecular es mayor a 100 kDa y posee propiedades antiangiogénicas e inmunosupresoras, pero puede ser degradado por hialuronidasas, que se encuentran en la superficie celular, en

fragmentos de 20 kDa o intracelulares en disacáridos, o por especies reactivas de oxígeno (ROS) en fragmentos de distintos pesos moleculares bajos durante una respuesta inflamatoria y daño tisular lo cual favorece los procesos de inflamación y activación de células T (Marinho, A. et al. 2021; Nikitovic, D. 2013).

Participa en la morfogénesis, diferenciación y proliferación celular, así como en la reparación y regeneración de tejidos, tiene una gran viscoelasticidad e higroscopicidad atrayendo a las moléculas de agua por enlaces de hidrógeno e interactúa con moléculas extracelulares para el ensamblaje de la matriz extracelular (Marinho, A. et al. 202; Zhu Z. et al. 2017).

El ácido hialurónico puede interactuar con hialadherinas, glicoproteínas de membrana, cuyo dominio intracelular interactúa con el citoesqueleto regulando la morfogénesis, migración, apoptosis y supervivencia celular. Entre las hialadherinas se encuentra CD44, la cual es una glicoproteína importante para la migración celular e infiltración, además de regular la respuesta inflamatoria. Los fragmentos cortos de HA se pueden unir a TLR2 y TLR4 provocando una respuesta proinflamatoria mediante la activación de la vía NF- κ B y la maduración de células dendríticas (Stern R. et al 2007; Vigetti D. et al. 2014).

El ácido hialurónico ha sido de interés en la ingeniería de tejidos debido a su alta biocompatibilidad, degradabilidad, citocompatibilidad y variación en sus propiedades mecánicas y químicas, pero aún presenta desventajas como su rápida degradación *in vivo*. Su uso en hidrogeles ha sido importante debido a su capacidad de imitar a tejido nativo en términos de contenido de agua e intercambio de nutrientes y oxígeno (Chircov C. et al. 2018; Zhu Z. et al. 2017).

5.2 Hidrogeles

Los hidrogeles son redes tridimensionales reticuladas de polímeros sintéticos o naturales entrecruzados, hidratados con agua, pero sin poder disolverse en esta y con la capacidad de retenerla dentro de su estructura gracias a los grupos hidrofílicos que poseen (Ahmed E. M. 2015, Xiao S. et al. 2019).

Sus propiedades dependen de su composición y los métodos usados para su polimerización y la densidad de entrecruzado. En las aplicaciones biomédicas, los hidrogeles son diseñados para imitar las características de la matriz extracelular proporcionando un soporte para el crecimiento celular y la formación de tejido (Sharma S. & Tiwari S. 2020; Xiao S. et al. 2019).

Los hidrogeles pueden ser clasificados de distintas formas; por su entrecruzamiento pueden clasificarse en hidrogeles físicamente entrecruzados o de autoensamblado, y en hidrogeles químicamente entrecruzados. Los hidrogeles físicos son fáciles de producir y no requieren de agentes entrecruzantes ya que se basan en interacciones físicas que permiten que no sean solubles en un medio acuoso, mientras que los hidrogeles químicos son estables formados por enlaces covalentes, mecánicamente más fuertes y con mayor tiempo de degradación (Maitra, J. & Vivek K. S. 2014; Sharma S. & Tiwari S. 2020).

El uso de la gelatina en la ingeniería de tejidos se ha estudiado por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, costo bajo y un origen biológico con naturaleza polielectrolítica, se ha visto su uso para la fabricación de andamios por electrohilado, pero requiere de un solvente o tratamiento específico para su uso como el entrecruzamiento químico o enzimático, también se ha estudiado sus propiedades como hidrogel combinado con otros polímeros para mejorar sus propiedades mecánicas (Zamani R. et al. 2018; Ye, J. et al. 2021).

El uso de hidrogeles de ácido hialurónico se ha estudiado por su capacidad de imitar el tejido humano, la biocompatibilidad y la capacidad de ajuste de las propiedades de degradación, se ha estudiado para la administración de moléculas en hidrogel y se notó que el grado de liberación podía variar con el grado de entrecruzamiento y la incorporación de microesferas (Zhu Z. et al. 2017; Abatangelo G. et al. 2020). También se ha estudiado la bioimpresión de HA-Ma con Ge-Ma (ácido hialurónico y gelatina metacrilados) donde los hidrogeles mostraban variedad en la propiedad de viscoelasticidad siendo biocompatible y favoreciendo la unión y proliferación celular (Burdick J.A. & Prestwich G.D. 2011).

5.2.1 Entrecruzantes

Muchos biomateriales poliméricos se utilizan por sus grandes ventajas, sin embargo, tienen limitaciones principalmente asociadas a sus propiedades mecánicas e inestabilidad en los entornos fisiológicos. Los entrecruzantes se encargan de interconectar moléculas mejorando la estabilidad, disminuyendo la degradabilidad y las propiedades mecánicas estableciendo enlaces entre los grupos funcionales (Reddy N. et al. 2015).

Existen 4 tipos de entrecruzantes; físicos, químicos, enzimáticos y no enzimáticos; los entrecruzantes químicos producen enlaces químicos entre dos o más moléculas mediante enlaces covalentes inter o intramoleculares, es muy usado en la medicina regenerativa por su capacidad de generar modificaciones químicas con un mayor grado de entrecruzamiento (Reddy N. et al. 2015; Arora B. et al. 2017; Krishnakumar G. S. et al. 2019).

El glutaraldehído es de los principales entrecruzantes utilizados, ya que reacciona con los grupos funcionales de proteínas y carbohidratos formando enlaces covalentes, mejorando las propiedades

mecánicas, sin embargo, se ha mostrado citotoxicidad dependiente de la concentración (Reddy N. et al. 2015).

El éter diglicídico de 1,4-butanodiol, también conocido como BDDGE es un entrecruzante principalmente utilizado para colágeno, su mecanismo de entrecruzamiento forma enlaces covalentes, dependiente de los grupos epóxidos, el pH y la temperatura (Krishnakumar G. S. et al. 2019).

Dentro de los entrecruzantes se encuentra el EDC o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida hidrocloreto, el cual activa los grupos de ácido carboxílico o los grupos fosfatos de cualquier biopolímero formando O-urea, mientras que se une a un grupo amina formando un enlace amida liberando iso-urea como subproducto que puede ser eliminado con agua. El EDC ha mostrado la capacidad disminuir la velocidad de degradación, mejorar las propiedades mecánicas y mantener la estructura de la matriz, además de tener ventaja sobre otros entrecruzantes al no quedarse en el enlace químico y ser liberado como sustituto de la urea (Powell H. M. & Boyce S.T. 2006; Krishnakumar G. S. et al. 2019).

6. Inmunoterapia e ingeniería de tejidos

El campo naciente de la inmunoingeniería tiene como objetivo proporcionar nuevos enfoques para la comprensión y aplicación de la ingeniería, se basa en crear y aplicar principios de la ingeniería para investigar y modular al sistema inmunológico. En la terapia contra el cáncer, la inmunoingeniería crea conocimiento en escalas que van desde lo molecular hasta lo celular, incluyendo la liberación prolongada de fármacos (Green J.J. 2021).

Los biomateriales desarrollados en la ingeniería de tejidos se pueden utilizar en la inmunoterapia contra el cáncer ya que ofrecen la capacidad de proteger moléculas o células bioactivas controlando

su liberación, además de permitir la administración de múltiples agentes, reduciendo la toxicidad y el tamaño de la dosis (Koshy, S. T., & Mooney, D. J. 2016). Los agentes pueden incluir moléculas inmunoestimuladoras, ácidos nucleicos adyuvantes, proteínas y anticuerpos (Ali O.A. & Mooney D.J. 2010).

Uno de los obstáculos en las estrategias terapéuticas que incluyen inmunoterapia, es que las terapias requieren de altas dosis para conseguir concentraciones que sean biológicamente efectivas para realizar su función en los tejidos objetivos; lo que puede generar toxicidad o puede limitar su efectividad para generar la activación correcta de las células, por lo que el uso de biomateriales puede permitir sobrellevar algunas de las limitaciones (Cheung, A. S., & Mooney, D. J. 2015).

Los biomateriales pueden ser liberados por implantación quirúrgica o por inyección. Los biomateriales que pueden emplearse en procedimientos invasivos son preferidos, pero la elección de la ruta de liberación depende de la accesibilidad del sitio de entrega y las propiedades mecánicas del biomaterial (Cheung, A. S., & Mooney, D. J. 2015).

Los andamios con biomateriales son diseñados para ser biocompatibles y biodegradables, permitiendo una entrega mínimamente invasiva, generalmente con cargas bioactivas cuya cinética de liberación puede regular la respuesta inmunológica resultante. Las construcciones de biomateriales tridimensionales están diseñadas para proporcionar el soporte estructural necesario para la entrega de moléculas pequeñas, factores biológicos y células, como depósitos a largo plazo para la presentación controlada de moléculas bioactivas y como nichos con microambientes controlados que regulan la función celular, regulan el tráfico y la activación de las células inmunitarias *in situ* (Han, S., & Wu, J. 2022; Ali O.A. & Mooney D.J. 2010).

Los sistemas inyectables pueden ser diseñados para la gelación *in situ* o como andamios preformados maleables o con memoria de forma. Un tipo de sistema inyectable son los hidrogeles

que son construcciones altamente porosas que forman estructuras similares a la matriz extracelular. Las ventajas proporcionadas por estos sistemas son que evitan el daño innecesario al tejido y las complicaciones asociadas por la respuesta inflamatoria, además sus propiedades viscoelásticas pueden amoldarse a cualquier espacio disponible interactuando fácilmente con los sistemas vivos (Leach, D. G., Young, S., & Hartgerink, J. D. 2019;).

Algunos ejemplos son la colágena, el quitosano y alginato que se pueden modificar en su densidad de reticulación para desarrollar geles con degradación definida y rigidez que puede influir en la cinética de liberación o unión de biomoléculas inmunoestimuladoras para la administración de fármacos, la viabilidad y estado de activación de las células (Leach, D. G., Young, S., & Hartgerink, J. D. 2019; Adu-Berchie, K., & Mooney, D. J. 2020).

Por su parte, los nanomateriales se dirigen a diferentes células o localizaciones subcelulares según el tamaño y la opsonización, ofrecen características especiales para la penetración de barreras intersticiales y mucosas para acceder a las células presentadoras de antígenos de manera más eficiente y realizar la liberación de su carga después de la endocitosis; además, poseen la capacidad de imitar señales endógenas y señales agonistas de TLR para la activación de la respuesta inmunológica (Cheung, A. S., & Mooney, D. J. 2015).

Antecedentes

Hong S. R. et al. en 2004 elaboraron andamios de Ge/HA con una proporción de 9/1 y 7/3 liofilizados y entrecruzados con EDC, los resultados mostraron que el andamio 9/1 (20-50 μ m) tuvo un tamaño de poro promedio menor al de 7/3 (60-100 μ m). Los andamios fueron cortados, esterilizados e implantados en ratas Wistar donde se observó una degradación similar de ambos andamios a los 15 días, sin embargo, el andamio 7/3 tuvo una degradación mayor (60%) los

primeros días favoreciendo el depósito de colágena, además de mostrar una respuesta inflamatoria mayor favoreciendo la migración prolongada de neutrófilos y fibroblastos.

Eggert A. O. *et al.* en el 2004 obtuvo dos péptidos con secuencias de 13 aminoácidos con alta afinidad a MHC-I. El primer péptido, LGITYDGM ubicado en MAGE-A1-3 y MAGE-A5 y el segundo, HNTQYCNL, en MAGE-A5. Se vacunaron ratones dos veces con los péptidos y después de 6 días de estimulación *in vitro* se analizaron con ELISPOT donde se observó una secreción específica de IFN- γ principalmente en MAGE-A5. Posteriormente en sus estudios *in vivo* de análisis de inmunidad protectora a la exposición a melanoma B78-D14, en MAGE-A5 se obtuvo una carga tumoral similar al control positivo (TRP2), además de observar linfocitos CD8+ en los sitios de metástasis de los ratones tratados con MAGE-A5.

Fan Zhang *et al.* en el 2011 elaboró andamios 3D de Ge/HA a una concentración de 0/100, 20/80, 40/60, 60/40, 80/20 y 100/0 liofilizados y entrecruzados con EDC al 50 mM, los resultados reportados muestran que a mayor concentración de HA el tamaño de los poros aumenta y la forma tiende a alargarse y volverse irregular, además de aumentar la absorción de agua y el porcentaje de degradación. Los andamios no son citotóxicos y la viabilidad celular aumenta al aumentar la concentración de gelatina, por lo que concluye que el andamio puede ser viable para la ingeniería de tejidos blandos como piel, cartílago y vasos sanguíneos.

Arellano R. en 2014 construyó andamios de Ge/HA en una proporción 4/1 liofilizados y entrecruzados con concentraciones de 6, 30, 50 y 60 mM de EDC, los resultados reportados muestran que la porosidad es mayor a menor concentración de EDC, además de aumentar el

número de poros por andamio a mayor concentración debido a la disminución del tamaño de estos, lo cual a su vez mostró una disminución en la capacidad de absorción con el aumento de concentración (con excepción de 50mM) y por último el cultivo de células fue viable en las concentraciones de EDC iguales o menores a 50mM.

Piñón Zárate G. et al. 2014 usó células de médula ósea estimuladas con GM-CSF para diferenciarlas en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDC) y posteriormente estimuladas con TNF- α , MAGE-AX y GK-1 en diferentes grupos analizando el efecto de los elementos en su fenotipo donde observó que todos los grupos mostraron un incremento en la expresión estadísticamente significativo respecto al grupo control de moléculas coestimuladoras CD4, CD80 y CD86. Para los experimentos *in vivo* inoculó 60,000 células de B16-F10 y después de una semana inició un protocolo de inmunización cada semana por 3 semanas de BMDC maduras con TNF- α , estimuladas MAGE-AX, GK-1 y MAGE-AX/GK1 y un grupo control obteniendo 5 grupos. Los grupos con MAGE-AX o GK-1 mostraron las mayores áreas de muerte tumoral y una sobrevida del 10% hasta el día 40, mientras que el grupo estimulado con MAGE-AX/GK-1 mostró grandes áreas de muerte tumoral y el menor crecimiento tumoral asociado a una sobrevida del 40% hasta 1.5 años después, lo cual se relacionó con el porcentaje de proliferación de linfocitos CD8+ y a una mayor producción de IFN- γ .

Jarquín K. en 2017 elaboró andamios de Ge/HA a una proporción 4/1 liofilizados y entrecruzados con concentraciones de 6, 30, 50 y 60 mM de EDC. Observó que al aumentar la concentración de EDC el tamaño de los poros en los andamios disminuían su tamaño y absorción y aumentaban su citotoxicidad mostrando una disminución en la presencia y adhesión de células en los cultivos y

concluyó que una concentración menor a 50mM de EDC es viable para la realización de una mayor investigación y estudio.

De la Rosa C. en 2021 elaboró andamios de Ge/HA liofilizados y entrecruzados con una concentración de 50 mM de EDC, en los cuales observó adherencia y no obtuvo citotoxicidad. Implantó los andamios en ratones C57BL/6 y al realizar el análisis histológico observó reclutamiento de neutrófilos y macrófagos hasta 10 días posteriores a la implantación, al inocular a los ratones con melanoma y observar la diferencia entre ratones tratados con andamio y sin andamio, obtuvo una disminución en el tamaño tumoral estadísticamente significativa en presencia del andamio observando una disminución en el estroma tumoral y menor angiogénesis.

Justificación

El melanoma es una enfermedad de bajo pronóstico debido a su alta mortalidad y capacidad metastásica. La inmunoterapia ha ofrecido opciones de tratamiento específicas, sin embargo, las opciones pueden inducir toxicidad y baja efectividad debido a la corta vida media de las moléculas y células o los efectos adversos que pueden inducir. El uso de biomateriales de ingeniería de tejidos ofrece una alternativa para la liberación gradual de moléculas que permiten el reclutamiento y la activación de células *in situ*, lo que lleva a una respuesta inmunológica prolongada.

Un hidrogel Ge/HA acoplado a MAGE-A5 y CpGs permite la liberación gradual de las moléculas de CpGs que favorecen el desarrollo de una respuesta innata, y MAGE-A5 que permite una respuesta específica y la activación de linfocitos, lo cual junto a las propiedades inmunogénicas propias del hidrogel previamente mencionadas, puede favorecer el reclutamiento y activación de células presentadoras de antígenos y el reclutamiento, la activación y proliferación de los linfocitos T que son las principales células efectoras en las respuestas antitumorales.

Objetivos

Objetivo general

Analizar el efecto de hidrogeles inyectables de Ge/HA, Ge/HA MAGE-A5, Ge/HA CpGs y Ge/HA MAGE-A5 CpGs en linfocitos T en un modelo murino C57BL/6 inoculado con melanoma.

Objetivos particulares

- Construir andamios de Ge/HA, Ge/HA MAGE-A5, Ge/HA CpGs y Ge/HA MAGE-A5 CpGs.
- Fabricar los hidrogeles inyectables de Ge/HA, Ge/HA MAGE-A5, Ge/HA CpGs y Ge/HA MAGE-A5 CpGs.
- Analizar la respuesta *in vitro* de linfocitos T de esplenocitos cultivados sobre los andamios.
- Evaluar la presencia y maduración en linfocitos T en ganglios y bazo de ratones C57BL/6 después de ser inyectados subcutáneamente con los hidrogeles de Ge/HA, Ge/HA MAGE-A5, Ge/HA CpGs y Ge/HA MAGE-A5 CpGs.
- Inducir melanoma B16-F10 en los ratones C57BL/6 posterior a la inyección de los hidrogeles.
- Realizar el análisis de crecimiento tumoral y el análisis histológico de los ratones.

Hipótesis

Si los hidrogeles de Ge/HA acoplados a CpGs y MAGE-A5 inoculados en ratones C57BL/6 con melanoma inducido, estimulan al sistema inmunológico, entonces se inducirá la proliferación y activación de linfocitos T con lo cual se generará una respuesta antitumoral.

Metodología

Diseño experimental



Material biológico

Para el desarrollo de la investigación se utilizaron 51 ratones macho C57BL/6 con haplotipo H2Kb de 7 semanas de edad, de los cuales 2 ratones se utilizaron para los experimentos *in vitro* y 49 se utilizaron en los experimentos *in vivo* divididos en 5 grupos.

Los ratones C57BL/6 fueron mantenidos en condiciones de luz/oscuridad controladas, en cajas sólidas con aserrín libre de pirógenos y con tapa removible en forma de reja, con disponibilidad de agua y alimento las 24 horas; en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Medicina de la

UNAM y fueron sacrificados bajo los criterios y la aprobación del Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina y la NOM-062.

Construcción de andamios

Se elaboraron andamios tridimensionales porosos de Ge/HA, además de andamios de Ge/HA complementados con MAGE-A5, andamios de Ge/HA complementados con CpGs y andamios de Ge/HA complementados con MAGE-A5 y CpGs.

Para la elaboración de los andamios se utilizó el método Arellano 2014, disolviendo en una proporción 4:1 Ge/HA (ambos Sigma Aldrich St. Louis MO. USA) en agua destilada, la mezcla se realizó en baño maría a una temperatura de 40°C por 30 minutos en agitación constante hasta que se obtuvo una solución homogénea. Para los andamios complementados con MAGE-A5 y CpGs, durante la preparación de la mezcla de gelatina/ácido hialurónico se agregaron 40 µl/ml de CpGs sintetizado por InvivoGen Mouse TLR9Agonist Kit (San Diego, CA, USA) y/o 20 µl/ml de MAGE-A5 (LGITYDGM) con 94% de pureza sintetizado por Research Genetics (Invitrogen, Leiden, Holanda) dependiendo del tratamiento.

Posteriormente se colocó 1ml de la solución en tubos Eppendorf de 1.5ml con ayuda de una jeringa, se centrifugó para la eliminación de burbujas, se dejaron enfriar por una hora y posteriormente congelaron a -20°C durante 24 horas para ser liofilizados a una temperatura de -110°C durante 10 horas a 0.025hPa de presión atmosférica. Para el entrecruzamientos los andamios obtenidos se colocaron en una solución de 30mM de EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en etanol al 96% a 4°C toda la noche. Los andamios fueron lavados 3 veces con agua destilada para eliminar los residuos de EDC y los productos de la reacción iso-urea para finalmente ser liofilizados por 8 horas en las condiciones preestablecidas.

Experimentos *in vitro*

Para los experimentos *in vitro* se utilizaron a dos ratones C57BL/6 que previamente habían sido inoculados con 60,000 células de melanoma B16-F10 que iniciaban el proceso de desarrollo tumoral. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, para después reseccionar el bazo y lavarlo 3 veces con PBS estéril a 4°C en agitación constante. El bazo se colocó en cajas petri de 5cm entre 2 mallas de nylon con poros de 200 micras en una caja petri con 5ml de medio RPMI suplementado. Con ayuda de un émbolo se maceró el bazo para obtener el sobrenadante y se centrifugó a 2000 rpm por 3 minutos para obtener las células a las que se les realizó un conteo de viabilidad celular con azul tripano en una cámara de Neubauer.

Los andamios preparados con las características previamente mencionadas se cortaron en fragmentos de 5mm de grosor y 7 mm de diámetro aproximadamente, se separaron por tratamiento, se colocaron en cajas de 6 pozos y se colocaron con luz UV en la campana de flujo laminar a 37°C antes de su uso.

De los esplenocitos obtenidos de los ratones con melanoma se cultivaron 1.5 millones de células por pozo en cajas de 24 pozos, con 2 ml de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico, colocando además por pozo un andamio previamente esterilizado de los 4 tratamientos GE/HA, GE/HA CpGs, GE/HA MAGE-A5 y GE/HA CpGs MAGE-A5 y un grupo control con solo las células y medio RPMI. Se incubaron por 5 días a 37°C y 5% CO₂ y se observaron al microscopio para observar la adhesión celular, posteriormente se obtuvieron las células para ser teñidas con fluorocromos y ser analizadas por citometría de flujo en el citómetro FACSCalibur evaluando fenotipos de linfocitos auxiliares CD3⁺CD4⁺, linfocitos citotóxicos CD3⁺CD8⁺ y el nivel de activación con CD137 usando como control células sin teñir.

Experimentos *in vivo*

Fabricación de hidrogeles

Para determinar la disolución a la cual se debían de preparar los andamios para obtener los hidrogeles se realizaron pruebas de solubilidad con andamios de Ge/HA con diferentes pesos siendo el menor 0.0075g y el mayor 0.0097g hidratados con agua destilada con 150µl, 250µl y 500µl, se dejaron por 24 horas en cajas de 6 pozos y posteriormente se maceraron con ayuda de un émbolo y se colocaron en una aguja para determinar la facilidad de inyección, seleccionando los andamios con un peso de 0.0097g y 500µl.

Los andamios de GE/HA, GE/HA CpGs, GE/HA MAGE-A5 y GE/HA CpGs MAGE-A5 se cortaron en fragmentos de 0.0097g y se hidrataron con 500µl de PBS estéril por toda la noche a una temperatura de 37°C y posteriormente fueron esterilizados con luz UV, finalmente los andamios fueron macerados con la ayuda de un émbolo y colocados dentro de una aguja de 5ml para ser utilizados.

Evaluación del efecto de los hidrogeles de Ge/HA en esplenocitos y células del ganglio de ratones

Los ratones C57BL/6 se dividieron en 4 grupos (A) Grupo Ge/HA, (B) Grupo Ge/HA CpGs, (C) Grupo Ge/HA MAGE-A5 y (D) Grupo Ge/HA MAGE-A5 CpGs, cada uno con 6 ratones, los cuales fueron inyectados de forma subdérmica cerca del ganglio inguinal con 100µl del hidrogel obtenido.

Para la evaluación de linfocitos T se sacrificaron 2 ratones por grupo mediante dislocación cervical a los 7 días y a los 21 días. De los ratones sacrificados se obtuvieron los 2 ganglios inguinales y el bazo (ganglios juntos y bazo por separado) y se colocaron en tubos falcón con PBS a 4°C para

lavarlos 3 veces con PBS. Posteriormente los ganglios y bazos obtenidos se colocaron en una caja petri por separado con 1 ml de medio RPMI suplementado y con ayuda de un émbolo se disgregaron los órganos y se obtuvo el sobrenadante, el cual se colocó en un tubo falcon, después se lavó la caja con otro mililitro de medio y se colocó en el mismo tubo. Con ayuda de una cámara de Neubauer se hizo un conteo celular y se cultivaron un millón de células por pozo junto con 2ml de medio RPMI y 25µM de MAGE-A5 para estimularlas en cajas de 24 pozos por 3 días a 37°C y 5% de CO₂ para expandirlas. Finalmente, se obtuvieron las células, se tiñeron y se analizaron por citometría de flujo en el citómetro FACSCalibur evaluando fenotipos de linfocitos auxiliares CD3⁺CD4⁺, linfocitos citotóxicos CD3⁺CD8⁺ y el nivel de activación con CD137 usando como control células sin teñir.

Inducción del melanoma y evaluación histológica

Cultivo de células B16-F10

Las células B16-F10 de melanoma (The American Type Culture Collection, USA) se cultivaron en frascos de cultivo celular con 10ml medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibióticos, a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad, observándolas y cambiando el medio cada tercer día.

Inducción del melanoma

Los ratones C57BL/6 del grupo de sobrevida se dividieron en 5 grupos, (A) Sin tratamiento, (B) Ge/HA, (C) Ge/HA MAGE-A5, (D) Ge/HA CpGs y (E) Ge/HA MAGE-A5/CpGs con 5 ratones cada uno.

Los ratones se inyectaron de forma subdérmica con 100µl de hidrogel cerca del ganglio inguinal, 21 días después se inocularon mediante una inyección con 50,000 células B16-F10 de melanoma en la región inguinal y se observó el crecimiento tumoral cada tercer día con ayuda de un Vernier midiendo las dimensiones de la masa tumoral y sacrificando a los organismos al tener un diámetro tumoral mayor de 2 cm.

Análisis histológico

Los ratones con un diámetro tumoral de 2 cm o cercano, se sacrificaron por dislocación cervical para extraer los tumores, los cuales fueron fijados con formol por 24 horas, posteriormente se cortaron en fragmentos para ser fijados en parafina y poder ser procesados con técnica histológica convencional y teñidos con hematoxilina/eosina. Las muestras fueron observadas con el microscopio fotónico Nikon Eclipse para tomar fotomicrografías con el programa NIS Elements F a 4x, 10x, 20x y 40x para observar las diferencias en los tumores de los distintos tratamientos. Las fotomicrografías a 20x fueron estudiadas mediante el programa Image Pro Plus 7 donde se seleccionaron las zonas que contenían tumor, las áreas en blanco y las zonas que presentaban muerte celular masiva para ser graficado.

Análisis de datos

Para el análisis estadístico se realizó un ensayo ANOVA de 2 vías y luego una prueba post hoc de Tukey para ver si hubo cambios significativos, considerando como significativa una $p < 0.05$. Todas las gráficas y el análisis estadístico se realizaron con el programa GraphPad 9.

Resultados y Discusión

Construcción del andamio

Los andamios obtenidos de Ge/HA (en proporción 4/1) y las combinaciones con MAGE-A5 y CpGs entrecruzados con EDC a 30mM, fueron de apariencia esponjosa y con consistencia sólida, pero comprimible. Los andamios al cortarlos tuvieron un peso de 0.0097g y no se observaron diferencias visibles entre los distintos tipos de andamios fabricados.

El uso de EDC como entrecruzante de Ge/HA se ha utilizado en diversos estudios como es el caso de Ali et al. 2009 donde se utilizó EDC al 50 mM para entrecruzar andamios de Ge/HA a distintas concentraciones. Por otro lado, Chag K.C. et al. 2021 utilizaron EDC al 1% para entrecruzar un hidrogel de Ge/HA complementado con hinokitiol. Wu S. et al. 2017 también entrecruzó andamios de Ge/HA con 0.1% de EDC, de acuerdo con sus resultados, que coinciden con los de este proyecto, se obtuvieron andamios porosos con capacidad de absorber agua y no degradarse rápidamente después de su formación.

Experimentos *in vitro*

Mediante el cultivo de esplenocitos obtenidos de los bazo de ratones con melanoma, se pudo observar la interacción de las células con el andamio como se resalta en la Figura 8. El andamio se observa como una estructura interconectada formada de poros donde se puede notar que los esplenocitos se encuentran principalmente en los espacios formados por los poros y en cierta medida en los contornos.

Estudios de citotoxicidad del andamio de Ge/HA entrecruzado con EDC fueron realizados por Jarquín Y.K. 2016 cultivando BMDC en los andamios entrecruzados a distintas concentraciones obteniendo viabilidad a concentraciones menores de 60mM. Posteriormente De la Rosa 2021

cultivó esplenocitos sobre el andamio entrecruzado con EDC a 50mM observando viabilidad celular. De la Rosa 2021 también observó la interacción de las células con el andamio y observó la presencia de células en los contornos del andamio, similar a lo observado en este trabajo.

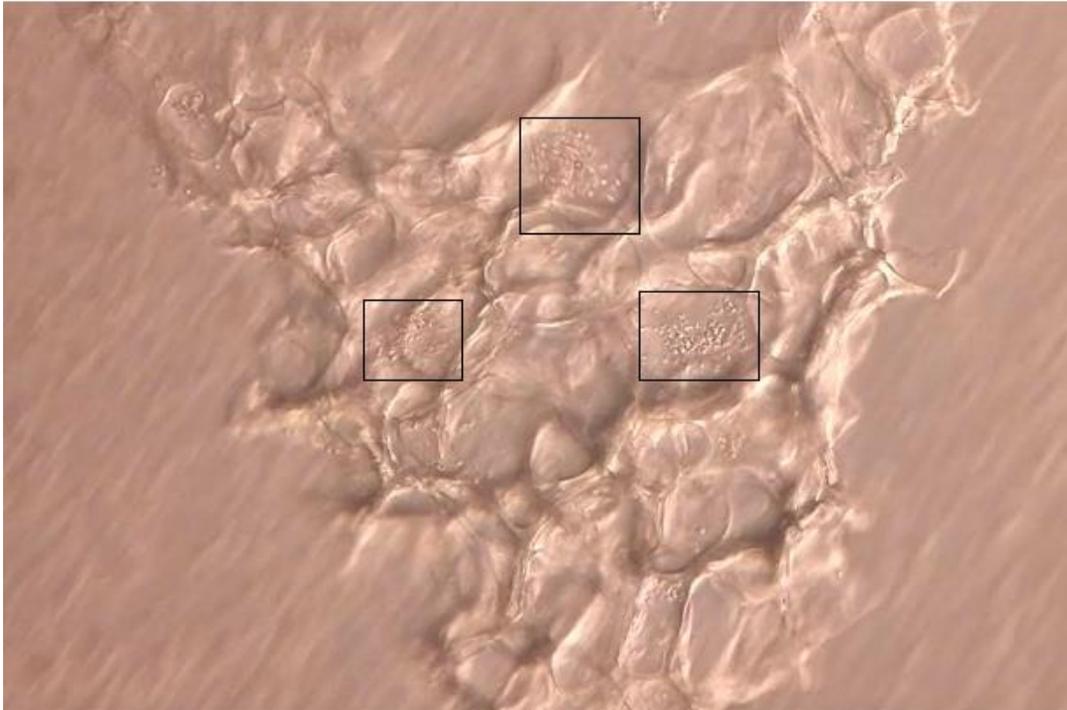


Figura 8. Fotomicrografía del andamio con esplenocitos murinos después de 3 días de cultivo

Efecto de los andamios en los linfocitos de bazo *in vitro*

Para evaluar el fenotipo de los linfocitos T en los distintos tratamientos, los andamios se cultivaron con esplenocitos del modelo C57BL/6 durante tres días y se evaluaron por citometría de flujo con los fenotipos CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, así como la media de intensidad de fluorescencia (MIF) de ambos a CD137 para evaluar la activación.

Como se puede observar en la Figura 9, se obtuvo una media de células CD3⁺CD4⁺ de 65.4% para el grupo control, 55.7% en Ge/HA, 68.5% para MAGE-A5, 63.6% para CpGs y finalmente 67.8% en MAGE-A5/CpGs; sin embargo, no se pueden observar diferencias significativas entre los

distintos tratamientos. Por su parte, en las células $CD3^+CD8^+$ se observa que hay variación en la proliferación de los grupos. Los grupos con un menor porcentaje de proliferación son los asociados a MAGE-A5 y MAGE-A5/CpGs (media de 6 y 7.8% respectivamente); con un porcentaje mayor de proliferación en el tratamiento de GE/HA (38.5%) y CpGs (28.5%). La disminución de MAGE-A5 y MAGE-A5/CpGs respecto al grupo de Ge/HA es estadísticamente significativa (p de 0.0031 y 0.0059 respectivamente).

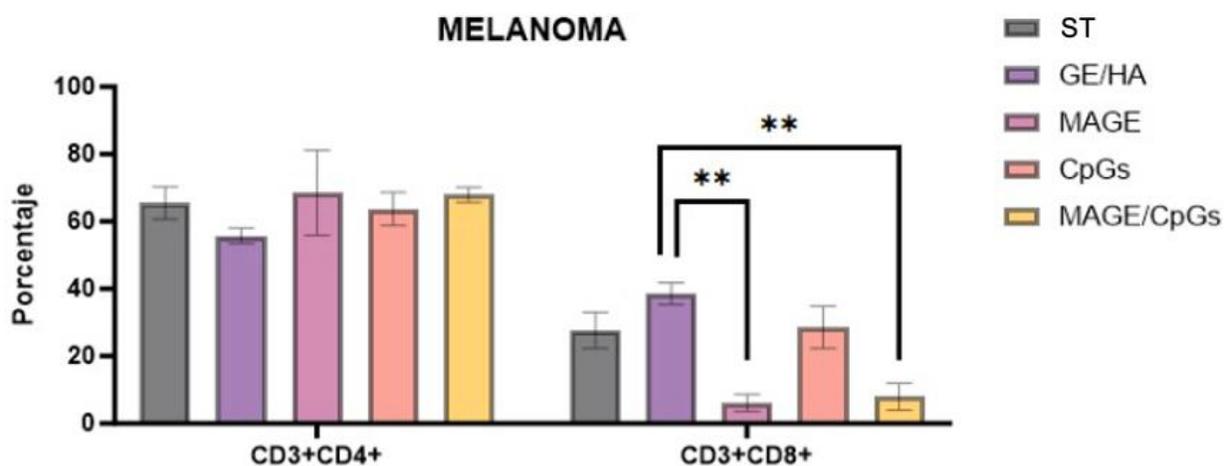


Figura 9. Porcentaje de linfocitos $CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$ de los cultivos de esplenocitos-andamios de Ge/HA. Porcentaje de linfocitos T $CD3^+CD4^+$ y porcentaje de linfocitos T $CD3^+CD8^+$.

Para conocer el efecto de los andamios en los linfocitos T, se utilizó la media intensidad de fluorescencia (MIF) del marcador de CD137, el cual es considerado un marcador de activación y proliferación de linfocitos. Como se puede observar en la Figura 10, no se encontraron diferencias en la media de intensidad de fluorescencia de CD137 de los linfocitos $CD3^+CD4^+$ en los distintos tratamientos siendo la media de los tratamientos entre 10.5 y 11.8. Por otro lado, en los linfocitos $CD3^+CD8^+$ se pudo observar variaciones no significativas entre los distintos grupos, siendo

mayores para el grupo control y los grupos con MAGE-A5 y MAGE-A5/CpGs (con una media de 7.6, 6.2 y 11.5 respectivamente), e inferiores para Ge/HA y CpGs (media de 2 y 2.2).

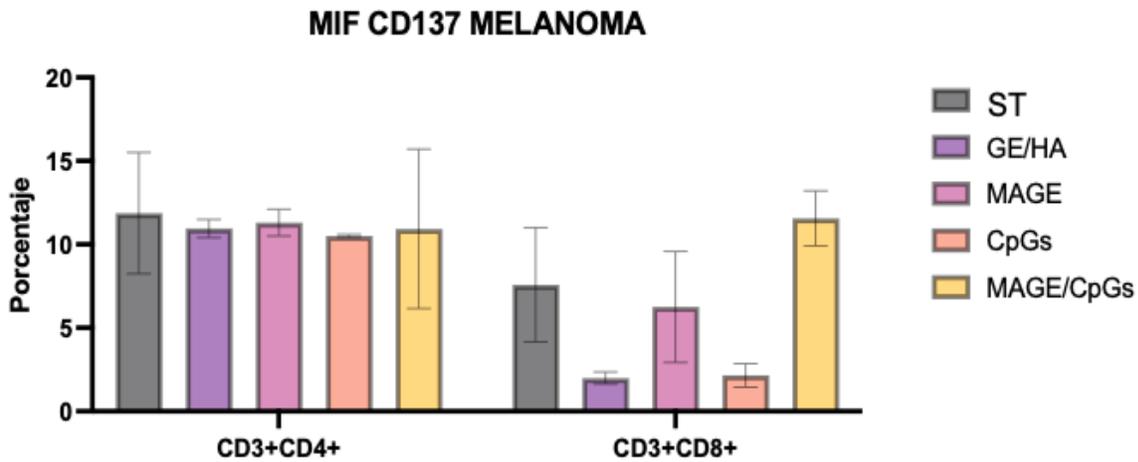


Figura 10. Media de intensidad de fluorescencia MIF de CD137 en linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de esplenocitos después de 3 días de cultivo con andamios de Ge/HA.

Una cosa importante para tener en cuenta es que los bazos fueron obtenidos de ratones con una exposición previa a melanoma, por lo cual, una activación de la respuesta inmunológica ya había ocurrido en respuesta a esa exposición, lo que puede explicar que la proliferación fuera tan alta para todos los grupos de CD3⁺CD4⁺ los cuales pudieron ser activados y ver favorecida su proliferación por los macrófagos mediante el MHC-II según lo reportado por Fuerte-Pérez 2023, donde se obtuvieron altos niveles de activación con CD80, CD86 y CD40 para los grupos de sin tratamiento, MAGE-A5 y MAGE-A5/CpGs y altos niveles de activación para CpGs para macrófagos CD3⁻ Ly6c⁺. Además de ser posiblemente favorecidos por las citocinas producidas por los mismos como IL-12 y TNF- α que favorecen la citotoxicidad de linfocitos CD8⁺ y la formación de los linfocitos Th tipo 1 asociados a un incremento en la generación de la respuesta tumoral, por lo que podemos inferir que los linfocitos CD4⁺ obtenidos son Th1.

Por su parte en los linfocitos CD3⁺CD8⁺ lo que podemos observar es que si bien la proliferación es menor para los grupos con MAGE-A5 y MAGE-A5/CpGs, son los grupos que muestran una mayor activación. Los linfocitos CD3⁺CD8⁺ o linfocitos citotóxicos, son de las principales células que se encargan de la respuesta tumoral, ya que son los linfocitos infiltrantes de tumor que se encargan de la inducción de muerte celular. Considerando que la proliferación de linfocitos observada se debe a la respuesta tumoral que el ratón estaba generando previo a la exposición a los andamios, MAGE-A5 al ser un antígeno tumoral puede ser la causa de una menor proliferación ya que puede llegar a inducir tolerancia o agotamiento de los linfocitos que ya estaban siendo estimulados. Estos resultados pueden relacionarse también con el incremento en los niveles de activación para los grupos con MAGE-A5 y con los niveles de activación de CD80 en el tratamiento de MAGE-A5 y CD40 en el tratamiento de MAGE-A5/CpGs observados por Fuerte-Pérez 2023 en células dendríticas MHC-II⁺CD11c⁺ encargadas de la presentación mediante MHC-I y la liberación de IL-12.

Experimentos *in vivo*

Elaboración de los hidrogeles

Para la elaboración de los hidrogeles se realizó una prueba de hidratación en andamios de un tamaño de entre 0.0075 y 0.0097g con 150µl, 250µl y 500µl de agua destilada por 24 hrs. con un control sin hidratar. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 11. donde se resalta que el fragmento control sin hidratar (A y a) permaneció sin cambios, los fragmentos hidratados con 150µl (B) mantuvieron su estructura sólida después del tiempo establecido (b) y no fue posible disolverlos, los andamios hidratados con 250µl (C) después del tiempo de hidratación tenían una consistencia blanda que al momento de macerarlo se formaron pequeños fragmentos gelatinosos,

sin embargo, no se pudo conseguir una consistencia homogénea (c), finalmente el andamio que fue hidratado con 500 μ l (D) después del tiempo de hidratación tenía una consistencia muy suave y al macerarlo se obtuvo un gel con consistencia acuosa, el cual además podía pasar a través de una jeringa, propiedad importante para su inoculación en los ratones por lo cual se consideró que el volumen adecuado de hidratación era de 500 μ l. Se ha observado que la capacidad de hinchazón de los hidrogeles o su capacidad de absorber agua está dada por el tamaño de los poros, la densidad de reticulación y las interacciones entre los polímeros (Velasco Rodriguez B. et al. 2021). Se ha reportado que el hinchamiento de hidrogeles y criogeles híbridos de HAMA-GeMa era menor, a mayor porcentaje de HAMA o a mayor porcentaje de entrecruzamiento debido a una mayor densidad de reticulación lo que disminuye la flexibilidad y capacidad de expansión, además de una disminución en la degradación con colagenasa atribuido a la formación de enlaces más fuertes entre los materiales (Camci-Unal, G. et al. 2013; Velasco Rodriguez, B. et al. 2021; Rezaeeyazdi, M. et al. 2018).

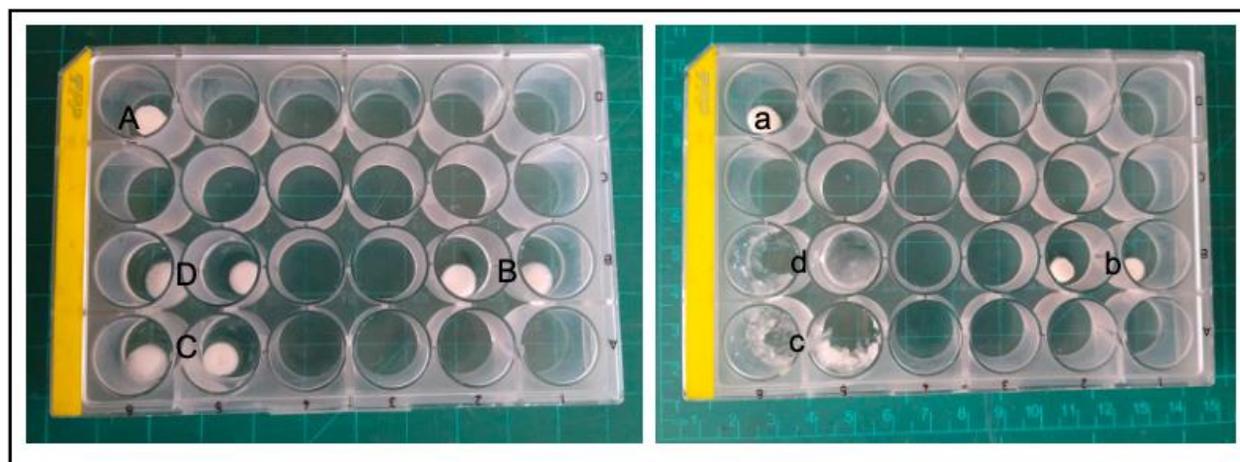


Figura 11. Prueba de hidratación del andamio de Ge/HA después de 24 horas con agua destilada y posterior a la maceración del andamio, control (a), con 100 μ l (b), 250 μ l (c) y 500 μ l (d).

Análisis del efecto de los hidrogeles en linfocitos de ganglio

Como se puede observar en la Figura 12 donde se comparan los linfocitos en ganglios en la semana 1 y 3, las células CD3⁺CD4⁺ durante la primera semana variaron sus niveles de proliferación en los distintos grupos siendo menor en el tratamiento de Ge/HA (media de 36%) y aumentando para los grupos principalmente de CpGs y MAGE-A5/CpGs (media de 55.2 y 56.4% respectivamente), sin embargo, no se observan diferencias significativas entre tratamientos. Para la tercera semana el mismo fenotipo no mostró variaciones entre los tratamientos obteniendo una proliferación de 83.3% para Ge/HA, 81.3% para MAGE-A5, 79.9% para CpGs y 82.2% para MAGE-A5-CpGs, por lo cual se puede observar un incremento en el número de células CD3⁺CD4⁺ en ganglios de la semana 1 a la semana 3 aumentando alrededor del 20% (Figura 12).

En el fenotipo CD3⁺CD8⁺ se puede observar como en la primera semana se encuentra en 13.6% y 14.1% para el grupo de MAGE-A5 y de Ge/HA y siendo ligeramente inferior para los grupos de CpGs y MAGE-A5/CpGs (8.1% y 10.4% respectivamente), por otro lado, en la semana 3 se puede observar que no hay diferencias entre los tratamientos obteniendo 13.1% para Ge/HA, 13.3% para MAGE-A5, 7.7% para CpGs y 11.3% para MAGE-A5/CpGs para los grupos, por lo que no se observan diferencias con respecto a la primera semana.

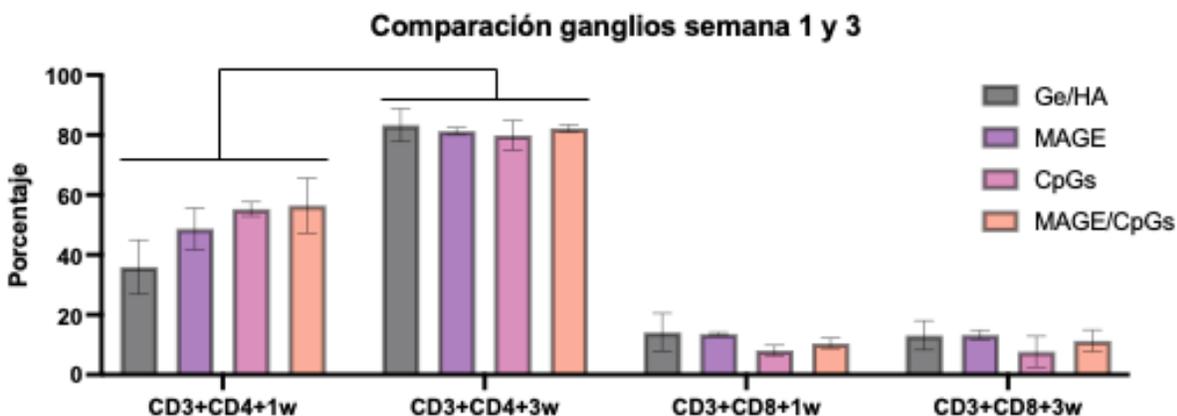


Figura 12. Porcentaje de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en ganglio después de una semana y tres semanas de inoculación de los hidrogeles.

Como se mencionó previamente, para medir la activación de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ se utilizó el marcador CD137, como se puede observar en la Figura 13 durante la primera semana el fenotipo CD3⁺CD4⁺ no mostró variaciones significativas entre tratamientos, siendo de 6.2 para Ge/HA, 6.2 para MAGE-A5, 5.4 para CpGs y 5.8 para MAGE-A5/CpGs y mostrando una disminución en la media de intensidad de fluorescencia para la semana 3 en todos los tratamientos, siendo 3.5 para Ge/HA, 2.9 para MAGE-A5, 3 para CpGs y 3.2 para MAGE-A5-CpGs. Por su parte la media de intensidad de fluorescencia de CD137 de linfocitos CD3⁺CD8⁺ mostró ligeras variaciones no significativas entre grupos siendo de 6.1 para Ge/HA, 5.3 para MAGE-A5, 4.7 para CpGs y 4.5 para MAGE-A5-CpGs y mostrando una disminución para la tercera semana con 1.7 para Ge/HA, 1.7 para MAGE-A5, 1.6 para CpGs y finalmente 2 para MAGE-A5/CpGs en donde no se observan diferencias significativas entre tratamientos, pero si diferencias considerables respecto a la primera semana.

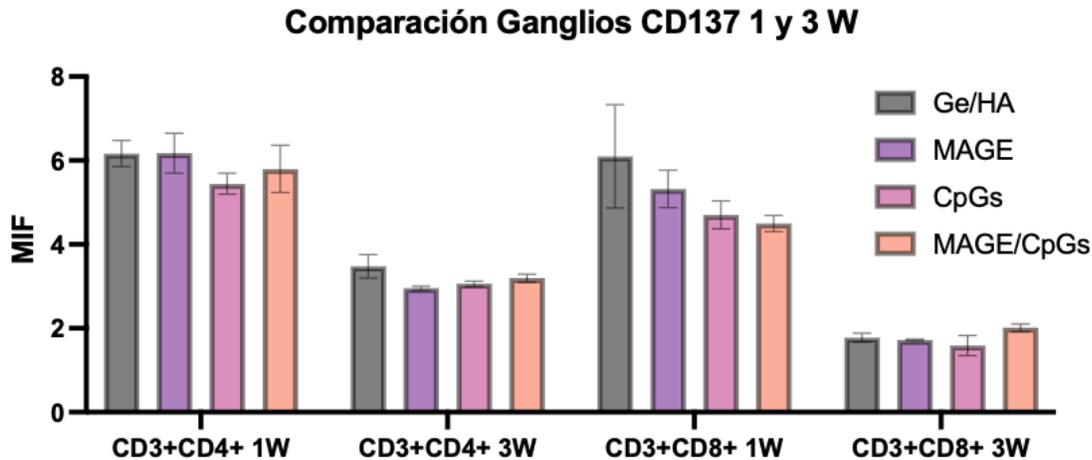


Figura 13. Media de intensidad de fluorescencia de CD137 en linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de ganglios, después de una semana y tres semanas de inoculación de hidrogeles.

La proliferación de linfocitos T esta dada por un incremento en la producción de IL-2 la cual es producida por los mismos linfocitos y también por la producción de IL-12 la cual es producida por macrófagos y células dendríticas, el incremento en la producción de IL-12 fue observado al medir los niveles de citocinas (datos no reportados). En los linfocitos CD4⁺, se puede observar un incremento en la proliferación de todos los grupos lo cual responde a la respuesta inmune adaptativa que muestra un incremento después de los 15 días. El hecho de que no se observan diferencias significativas desde el grupo de Ge/HA está relacionado con que el andamio por sí solo muestra propiedades inmunogénicas debido a los materiales que lo forman favoreciendo la proliferación de leucocitos como fue reportado por De la Rosa 2021. Los CpGs pueden ser reconocidos por el TLR9 que se asocia a una respuesta innata inespecífica que conlleva a un incremento en la proliferación de linfocitos Th1 (Bode et al. 2003) cuya tendencia se puede observar en las gráficas. Mientras que el antígeno es presentado por MHC-I a los linfocitos CD8⁺, este no muestra un incremento significativo, pero se debe tener en cuenta que la respuesta también está determinada por las citocinas y las moléculas coestimuladoras localizadas en APCs.

Estudios previos han mostrado que el uso de CpGs como adyuvante en vacunas acopladas a antígenos tumorales como Melanin-A incrementan la respuesta inmunológica, ya que juntos estimulan la activación de células dendríticas por el TLR9, lo cual mejora la respuesta de células T (Speiser D.E. et al. 2005); por lo cual, dentro de los resultados esperados se encontraba que al colocar los dos elementos (MAGE-A5 y CpGs) la respuesta se viera favorecida, lo cual no fue observado. Algo a lo que se puede asociar esta falta de incremento en la respuesta es que el uso de una mayor diversidad de elementos puede disminuir la efectividad de los tratamientos, ya sea por una menor efectividad al reconocer los elementos, por una posible disminución en la incorporación de elementos al andamio o por una inducción de tolerancia en las células. En los estudios previamente mencionados utilizan más de una dosis y no utilizan más elementos.

Análisis del efecto de los hidrogeles en linfocitos de bazo

En los esplenocitos o células de bazo se puede observar una tendencia similar a la de las células de ganglio (Figura 14), las células $CD3^+CD4^+$ durante la primera semana variaron de forma no significativa siendo igual para el tratamiento de Ge/HA y el tratamiento de MAGE-A5 (media de 49% y 49.4%), ligeramente mayor para CpGs (62.8%) e inferior para MAGE-A5/CpGs (43.9%), mientras que en la tercera semana el mismo fenotipo $CD3^+CD4^+$ no mostró variaciones entre tratamientos siendo de 83.3% para Ge/HA, 81.2% para MAGE-A5, 79.8% para CpGs y 82.2% para MAGE-A5/CpGs, todo el grupo de tratamientos $CD3^+CD4^+$ de la semana 3 muestra un aumento respecto a los porcentajes en los tratamientos de la semana 1. Por otro lado, las células $CD3^+CD8^+$ durante la primera semana mostraron variaciones ligeras entre los tratamientos sin diferencias significativas, siendo superior en el tratamiento de Ge/HA (14.8%) y constante para el resto de los tratamientos de 8.7% para MAGE-A5, 8.2% para CpGs y 9.7% para MAGE-A5/CpGs,

para la tercera semana se observa un ligero incremento en los distintos tratamientos de 14.5% para Ge/HA, 19.4% para MAGE-A5, 19.9% para CpGs y 18.7% para MAGE-A5/CpGs.

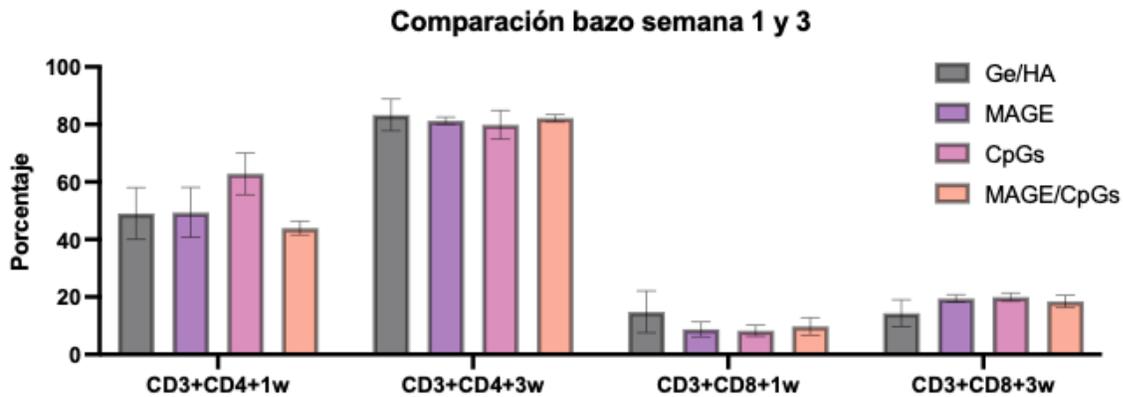


Figura 14. Porcentaje de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en bazo después de una semana y tres semanas de inoculación de los hidrogeles.

Como se puede observar en la Figura 15 en los linfocitos CD3⁺CD4⁺ de bazo no hay variación en la media de intensidad de fluorescencia entre tratamientos en la primera semana siendo de 2.8 para Ge/HA, 3.7 para MAGE-A5, 2.2 para CpGs y 3.5 para MAGE-A5/CpGs, mostrando un aumento durante la semana tres a 9.3 para Ge/HA, 8.1 para MAGE-A5, 6.9 para CpGs y 6.8 para MAGE-A5/CpGs. Por su parte, la media de intensidad de fluorescencia de los linfocitos CD3⁺CD8⁺ se muestra de igual forma con una MIF de 2.8 para Ge/HA, 3.1 para MAGE-A5, 1.6 para CpGs y 3.1 para MAGE-A5/CpGs durante la primera semana con incremento a 27.7 para MAGE-A5, 34.1 para CpGs y 15.5 para MAGE-A5/CpGs, mostrando un incremento estadísticamente significativo de los grupos de MAGE-A5 y CpGs respecto al grupo de Ge/HA (valor de p de 0.02 y 0.0026 respectivamente).

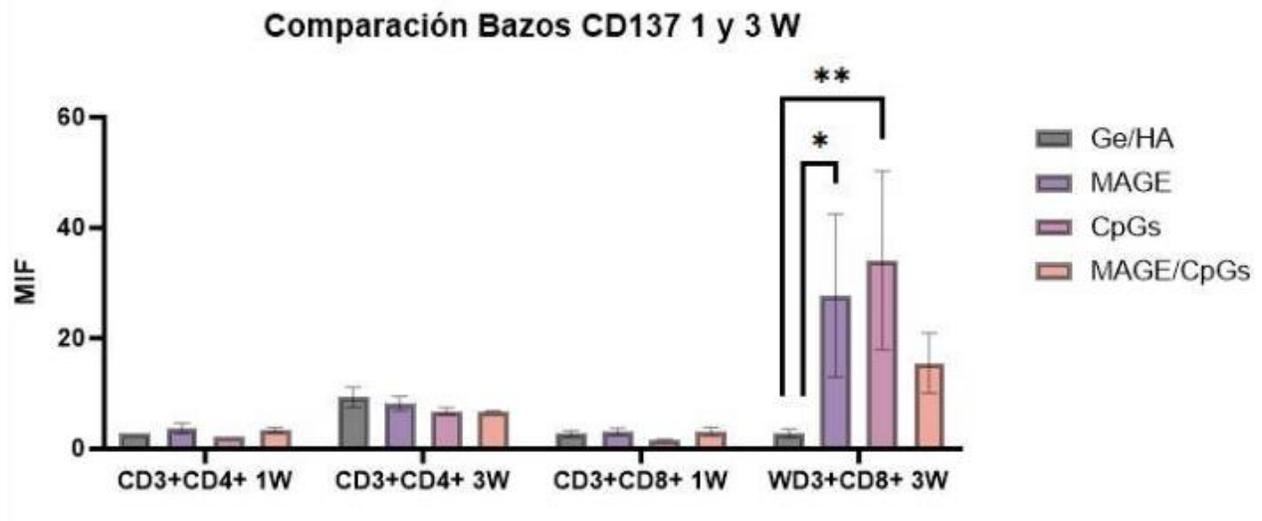


Figura 15. Media de intensidad de fluorescencia de CD137 en linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de bazo, después de una semana y tres semanas de inoculación de hidrogeles.

Al igual que en células de ganglio se puede observar un incremento de linfocitos CD4⁺, de acuerdo con lo estudiado por Fuerte Perez 2023, se observa una mayor activación de macrófagos CD3⁺Ly6C⁺ que favorecen la presentación por MHC-II asociado a la proliferación de linfocitos CD4⁺, si bien no hay un incremento significativo de células CD8⁺, hay una tendencia que responde a las posibles citocinas que están siendo liberadas por las células atraídas por el hidrogel como la IL-12 y TNF- α que es producida por los macrófagos. Una de las citocinas que se vio incrementada fue el IFN- γ (datos no reportados), la cual es una molécula que favorece la actividad de los macrófagos y la expresión del MHC-I en las APCs, así como en el desarrollo y la activación de los linfocitos. Lo cual puede asociarse con el incremento significativo en la activación de CD8⁺ observado para los grupos de MAGE-A5 y CpGs.

Análisis de sobrevida

Volumen tumoral

Para observar el efecto de los hidrogeles de Ge/HA, estos se inocularon a grupos de 5 ratones por tratamiento, posteriormente se les inocularon 60,000 células de melanoma B16-F10 y se observó el desarrollo del tumor.

En la Figura 16 se puede observar el crecimiento tumoral a partir del día 22 posterior a la inoculación de melanoma. En el día 22 se puede observar que el crecimiento tumoral para todos los grupos es menor a 5mm^3 , con excepción del grupo sin tratamiento; para el día 24 se observó un incremento principalmente en el grupo sin tratamiento donde aumentó a 21mm^3 y el grupo MAGE-A5 que incrementó a 7mm^3 ; para el día 26 el grupo sin tratamiento tuvo un tamaño tumoral de 23mm^3 , el grupo MAGE-A5 incrementó a 10mm^3 , los grupos Ge/HA y CpGs alcanzaron un tamaño de 5mm^3 y finalmente el grupo MAGE-A5/CpGs no tuvo crecimiento tumoral. Al día 28, se realizó el sacrificio de todos los ratones que hubieran desarrollado tumor, por lo que se redujo el número de ratones del grupo de Ge/HA, MAGE-A5 y CpGs, mientras que el grupo sin tratamiento se quedó sin ratones. Para el día 32 se observó desarrollo tumoral en los ratones restantes del grupo de Ge/HA, mientras que el grupo de MAGE-A5/CpGs también mostró desarrollo tumoral de 3mm^3 ; para el día 34 el tamaño tumoral del grupo Ge/HA alcanzó el tamaño de 8mm^3 , y del grupo MAGE-A5/CpGs 11mm^3 , los cuales fueron sacrificados, terminando así con los ratones de ambos grupos. Posterior al día 34, el grupo MAGE-A5 volvió a mostrar desarrollo tumoral llegando a un tamaño tumoral de 6mm^3 para el día 40, mientras que los ratones restantes del grupo CpGs no mostraron desarrollo tumoral para el día 40 cuando se terminó el experimento.

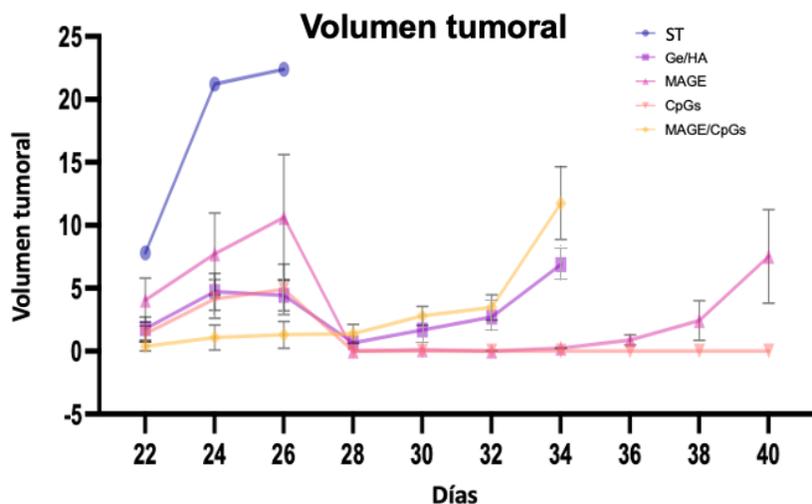


Figura 16. Gráfica del volumen tumoral de los ratones CD57BL/6 del día 22 al 40 posterior a la inoculación del melanoma de los distintos tratamientos.

Análisis histológico

Para el análisis histológico de los tumores se utilizó la técnica histológica convencional, los cortes de los tumores se tiñeron con hematoxilina/eosina y se observaron en el microscopio Nikon ECLIPSE 80i con el programa NIS-Elements F.

En la Figura 17, el estroma tumoral del grupo Sin tratamiento (A), se pueden observar las células basófilas vivas con amplia producción de melanina, sin muestras de daño o muerte celular. Para el tratamiento con hidrogel de Ge/HA (B) se observa una amplia presencia de células basófilas sin evidencia de muerte celular y con gran cantidad de vasos sanguíneos en todo el estroma tumoral.

En el tratamiento con el hidrogel de Ge/HA/MAGE-A5 (C) se puede observar zonas de eosinofilia asociadas a muerte celular masiva donde se observan células con restos de material genético, intercaladas con células basófilas y la presencia de un vaso sanguíneo limitado. Para el tratamiento con hidrogel de Ge/HA/CpGs (D) se pueden observar células basófilas rodeadas de eosinofilia o

zonas de muerte celular, con evidencia de restos de material genético y liberación de melanina de las células. Finalmente, en el tratamiento con el hidrogel de Ge/HA/MAGE-A5/CpGs (E) se observa una zona de amplia muerte celular con evidencia de restos celulares y de material genético, además de pequeñas zonas con células basófilas y vasos sanguíneos rodeadas de una zona de transición a muerte con liberación de melanina.

Las fotomicrografías a 20x fueron analizadas mediante el programa Image Pro Plus para ser gráficas, como se puede observar en la gráfica (Figura 17 F), se obtuvo que el grupo con mayor zona de muerte tumoral es el grupo de Ge/HA CpGs (33.4%), seguido del grupo Ge/HA MAGE-A5/CpGs (25%) y por su parte el grupo con menor área de muerte tumoral es el grupo sin tratamiento (3.1%).

El estroma tumoral del melanoma puede variar dependiendo de la zona donde se encuentra el tumor, pero incluye colágena tipo I, fibronectina y elastina que son proteínas estructurales de la matriz extracelular, sobre la cual se pueden desarrollar fibroblastos y células endoteliales que secretan factores de crecimiento que promueven la formación de microvasculatura (Cunquero-Tomás A.J. & Fernandez Díaz A. 2018). La respuesta antitumoral que se da dentro del microambiente tumoral se caracteriza por la presencia de diversas células entre las que se encuentran: neutrófilos, macrófagos y linfocitos infiltrantes del tumor ($CD8^+$) que se encargan de promover la apoptosis de las células tumorales, si bien no se observan diferencias significativas se puede observar una tendencia de incremento de zonas de muerte para los grupos con tratamiento, principalmente con CpGs, que si bien se esperaría que el tratamiento combinado tuviera una mayor efectividad, se puede observar que también se encuentran elevada la respuesta, similar a lo reportado por Piñón-Zárate 2014 donde observó una mayor zona de muerte tumoral en el grupo con GK-1 que al igual que CpGs favorece una respuesta innata, asociado también a un incremento

en la IL-12, la cual favorece la activación de linfocitos Th-1 y la producción de citocinas como IL-2 e IFN- γ que es importante para la proliferación e infiltración de linfocitos infiltrantes del tumor (Marzagalli M. et al. 2019).

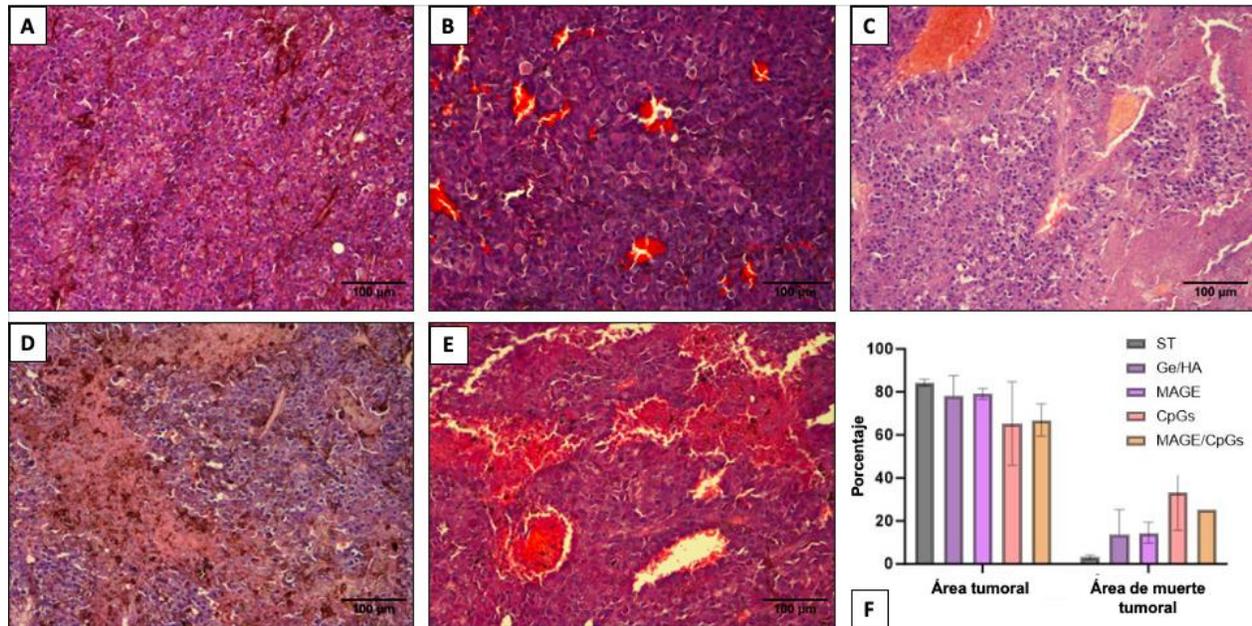


Figura 17. Fotomicrografías del estroma tumoral de los distintos tratamientos a 20x. Sin tratamiento (A), Ge/HA(B), Ge/HA/MAGE-A5 (C), Ge/HA/CpGs (D) y Ge/HA/MAGE-A5/CpGs (E). Gráfica de la relación en las fotomicrografías de áreas tumorales y áreas de muerte tumorales en los tratamientos (F).

Conclusiones

Los hidrogeles de Ge/HA acoplados a antígenos MAGE-A5 y al adyuvante CpGs mostraron resultados diversos entre los experimentos *in vitro* y los experimentos *in vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que el hidrogel por sí solo posee propiedades inmunogénicas favoreciendo la proliferación y activación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺; el hidrogel al ser acoplado a una de las moléculas coestimuladoras incrementa la respuesta generada con respecto al hidrogel de Ge/HA solo, mostrando que la unión y liberación de los adyuvantes fue adecuada. Estas propiedades se

vieron reflejadas al momento de retar a los organismos con B16-F10, donde se observó que al acoplar una molécula coestimuladora, la respuesta antitumoral se veía favorecida, el crecimiento tumoral se vio disminuído y el estroma tumoral se encontró con grandes zonas de muerte, principalmente con CpGs asociados a una activación inespecífica de la respuesta inmunológica que favorece la activación de las células de la respuesta innata que ayudan a la producción de citocinas y a la presentación de antígenos para favorecer la activación y proliferación de células citótóxicas y la generación de la respuesta antitumoral.

Los hidrogeles de Ge/HA acoplados a antígenos MAGE-A5 y adyuvante CpGs mostraron ser una terapia para ser estudiada; el uso de hidrogeles muestra ser una estrategia prometedora al ser poco invasiva y con una buena efectividad, además de poseer propiedades inmunogénicas asociadas posiblemente a la respuesta inmunológica innata que favorece la presentación de antígenos y la activación de linfocitos T, así como la producción de moléculas coestimuladoras como citocinas.

Perspectivas

La inclusión de más de un elemento al andamio/hidrogel puede modificar y reducir la capacidad de integración de los elementos. Se sugiere analizar la integración y liberación de los elementos acoplados al andamio a distintas concentraciones mediante cinética.

Los estudios muestran incremento en la respuesta inmunológica adaptativa al realizar más de una exposición al estímulo, por lo que se sugiere observar la variación de la respuesta con más de una exposición profiláctica.

Los linfocitos son los principales encargados de la respuesta antitumoral, se puede comprobar la localización mediante inmunohistoquímica para identificar los linfocitos infiltrantes de tumor.

Estudiar la presencia de otras células asociadas a la respuesta lítica contra el tumor como los linfocitos NK podría ayudar a entender de mejor forma la respuesta antitumoral.

Bibliografía

- Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L., & Brun, P. (2020). Hyaluronic Acid: Redefining Its Role. *Cells*, 9(7), 1743. <https://doi.org/10.3390/cells9071743>
- Abdulghani, S., & Mitchell, G. (2019). Biomaterials for In Situ Tissue Regeneration: A Review. *Biomolecules*, 9(11), 750. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9110750>
- Adu-Berchie, K., & Mooney, D. J. (2020). Biomaterials as Local Niches for Immunomodulation. *Accounts of chemical research*, 53(9), 1749–1760. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00341>
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(2), 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Akkın, S., Varan, G., & Bilensoy, E. (2021). A Review on Cancer Immunotherapy and Applications of Nanotechnology to Chemoimmunotherapy of Different Cancers. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(11), 3382. <https://doi.org/10.3390/molecules26113382>
- Anderson, N. R., Minutolo, N. G., Gill, S., & Klichinsky, M. (2021). Macrophage-Based Approaches for Cancer Immunotherapy. *81(5)*, 1201–1208. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-20-2990>
- Arellano, R. M. (2014). Construcción de andamios de gelatina-ácido hialurónico entrecruzados con distintas concentraciones de EDC (n-3-dimetilaminopropil)-n-etilcarbodiimida) (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- Arora, B., Tandon, R., Attri, P., & Bhatia, R. (2017). Chemical Crosslinking: Role in Protein and Peptide Science. *Current protein & peptide science*, 18(9), 946–955. <https://doi.org/10.2174/1389203717666160724202806>

- Atienza-Roca, P., Cui, X., Hooper, G. J., Woodfield, T. B. F., & Lim, K. S. (2018). Growth Factor Delivery Systems for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 245–269. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2_13
- Bacáková, L., Filová, E., Rypáček, F., Svorčík, V., & Starý, V. (2004). Cell adhesion on artificial materials for tissue engineering. *Physiological research*, 53 Suppl 1, S35–S45.
- Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Omid, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-jahromi S., & Ziraksaz Z. (2017) Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33:2, 144-172, DOI: 10.1080/02648725.2018.1430464
- Baxevanis, C. N., Perez S. A., & Papamichail M. (2009). Cancer immunotherapy, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 46 (4), 167-189, DOI: 10.1080/10408360902937809
- Bayan, C. Y., Lopez, A. T., Gartrell, R. D., Komatsubara, K. M., Bogardus, M., Rao, N., Chen, C., Hart, T. D., Enzler, T., Rizk, E. M., Pradhan, J. S., Marks, D. K., Geskin, L. J., & Saenger, Y. M. (2018). The Role of Oncolytic Viruses in the Treatment of Melanoma. *Current oncology reports*, 20(10), 80. <https://doi.org/10.1007/s11912-018-0729-3>
- Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-11425>
- Bode, C., Zhao, G., Steinhagen, F., Kinjo, T., & Klinman, D. M. (2003). CpG DNA as a vaccine adjuvant. *10(4)*, 499–511. <https://doi.org/10.1586/erv.10.174>

- Beutler B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40 845–859
doi:10.1016/j.molimm.2003.10.005
- Borroni, E. M., & Grizzi, F. (2021). Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *International journal of molecular sciences*, 22(24), 13275.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413275>
- Brenchley, J. M., & Bosselut, R. (2014). CD4 and CD8 Molecules. Reference Module in Biomedical Sciences. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00114-8>
- Burdick, J. A., & Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials*, 23(12), H41–H56.
<https://doi.org/10.1002/adma.201003963>
- Caballero Aguilar, L. M., Silva, S. M., & Moulton, S. E. (2019). Growth factor delivery: Defining the next generation platforms for tissue engineering. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 306, 40–58.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.05.028>
- Camci-Unal, G., Cuttica, D., Annabi, N., Demarchi, D., & Khademhosseini, A. (2013). Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels. *Biomacromolecules*, 14(4), 1085–1092. <https://doi.org/10.1021/bm3019856>
- Carneiro, J., & Junqueira, L. C. U. (2022). *Histología básica : texto y atlas* (13a edición). Editorial Médica Panamericana. ISBN 9786078546534
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal: official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section*

of the Cervical Spine Research Society, 17 Suppl 4(Suppl 4), 467–479.
<https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>

- Chang, K. C., Chen, W. C., Chen, C. H., Ko, C. L., Liu, S. M., & Chen, J. C. (2021). Chemical cross-linking on gelatin-hyaluronan loaded with hinokitiol for the preparation of guided tissue regeneration hydrogel membranes with antibacterial and biocompatible properties. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 119, 111576. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111576>
- Chaudhari, A. A., Vig, K., Baganizi, D. R., Sahu, R., Dixit, S., Dennis, V., Singh, S. R., & Pillai, S. R. (2016). Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *International journal of molecular sciences*, 17(12), 1974. <https://doi.org/10.3390/ijms17121974>
- Chester, C., Sanmamed, M. F., Wang, J., & Melero, I. (2018). Immunotherapy targeting 4-1BB: mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *131(1)*, 49–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741041>
- Cheung, A. S., & Mooney, D. J. (2015). Engineered Materials for Cancer Immunotherapy. *Nano today*, 10(4), 511–531. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2015.06.007>
- Chircov, C., Grumezescu, A. M., & Bejenaru, L. E. (2018). Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 59(1), 71–76.
- Cordero, R. J. B., & Casadevall, A. (2020). Melanin. *Current Biology*, 30(4), R142–R143. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.12.042>

- Damsky, W. E., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. (2014). Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene*, 33(19), 2413–2422. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.194>
- Davis, L. E., Shalin, S. C., & Tackett, A. J. (2019). Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer biology & therapy*, 20(11), 1366–1379. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032>
- D’Alba L. & Shawkey M. D. (2018). Melanosomes: Biogenesis, Properties and Evolution of an Ancient Organelle. *Physiological review*. 99(1), 1-19. <https://doi.org/10.1152/physrev.00059.2017>
- Delves P., Martin S., Burton D., Roitt I. (2014). *Fundamentos Inmunología*. (12a edición). Editorial médica panamericana. ISBN: 9786079356279
- De la Rosa L. C. (2021). Inmunoestimulación a través de un andamio de gelatina-ácido hialurónico entrecruzado, en un modelo murino de melanoma (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
- de Winde, C. M., Munday, C., & Acton, S. E. (2020). Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. *Medical microbiology and immunology*, 209(4), 515–529. <https://doi.org/10.1007/s00430-020-00680-4>
- Duharte, A. B. (2003). Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *Medisan*, 7(2), 75-88.
- Dunn, G.P., Bruce A.T., Ikeda, H., Old, L.J., & Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>

- Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber R.D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. Annual Review of Immunology 22:1, 329-360. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803>
- Dzwierzynski, W. W. (2021). Melanoma Risk Factors and Prevention. Clinics in Plastic Surgery, 48(4), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2021.05.001>
- Eddy, K., & Chen, S. (2020). Overcoming Immune Evasion in Melanoma. International journal of molecular sciences, 21(23), 8984. <https://doi.org/10.3390/ijms21238984>
- Eggert, A., Mads Hald Andersen, Voigt, H., Schrama, D., Eckhardt Kämpgen, Per thor Straten, & Becker, J. C. (2004). Characterization of mouse MAGE-derived H-2Kb-restricted CTL epitopes. 34(11), 3285–3290. <https://doi.org/10.1002/eji.200324618>
- Embgenbroich, M., & Burgdorf, S. (2018). Current Concepts of Antigen Cross-Presentation. Frontiers in Immunology, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01643>
- Fidler I. J. (1988). The biology of melanoma metastasis. The Journal of dermatologic surgery and oncology, 14(8), 875–881. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.1988.tb03591.x>
- Gaharwar, A.K., Singh, I. & Khademhosseini, A. (2020). Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration. Nature Reviews Materials 5, 686–705. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0209-x>
- Gartner, L. P. (2017). *Color atlas and text of histology* (7a edición). Lippincott Williams and Wilkins. ISBN 9781496346735
- Gerritsen, B. and Pandit, A. (2016), The memory of a killer T cell: models of CD8+ T cell differentiation. Immunol Cell Biol, 94: 236-241. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.118>

- Global Cancer Observatory. (2020). IARC. Recuperado 27 de febrero del 2022 de: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=0&sexes=0&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=16&populations=903_904_905_908_909_935&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&years=2030
- Global Cancer Observatory. (2020). IARC. Recuperado 27 de febrero del 2022 de: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/tables?types=1&sexes=0&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=16&populations=484&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&years=2030
- Global Cancer Observatory. (2020). IARC. Recuperado 27 de abril del 2023 de: https://gco.iarc.fr/overtime/en/dataviz/trends?populations=48400&sexes=1_2&types=1&multiple_populations=1&cancers=12
- Green J. J. (2021). Immunoengineering has arrived. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 109(4), 397–403. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37041>
- Guerder, S., & Flavell, R. A. (1995). T-Cell Activation: Two for T. *Current Biology*, 5(8), 866–868. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(95\)00175-8](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(95)00175-8)
- Halstead, E., Mueller, Y., Altman, J. et al. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* 3, 536–541 (2002). <https://doi.org/10.1038/ni798>
- Han, S., & Wu, J. (2022). Three-dimensional (3D) scaffolds as powerful weapons for tumor immunotherapy. *Bioactive materials*, 17, 300–319. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.020>
- Hong, S. R., Chong, M. S., Lee, S. B., Lee, Y. M., Song, K. W., Park, M. H., & Hong, S. H. (2004). Biocompatibility and biodegradation of cross-linked gelatin/hyaluronic acid

- sponge in rat subcutaneous tissue. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, 15(2), 201–214.
- Ionescu, O. M., Mignon, A., Minsart, M., Van Hoorick, J., Gardikiotis, I., Caruntu, I., Giusca, S. E., Van Vlierberghe, S., & Profire, L. (2021). Gelatin-Based Versus Alginate-Based Hydrogels: Providing Insight in Wound Healing Potential. *Macromolecular Bioscience*, 21(11), 2100230. <https://doi.org/10.1002/mabi.202100230>
 - Jarquín K. (2016). Construcción de un andamio de gelatina-ácido hialuronico y microesferas de BMP-2 y VEGF (tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
 - Kim, A., & Cohen, M. S. (2016). The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert opinion on drug discovery*, 11(9), 907–916. <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1201057>
 - Kim, A. M. J., Nemeth, M. R., & Lim, S. O. (2022). 4-1BB: A promising target for cancer immunotherapy. *Frontiers in oncology*, 12, 968360. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.968360>
 - Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. 4(4), 249–259. <https://doi.org/10.1038/nri1329>
 - Klinman, D. M., Currie, D. C., Ihsan Gursel, & Verthelyi, D. (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. 199(1), 201–216. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00148.x>
 - Koprowska K. & Czyz M. (2011). Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities. *Advances in Hygiene and Experimental Medicine*. 65: 734-751. 10.5604/17322693.966832

- Koshy, S. T., & Mooney, D. J. (2016). Biomaterials for enhancing anti-cancer immunity. *Current opinion in biotechnology*, 40, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.001>
- Kotsias, F., Cebrian, I., & Alloatti, A. (2019). Antigen processing and presentation. *International review of cell and molecular biology*, 348, 69–121. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.07.005>
- Kumar, B. V., Connors, T. J., & Farber, D. L. (2018). Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48(2), 202–213. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.007>
- Lamb, L. A., Halpern, A. C., & Hwu, W.-J. (2003). Diagnosis and management of stage I/II melanoma. *Seminars in Oncology Nursing*, 19(1), 22–31. <https://doi.org/10.1053/sonu.2003.50001>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Leach, D. G., Young, S., & Hartgerink, J. D. (2019). Advances in immunotherapy delivery from implantable and injectable biomaterials. *Acta biomaterialia*, 88, 15–31. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.016>
- Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiological reviews*, 99(2), 1223–1248. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2018>
- Lin, K., Zhang, D., Macedo, M. H., Cui, W., Sarmiento, B., & Shen, G. (2018). Advanced Collagen-Based Biomaterials for Regenerative Biomedicine. *Advanced Functional Materials*, 29(3), 1804943. <https://doi.org/10.1002/adfm.201804943>
- Lin, H., Beck, A. M., Shimomura, K., Sohn, J., Fritch, M. R., Deng, Y., Kilroy, E. J., Tang, Y., Alexander, P. G., & Tuan, R. S. (2019). Optimization of photocrosslinked

gelatin/hyaluronic acid hybrid scaffold for the repair of cartilage defect. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 13(8), 1418–1429.
<https://doi.org/10.1002/term.2883>

- Liu, D., Nikoo, M., Boran, G., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2015). Collagen and gelatin. *Annual review of food science and technology*, 6, 527–557.
<https://doi.org/10.1146/annurev-food-031414-111800>
- Lowe, J. S., Anderson, P. G., & Stevens, A. (2015). *Histología humana* (4a edición). Elsevier. ISBN 9788490229064
- Lu, T., Li, Y., & Chen, T. (2013). Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 337.
<https://doi.org/10.2147/ijn.s38635>
- Lugowska, I., Teterycz, P. & Rutkowski, P. (2018). Inmunoterapia del melanoma. *Oncología contemporánea (Poznan, Polonia)*, 22 (1A), 61–67. <https://doi.org/10.5114/wo.2018.73889>
- Mak T. W., Saundes M. E. & Jett B. D. (2014). *The T Cell Receptor: Proteins and Genes. De: Primer to The Immune Response* (2a edición). AP Cells. Pp 181-196. ISBN-13: 978-0-12-374163-9
- Maitra, J. & Vivek K. S. (2014). Cross-linking in Hydrogels - A Review. *American Journal of Polymer Science*, 4(2), 25–31. <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajps.20140402.01.html>
- Mattia G, Puglisi R, Ascione B, Malorni W, Carè A, Matarrese P. (2018). Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis.* Jan 25;9(2):112. doi: 10.1038/s41419-017-0059-7.

- Marinho, A., Nunes, C., & Reis, S. (2021). Hyaluronic Acid: A Key Ingredient in the Therapy of Inflammation. *Biomolecules*, 11(10), 1518. <https://doi.org/10.3390/biom11101518>
- Martins, J. G., Camargo, S. E. A., Bishop, T. T., Popat, K. C., Kipper, M. J., & Martins, A. F. (2018). Pectin-chitosan membrane scaffold imparts controlled stem cell adhesion and proliferation. *Carbohydrate polymers*, 197, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.062>
- Marzagalli, M., Ebel, N. D., & Manuel, E. R. (2019). Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 59, 236–250. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.002>
- Medzhitov R. & Janeway C. (2000). Innate Immunity. *New England Journal of Medicine*, 343(5), 338–344. <https://doi.org/10.1056/nejm200008033430506>
- Mishra, H., Mishra, P. K., Ekielski, A., Jaggi, M., Iqbal, Z., & Talegaonkar, S. (2018). Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. doi:10.1007/s00432-018-2726-1
- Murad, Y., & Clay, T. M. (2009). CpG Oligodeoxynucleotides as TLR9 Agonists. 23(6), 361–375. <https://doi.org/10.2165/11316930-000000000-00000>
- Murphy K., Travers P., & Walport, M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*. (7a edición). McGraw Hill. ISBN: 978-970-10-7347-6
- Nikitovic, D., Kouvidi, K., Karamanos, N. K., & Tzanakakis, G. N. (2013). The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *BioMed research international*, 929531. <https://doi.org/10.1155/2013/929531>

- Ostrowski, S. M., & Fisher, D. E. (2020). Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. doi: 10.1016/j.hoc.2020.08.010
- Owen J.A., Punt J. & Stranford S.A. (2014). Kuby. *Inmunología*. (7a edición). McGraw Hill. ISBN: 978-607-15-1126-3
- Ralli, M., Botticelli, A., Visconti, I. C., Angeletti, D., Fiore, M., Marchetti, P., Lambiase, A., de Vincentiis, M., & Greco, A. (2020). Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *Journal of immunology research*, 2020, 9235638. <https://doi.org/10.1155/2020/9235638>
- Ramshaw, J. A. M., Shah, N. K., & Brodsky, B. (1998). Gly-X-Y Tripeptide Frequencies in Collagen: A Context for Host–Guest Triple-Helical Peptides. *Journal of Structural Biology*, 122(1-2), 86–91. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3977>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Rossi C. R. , & Alaibac, M. (2014). Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo*, 28(6), 1005–1011. <https://iv.iiarjournals.org/content/28/6/1005.long>
- Rezaeeyazdi, M., Colombani, T., Memic, A., & Bencherif, S. A. (2018). Injectable Hyaluronic Acid-co-Gelatin Cryogels for Tissue-Engineering Applications. *Materials (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1374. <https://doi.org/10.3390/ma11081374>
- Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105. <https://doi.org/10.3390/polym13071105>
- Reddy, N., Reddy, R., & Jiang, Q. (2015). Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in biotechnology*, 33(6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>

- Regueiro, J. R. (2015). Cáncer e inmunidad. *Acta Científica y Tecnológica*, 22:27-32 .
- Rehfeld, A., Nylander, M., & Karnov, K. (2017). *Compendium of histology: a theoretical and practical guide*. Springer. ISBN 9783319418735
- Reyes, S. J., González, K. B., Rodríguez, C., Navarrete-Muñoz, C., Salazar, A. P., Villagra, A., Caglevic, C., & Hepp, M. I. (2020). Actualización general de inmunoterapia en cáncer. *Revista Médica de Chile*, 148(7), 970–982. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000700970>
- Rigel, D. S., Russak, J., & Friedman, R. (2010). The Evolution of Melanoma Diagnosis: 25 Years Beyond the ABCDs. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 60(5), 301–316. doi:10.3322/caac.20074
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2018). *Histology: a text and atlas with correlated cell and molecular biology* (8a edición). Lippincott Williams and Wilkins. ISBN 9781496383426
- Sang, M., Wang, L., Ding, C., Zhou, X., Wang, B., Wang, L., Lian, Y., & Shan, B. (2011). Melanoma-associated antigen genes – An update. *Cancer Letters*, 302(2), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2010.10.021>
- Sang, M., Lian, Y., Zhou, X., & Shan, B. (2011). MAGE-A family: Attractive targets for cancer immunotherapy. *Vaccine*, 29(47), 8496–8500. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.014>
- Sanz, J. M., Lahoz, A. M. G., & Silva, A. (2021). El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 13(33), 1932–1941. <https://doi.org/10.1016/j.med.2021.05.006>

- Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A. & Ugurel, S. (2018). Melanoma. *The Lancet*, 392(10151), 971–984. doi:10.1016/s0140-6736(18)31559-9
- Serrato, O. D., Nieto A. R., Aguilera M. A. (2015). Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. Ene-Abr; 64, 61–69.
- Shain, A. H., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16(6), 345–358. doi:10.1038/nrc.2016.37
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107–1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shapouri-Moghaddam, A, Mohammadian, S, Vazini (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiology*, 233: 6425– 6440. <https://doi.org/10.1002/jcp.26429>
- Sirisha, V.L. & D'Souza, J. (2016). Polysaccharide-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems: Principles and Applications. 10.1201/9781315372303-32.
- Smith-Garvin, J. E., Koretzky, G. A., & Jordan, M. S. (2009). T cell activation. *Annual review of immunology*, 27, 591–619. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>
- Speiser, D. E., Liénard, D., Rufer, N., Rubio-Godoy, V., Rimoldi, D., Lejeune, F., Krieg, A. M., Cerottini, J. C., & Romero, P. (2005). Rapid and strong human CD8⁺ T cell

- responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. *The Journal of clinical investigation*, 115(3), 739–746. <https://doi.org/10.1172/JCI23373>
- Tiberio, L., Del Prete, A., Schioppa, T., Sozio, F., Bosisio, D., & Sozzani, S. (2018). Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration. *Cellular & molecular immunology*, 15(4), 346–352. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0005-3>
 - Varadé, J., Magadán, S., & González-Fernández, Á. (2020). Human immunology and immunotherapy: main achievements and challenges. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(4), 805–828. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00530-6>
 - Vasquez, L., Castro, D., De León, J., & Beltrán, B. (2020). Inmunoterapia en cáncer: de los inicios al premio Nobel. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 37(1), 115–121. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2020.371.4329>
 - Velasco-Rodriguez, B., Diaz-Vidal, T., Rosales-Rivera, L. C., García-González, C. A., Alvarez-Lorenzo, C., Al-Modlej, A., Domínguez-Arca, V., Prieto, G., Barbosa, S., Soltero Martínez, J. F. A., & Taboada, P. (2021). Hybrid Methacrylated Gelatin and Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds. Preparation and Systematic Characterization for Prospective Tissue Engineering Applications. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6758. <https://doi.org/10.3390/ijms22136758>
 - Vigetti, D., Karousou, E., Viola, M., Deleonibus, S., De Luca, G., & Passi, A. (2014). Hyaluronan: Biosynthesis and signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(8), 2452–2459. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.001>
 - Villegas V. A., & Ramírez P.D. (2015). Las células Treg en la inmunomodulación e inflamación asociada al cáncer. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 58(6), 5–17. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002617422015000600005

- Weon, J. L., & Potts, P. R. (2015). The MAGE protein family and cancer. *Current opinion in cell biology*, 37, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.08.002>
- Worbs, T., Hammerschmidt, S. I., & Förster, R. (2017). Dendritic cell migration in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 17(1), 30–48. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.116>
- Wu, S., Deng, L., Hsia, H., Xu, K., He, Y., Huang, Q., Peng, Y., Zhou, Z., & Peng, C. (2017). Evaluation of gelatin-hyaluronic acid composite hydrogels for accelerating wound healing. *Journal of biomaterials applications*, 31(10), 1380–1390. <https://doi.org/10.1177/0885328217702526>
- Xiao, S., Zhao, T., Wang, J., Wang, C., Du, J., Ying, L., Lin, J., Zhang, C., Hu, W., Wang, L., & Xu, K. (2019). Gelatin Methacrylate (GelMA)-Based Hydrogels for Cell Transplantation: an Effective Strategy for Tissue Engineering. *Stem cell reviews and reports*, 15(5), 664–679. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09893-4>
- Ye, J., Yang, G., Zhang, J., Xiao, Z., He, L., Zhang, H., & Liu, Q. (2021). Preparation and characterization of gelatin-polysaccharide composite hydrogels for tissue engineering. *PeerJ*, 9, e11022. <https://doi.org/10.7717/peerj.11022>
- Yue, K., Trujillo de Santiago, G., Alvarez, M. M., Tamayol, A., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2015). Synthesis, properties, and biomedical applications of gelatin methacryloyl (GelMA) hydrogels. *Biomaterials*, 73, 254–271. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.045>
- Zamani, R., Aval, S. F., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Nejati-Koshki, K., & Zarghami, N. (2018). Recent Advances in Cell Electrospinning of Natural and Synthetic Nanofibers for

Regenerative Medicine. *Drug research*, 68(8), 425–435. <https://doi.org/10.1055/s-0043-125314>

- Zanna, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Mariatulqabtiah, A. R., Nur-Fazila, S. H., & Mahiza, M. I. N. (2021). Review of Dendritic Cells, Their Role in Clinical Immunology, and Distribution in Various Animal Species. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8044. <https://doi.org/10.3390/ijms22158044>
- Zhang F, He C, Cao L, Feng W, Wang H, Mo X, Wang J. (2011). Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. Apr 1;48(3):474-81.
- Zhu, Z., Wang, Y.-M., Yang, J., & Luo, X.-S. (2017). Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering. *Plastic and Aesthetic Research*, 4(12), 219. <https://doi.org/10.20517/2347-9264.2017.71>