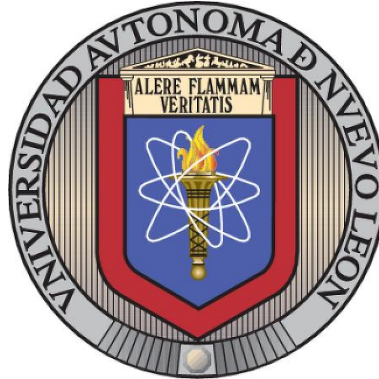


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMIA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE OLIGONUCLEOTIDOS CpG EN LA
PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16F10**

POR

MVZ. RAMIRO JOEL RODRIGUEZ GARCIA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO

DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

SEPTIEMBRE, 2017

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE OLIGONUCLEOTIDOS CpG EN LA
PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS EN CÉLULAS DE
MELANOMA MURINO B16F10**

Comité de Tesis



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila

Director



Dr. Pablo Zapata Benavides

Co-Director



Dra. Sibilina Cedillo Rosales

Co-Director



Dr. Juan José Zárate Ramos

Co-Director



Dr. Ramiro Ávalos Ramírez

Co-Director

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, la perseverancia y paciencia que ha puesto en mí, a sus enseñanzas que tarde he aprendido, pero con fe y devoción las sigo, mi fiel amigo.

A mis padres por el apoyo incondicional a mis decisiones, a su eterno amor que me acobija en las etapas difíciles de mi vida; nunca les pagare todo lo que hacen por mis hermanos y por mí, los amo mis viejos de oro.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico en mi investigación y por la beca.

Al Departamento de Genética y de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en especial a Brisa, Cynthia y Leslee por su apoyo moral, intelectual y técnico; así como al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Dra. Cristina Rodríguez por brindarme el apoyo total para la culminación de este proyecto.

Mi eterno amor y respeto a la Unidad de Biología Molecular del Cáncer del LIV... Chago, Kary, Dani, Ash, Fer, Mariela, Filip, Cecy, Jorge, Manuel, Moni, Genaro; por su apoyo incondicional y los buenos momentos que pasamos juntos, si les dedico palabras a cada uno, serán más que la tesis misma, saben que tienen en mí a un hermano y nunca los dejare.

Al Amigo, Maestro Y Doctor... Edgar Manilla, por sus enseñanzas, tiempo y amistad; alguien me dijo que el mejor amigo, al rodar de la vida y de los años se convierte en tu hermano, y sin duda tú lo eres.

A la Dra. Diana Zamora por su sincera amistad y enseñanzas en este largo camino de la investigación, siempre ha sido un ejemplo para mí en el ámbito profesional y personal, su calidez humana la distingue por donde ande, agradezco a Dios en ponerla en mi camino.

Al Dr. Pablo Zapata al abrirme las puertas de su laboratorio y familia, gracias por ser el ejemplo de hacer bien las cosas, por dejar verlo como una figura paterna, por apoyarme en los momentos difíciles de mi investigación y vida personal, estoy seguro que no volveré a encontrar otro líder y excelso investigador como usted, gracias de todo corazón.

Al Dr. Juan José Zarate Ramos por su amistad que ha perdurado en los momentos cumbres de nuestras vidas personales, por su apoyo económico en mi proyecto, por hablar siempre sinceramente y a los ojos, nuestra Facultad es otra.

DEDICATORIA

A ti Señor Dios, por no soltarme de tu mano

A mi familia, con eterno amor a mis padres Ramiro Joel Rodríguez Fernández y María Guadalupe Isabel García Salazar, quienes han hecho el hombre que soy.

A ellos, mis abuelos, se dice que tus primeros superhéroes son tus padres, pero como se dice en la ciencia “Antes que todo...”, ellos son a los primeros que queremos imitar y sobre todo ser a su semejanza...

Mis Abuelos Paternos

† Ramiro Rodríguez Ortega

† Flor de María Fernández Galindo

Mis Abuelos Maternos

† Melchor García Bocanegra

† María Salazar Villanueva

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Cáncer.....	2
2.2. Cáncer de piel	3
2.3. Cáncer Maligno	4
2.4. Factores de Riesgo.....	4
2.5. Diagnóstico.....	6
2.5.1. Diagnóstico clínico.....	6
2.5.2. Diagnóstico Histopatológico.....	7
2.6. Estadificación y pronóstico.....	8
2.7. Terapias convencionales contra cáncer	11
2.8. Terapias modernas.....	12
2.8.1. Inmunoterapia.....	13
2.8.2. Inmunoterapia pasiva.....	14
2.8.3. Inmunoterapia activa.....	15
2.8.3.1. Vacunas.....	16
2.9. Oligonucleótidos CpG.....	18
3. JUSTIFICACIÓN	20

4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general.....	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1. Cultivo celular	23
6.2. Oligonucleótidos CpG	23
6.3. Análisis de la expresión de TLR9 en la línea celular B16F10.....	23
6.3.1. RT-PCR.....	24
6.3.1.1. Electroforesis en gel de agarosa.....	25
6.3.2. Western blot.....	25
6.3.2.1. Extracción y cuantificación de proteínas totales.....	25
6.3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	25
6.3.2.3. Inmunotransferencia	26
6.3.2.4. Inmunodetección	26
6.4. Ensayo de proliferación celular (MTT)	27
6.5. Análisis de citocinas en sobrenadante de la línea celular B16F10 post-estimulación con CpG	27
6.6. Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS	28
7.1. Expresión de TLR9 en células B16F10.....	28
7.2. Efecto de los CpG en la proliferación de células B16F10.....	29
7.3. Efecto de los CpG en la producción de citocinas Th1/Th2/Th17.....	31
8. DISCUSIÓN.....	33
9. CONCLUSIONES.....	37
10. BIBLIOGRAFÍA.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Clasificación actual de la American Joint Committe on Cancer para el melanoma maligno	9
Tabla 2. Definición de los grupos de estadiaje del melanoma maligno cutáneo	10
Tabla 3. Rango de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma	11
Tabla 4. Monitoreo de respuesta inmune para ensayos clínicos	14
Tabla 5. Inmunoterapias anticancerígenas disponibles	16
Tabla 6. Ventajas adicionales de las vacunas de DNA contra las vacunas tradicionales	17
Tabla 7. Tipos de oligonucleótidos CpG con sus características estructurales y actividad inmunomoduladora.....	19
Tabla 8. Par de oligonucleótidos empleados para la amplificación de TLR9 y β -actina mediante RT-PCR.....	24
Tabla 9. Condiciones usadas para la amplificación de TLR9 y β -actina por RT-PCR	24
Tabla 10 . Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de células RAW264.7 estimuladas con CpG 1826 y controles	31
Tabla 11. Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de células B16F10 estimuladas con CpG 1826 y controles.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Regla ABCDE para la sospecha clínica de melanoma	7
Figura 2. Amplificación de TLR9 en células B16F10	28
Figura 3. Expresión basal de la proteína TLR9 en células B16F10.....	29
Figura 4. Proliferación de células B16F10 tratadas con los CpG 1826, 2395 y DSLO3	30
Figura 5. Fotografías representativas del efecto en la proliferación de células B16F10, tratadas con 0, 25 y 50 µg/ml del CpG1826, a 48h de incubación	30

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

APC.....	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
B16F10.....	Línea celular de melanoma murino
ODN CpG	Oligonucleótidos CpG
EMT	Transición Epitelio-Mesenquimal
ECM	Matriz extracelular
Th1	Linfocitos T helper 1
Th2	Linfocitos T helper 2
PEI.....	Polietiliminina
TLR-9	Receptor tipo Toll 9
WT1	Tumor de Wilms 1
x g	Fuerzas relativas gravitacionales
µg	Microgramos
µL.....	Microlitros
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
CSCs.....	Células Madre de Cáncer
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DTCs	Células Tumorales Diseminadas
H&E	Hematoxilina y Eosina
AA.....	Aminoácidos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
TBS-T	Buffer salino Tris- Tween
IFN	Interferón

mLMililitros

mMmilimolar

NK.....Células asesinas naturales

RESUMEN

Los avances *in vitro* e *in vivo* en el tratamiento contra cáncer, han llevado a descubrir nuevos agentes inmunoterapéuticos, como los oligonucleótidos CpG, que son secuencias sintéticas no metiladas que emulan el ADN bacteriano. En este trabajo, evaluamos *in vitro* el efecto de diferentes CpG en la proliferación y producción de citocinas Th1, Th2 y Th17 en células de melanoma murino B16F10. Para ello, primeramente analizamos el nivel de expresión basal del receptor tipo Toll 9 (TLR9) por RT-PCR y Western blot, posteriormente, se evaluó la proliferación celular mediante ensayo de MTT y se realizó la cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo celular, mediante citometría de flujo. En los resultados obtenidos, se observó una alta expresión de TLR9 a nivel de RNAm y proteína, lo que constituye el primer reporte científico de la expresión de TLR9 en células B16F10. Se observó que a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$, el CpG 1826 reduce en un 40% la proliferación celular, además este CpG fue capaz de inducir la secreción de altos niveles de IL-10, una citocina anti-inflamatoria. En conjunto, los resultados sugieren un rol biológico de TLR9 en la proliferación de células B16F10, proponiendo su uso como monoterapia dirigida directamente a la célula tumoral, prestando atención en sus propiedades inmunomoduladoras que podrían tener un efecto detrimental sobre el sistema inmunológico en el microambiente tumoral.

ABSTRACT

In vitro and *in vivo* advances in cancer treatment have led to the discovery of novel immunotherapeutic agents, such as the CpG oligonucleotides, which are unmethylated synthetic sequences that emulate bacterial DNA. In this work, we evaluated *in vitro* the effect of different CpG on the proliferation and production of Th1, Th2 and Th17 cytokines in B16F10 murine melanoma cells. In order to do this, we first analyzed the basal expression level of the Toll-like receptor 9 (TLR9) by RT-PCR and Western blot; subsequently, cell proliferation was evaluated by MTT assay and cytokine quantification was performed in cell culture supernatant, by flow cytometry. In the obtained results, a high expression of TLR9 at mRNA and protein level was observed, which constitutes the first scientific report of the expression of TLR9 in B16F10 cells. It was observed that a concentration of 50 µg / ml, CpG 1826 reduces cell proliferation by 40%, in addition this CpG is able to induce the secretion of high levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine .Overall, the results suggest a biological role of TLR9 in the proliferation of B16F10 cells, proposing its use as monotherapy directed directly to the tumor cell, paying attention to its immunomodulatory properties that could have a detrimental effect on the immune system in the tumor microenvironment.

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad que va en aumento en la población mundial, debido a diferentes factores que predisponen a su aparición en el organismo, como, por ejemplo; el humo del tabaco o la radiación solar, por nombrar algunos. Se ha encontrado que las mismas técnicas convencionales usadas para controlar el cáncer, por ejemplo, la radioterapia o quimioterapia predisponen al desarrollo de diferentes tipos de cáncer debido a la duración del tratamiento.

Es por esto que los avances *in vivo* e *in vitro* en la inmunoterapia, han destacado para que esta sea una alternativa convincente para el tratamiento del cáncer, estos avances han permitido crear compuestos como lo son los oligonucleótidos CpG que son secuencias sintéticas no metiladas que emulan al ADN bacteriano.

Estos oligonucleótidos CpG han demostrado que modulan tanto la inmunidad innata y adaptativa del organismo para contrarrestar las células cancerígenas debido a su efecto inmunoestimulante; principalmente en la producción de citocinas anti-inflamatorias como pro-inflamatorias, entre estas citosinas analizadas fueron IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF y IFN- γ .

En el presente estudio, se analizó los efectos que tienen los oligonucleótidos CpG en la proliferación y producción de citocinas en la línea celular melanoma murino B16F10, por su uso como terapia alternativa contra este tipo de cáncer.

2 ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer es una patología caracterizada por el crecimiento descontrolado de células con material genético dañado y por esto, no pueden ser dirigidas a apoptosis; pudiendo generarse una metástasis, ocurriendo, cuando las células cancerígenas entran al torrente sanguíneo y a los vasos linfáticos, invadiendo así otros tejidos; ocurriendo tanto en la especie humana como en animales domésticos y/o salvajes (Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011).

El proceso para que el cáncer se desarrolle, se denomina carcinogénesis, la cual consta de tres etapas: iniciación, promoción y progresión. En la primera ocurre siempre a nivel genómico, aquí pueden actuar agentes químicos, físicos y/o virales; tanto en tumores benignos como malignos. En la segunda etapa participan los factores de crecimiento favoreciendo la formación tumoral. En la última etapa participan todos estos factores, pero es exclusiva de tumores malignos, que implica la invasión a tejidos vecinos (metástasis) (Civetta and Civetta, 2011).

El cáncer puede desarrollarse por factores endógenos, como, herencia genética, factores inmunes, hormonales y/o nutritivos, al igual que por factores exógenos, como, cigarro, alcohol, luz UV, etcétera. Reportes recientes de la OMS (2015) en una nota descriptiva, mencionan que el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo y la principal de la categoría de Enfermedades No Transmisibles (OMS, 2015). Debido a su naturaleza multifactorial, aproximadamente el 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo:

- ❖ Índice de masa corporal elevado
- ❖ Ingesta reducida de frutas y verduras
- ❖ Falta de actividad física
- ❖ Consumo de tabaco
- ❖ Consumo de alcohol.

La habilidad del cáncer para que sea letal es el crecimiento metastásico, especialmente de las células tumorales diseminadas, pudiendo ocurrir a corto plazo o a largo plazo (años o

décadas), incluso después de un tratamiento exitoso; como la cirugía y/o tratamientos alternativos.

La cascada metastásica es muy compleja, ya que implica la diseminación de las células tumorales malignas del tumor primario a órganos secundarios. Iniciando en la creación de un nicho pre-metastásico en el lugar diana. Las células pertenecientes al tumor primario experimentan la Transición Epitelio-Mesenquimal (TEM), aunado a la degradación de las membranas basales y la remodelación de la matriz extracelular (MEC) por las proteinasas, adquieren propiedades invasivas; lo que facilita la transportación como células individuales o colectivamente en los vasos recién formados (angiogénesis), algunas células tumorales extravasadas pueden llegar a permanecer inactivas durante años. Así, finalmente, algunas células cancerígenas crecen en un tumor secundario, requiriendo remodelación de la matriz extracelular MEC y angiogénesis (Geiger and Peeper, 2009).

2.2 Cáncer de piel

Se sabe que el cáncer de piel o cutáneo es el más común y frecuente en el hombre, en algunos países tiene una alta frecuencia en la población. La probabilidad de que un individuo pueda desarrollar cáncer en la piel depende de factores genéticos, como ambientales (Gamerosa and Téllez, 2016).

Lo mismo ocurre con especies domésticas, en especial en los caninos; un ejemplo actual es que ciertas neoplasias de los caninos se establecen como fuertes modelos comparativos de neoplasias humanas, principalmente por sus características: espontáneas y de frecuencia (Dobson, 2013).

Solo en nuestro país, el cáncer de piel se encuentra entre los primeros tres lugares de frecuencia, según un informe emitido en el 2001 por el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas. En las mujeres representa el tercer tipo de neoplasia y para los hombres el primero (Secretaría de Salud, 2001).

El cáncer de piel está incluido en un nutrido grupo de neoplasias que tienen características muy diversas entre sí, en cuanto a su origen y a sus factores de riesgo y pronóstico, enmarcando dos grupos principales: el de Melanoma maligno y el cáncer cutáneo No

Melanoma, que abarca particularmente a los carcinomas Espinocelulares y Basocelulares (Martinez and Otley, 2001).

2.3 Cáncer Maligno

El melanoma es un tumor que se deriva en la proliferación de melanocitos atípicos, con o sin la capacidad de producir pigmento, tiene una gran capacidad metastásica; produciendo una neo-formación cutánea pigmentada, plana o exofítica, logrando ser curable durante la etapa inicial pero que sin tratamiento es de rápido avance, desarrollando así la metástasis a ganglios linfáticos y hematógenas que provocan un alta mortalidad (De la Fuente-García and Ocampo-Candiani, 2010).

2.4 Factores de Riesgo

La etiología del melanoma es muy compleja y variable, aun en época de avances tecnológicos y clínicos, se siguen buscando factores que estén asociados con su aparición y desarrollo; entre esos se encuentran factores ambientales, así como factores dependientes del huésped, como lo son los de tipo genéticos.

Los factores de riesgo encontrados en literaturas recientes (Gorantla and Kirkwood, 2014;Hernández and Nieweg, 2014;Rodríguez García, Hechavarría Miyares and Azze Pavón, 2001) destacan los siguientes asociados a melanoma:

- Tipo de piel:El melanoma afecta 20 veces más a la población caucásica que a la afroamericana. El alto riesgo de padecer melanoma en las diferentes coloraciones de piel es del 2% (1 en 50) para los caucásicos, del 0.1% (1 en 1,000) para los afroamericanos y del 0.5% (1 en 200) para la gente hispana.
- Edad:La edad promedio de incidencia en cualquier tipo de raza es de 61 años, pero no es anormal o infrecuente entre los menores de 30 años y singularmente en mujeres jóvenes. Los hombres tienen un mayor riesgo de padecerlo.

- Exposición a radiaciones ultravioletas: Es el factor predominante de tipo ambiental que conduce al melanoma. Las quemaduras solares (UV-B) se sospechan como causales. La exposición a rayos (UV-A) de camas de bronceado están implicados en el riesgo y la incidencia de melanoma especialmente entre mujeres menores de 35 años.
- Presencia de nevus: La formación de *nevus* atípicos y pecas y/o lunares atípicos, principalmente en la región del tronco.
- Antecedentes familiares y/o Genéticos: Los genes implicados en la génesis del melanoma son: CDKN2A, CDK4 (este gen tiene alta penetrancia y frecuentemente alterado en el melanoma familiar esto en la especie humana), MC1R (gen de mediana-baja penetrancia) y en igual o mayor importancia, los oncogenes que regulan la vía de señalización RAS/MAPK y que median la respuesta celular por la vía del factor de desarrollo (BRAF y NRAS).
- El *status* socioeconómico y el nivel de educación han sido catalogados como factores de riesgo.

Los tumores melanocíticos son relativamente comunes en los caninos, aunque no hay estudios en México, en Europa representa el 4% de los tumores cutáneos y representa uno de los más comunes causantes de malignidades orales en el canino. El melanoma ocurre frecuentemente en perros con una alta pigmentación en la piel, como ocurre en la raza Schnauzers (tanto miniatura como standard) y en los Scottish terriers (Dobson, 2013).

Hay pocos estudios enfocados en la predisposición genética del desarrollo del melanoma en modelos animales, a excepción de las mutaciones en MC1R. En la especie equina, por

ejemplo, se encontró una mutación intrónica de 4,6 kb en el gen STX17 (syntaxina-17) que se asocia con un fenotipo de despigmentación similar al vitíligo y susceptibilidad al melanoma(van der Weyden et al., 2016).

2.5 Diagnóstico

La primera instancia para el diagnóstico del melanoma, tanto en la población humana como en animales domésticos es por sospecha clínica, apoyándose con un estudio especializado en dermatología; pero el análisis de oro hasta nuestros días, tanto en medicina humana como en medicina veterinaria es la Histopatología. Por estas variadas herramientas, conviene dividir el diagnóstico en dos apartados: Diagnóstico clínico y Diagnóstico Histopatológico(Gallegos-Hernández, 2008).

2.5.1 Diagnóstico clínico

Un análisis visual del paciente puede definir el diagnóstico preciso y precoz de melanoma; determinando el número total de *nevus* y así detectando las características clínicas sugestivas de pre-malignidad y/o malignidad.

Como prueba o protocolo clásico, se emplea la regla denominada *ABCDE*, la cual describe las características clínicas de los melanomas, en las que están: Asimetría, Borde irregular, Coloración, Diámetro (mayor de 6 mm) y Elevación (Figura 1). Se ha comprobado que hay lesiones que miden menos de 6 mm, ser simétricas y con bordes regulares. Se encuentran casos con prurito, ulceración y sangrado; siendo estos signos de melanoma tardío (González and Flores, 2010)



Figura 1. Regla ABCDE para la sospecha clínica de melanoma

(González and Flores, 2010).

El plantear un diagnóstico diferencial se deberá identificar principalmente con nevus melanocíticos atípicos, y con la lesiones antes mencionadas que indican alto porcentaje de malignidad o premalignidad; se conoce que un diagnóstico diferencial se puede someter debido a presencia de lesiones como: lentigo actínico, nevus azul, queratosis seborreica, carcinoma basocelular pigmentado, angioqueratoma, hematoma, hemangioma, dermatofibroma y queratosis actínica pigmentada, estos diagnósticos se pueden corroborar con dermatoscopia (Grin et al., 1990).

2.5.2 Diagnóstico Histopatológico

Los estudios histopatológicos han sido la piedra angular en el estudio del melanoma maligno, gracias a este tipo de herramienta el melanoma es curable cuando se diagnostica tempranamente, el primer paso para la confirmación del melanoma es la biopsia de lesiones pigmentadas con características clínicas sospechosas; aunado también a la historia clínica familiar.

Los dos tipos de biopsias más recomendadas y/o utilizadas para el diagnóstico son: escisional e incisional(Hernández et al., 2005).

- **Escisional:** Se puede realizar en lesiones pequeñas cuya exéresis no requiera un procedimiento reconstructivo. No se requiere dar margen sano, usualmente 1 mm a 2 mm es suficiente, se debe incluir tejido subcutáneo. Se deberá tener cuidado en no producir alteraciones en el drenaje linfático, pensando en el procedimiento de ganglio centinela.
- **Incisional:** Se recomienda en caso de lesiones grandes (mayores de 2 cm), o localizadas en sitios donde su resección completa producirá secuelas cosméticas importantes, como, por ejemplo: la oreja o la cara. Se debe realizar en la zona de mayor grosor e incluir el subcutáneo.

Los ganglios linfáticos deben ser explorados y evaluados, ya que es el factor pronóstico más importante en los pacientes con melanoma y cualquier tipo de cáncer, entre el 15% y el 20% de los pacientes con melanoma desarrollan metástasis ganglionares, lo que presagia un pronóstico significativamente peor (Han et al., 2016).

2.6 Estadificación y pronóstico

En el 2002, se oficializa por el *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, el sistema TNM, esto con el fin de describir la extensión anatómica de distintas neoplasias. La letra T se refiere al espesor del tumor, la N al número de ganglios regionales cercanos que han sido afectados y la M a la presencia de metástasis a distancia.

Para melanoma, el sistema TNM se actualizó en el 2009 modificando y agregando estadios, se muestran en la Tabla 1(Lavanderos, Pérez and Jeria, 2010).

Tabla 1. Clasificación actual de la American Joint Committee on Cancer para el melanoma maligno(2009) (Lavanderos, Pérez and Jeria, 2010).

Clasificación T	Grosor micrométrico de Breslow	Ulceración
T0	Sin evidencia de tumor primario	Cualquiera
Tis	<i>In situ</i>	Cualquiera
T1	1.0 mm	a: sin ulceración y mitosis < a 1/mm ² b: con ulceración o mitosis igual o > a 1/mm ²
T2	1.01-2.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T3	2.01-4.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
T4	> 4.0 mm	a: sin ulceración b: con ulceración
Clasificación N	Nº de ganglios metastáticos	Tamaño de ganglio metastático
N1	1 ganglio	a: micrometástasis* b: macrometástasis**
N2	2-3 ganglios	a: micrometástasis* b: macrometástasis** c: metástasis satélites/en tránsito sin metástasis nodal
N3	4 o más ganglios, conglomerado de adenopatias o metástasis satélite/en tránsito con cualquier metástasis ganglionar	
Clasificación M	Localización	LDH sérica
M1a	Piel distante, subcutánea o metástasis nodal	Normal
M1b	Metástasis pulmonares	Normal
M1c	Todas las demás localizaciones Cualquier localización	Normal Elevada

*: micrometástasis: diagnosticadas mediante estudio histopatológico del LNC.

** : Macrometástasis: aquellas clínica o detectables por imagen, confirmadas mediante linfadenectomía terapéutica.

En la Tabla 2, se muestra la clasificación resumida por estadios clínicos y patológicos.

Tabla 2. Definición de los grupos de estadiaje del melanoma maligno cutáneo (Lavanderos, Pérez and Jeria, 2010).

Definición de los grupos de estadiaje del melanoma maligno cutáneo.							
Estadiaje clínico				Estadiaje patológico			
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0	IB	T1b T2a	N0 N0	M0 M0
IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0	IIA	T2b T3a	N0 N0	M0 M0
IIB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0	IIB	T3b T4a	N0 N0	M0 M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Cualquier T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a T1-4a	N1a N2a	M0 M0
				IIIB	T1-4b T1-4b T1-4a T1-4a T1-4a/b	N1a N2a N1b N2b N2c	M0 M0 M0 M0 M0
				IIIC	T1-4b T1-4b Tx	N1b N2b N3	M0 M0 M0
IV	Tx	Nx	M1	IV	Tx	Nx	M1

A continuación se muestran los porcentajes de supervivencia a 5 años con su estadio y presencia o no de ulceraciones (Tabla 3) (Casanova Seuma, Martí Laborda and Baradad Brusau, 2005).

Tabla 3. Rango de supervivencia a 5 años para pacientes con melanoma

(Casanova Seuma, Martí Laborda and Baradad Brusau, 2005).

Estadio	Tumor no ulcerado	Tumor ulcerado
IA	95%	91%
IB	95%	91%
IIA	-	80%
IIB	-	65%
IIC	-	45%
IIIA	65%	70%
IIIB	45%	53%
IIIC	25%	30%

En el estadio IV, se ha categorizado debido a la presencia de metástasis a distancia y al sitio de afectación; en los cuales están: M1a (que afecta a zonas cutáneas, subcutáneas y/o linfáticas), M1b (afectando a pulmones), M1c (si afecta a vísceras o se detecta una elevación de las LDH). En el caso de los rangos de supervivencia a 1 año, existe una pequeña diferencia en cuanto a estas categorías; para M1a es del 59,3%, en M1b es del 57% y para M1c es del 40,6% (Casanova Seuma, Martí Laborda and Baradad Brusau, 2005).

2.7 Terapias convencionales contra cáncer

Existen diferentes tipos de tratamiento contra los muchos y diversos tipos de cáncer, la cirugía en etapas tempranas es, sin duda, la terapia más efectiva y utilizada para el manejo del melanoma maligno; en este tipo de tratamiento se extrae el tumor o cáncer como tejido adyacente. Desafortunadamente la mayoría de los casos que llegan hacer diagnosticados

son en etapas avanzadas, es por esto que se ha encaminado a la búsqueda y desarrollo de nuevas terapias (Leong et al., 2012).

Un método convencional muy utilizado es la radioterapia, el cual se utilizan ondas de alta energía para matar células cancerígenas y así, prevenir su crecimiento. Pero no es útil cuando el tumor genera metástasis a otros órganos. La desventaja de esta terapia es que no es específica para las células cancerosas, ya que también daña a células sanas, aunado que se ha demostrado en estudios *in vivo* que activa vías oncogénicas como en glioblastoma (Falk et al., 2014).

Otra de las terapias convencionales es la quimioterapia, consiste principalmente en la utilización de fármacos que provocan la muerte de las células cancerosas. Y tiene la misma desventaja que la radioterapia que es la afectación por igual de células normales o sanas, lo que genera o contribuye a una toxicidad. La característica de los pacientes es que se ven afectadas las células que se encuentran en replicación rápida, como es el caso de las células de médula ósea, de la pared del intestino y folículos pilosos (DeVita and Chu, 2008).

Recientemente se han logrado avances importantes en la invención de tratamientos contra melanoma como es el caso de la aprobación del antígeno del linfocito T citotóxico (CTLA-4) que bloquea el anticuerpo monoclonal (ipilimumab) y el inhibidor de la quinasa BRAF^{V600E} (vemurafenib) por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés). Estos fármacos con los ya aprobados como lo es la dacarbazina (1975), Interferón-alfa (1995) y la interleucina-2 (1998); no han demostrado un beneficio global de supervivencia a corto plazo, teniendo un papel claro para la paliación de los pacientes con melanoma (Luke and Schwartz, 2013).

2.8 Terapias modernas

Por la ineficacia y desventajas de las terapias convencionales, surgen nuevas vías de desarrollo para nuevas terapias, que aun en día estando en investigación y prueba, han dilucidado nuevas formas de eliminar a las células cancerosas.

Es por esto que nacen las terapias biológicas, caracterizadas por el uso de organismos vivos, sustancias procedentes de organismos vivos o versiones producidas en el

laboratorio de tales sustancias para tratar enfermedades. Algunas terapias biológicas para el cáncer usan vacunas o bacterias para estimular el sistema inmunitario del cuerpo para que actúe contra las células cancerosas. Estos tipos de terapia biológica, los cuales algunas veces se llaman colectivamente "inmunoterapia", no se apuntan directamente a las células cancerosas(NCI, 2013).

2.8.1 Inmunoterapia

Los avances y la necesidad de crear tratamientos con una especificidad alta, conllevaron al surgimiento de la inmunoterapia, con el objetivo de utilizar la especificidad y naturaleza del sistema inmune. Esta terapia fue ignorada hasta la década de 1950, cuando la teoría original de la vigilancia inmunológica de Burnet y Thomas fue reforzada por el hallazgo de que los ratones cruzados de la misma cepa rechazaban los tumores tras la estimulación secundaria y podían ser vacunados. Esto sugirió que el sistema inmunológico podría reconocer tumores específicos de antígenos y adquirir inmunidad anti-tumoral (Rangwala and Tsai, 2011).

La inmunoterapia tiene como objetivo que el sistema inmune monte una respuesta endógena natural contra células extrañas, especialmente a células altamente inmunogénicas del cáncer, a través de una serie compleja de pasos. Estos pasos consisten en la presentación de antígenos de cáncer a las células T esto a través de células presentadoras de antígeno (APC), el cebado y activación de linfocitos T en los ganglios linfáticos, la movilización e infiltración de células T en los lechos tumorales, después el reconocimiento de células cancerosas por células T, creación de células T efectoras y un sequito de células inmunitarias endógenas y anticuerpos para actuar de manera conjunta y eliminar a las células cancerosas (Sukari et al., 2016).

Es importante realizar un monitoreo inmunológico para evaluar la efectividad de la inmunoterapia. Berzofsky y colaboradores, describen diversos métodos para la determinación, tanto de la frecuencia y funcionamiento de las células T específicas de antígeno. Los linfocitos CD8+ pueden ser detectados mediante péptidos que se unan a multímeros MHC, por citocinas en ensayos de inmunospot o mediante la tinción de citocinas intracelulares y citometría de flujo (Berzofsky et al., 2004).

Tabla 4. Monitoreo de respuesta inmune para ensayos clínicos

(Berzofsky et al., 2004).

Assay	Advantages	Disadvantages	Sensitivity
Proliferation	Technically simple	Unable to enumerate specific cells; measures predominantly CD4, not CD8, T cells	
Tetramer staining	Quantitative cell number; subset analysis possible	Requires synthesis of specific tetramers; not a measure of functional activity; limited to single epitopes	1:10 ⁴
Cytokine flow cytometry	Quantitative cell number; functional assay; subset analysis possible	Requires incubation; unable to obtain live cells after assay; technically complicated	1:5 × 10 ⁴
ELISA	Functional assay	No phenotypic information on responding cells; unable to enumerate specific cells; bystander activation	
ELISPOT	Quantitative cell number; functional assay	No phenotypic information on responding cells; bystander activation	1:10 ⁵
Cytotoxicity	Functional assay; relative cell quantitation	Requires autologous tumor/targets; in vitro stimulations required; unable to enumerate specific cells	
RT-PCR	Universal reagents; indirect measure of function	Measures mRNA, not protein; unable to enumerate specific cells; requires several steps (time consuming)	1:10 ⁵
Limiting dilution	Quantitative cell number; functional assay	Labor intensive; requires multiple stimulations; detects only cells that can proliferate	1:10 ⁵

Por el gran bloque de investigación que es la inmunoterapia, se divide en inmunoterapia pasiva e inmunoterapia activa.

2.8.2 Inmunoterapia pasiva

Se basa en la activación y proliferación de células T específicas fuera del cuerpo, para después, una vez que se ha obtenido la cantidad suficiente, regresarlas al paciente en forma de transfusión. Estos linfocitos T suelen proceder de donadores, pero en ocasiones se activan y multiplican ex vivo las células del mismo paciente, para luego realizar una autotransfusión (De La Peña and Madrigal, 2006).

En 1982, Miller y colaboradores utilizaron un anticuerpo monoclonal anti-idiotípico que lograba inducir remisión en pacientes con linfoma de células B, logrando así, la primera aplicación efectiva de anticuerpos monoclonales contra una malignidad humana como terapia (Miller et al., 1982).

Actualmente, la inmunoterapia pasiva se basa en la utilización de anticuerpos que establecen el vínculo entre los antígenos asociados a tumores (AAT) y el sistema inmunológico innato, proporcionando una inmunoglobulina (Ig) de antígeno-específica tumoral, cuya región Fc interacciona con el sistema inmune del huésped. Se conoce que

los efectos biológicos de los anticuerpos que se administran pasivamente son múltiples, incluyendo la aglutinación, la neutralización de las proteínas de señalización o el bloqueo de los sitios de unión a los receptores (Schuster, Nechansky and Kircheis, 2006).

2.8.3 Inmunoterapia activa

En este tipo de inmunoterapia, el huésped o paciente es estimulado para que genere una respuesta inmune debido a agentes exógenos a él, que, directa o indirectamente logren aniquilar a las células cancerosas. Las bacterias o componentes de estas, fueron los primeros agentes exógenos que se utilizaron para la estimulación no específica, como lo demostró el Dr. William Coley que, en la década de 1890, observó que las infecciones bacterianas potencialmente fatales podrían inducir una respuesta antitumoral eficaz en los pacientes con tumores parcialmente resecaados(Chodon, Koya and Odunsi, 2015).

Para que un tipo de cáncer se destruido inmunológicamente, tenemos los siguientes criterios:

- ❖ Generación de un número suficiente de células T efectoras.
- ❖ Movilización e infiltración hacia el tumor.
- ❖ Evasión de las redes inhibitorias en microambiente tumoral.
- ❖ Persistencias de las células T antitumorales.

Chodon, Koya y Odunsi, en el 2015, conjuntan las inmunoterapias anticancerígenas aprobadas que han obtenido aprobación regulatoria.

Tabla 5. Inmunoterapias anticancerígenas disponibles

(Chodon, Koya and Odunsi, 2015).

Approach	Licensed
Tumor targeting antibodies	Yes
DC vaccination	Yes
Peptide vaccines	No
Immunostimulatory cytokines	Yes
Immunomodulatory antibodies	Yes
Oncolytic virotherapy	Yes
TLR agonists	Yes
DNA and recombinant viral vaccines	No
Inhibitors of IDO, arginase	No
Adoptive cell therapy	No

Las vacunas de DNA han tenido auge en los últimos años, debido a su función activadora del sistema inmune contra el crecimiento y movilización de las células cancerígenas.

2.8.3.1 Vacunas

Los avances más recientes de la ciencia respecto al tratamiento del cáncer son las vacunas de DNA, estas son comúnmente administradas después de la aparición del tumor, logrando estimular la respuesta específica de células T, este tipo de vacuna utiliza las células completas atenuadas, paredes celulares o antígenos específicos de tumor logrando así que el paciente se proteja contra la enfermedad. En la Tabla 6, se muestran las ventajas de este tipo de vacuna contra las convencionales.(Mota-Sánchez, 2009).

Tabla 6. Ventajas adicionales de las vacunas de DNA contra las vacunas tradicionales (Mota-Sánchez, 2009).

Categorías	Ventajas
<u>Seguridad</u>	No utilizan microorganismos vivos
<u>Inmunidad</u>	Inducen tanto una respuesta inmunitaria celular como humoral
<u>Diseño</u>	Modificación de los antígenos codificados en los plásmidos
<u>Producción</u>	Menor costo al producirse a gran escala
<u>Estabilidad</u>	Vida media mayor, debido a que se puede prescindir de la cadena en frío

En el caso de melanoma, las vacunas aunque todavía se encuentran en fase experimental, han demostrado que pueden ser la estrategia inmunoterapéutica más efectiva debido al aumento de la supervivencia media en los pacientes (de 6-9 meses hasta los 23 meses), sin efectos tóxicos notables o secundarios. Hay varias vacunas que han demostrado esta mayor efectividad: Melacine, Canvaxin, GMK, M-Vax y la vacuna polivalente de antígenos parcialmente purificados de Bystryn, que actualmente se encuentran en ensayo clínico fase III (Torrella and Noris-García, 2004).

Aunado a estas ventajas y al aumento de supervivencia, ahí diferentes tipos de adyuvantes que son utilizados en este tipo de vacuna, y han sido identificados como potencialmente inmunoestimuladores, como es el caso de los oligonucleótidos CpG, que son reconocidos por el sistema inmune innato (Franco, 2016).

2.9 Oligonucleótidos CpG

En la década de los 90's, Weiner y colaboradores, señalan que el ADN bacteriano logra inducir la activación de células B, monocitos y células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés); y mencionan, que de igual forma el ADN bacteriano puede inducir la

producción tanto *in vitro* como *in vivo* de una variedad de citocinas pro-inflamatorias (Weiner et al., 1997).

Lo anterior mencionado se debe a que el ADN bacteriano contiene en su estructura, en un alta frecuencia, una serie de oligonucleótidos (ODN, por sus siglas en inglés) que, a su vez, contienen motivos CpG no metilados (CpG ODN) que inducen a los macrófagos a secretar IL-12, y a la par induce la secreción de interferón (IFN) $-\gamma$ por las células asesinas naturales (NK). Para la elección de los componentes que tienen efectos inmunoestimuladores del ADN bacteriano, se utiliza un panel de ODN sintéticos y así identificar secuencias específicas de 6 bases que proporcionan la actividad. Las secuencias comparten un motivo CpG no metilado que se encuentra flanqueado por dos purinas y 2 pirimidinas. Si eliminamos los dinucleótidos CpG u ocurre la metilación del dinucleótido se anulara la actividad inmunoestimuladora (Chu et al., 1997).

Los ODN CpG son absorbidos por las células a través de endocitosis absorbente y se une al TLR9 (receptor específico) presente dentro de los endolisosomas en el compartimento intracelular de células B y células dendríticas plasmacitoides (Taye and Tekewe, 2012).

En la Tabla 7, se muestran las diferencias en los oligonucleótidos CpG según su estructura (Klinman, 2004).

Tabla 7. Tipos de oligonucleótidos CpG con sus características estructurales y actividad inmunomoduladora (Klinman, 2004).

ODN type	Example	Structural characteristics	Immunomodulatory activity
D (also known as CpG-A)	GGTGCATCGATGCAGGGGGG	Mixed phosphodiester (italics)/phosphorothioate backbone Single CpG motif (blue) CpG flanking region forms a palindrome (red) Poly-G tail at 3' end (green)	APC maturation, mediated by IFN- α Preferentially stimulates pDCs to secrete IFN- α
K (also known as CpG-B)	TCCATGGACGTTCTGAGCGTT	Phosphorothioate backbone Multiple CpG motifs (blue) 5' motif most stimulatory	pDC maturation and production of TNF Triggers B-cell proliferation, and IgM and IL-6 production
C	TCGTCGTTCGAACGACGTTGAT	Phosphorothioate backbone Multiple CpG motifs (blue) TCG dimer at 5' end (purple) CpG motif imbedded in a central palindrome	Stimulates B cells to produce IgM and IL-6 Activates pDCs to secrete IFN- α

APC, antigen-presenting cell; IFN- α ; interferon- α ; IL-6, interleukin-6; ODN, oligodeoxynucleotide; pDC, plasmacytoid dendritic cell; TNF, tumour-necrosis factor.

3 JUSTIFICACIÓN

Los avances *in vitro* e *in vivo* en inmunoterapia, han llevado a descubrir nuevos factores y/o adyuvantes para potencializar las funciones del sistema inmune, como el caso de los ODN CpG.

Por ende, estudiar el efecto que tienen los oligonucleótidos CpG sobre la célula tumoral, particularmente en la proliferación y producción de citocinas, constituye un aspecto muy relevante que ayudará a comprender la modulación del microambiente tumoral por este tipo de inmunoterapia.

4 HIPÓTESIS

Los oligonucleótidos CpG afectan la proliferación y la producción de citocinas en la línea de melanoma murino B16F10.

5 OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto del tratamiento con oligonucleótidos CpG en la proliferación y producción de citocinas en células tumorales B16F10.

Objetivos Particulares

1. Determinar la expresión basal del receptor tipo Toll 9 (TLR9) en la línea celular de melanoma murino B16F10.
2. Analizar el efecto de oligonucleótidos CpG (ODN CpG) sobre la proliferación de células B16F10.
3. Cuantificar el nivel de citocinas pro inflamatorias (IL-2, IL-6, TNF- α , INF- γ e IL-17) y anti inflamatorias (IL-4 e IL-10) en sobrenadantes de células B16F10 control y tratadas con ODN CpG.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares murinas B16F10 (melanoma) y RAW264.7 (macrófagos), las cuales fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). La línea celular de melanoma fue mantenida en medio cultivo de Dulbecco's modificado de Eagle (DMEMF-12; Life Technologies, Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá) y las células RAW264.7 en medio RPMI1640, ambos suplementados al 10% con suero fetal bovino (FBS; Gibco, Grand Island, NY), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml estreptomicina. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo a 37°C en una atmósfera húmeda a 95% de O₂ y con 5% de CO₂.

6.2 Oligonucleótidos CpG

Los oligos CpG fueron sintetizados por la compañía Alpha DNA, como un liofilizado libre de endotoxinas purificado mediante HPLC, correspondientes a las siguientes secuencias: ODN 1826 clase B (5'-tccatgacgttctctgacgtt-3'), ODN DSL03 clase C (5'-tcgcaacgttcgccgcgttcgaacgcgg-3'), ODN 2395 clase C (5'-tcgtcgttttcggcgc:gcgccg-3'); todos estos con enlace fosforotioato y la región subrayada corresponde a la región palindrómica. Estos se resuspendieron en agua miliQ estéril hasta alcanzar una concentración de 100 µM y se realizaron alícuotas de 30 µl las cuales se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso.

6.3 Análisis de la expresión de TLR9 en la línea celular B16F10

El análisis de expresión se realizó a nivel de transcrito mediante RT-PCR y a nivel de proteína por Western blot. Como control positivo de expresión de TLR9 se empleó la línea celular de macrófagos murinos RAW264.7.

6.3.1 RT-PCR

Se extrajo el ARN total de células B16F10 y RAW264.7 en cultivo, mediante el método de Trizol, posteriormente se cuantificó el ARN y se realizó la reacción de transcripción reversa, una vez que se obtuvieron los ADNc, se llevó a cabo la PCR, las reacciones se realizaron utilizando 5µL de ADNc de cada una de las muestras, 5µL de buffer 5 X (10nM de Tris-HCl, 50nM de KCl a pH final de 8.4), 0.5µL de dNTP's (10mM), 0.5µL de cada oligonucleótido (100ng/µL de sentido y 100ng/µL de antisentido), 1.5µL de MgCl₂ (25mM), 0.2 unidades de Taq polimerasa y aforando a un volumen total de 25µL por reacción.

Las secuencias de primers utilizados para la reacción de PCR se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Par de oligonucleótidos empleados para la amplificación de TLR9 y β-actina mediante RT-PCR.

GEN	SENTIDO	ANTISENTIDO
TLR9	5'-CTCTCTCCATACACTGAACTC-3'	3'-GAGGCAGATGATGCAGAGCA-5'
β-actina	5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'	3'-GTCCTTAATGTACACGCACGATTTC-5'

Las condiciones de temperatura empleadas para la reacción de PCR se presentan a continuación (Tabla 9):

Tabla 9. Condiciones usadas para la amplificación de TLR9 y β-actina por RT-PCR

<i>Gen</i>	<i>Desnaturalización</i>	<i>Alineamiento</i>	<i>Extensión</i>	<i># ciclos</i>	<i>Producto esperado (pb)</i>
TLR9	96 °C/1min	54 °C/1min	72 °C/1min	30	456
β-actina	94 °C/40seg	52 °C/1min	72 °C/40seg	30	541

6.3.1.1 Electroforesis en gel de agarosa

Para el corrimiento y visualización de los productos de PCR de los genes estudiados, se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer SB. El corrimiento electroforético fue realizado a 100V por 30min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, analizados en un transiluminador bajo luz UV y foto-documentados.

6.3.2 Western blot

6.3.2.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales

Se recolectaron células B16F10 y RAW264.7 en tubos eppendorf, luego se centrifugaron y lavaron con PBS 1X. El paquete celular fue resuspendido en buffer de lisis (Tritón 1%, NaCl 150mM, Tris 25mM pH 7.6) e incubado en hielo por 30min. Transcurrido ese tiempo se centrifugó por 5 min a 10,000rpm y el sobrenadante conteniendo las proteínas se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, debidamente etiquetado. Posteriormente, las proteínas obtenidas fueron cuantificadas con el kit DC Protein Assay (BIO-RAD, Hercules, CA, USA). Donde se añaden 20 µl del reactivo S por cada ml de reactivo A que será necesario; se hizo una dilución 1:5 de las muestras y se pipetearon 5 µl a cada pozo, se añadieron 25 µl del reactivo A' y 200 µl del reactivo B, después de 15 minutos se leyó la absorbancia a 595nm.

6.3.2.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se corrieron 50µg de proteínas, más la cantidad necesaria de buffer de Laemli 5X, en un gel de poliacrilamida al 10%. El corrimiento se efectuó en una cámara de electroforesis con buffer de corrida (Tris Base 25 mM, glicina 250 mM pH 8.3 y SDS al 1%) durante 20 min a 40V y después a 100 V, durante 1 hora y media.

6.3.2.3 Inmunotransferencia

Se formó un “sándwich” de la siguiente forma: una esponja, papel filtro, el gel de poliacrilamida, una membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja, esto en la cámara húmeda de transferencia en buffer de transferencia (Buffer Tris-Gly 10X: 30 g Tris Base, 114 g de glicina. Buffer de transferencia 1X: 100 ml de buffer Tris-Gly 10X, 200 ml de metanol y 700 ml de agua miliQ), a 26V durante toda la noche en cuarto frío.

6.3.2.4 Inmunodetección

Primeramente se bloqueó la membrana con una solución al 5 % de leche descremada en TBS 1X con Tween al 0.5%, durante 1 hora. Posterior a esto, se retiró la solución de bloqueo y se agregó un anticuerpo monoclonal contra TLR-9 a una dilución 1:500 y un anticuerpo contra β -actina a una dilución 1:20000 durante toda la noche en un cuarto frío. Después de la incubación con estos anticuerpos primarios, se efectuaron tres lavados con TBS-T 1X por 10 minutos cada uno. Se añadió el anticuerpo secundario, un monoclonal anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano en una dilución 1:5000 durante 1 hora y media, seguido de tres lavados como ya se mencionó. Por último, se añadió 1.5 ml de quimioluminiscencia como sustrato y se reveló con un film en cuarto oscuro, con 1 minuto de exposición. La señal se analizó en el software de densitometría ImageJ2x.

6.4 Ensayo de proliferación celular (MTT)

El efecto sobre la viabilidad y proliferación celular del tratamiento con los CpG fue evaluado a las 48 horas mediante un ensayo de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol]. El MTT se preparó al 0.5% p/v en PBS 1X, a una concentración final de 5 µg/ml en PBS 1X. Posteriormente se adicionaron a cada pozo 20 µl del MTT y se incubó la placa a 37 °C por 1 hora. Entonces el medio fue retirado, cuidando de no remover las sales de formazán formadas y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pozo, hasta disolver muy bien las sales. Por último, se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 570 nm, en un lector de placas de ELISA. Los resultados fueron graficados como el promedio de las 4 lecturas hechas más la respectiva desviación estándar.

6.5 Análisis de citocinas en sobrenadante de la línea celular B16F10 post-estimulación con CpG.

La medición de citocinas se realizó por citometría de flujo usando el kit comercial BD Cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 kit (catálogo no. 560485, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Accuri C6 (BD Biosciences, San José, CA, USA) y el análisis de datos se hizo en el programa CFlow plus, proporcionado por la misma compañía. La concentración individual de cada citocina se estimó a partir de la intensidad media de fluorescencia para cada muestra.

6.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS Statistics, version 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7 RESULTADOS

7.1 Expresión de TLR9 en células B16F10

Como primer paso, previo a la evaluación de la actividad biológica de los CpG, se determinó la expresión basal del receptor TLR9 en células de melanoma murino B16F10, a nivel de RNAm y proteína, mediante RT-PCR y Western blot, respectivamente. La visualización del producto de PCR en gel de agarosa mostró una banda de 456pb, correspondiente al tamaño esperado del producto amplificado, tanto para células B16F10, como para RAW264.7, que fueron utilizadas como control positivo de la expresión de TLR9 (Figura 2).

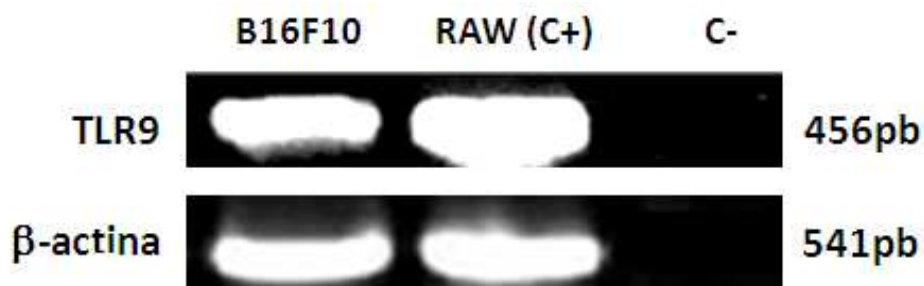


Figura 2. Amplificación de TLR9 en células B16F10. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Como control positivo de expresión de TLR9 se utilizaron células RAW264.7. Como control endógeno se utilizó β-actina.

Posteriormente se determinó la expresión de la proteína de TLR9, observando una banda de 160kDa, correspondiente al peso molecular reportado en la literatura (Figura 3).



Figura 3. Expresión basal de la proteína TLR9 en células B16F10. La detección fue realizada por Western blot, usando un anticuerpo anti-TLR9 monoclonal. La línea celular RAW264.7 fue usada como control positivo de la expresión de TLR9. Como control endógeno fue detectada la proteína β -actina.

7.2 Efecto de los CpG en la proliferación de células B16F10

Una vez corroborada la expresión de TLR9 en células B16F10, se procedió a evaluar el efecto sobre la proliferación celular del tratamiento con los CpG 1826 (clase B), CpG 2395 (clase C) y DSLO3 (clase C), a 48h de incubación. Para los 3 tratamientos se observó una inhibición parcial de la proliferación celular, la cual fue mayor para el tratamiento con el CpG 1826, donde se alcanzó una inhibición del 40%, a una dosis de 50 μ g/ml (Figuras 4 y 5), mientras que a concentraciones superiores no se incrementó el efecto inhibitorio. Asimismo se realizó el tratamiento de las células con una secuencia control No-CpG, con la cual se obtuvo una inhibición máxima del 40% a 50 μ g/ml, similar al resultado obtenido para el CpG-1826. No se observaron alteraciones morfológicas ni destrucción celular en ninguno de los tratamientos.

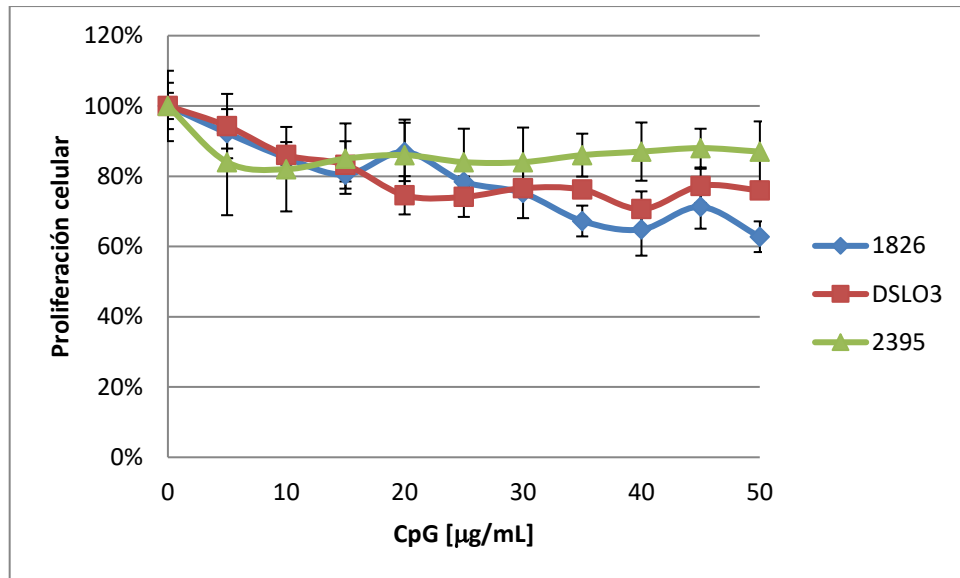


Figura 4. Proliferación de células B16F10 tratadas con los CpG 1826, 2395 y DSLO3. Cada dosis fue probada por cuadruplicado, el porcentaje representa el promedio \pm la desviación estándar.

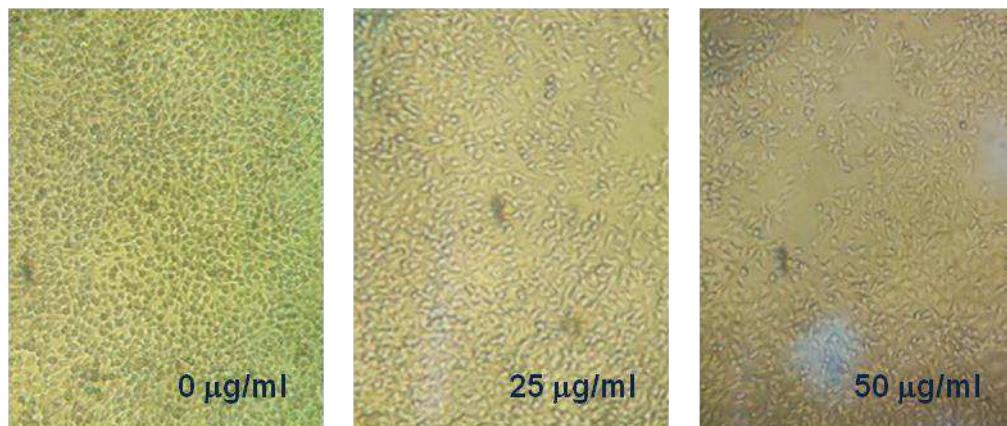


Figura 5. Fotografías representativas del efecto en la proliferación de células B16F10, tratadas con 0, 25 y 50 µg/ml del CpG1826, a 48h de incubación.

7.3 Efecto de los CpG en la producción de citocinas Th1/Th2/Th17

Para determinar la capacidad del CpG1826 para modular la producción de citocinas Th1/Th2/Th17, se trataron células B16F10 con dosis de 3 y 30 µg/ml y a las 48h se obtuvieron los sobrenadantes del cultivo. Como control fueron estimuladas RAW264.7. Los resultados obtenidos en células RAW264.7, muestran que el CpG1826 indujo la secreción de 4.33 y 3.48 pg/ml de IL-10, en células estimuladas con 3 y 30 µg/ml, respectivamente, con un aumento significativo en la producción de TNF- α , donde se cuantificaron 1161.03 pg/ml en sobrenadante de células sin estimular, con una producción de 4512.57 y 5516.46 pg/ml, para células estimuladas con 3 y 30 µg/ml, respectivamente. Para el resto de las citocinas analizadas no se observó ninguna modulación. Interesantemente el tratamiento con la secuencia random sin CpG también indujo un aumento significativo de TNF- α (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de células RAW264.7 estimuladas con CpG 1826 y controles.

Tratamiento	Concentración de citocinas (pg/ml)						
	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF- α	IFN- γ
Medio de cultivo	0.93	0	0	0	0	0	0
RAW264.7 sin trat.	1.11	0	0	0	0	1161.03	0
CpG 3µg/ml	1.39	0	0	4.33	0	4512.87	0
CpG 30µg/ml	1.43	0	0	3.48	0	5516.46	0
Random 30µg/ml	1.39	0	0	0	0.23	2285.54	0

En el caso de las células B16F10, los resultados indican un incremento en la concentración de IL-10 con respecto al grupo control (23.64 pg/ml), para las células estimuladas con 3 y 30 µg/ml del CpG 1826, así como para la secuencia No CpG, donde se cuantificaron 32.04, 50.98 y 64.4 pg/ml, respectivamente. Para la citocina TNF-α se indujo la secreción de 15.64 pg/ml con el tratamiento de 3 µg/ml de CpG 1826, así como con la secuencia random, donde se cuantificaron 8.3 pg/ml de TNF-α. Para el resto de las citocinas la modulación observada no fue significativa (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración de citocinas Th1/Th2/Th17 en sobrenadantes de células B16F10 estimuladas con CpG 1826 y controles.

Concentración de citocinas (pg/ml)							
Tratamiento	IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	IL-17	TNF-α	IFN-γ
Medio de cultivo	0.93	0	0	0	0	0	0
B16F10 sin trat.	1.98	0.91	12.13	23.64	0.06	0	0
CpG 3µg/ml	2.45	2.51	10.48	32.04	0.46	15.64	0.41
CpG 30µg/ml	1.3	0	8.04	50.98	0	0	0
Random 30µg/ml	1.94	0.38	9.44	64.4	0.15	8.3	0

8 DISCUSIÓN

El cáncer representa un serio problema de salud pública, la Organización Mundial de la Salud estima que para el año 2030, habrá en el mundo 26 millones de nuevos casos y 17 millones de muertes por año (Boyle and Levin, 2008). Las modalidades actuales de tratamiento, incluyendo la radio y la quimioterapia, aunque en algunos casos muestran efectividad en la clínica, no tienen un impacto significativo en la sobrevivencia y debido a su inespecificidad, resultan muy tóxicas para los pacientes. Aunado a ello, muchos tumores, incluyendo melanoma, poseen una resistencia intrínseca a estas terapias convencionales.

Desde los inicios de este siglo se ha reforzado la evidencia que indica una conexión directa entre inflamación crónica y cáncer. Así, se ha documentado el papel de los Receptores tipo Toll (TLRs), incluyendo el TLR9, en el desarrollo de tumores. De hecho se ha encontrado una fuerte asociación entre la sobreexpresión de TLRs y el desarrollo de tumores de estómago, pulmón, intestino, entre otros (Coussens and Werb, 2002). En melanoma, se ha reportado la expresión de TLR2, TLR3 y TLR4 (McCall et al., 2012).

En general, se ha observado que la activación de TLRs en células tumorales, además de promover una inflamación crónica, estimula la proliferación, migración y angiogénesis tumoral, y crea un microambiente que afecta negativamente la función del sistema inmune, lo que permite a los tumores desarrollarse y sobrevivir (McCall et al., 2012).

El efecto de la estimulación del TLRs ha sido estudiado en diversas líneas celulares, por ejemplo Kundu et al. demostraron que células epiteliales de próstata inmortalizadas que expresaban TLR4 y TLR9, exhibían una mayor proliferación al cultivarse en presencia de LPS y CpG, sus respectivos ligandos; además observaron que las células estimuladas eran menos susceptibles a la apoptosis inducida por TNF- α , a pesar de usar altas concentraciones de LPS (Kundu et al., 2008)

Se sabe que la señalización por TLRs participa en la activación de factores de transcripción que son importantes en la tumorigénesis, siendo los principales STAT3 y

NF- κ B. La activación de NF- κ B resulta en un aumento en la expresión de varios genes y citocinas, que se asocian con crecimiento celular y proliferación, incluyendo genes críticos para la progresión del ciclo celular y genes antiapoptóticos, incluyendo el inhibidor específico de caspasa 8, c-FLIP29, los inhibidores de caspasas cIAP1 y Ciap2, Bcl-2, Bcl-xL, c-Myc y c-Myb. Además, la estimulación de Ciclina D1/2 por NF- κ B se ha asociado con la progresión del ciclo celular (Chaturvedi et al., 2011).

Otro mecanismo de promoción del tumor desplegado vía activación de TLRs, incluye la producción de citocinas que controlan el crecimiento. Se reconoce que la activación de la señalización por TLRs resulta en la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, así como en rutas de señalización para la producción de interferones tipo I, con la subsecuente producción de citocinas “oncogénicas”, así como la activación de las vías MAPK y AKT. Son múltiples las citocinas que han sido asociadas a procesos oncogénicos, incluyendo TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-23 (McCall et al., 2012).

El propósito de este trabajo fue analizar la expresión del receptor TLR9 en células B16F10 de melanoma murino y más aún, establecer el rol de la estimulación de dicho receptor (a través de su ligando natural, los CpG) en la proliferación y producción de citocinas pro y antiinflamatorias. Los CpG son moléculas sintéticas que emulan el ADN bacteriano, y han sido utilizados en diversas enfermedades inmunológicas e infecciosas, así como en cáncer, donde se ha demostrado su eficacia en combinación con quimioterapia (Manegold et al., 2008) y otras terapias incluyendo anticuerpos, agentes antiangiogénicos, radioterapia y crioterapia (Vollmer et al., 2009). En modelos preclínicos, se ha demostrado el efecto antitumoral de ODN-CpG usados como monoterapia (Yao et al., 2009). Además, un estudio clínico reciente mostró la efectividad y seguridad de ODN-CpG como adyuvantes en la vacunación contra el antígeno tumoral universal WT1, en pacientes con cáncer de pulmón, páncreas, ovario, sarcoma y papilar (Ohno et al., 2012).

En la primera parte de este proyecto, se analizó la expresión de TLR9, obteniendo la amplificación del mismo a nivel de RNAm y proteína. Este hallazgo constituye el primer reporte de la expresión de TLR9 en la línea celular B16F10.

Posteriormente se evaluó el efecto del tratamiento con los CpG 1826, 2395 y DSLO, en la proliferación de las células B16F10. Se observó una inhibición parcial de la proliferación celular, la cual fue más acentuada para el CpG 1826, con un 40% de inhibición. Este resultado podría estar relacionado con la mayor capacidad de estimulación del TLR9, ya que el CpG 1826 está reportado como murino-específico, mientras que el CpG 2395 se considera humano-murino y el DSLO3 multiespecie. Resultados similares se encuentran en la literatura, por ejemplo Wu et al. reportan una inhibición de la proliferación de células de cáncer de páncreas PANC-1 inducida por el tratamiento con CpG (dosis y tiempo-dependiente), así como inhibición de la migración e invasión, efectos atribuidos a la expresión y estimulación del TLR9 (Wu et al., 2011).

En otro contexto celular, se observó que el tratamiento de una línea celular humana de neuroblastoma *in vitro*, no tuvo efecto citotóxico, ni afectó la morfología, sin embargo si se observó un efecto antitumoral *in vivo*, lo cual fue atribuido a la capacidad de activación del sistema inmune por parte del CpG (Yao et al., 2009).

En un estudio reciente en una línea de leucemia linfocítica crónica de células B que expresa altos niveles de TLR9, se encontró que el tratamiento con CpG de clase B induce una vía apoptótica que involucra la activación y clivaje de caspasas y poli (ADP-ribosa) polimerasa (Liang et al., 2010).

Adicionalmente se ha reportado que *in vitro* los CpG tienen la capacidad de disminuir la expresión de factores antiapoptóticos survivina y livina, potenciando la sensibilidad de células HepG2 de hepatoma, al 5-fluorouracilo (Liang et al., 2013).

Finalmente en cuanto al efecto del tratamiento con CpG en la producción y perfil de citocinas, el hallazgo más significativo fue el aumento en la secreción de IL-10 en células B16F10 estimuladas con el CpG-1826. La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que bloquea la actividad del factor NF- κ B y la vía de señalización JAK-STAT y ha sido documentado que favorece a ciertos tumores en la evasión del proceso de inmunovigilancia (Perrone et al., 2008). La IL-10 puede inducir el fenotipo de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ en el microambiente tumoral, las cuales secretan más IL-10, además de TGF- β , que pueden luego suprimir el efecto de células T efectoras

(Strauss et al., 2009). *In vitro*, se ha descrito una vía apoptótica dependiente de IL-10 autócrina en células leucémicas, como resultado de la estimulación del TLR9 con CpG (Liang et al., 2010).

9 CONCLUSIONES

1. Se detectó por primera vez la expresión del Receptor tipo Toll 9 (TLR9) a nivel de RNAm y proteína, en células B16F10.
2. El tratamiento de células B16F10 con diferentes CpG tuvo efecto inhibitorio sobre la proliferación celular. A una dosis de 50 µg/ml, el CpG 2395 redujo la proliferación un 13%, el CpG DSLO3 un 24% y el CpG 1826 un 40%.
3. El tratamiento de células B16F10 con el CpG 1826 indujo un aumento en la secreción de IL-10 con respecto al grupo control (23.64 pg/ml), para las células estimuladas con 3 y 30 µg/ml del CpG 1826, se cuantificaron 32.04, 50.98 y 64.4 pg/ml, respectivamente.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E., and Morris, J. C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *The Journal of clinical investigation* 113, 1515.
- Boyle P., Levin B.E. (eds). (2008). *World Cancer Report, 2008* (World, Health Organization, International Agency for research on Cancer). Lyon: IARC Press. Disponible en: http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf
- Casanova Seuma, J. M., Martí Laborda, R. M., and Baradad Brusau, M. (2005). Estadificación y pronóstico del melanoma. *Piel* 20, 133.
- Chaturvedi, M. M., B. Sung, V. R. Yadav, R. Kannappan & Aggarwal B. B. (2011). NFkappaB addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*, 30(14), pp. 1615-30.
- Chodon, T., Koya, R. C., and Odunsi, K. (2015). Active immunotherapy of cancer. *Immunological investigations* 44, 817.
- Chu, R. S., Targoni, O. S., Krieg, A. M., Lehmann, P. V., and Harding, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *The Journal of experimental medicine* 186, 1623.
- Civetta, M. T. M. d., and Civetta, J. D. (2011). Carcinogénesis. *Salud Pública de México* 53, 405.
- Coussens L.M., Werb Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*. 420: 860-867.
- De la Fuente-García, A., and Ocampo-Candiani, J. (2010). Melanoma cutáneo. *Gac Méd Méx* 146, 126.

- De La Peña, H., and Madrigal, J. (2006). Inmunoterapia celular contra el cáncer. Sociedad Mexicana de Oncología, AC 5, 61.
- DeVita, V. T., Jr., and Chu, E. (2008). A history of cancer chemotherapy.
- Dobson, J. M. (2013). Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs. ISRN Veterinary Science 2013, 941275.
- Falk, A. T., Moncharmont, C., Guilbert, M., Guy, J. B., Alphonse, G., Trone, J. C., Rivoirard, R., Gilormini, M., Toillon, R. A., Rodriguez-Lafrasse, C., and Magne, N. (2014). [Radiation-induces increased tumor cell aggressiveness of tumors of the glioblastomas?].
- Franco, D. A. (2016). Papel de los adyuvantes en la modulación de la respuesta inmune. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17, 280.
- Gallegos-Hernández, J. F. (2008). Melanoma cutáneo. La importancia de la fotoprotección y del diagnóstico oportuno. Cirugía y Cirujanos 76, 363.
- Gamerosa, P. C., and Téllez, J. E. (2016). El cáncer de piel, un problema actual.
- Geiger, T. R., and Peeper, D. S. (2009). Metastasis mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1796, 293.
- González, N., and Flores, A. (2010). El melanoma en México. Esp. Méd 15, 161.
- Gorantla, V. C., and Kirkwood, J. M. (2014). State of Melanoma: An Historic Overview of a Field in Transition. Hematology/oncology clinics of North America 28, 415.

- Grin, C. M., Kopf, A. W., Welkovich, B., Bart, R. S., and Levenstein, M. J. (1990). Accuracy in the clinical diagnosis of malignant melanoma. *Archives of dermatology* 126, 763.
- Han, D., Thomas, D. C., Zager, J. S., Pockaj, B., White, R. L., and Leong, S. P. L. (2016). Clinical utilities and biological characteristics of melanoma sentinel lymph nodes. *World Journal of Clinical Oncology* 7, 174.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57.
- Hanahan, D., and Weinberg, Robert A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646.
- Hernández, C., Ruiz, Á., Reigosa, A., Maldonado, G., Parada, D., Ball, E., Díaz Pietri, G., Khalek, Y., Gil, A., and Martirene, E. (2005). Reunión de consenso en melanoma maligno. Julio 2004. *Revista Venezolana de Oncología* 17.
- Hernández, J. F. G., and Nieweg, O. E. (2014). Melanoma cutáneo (MC): diagnóstico y tratamiento actuales. *Gaceta Médica de México* 150, 2.
- Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 4, 249.
- Kundu S. D., Lee C., Billips B.K. et al. (2008) The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate* 68:223-229.
- Lavanderos, J., Pérez, J. A., and Jeria, S. (2010). Actualizaciones en melanoma maligno cutáneo. *Cuad. cir.(Valdivia)* 24, 47.
- Leong, S. P. L., Mihm, M. C., Murphy, G. F., Hoon, D. S. B., Kashani-Sabet, M., Agarwala, S. S., Zager, J. S., Hauschild, A., Sondak, V. K., Guild, V., and

- Kirkwood, J. M. (2012). Progression of cutaneous melanoma: implications for treatment. *Clinical & experimental metastasis* 29, 775.
- Liang S.R., Hu G.R., Fang L.J., Huang S.J., Li J.S., Zhao M.Y., Meng M.J. (2013). CpG oligodeoxynucleotides enhance chemosensitivity of 5-fluorouracil in HepG2 human hepatoma cells via downregulation of the antiapoptotic factors survivin and livin. *Cancer Cell Int.* 13(1):106. doi: 10.1186/1475-2867-13-106.
- Liang, X., Moseman, E. A., Farrar, M. A., Bachanova, V., Weisdorf, D. J., Blazar, B. R., & Chen, W. (2010). Toll-like receptor 9 signaling by CpG-B oligodeoxynucleotides induces an apoptotic pathway in human chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 115(24), 5041–5052. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-03-213363>
- Luke, J. J., and Schwartz, G. K. (2013). Chemotherapy in the Management of Advanced Cutaneous Malignant Melanoma. *Clinics in dermatology* 31, 290.
- Manegold C., Gravenor D., Woytowicz D., Mezger J., Hirsh V., Albert G., Al-Adhami M., Readett D., Krieg A.M., Leichman C.G. (2008). Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26: 3979-3986.
- Martinez, J.-C., and Otley, C. C. (2001). The Management of Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer: A Review for the Primary Care Physician. *Mayo Clinic Proceedings* 76, 1253.
- McCall K., Benencia F., Kohn L.D., Malgor R., Schwartz A. and Schwartz F.L. (2012). Toll-Like Receptors as Novel Therapeutic Targets for the Treatment of Pancreatic Cancer, *Pancreatic Cancer -Molecular Mechanism and Targets*, Prof. Sanjay Srivastava (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/27263. Available from: <https://www.intechopen.com/books/pancreatic-cancer-molecular-mechanism->

and-targets/toll-like-receptors-as-novel-therapeutic-targets-for-the-treatment-of-pancreatic-cancer

Miller, R. A., Maloney, D. G., Warnke, R., and Levy, R. (1982). Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *New England Journal of Medicine* 306, 517.

Mota-Sánchez, J. (2009). Vacunas de ADN: inducción de la respuesta inmunitaria. *Salud Pública de México* 51, s463.

NCI, I. N. d. C. (2013). Terapias biológicas para el cáncer.

Organizacion Mundial de la Salud. Nota Descriptiva N°297. (2015).

Ohno S., Okuyama R., Aruga A., Sugiyama H., Yamamoto M. (2012). Phase I trial of Wilms' tumor 1 (WT1) peptide vaccine with GM-CSF or CpG in patients with solid malignancy. *Anticancer Research* 32: 2263-2269.

Perrone, G., P. A. Ruffini, V. Catalano, C. Spino, D. Santini, P. Muretto, C. Spoto, C. Zingaretti, V. Sisti, P. Alessandroni, P. Giordani, A. Cicetti, S. D'Emidio, S. Morini, A. Ruzzo, M. Magnani, G. Tonini, C. Rabitti & F. Graziano. (2008). Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer*, 44(13), pp. 1875-82.

Rangwala, S., and Tsai, K. (2011). Roles of the immune system in skin cancer. *British Journal of Dermatology* 165, 953.

Rodríguez García, R., Hechavarría Miyares, J. H., and Azze Pavón, M. d. I. Á. (2001). Cáncer de piel y ocupación. *Revista Cubana de Medicina* 40, 266.

Schuster, M., Nechansky, A., and Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology journal* 1, 138.

- Secretaría de Salud. (2001). Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas.
- Strauss, L., C. Bergmann & T. L. Whiteside. (2009). Human circulating CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ regulatory T cells kill autologous CD8⁺ but not CD4⁺ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*, 182(3), pp. 1469-80.
- Sukari, A., Nagasaka, M., Al-Hadidi, A., and Lum, L. G. (2016). *Cancer Immunology and Immunotherapy*.
- Taye, Y., and Tekewe, A. (2012). Cytosine phosphorothioate guanine oligodeoxy nucleotides as innovative immunotherapeutic adjuvants - a review. *International Journal of Drug Research and Technology* 2, 342.
- Torrella, A., and Noris-García, E. (2004). Inmunoterapia en melanoma. *Oncología (Barcelona)* 27, 16.
- van der Weyden, L., Patton, E. E., Wood, G. A., Foote, A. K., Brenn, T., Arends, M. J., and Adams, D. J. (2016). Cross-species models of human melanoma. *The Journal of Pathology* 238, 152.
- Vollmer J., Krieg A.M. (2009). Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61: 195-204.
- Weiner, G. J., Liu, H.-M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E., and Krieg, A. M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 10833.

Wu H.Q., Wang B., Zhu S.K., Tian Y., Zhang J.H., Wu H.S. (2011). Effects of CPG ODN on biological behavior of PANC-1 and expression of TLR9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 17(8):996-1003. doi: 10.3748/wjg.v17.i8.996.

Yao Q.H., Tang Y.J., Gao F.H., Tang J.Y. (2009). Antitumor effect of CpG oligonucleotides on human neuroblastoma xenografts in nude mice. *Ai Zheng* 28:344-349