

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“La Terapia Experimental Conjunta con
Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y la Inmunización
con Survivina Inhibe el Crecimiento *in vivo* de un
Melanoma Experimental Murino”**

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado de Doctor en Bioquímica por:

LORENA ANDREA AGUILAR GUZMÁN

Directores de Tesis

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Dr. Andrew F.G. Quest

SANTIAGO – CHILE

2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

LORENA ANDREA AGUILAR GUZMÁN

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 16 de noviembre de 2012

Directores de Tesis:

Dr. Arturo Ferreira

Dr. Andrew Quest

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María Inés Becker (Presidente)

Dr. Flavio Salazar

Dr. Javier Puente

Dr. María Rosa Bono

Dr. Jorge Martínez

*Dedicado a Mario, el amor de mi vida,
por tu apoyo y comprensión...
por hacerme feliz*

Agradecimientos

Le doy gracias a Dios por estar siempre junto a mí.

A mi familia que me ha dado todo, que ha estado siempre apoyándome y animándome. Son lo más lindo en mi vida.

A Mario Arismendi, mi marido y amigo incondicional, por el ánimo que me diste cada día, por la ayuda siempre extendida, por la comprensión frente a las largas jornadas. Gracias por todo tu amor.

A mis Directores de Tesis, los Drs. Arturo Ferreira y Andrew Quest, porque fueron una guía en mi camino, no solo en lo académico, sino que también en lo personal. Muchas gracias ambos.

Mis agradecimientos a la Dra Lisette Leyton por todo su apoyo a lo largo de estos años.

A Lorena Lobos por su amistad y cariño, pero por sobre todo, por su gran generosidad... fuiste un apoyo fundamental en importantes etapas de este proceso. Gracias amiga!!!!

A todos los amigos y compañeros de los laboratorios donde realicé esta Tesis, fue una gran alegría para mi compartir con ustedes los muchos buenos momentos que viví durante esta etapa, y también los no tan buenos, gracias por la preocupación y los consejos, gracias por las palabra de aliento y la mano desinteresada que de una u otra forma me ayudó a llegar a este momento. Mis agradecimientos a todos ustedes:

Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana: Ruth Mora, Ismael Maldonado, Eduardo Sosoniuk, Fernando Vivanco, Gerardo Vallejos, Katherine Weinberger, Francisca Coddou, Juana Orellana, Carolina Valck, Galia Ramírez, Leonora Duaso, Paula Abello, Andrea González, Haydee Gallardo, Jaime Peña, Ignacio Arias, Mary Aranguren, Gilda Soto y Ana Cepeda. Y a los miembros del proyecto Anillos de Investigación.

Laboratorio de Comunicaciones Celulares: Lorena Lobos, Lillian Corona, Natalia Díaz, Horacio Maldonado, Alejandra Valdivia, Claudia Calderón, Pamela Contreras, Vicente Torres, Denisse

Bravo, Jorge Díaz, Milene Kong, Areli Cardenas, Rodrigo Herrera, Adam Aguirre, Carolina Lagos, Gonzalo Fernández, Carlos Sanhueza, Álvaro Álvarez, Darío Vásquez, Edgardo Rojas, Hernán Huerta, María Inés Díaz, Rina Ortíz, Jimena Canales, Nicolás Soto, Pablo Mendoza, Patricio Silva, Rodrigo Arriagada, Sergio Nuñez, Valeska Cifuentes, Francesa Burgos, Patricia Mendoza, Nicolás Muñoz, Natalia Muñoz, Sra Rosita, Enrique Ñanculef.

Al Dr. David Lemus y a Carlos Rosas por toda su colaboración y disponibilidad en la realización de ensayos fundamentales de mi tesis. Y gracias por el cariño.

Por supuesto a todos los laboratorios del Programa Disciplinario de Inmunología y sus respectivos Académicos, los Drs. Juan Carlos Aguillón, Flavio Salazar, Marcela Hermoso, Mercedes López, María Carmen Molina, y muy particularmente a los Drs. Carolina Ribeiro, Carolina Valck y Leandro Carreño, así como a los estudiantes del Programa, Cristián Falcón, Alex Aravena y Karina Pino, por su apoyo y guía en ensayos fundamentales de mi tesis y por su amistad. A los funcionarios Ruth Mora, Juana Orellana, Álvaro Rojas, Inelia Butron, Oriana Córdova, Marisol Briones, Nancy Fabre, Félix González, Patricio Farías y Bastián Jerez por toda su ayuda y cariño que me facilitó enormemente mi trabajo.

Así también, mis agradecimientos al Centro de Estudios Moleculares de la Célula, y al Proyecto FONDAP, no sólo por permitirme formar parte de éste, sino también porque me brindaron la Beca de Estudios para Estudiantes de Primer Año del Doctorado en Bioquímica de la Universidad de Chile, la que fue indispensable para poder comenzar con mi programa doctoral. Mis agradecimientos a los laboratorios miembros del Centro y a sus respectivos Investigadores jefes, los Drs. Luigi Devoto, Cecilia Hidalgo, Sergio Lavandero, Andrés Stutzin, Enrique Jaimovich, Claudio Hetz y Luis Michea. Además, a Cecilia Zúñiga, por su siempre buena disposición.

Al Fondo Nacional para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología (FONDECYT), sin cuyo aporte tanto a los proyectos en los que estuvo inserto mi trabajo como a mi persona directamente, no hubiera sido posible este trabajo.

Este trabajo se realizó en:

- **Laboratorio de Comunicaciones Celulares**, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con el financiamiento de los Proyectos FONDECYT-FONDAP 1510006 y FONDECYT 1090071 del Dr. Andrew F.G. Quest;
- **Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana**, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, con el financiamiento del Proyecto FONDECYT 1095095 y los Proyectos Bicentenario de Anillos de Investigación ACT29 y ACT112 del Dr. Arturo Ferreira V.;

Además, contribuyeron al financiamiento de estos estudios: Beca FONDAP para estudiantes de Doctorado en Bioquímica (2006), Beca MECESUP UCH0606 para Estudios de Doctorado (2008); Beca CONICYT para Estudios de Doctorado (2009) y Beca CONICYT de Término de Tesis (2010), obtenidas por Lorena Aguilar Guzmán.

INDICE GENERAL

	Página
PORTADA	1
AGRADECIMIENTOS	4
INDICE GENERAL	7
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
ABREVIATURAS	13
I. RESUMEN	15
II. SUMMARY	16
III. INTRODUCCIÓN	17
III.1. Cáncer	17
III.2. Apoptosis	20
III.3. Survivina	23
III.4. Inmunización Genética y Cáncer	27
III.5. Angiogénesis	29
III.6. Sistema del Complemento	30
III.7. Calreticulina	32
III.8. Survivina y Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i> combinadas como agentes antitumorales	37
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVO GENERAL	39
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	40
VII.1. Soluciones y Reactivos Comerciales	40
VIII.1.1. Soluciones	40
VII.1.2. Reactivos Comerciales	40
VII.2. Métodos	42
VII.2.1. Evaluar la capacidad de inhibir la formación de tumores mediante la inmunización con <i>pSurv</i>, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria	42
VII.2.1.1. Purificación de DNA plasmidial libre de endotoxinas para la inmunización de ratones C57BL/6	42
VII.2.1.2. Inmunización genética intradérmica de ratones C57BL/6 con DNA plasmidial	43
VII.2.1.3. Cultivo de células de melanoma B16-F10 como modelo experimental	44
VII.2.1.4. Evaluación de la expresión de Surv en las células B16-F10	44

VII.2.1.5.	Evaluar la presencia de Surv intra y extracelular en células B16-F10 mediante Citometría de Flujo	45
VII.2.1.6.	Generación de tumor subcutáneo sólido	45
VII.2.1.7.	Purificación e Inyección rTcCRT	46
VII.2.1.8.	Determinación de eventuales efectos tóxicos de rTcCRT sobre las células B16-F10, mediante un ensayo de proliferación MTS	47
VII.2.1.9.	Determinación de la capacidad anti-angiogénica de rTcCRT en el modelo tumoral murino B16-F10/C57BL/6, mediante cuantificación de vasos sanguíneos en inmunohistoquímica.	48
VII.2.1.9.1.	Tinción Hematoxilina-Eosina-Azul Alcán	48
VII.2.1.9.2.	Tinción Arteta	49
VII.2.1.9.3.	Inmunohistoquímica anti-CD31	49
VII.2.1.9.4.	Cuantificación de la densidad microvascular	49
VII.2.1.10.	Determinación de la inducción de fagocitos de las células B16-F10 por la presencia de rTcCRT	50
VII.2.1.11.	Determinación de la generación de anticuerpos anti-rTcCRT inoculados subcutáneamente	50
VII.2.2.	Evaluar de la capacidad de inhibir la reincidencia de la formación de tumores subcutáneos y de metástasis, tras la resección del tumor primario, mediante la inmunización con <i>pSurv</i> en conjunto con la Calreticulina recombinante parasitaria	51
VII.2.2.1.	Evaluación del tratamiento quirúrgico combinado con la respuesta inmune al plasmidio <i>pSurv</i> y la acción local de rTcCRT	51
VII.2.2.1.1.	Tratamiento quirúrgico	51
VII.2.2.1.2.	Tratamiento local con rTcCRT	51
VII.2.3.	Evaluar la capacidad de inhibir la metástasis pulmonar mediante la inmunización con <i>pSurv</i> en conjunto con la Calreticulina recombinante parasitaria	53
VII.2.3.1.	Efecto de la inmunización en un ensayo de metástasis pulmonar	53
VII.2.3.1.1.	Inmunización plasmidial intramuscular	53
VII.2.3.1.2.	Inyección de células tumorales	53
VII.2.3.1.3.	Inoculación de la proteína rTcCRT intravenosa	56
VIII.	RESULTADOS	55
VIII.1.	Evaluar la capacidad inmunogénica del plasmidio codificante de Surv (<i>pSurv</i>) en conjunto con la Calreticulina recombinante parasitaria (rTcCRT), para inhibir la formación de tumores	60
VIII.1.1.	La inmunización conjunta con los plasmidios <i>pSurv</i> y <i>pTcCRT</i> no inhibe la formación de tumores	60
VIII.1.2.	Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de tumores del plasmidio <i>pSurv</i> en conjunto con rTcCRT	64
VIII.1.2.1.	rTcCRT no afecta la proliferación in vitro de células B16-F10	64

VIII.1.2.2.	La inmunización genética con <i>pSurv</i> , en conjunto con rTcCRT, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino	62
VIII.1.3.	La inmunización genética con <i>pSurv</i> , en conjunto con rTcCRT-R, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino, al igual que con la proteína completa	68
VIII.1.4.	Determinación de la capacidad anti-angiogénica de la inmunización con <i>pSurv</i> en conjunto con la inoculación in situ de rTcCRT	72
VIII.1.4.1.	Descripción histológica del tumor experimental subcutáneo melanoma murino B16-F10	72
VIII.1.4.2.	La combinación de tratamientos <i>pSurv</i> -rTcCRT inhibe la angiogénesis tumoral	75
VIII.1.5.	Determinación de la unión de rTcCRT a la membrana celular de los melanocitos y si allí recluta C1q, primer componente de complemento humano, efectivo promotor de señales profagocíticas	77
VIII.1.5.1.	rTcCRT se une a los melanocitos B16-F10	77
VIII.1.5.2.	C1q, primer componente de complemento humano, efectivo promotor de señales profagocíticas, se une a los melanocitos en forma independiente de la presencia de rTcCRT	79
VIII.1.5.3.	rTcCRT y C1q, juntas o por separado, aumenta la fagocitosis de las células B16-F10 por los macrófagos RAW 264.7	80
VIII.1.6.	La inoculación de rTcCRT genera respuesta inmune humoral	81
VIII.2.	Evaluar la capacidad de inhibición de <i>pSurv</i> con TcCRT, sobre la reincidencia de la formación del tumor subcutáneo y la metástasis, tras la resección de éste	83
VIII.3.	Evaluar la capacidad de inhibición de la metástasis pulmonar mediante la inmunización con plasmidios que codifican Surv en conjunto con rTcCRT	89
VIII.3.1.	La inmunización intradérmica con <i>pSurv</i> o <i>pSec-Surv</i> no afecta la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10	89
VIII.3.2.	La combinación de la inmunización con <i>pSurv</i> y <i>pSec-Surv</i> , más la inoculación i.v. con rTcCRT, inhibe la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10	92
IX.	DISCUSIÓN	94
X.	REFERENCIAS	103
XI.	PUBLICACIONES, COMO AUTOR O COAUTOR, DURANTE EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL	116
XI.1.	Publicaciones en revistas ISI	116
XI.2.	Publicación Capítulo libro	117
XII.	PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES	111

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Habilidades adquiridas por células cancerosas	19
Figura 2	Vías de señalización de la Apoptosis	22
Figura 3	La infección con <i>Trypanosoma cruzi</i> , inhibe el crecimiento de un adenocarcinoma mamario murino	36
Figura 4	Protocolo de la Reacción en Cadena de Polimerasa para la amplificación del gen que codifica <i>Surv</i>	43
Figura 5	Proteínas rTcCRT y rTcCRT-R utilizada en ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	47
Figura 6	Los plasmidios <i>pSec-Surv</i> y <i>pSurv</i> contienen el gen que codifica <i>Surv</i>	55
Figura 7	Las células HEK293T expresan intracelularmente la secuencia de <i>Surv</i> codificada en el plasmidio <i>pSurv</i>	56
Figura 8	Visualización microscópica del cultivo de células B16-F10	57
Figura 9	Las células B16-F10 expresan <i>Surv</i> intra y extracelularmente	58
Figura 10	Crecimiento tumoral diferencial entre grupos inoculados con distintos números de células B16-F10	59
Figura 11	Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con los plasmidios codificantes de <i>TcCRT</i> y <i>Surv</i> en el crecimiento de melanoma murino	61
Figura 12	La inmunización genética con <i>pSurv</i> y <i>pTcCRT</i> , en conjunto, no afecta el crecimiento de un melanoma experimental murino	62
Figura 13	rTcCRT no afecta la proliferación <i>in vitro</i> de células B16-F10	64
Figura 14	Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plasmidio <i>pSurv</i> y la inoculación de rTcCRT s.c. en el crecimiento de melanoma murino	65
Figura 15	La inmunización genética con <i>pSurv</i> , en conjunto con rTcCRT, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino	66

Figura 16	La inmunización genética con <i>pSurv</i>, en conjunto con el dominio R de TcCRT (rTcCRT-R), retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino	70
Figura 17	Corte histológico de tumor melanoma murino B16-F10	74
Figura 18	La inmunización con el plasmidio que codifica <i>Surv</i> y la inoculación con rTcCRT, ya sea en conjunto o por separado tienen efecto anti-angiogénico	75
Figura 19	rTcCRT se une a las células B16-F10	77
Figura 20	El primer componente del Sistema del Complemento, C1q, se une a las células B16-F10, independiente de la presencia de rTcCRT	79
Figura 21	La presencia de rTcCRT y C1q aumenta la fagocitosis de las células B16-F10 por los macrófagos RAW 264.7	80
Figura 22	La inoculación de rTcCRT subcutáneamente generar anticuerpos en los animales tratados	81
Figura 23	Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plasmidio <i>pSurv</i> y la inoculación de rTcCRT s.c. en la incidencia y metástasis de un melanoma murino	83
Figura 24	El proceso de cicatrización, tres días post herida quirúrgica, es macroscópicamente normal, cuando la herida se trata tópicamente con tres concentraciones de rTcCRT	85
Figura 25	La inmunización con <i>pSurv</i>, previo a la remoción quirúrgica no afecta el tamaño del tumor B16-F10 en ratones	86
Figura 26	La resección quirúrgica de un melanoma B16-F10 no es seguida de reincidencia local	86
Figura 27	La inmunización con <i>pSurv</i> acompañada de la administración de rTcCRT, previo a la remoción quirúrgica de tumores B16-F10 en ratón C57BL/6, no afecta el grado de metástasis regional	88
Figura 28	Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plasmidio <i>pSec-Surv</i> y <i>pSurv</i> en la metástasis pulmonar	90
Figura 29	La inmunización con <i>pSurv</i> o <i>pSec-Surv</i> no afecta la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10	91

Figura 30	Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con los plasmidios <i>pSec-Surv</i> y <i>pSurv</i> en la metástasis pulmonar	92
Figura 31	La combinación de la inmunización con <i>pSurv</i> y <i>pSec-Surv</i>, más la inoculación i.v. con rTcCRT, inhibe la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10	93
Figura 32	Esquema resumen de los antecedentes recopilados en esta tesis doctoral	102

ABREVIATURAS

aa	Amino ácidos
Ac	Anticuerpo (s)
AcPo	Anticuerpo Policlonal
ABTS	2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
AEC	3 – Amino – 9 – Ethylcarbazole
BAL	Benzamidina /Antipainaa/ Leupeptina
BSA	Albumina Sérica Bovina
DNA	Ácido DesoxiriboNucleico
DO	Densidad Óptica
ELISA	Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas
FITC	Isotiocianato de fluoresceina
x g	Fuerza centrifuga relativa
i.d.	Intra-dérmico
Ig	Inmunoglobulinas
INF-γ	Interferon gamma
i.m.	Intra-muscular
i.v.	Intra-venoso
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
MEC	Matriz Extra Celular
mM	Milimolar
MmCRT	Calreticulina murina
ml	Mililitro(s)
μg	Microgramo(s)
μl	Microlitro(s)
μM	Micromolar
MEC	Matriz Extracelular
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad

OVA	Orthovanadato de Sodio
PBS	Tampón Fosfato Salino
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
<i>pSurv</i>	pcDNA-Survivina
<i>pSec-Surv</i>	<i>pSecTag-Surv</i>
s.c.	Sub-cutáneo
Surv	Survivina
RE	Retículo Endoplasmático
rHuCRT	Calreticulina recombinante humana
rTcCRT	Calreticulina recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute
RT	Temperatura ambiente
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SFB	Suero fetal bovino
SPI	Suero Pre-Inmune
SI	Suero Inmune
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>

I. RESUMEN

El cáncer, una de las causas más frecuentes de muerte en el mundo, es un gran desafío para el desarrollo de terapias específicas anti-tumores o de sus metástasis. Ya sea la inmunoterapia anti-tumoral ó la terapia anti-angiogénica, son estrategias con un muy buen potencial en la lucha contra el cáncer. La primera busca activar la respuesta de linfocitos T tumor-específicos, mientras que la segunda bloquea o retarda el crecimiento del tumor al interferir con el abastecimiento adecuado de nutrientes y oxígeno y con la remoción de productos catabólicos tóxicos. La inmunoterapia requiere de la identificación de Antígenos Asociados Tumores (TAA) que se expresen preferencialmente en tejidos con alto nivel proliferativo, como los tumores. Un TAA adecuado para este tipo de terapia debe ser esencial para la mantención de la viabilidad del tumor y ser blanco de linfocitos T citotóxicos. Survivina (Surv), cumple con estos requisitos. Por otra parte, en vertebrados, Calreticulina (CRT), proteína altamente pleiotrópica, además de su participación en procesos de presentación antigénica en células presentadoras de antígeno (APCs), puede translocarse a la membrana externa e interactuar con C1 del complemento. A pesar de la enorme distancia evolutiva entre el *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, y los mamíferos, CRT del parásito (TcCRT) comparte una gran cantidad de características estructurales y funcionales con sus homólogos vertebrados. Recientemente, hemos propuesto que el efecto anti-neoplásico asociado a la infección por *T. cruzi*, se debería, al menos parcialmente, a la capacidad anti-angiogénica de TcCRT, al interactuar con células endoteliales, interfiriendo con su multiplicación, movilidad y capacidad morfogénica capilar. En estas actividades, la proteína parasitaria es más efectiva que su contraparte humana. Por estas razones, nuestra Hipótesis de Trabajo propuso que, la inmunización genética con *Surv* y la administración concomitante de TcCRT, genera una actividad anti-tumoral mayor que con solo uno de estos productos. Los principales resultados obtenidos señalan que: **i)** De acuerdo a lo esperado, rTcCRT no afecta la proliferación *in vitro* de células de un melanoma murino B16-F10, **ii)** la inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con rTcCRT (ó su dominio R), retrasa el crecimiento del tumor, **iii)** aumentando la sobrevivencia de los animales tratados. **iv)** El tratamiento combinado *pSurv-rTcCRT* inhibe la angiogénesis tumoral. **v)** rTcCRT se une a los melanocitos, promueve la incorporación de C1q humano y la fagocitosis macrofágica y, **vi)** La combinación de la inmunización con *pSurv* y *pSec-Surv*, más la inoculación i.v. con rTcCRT, inhibe sinérgicamente la metástasis pulmonar. Es probable que una secuencia de eventos se desencadene primariamente por la actividad anti-angiogénica de TcCRT, en el tumor, generando una respuesta al estrés derivado, siendo translocada CRT de la célula tumoral a la membrana externa, donde captura C1, evento que promueve la fagocitosis de la célula tumoral, por parte de las APCs. La presentación de péptidos derivados de antígenos TAA debiera ocurrir (Surv incluida), con la consiguiente inducción de actividad inmune anti-tumor. Independientemente, Surv podría también mediar actividad inmune anti-células endoteliales. En consecuencia, el retardo en el crecimiento tumoral y aumento en la sobrevivencia de los animales tratados con *pSurv-rTcCRT* se debería a la combinación de efectos sobre distintos blancos moleculares, colaborando y potenciando el efecto final.

II. SUMMARY

Cancer, the most frequent cause of death worldwide, is a great challenge for the development of specific anti-tumor and metastasis treatment. Either immune anti-tumor or anti-angiogenic therapies, are potentially promising in the struggle against cancer. Immune therapy seeks to activate the response of antigen-specific T lymphocytes, thus allowing selective elimination of tumor cells, while anti-angiogenesis blocks or delays tumor growth by interfering with nutrient or oxygen supply and with the removal of catabolic toxic products. Immune therapy for cancer treatment requires the identification of Tumor Associated Antigens (TAA), specifically expressed in tissues with high proliferative levels, such as tumors. A TAA useful for this therapy must be essential for tumor liability and also serve as a target for cytotoxic T lymphocytes. Survivin (Surv), fulfills these requirements. On the other hand, in vertebrates, Calreticulin (CRT), a highly pleiotropic protein, besides its participation in antigen presenting cells (APCs), can translocate to the external membrane and interact with complement C1. In spite of the great evolutionary distance between *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, and mammals, parasite CRT (TcCRT) shares many structural and functional properties with its vertebrate counterparts. Recently, we have proposed that the anti-tumor effect associated to *T. cruzi* infection is at least partially due to the TcCRT anti-angiogenic capacity. Thus, upon interacting with endothelial cells, TcCRT interferes with their multiplication, mobility and capacity to generate capillaries. In all these activities, the parasite protein is more effective than its human counterpart. For these reasons, the Working Hypothesis proposes that genetic immunization with *Surv* and concomitant TcCRT administration, generates a greater anti-tumor activity than each of these products, administered separately. The principal results obtained indicate that: **i)** As expected, while rTcCRT does not affect the *in vitro* proliferation of B16-F10 tumor cells, **ii)** genetic immunization with *pSurv*, together with rTcCRT (or its R domain), slows the growth of the B16-F10 murine melanoma **iii)** increasing survival of treated animal. **iv)** *pSurv*-rTcCRT treatment inhibits tumor angiogenesis. **v)** rTcCRT binds to B16-F10 melanocytes, promotes the incorporation of human C1q and consequent macrophage phagocytosis and, **vi)** The combination of immunization with *pSurv* and *pSecSurv* plus rTcCRT i.v. inoculation, synergistically inhibits lung metastasis. Perhaps, a sequence of events is primarily unleashed by the TcCRT anti-angiogenic activity in the tumor. As a response to derived stress, tumor cell CRT is translocated to the external membrane, where it captures C1, an event that promotes tumor phagocytosis by APCs. TAA-derived antigen presentation (Surv included) should follow, with the induction of anti-tumor immune activity. Independently, Surv could also mediate anti-endothelial cell immune activity. Consequently, the slower tumor growth and increased survival of the animals treated with *pSurv*-rTcCRT is due to the combined effects on different molecular targets, collaborating and enhancing the overall effect.

III. INTRODUCCIÓN

En esta Tesis proponemos la manipulación experimental *in vivo*, de dos moléculas que, independientemente, muestran efectos moduladores del crecimiento tumoral, operando posiblemente sobre distintos blancos moleculares. Se trata de Survivina (Surv) humana y de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT). Así, propondremos que, la inmunización con Surv, en conjunto con el suministro sistémico de TcCRT, podría tener efectos anti-tumorales, al menos aditivos.

III. 1. Cáncer

Neoplasia maligna, tumor maligno o cáncer son distintas formas de referirnos a la misma patología que ha sido objeto de investigación durante más de medio siglo, buscando comprender sus causas, mecanismos y posibles tratamientos.

Pese a los estudios realizados, el cáncer representa la principal causa de muerte a nivel mundial, estimándose que alrededor de 7,6 millones de personas fallecieron durante el año 2008 por esta razón, lo que corresponde, aproximadamente, al 13% del total de defunciones en el mundo durante ese año. De esas muertes por cáncer, más del 70% ocurrieron en países de bajos y medianos ingresos. Se estima además, que este valor superará los 13 millones para el 2030. Aunque existen diferencias según el sexo, los principales cánceres causantes de muerte son: pulmonar (1,37 millones de defunciones); gástrico (736.000 defunciones); hepático (695.000 defunciones); colorrectal (608.000 defunciones); mamario (458.000 defunciones); y

cervicouterino (275.000 defunciones), melanoma (25.860 defunciones), entre otros (OMS, 2012).

Durante el proceso de génesis tumoral las células se transforman, presentando la capacidad de replicarse rápida y sostenidamente, pudiendo invadir tejidos adyacentes o alcanzar órganos lejanos a su ubicación primaria, proceso denominado metástasis.

Se ha establecido que la generación del cáncer se debe a cambios dinámicos en el genoma, como lo es la activación de oncogenes que generan un aumento dominante de su función o por mutaciones recesivas de genes con función supresoras de tumores. Ambas clases de genes cancerígenos han sido identificados a través de la alteración de su expresión en células tumorales humanas y animales. Dentro de los procesos celulares que se alteran por estos cambios genómicos encontramos la autosuficiencia en señales de crecimiento, la insensibilidad a las señales que frenan el crecimiento, el potencial replicativo ilimitado, la invasión tisular y metástasis, la evasión de la apoptosis, y la producción de sustancias angiogénicas (Hanahan and Weinberg, 2000). Más recientemente, se han agregado una nueva serie de alteraciones celulares que se involucran en la transformación de éstas en células tumorales, como desregulación energética celular, evasión de la destrucción inmunológica, inestabilidad genómica y mutaciones y promoción de inflamación tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figura 1).

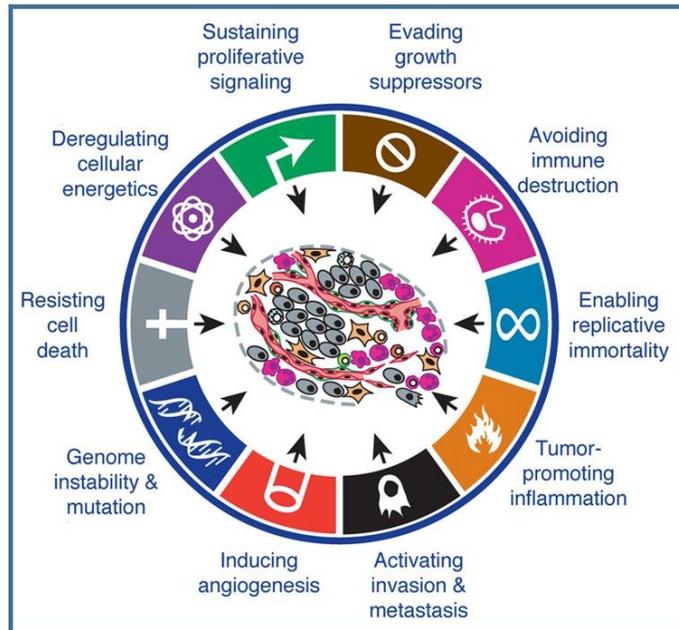


Figura 1: Habilidades adquiridas por células cancerosas: Para que una célula se transforme en una tumoral debe cumplir una serie de modificaciones fenotípicas (Hanahan and Weinberg, 2011).

La modificación en la expresión proteica, conlleva cambios en el patrón de expresión antigénica, ya sea por la aparición de los denominados neoantígenos, o por el aumento de antígenos ya existentes, siendo denominados como Antígenos Asociados a Tumores (TAA). Estos pueden ser reconocidos por el Sistema Inmune generando, por ejemplo, linfocitos T específicos (Dunbar *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 1998). Existe además, una correlación positiva entre la infiltración de linfocitos y el pronóstico del paciente (Clemente *et al.*, 1996), indicando la presencia de mecanismos de inmunovigilancia que controlan la progresión del tumor, sin embargo, en algunos pacientes con cáncer, esta respuesta puede estar total o parcialmente suprimida. De esta forma, ciertos tumores evaden la respuesta inmune específica regulando negativamente la expresión de moléculas, como por ejemplo, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) en la superficie celular, reduciendo así la presentación antigénica (Cabrera *et al.*, 1996; Cromme *et al.*, 1994).

En el proceso de metástasis, algunas células tumorales adquieren la habilidad de migrar fuera del tumor primario e invadir órganos distantes donde forman un tumor secundario, transformando un tumor primario en una enfermedad sistémica. La invasión incluye la activación de vías de señalización que controlan la dinámica del citoesqueleto, el nivel de unión a la matriz extra celular (MEC) y de la unión célula-célula, seguida de la migración de las células a tejidos adyacentes o lejanos (Chambers *et al.*, 2002; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Sahai, 2007). La migración es un proceso esencial en una gran variedad de fenómenos biológicos, tanto normales como patológicos, controlando la homeostasis, por ejemplo, de la respuesta inmune o en la reparación de heridas (Steffensen *et al.*, 2001). También requiere de la regulación e integración de múltiples vías de señalización que controlan la polarización de la célula, la generación de un frente de avance hacia la dirección de movimiento. Además, se requiere la unión de receptores de adhesión a ligandos de la MEC, formando conexiones con el citoesqueleto, los que sirven como puntos de tracción para la migración (Friedl and Alexander, 2011).

Un modelo ampliamente descrito para estudio de la biología y tratamiento tumoral, es el melanoma murino B16-F10. Estas células tienen la capacidad de crecer *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 (modelo singénico) (Fidler, 1975; Nicolson *et al.*, 1978). Además, este modelo permite abordar tanto el crecimiento de tumor primario como de metástasis, gracias a que sus células pigmentadas facilitan su identificación de forma macroscópica.

III.2. Apoptosis

Se considera la apoptosis o muerte celular programada como el proceso que regula la homeostasis de tejidos y órganos mediante la eliminación de células senescentes o dañadas. La disminución de este proceso puede desencadenar el desarrollo de patologías como el cáncer o

desordenes vasculares, así como su aumento en cuadros como falla cardiaca congestiva, entre otros.

La apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos que incluyen la activación de enzimas proteolíticas intracelulares específicas (caspasas) que se unirán a una variedad de sustratos nucleares y citoplasmáticos. Puede iniciarse como resultado de un suministro insuficiente de señales de supervivencia o ser inducido por varios tipos de daño celular como la hipoxia, especies reactivas de oxígeno, ataque del sistema del complemento, óxido nítrico, citoquinas como son el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) o el ligando para el receptor de muerte celular Fas (CD95). Todo esto desemboca en una serie de cambios en la superficie celular, como lo es la exposición de fosfatidilserina al exterior de la membrana, la cual normalmente se encuentra hacia el interior de la célula, resultando en la captación y degradación rápida de células apoptóticas por células fagocíticas residentes localmente o infiltradas. Este proceso es tan rápido que, en un tejido normal, prácticamente no encontramos células apoptóticas (Stuart and Hughes, 2002).

La apoptosis involucra una serie de familias de proteínas que regulan, tanto la vía activada por receptores de muerte en la superficie celular (vía extrínseca) (Figura 2A), como la iniciada por la mitocondria (vía intrínseca) (Figura 2B). Se han descrito, entre otras, la familia de las Bcl-2, conformada por las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bid, Bad y Bim, y las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-XL. Por otro lado, encontramos la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), dirigidas por la proteína SMAC/DIABLO. Las IAP se caracterizan por presentar dominios de alrededor de 70 amino ácidos (aa), denominados Repetición Baculovirus IAP (BIR), evolutivamente conservado en virus, hongos, nematodos, insectos y mamíferos (Li, 2003). Se han establecido ocho miembros proteicos de esta familia: NIAP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Ts-IAP, Apollon, Livin y Survivina (Surv) (Nachmias *et al.*, 2004; Salvesen and Duckett, 2002).

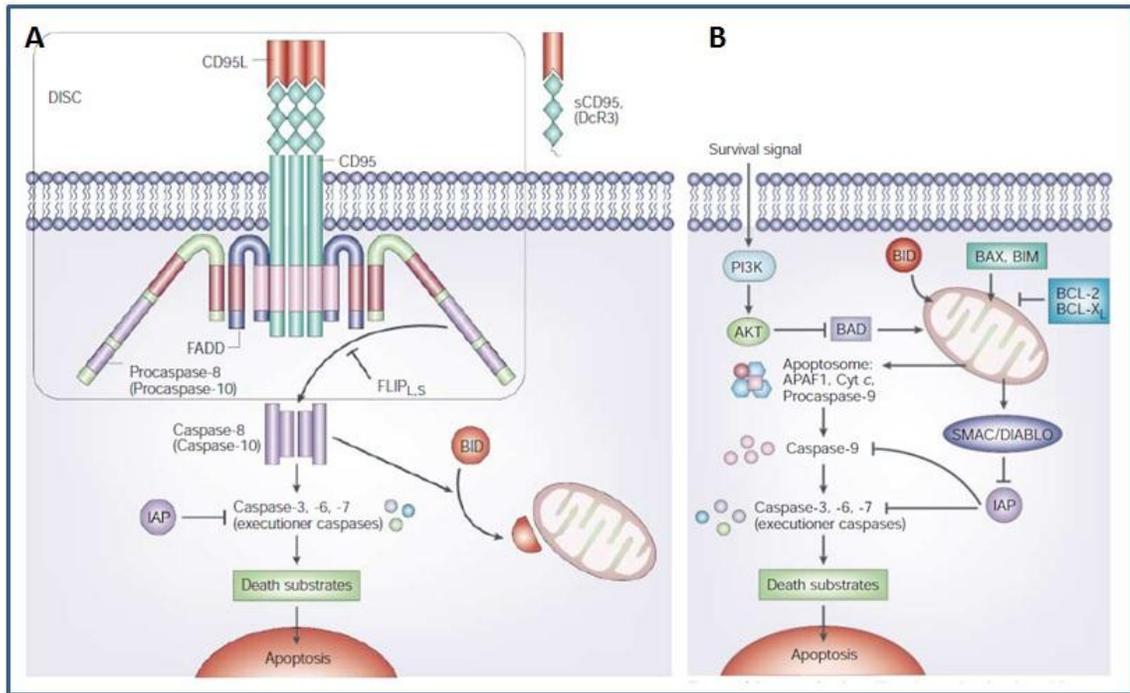


Figura 2: Vías de señalización de la Apoptosis: A. Vía apoptótica dependiente de receptor extrínseca: La unión de ligandos de muerte (en este caso representado por CD95L, como ejemplo) a su receptor, conduce a la formación del complejo de señalización (DISC) que induce muerte celular. En DISC, el dominio de la proteína FAS asociado a muerte (FADD) recluta al iniciador Pro-caspasa 8, activado por una proteólisis autocatalítica. Esta vía puede ser inhibida por proteínas que evitan la unión de los ligandos ó la activación de las caspasas, denominadas proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). **B. Vía apoptótica mitocondrial (intrínseca):** La activación de esta vía conlleva la liberación de Citocromo C (Cyt C) al citosol, donde se une al factor 1 activador de la proteasa apoptótica (APAF1) para formar el apoptosoma activando la caspasa-9. La inhibición puede ser realizada en diferentes niveles por proteínas anti-apoptóticas, incluyendo la familia Bcl2 (Bcl2 y Bcl-XL) y la familia de las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), que son dirigidas por la proteína SMAC/DIABLO. Otros mecanismos son las señales de supervivencia, tales como factores de crecimiento y citoquinas que activan la vía PI3K, y ésta a la AKT, que fosforila e inactiva de la proteína pro-apoptótica Bad (Igney and Krammer, 2002).

III.3. Survivina

Surv es el miembro más pequeño de la familia IAP, ya que contiene solo un dominio BIR (Ambrosini *et al.*, 1997). Regula tanto la división como la supervivencia celular, expresándose en bajas cantidades y brevemente durante la mitosis. Sin embargo, se ha visto su sobreexpresión en la mayoría de los cánceres humanos, encontrándose en estos casos en niveles muy altos en forma continua, suprimiendo la apoptosis y ayudando en la división celular (Reed and Bischoff, 2000).

Su gen se localiza en el cromosoma humano 17q25.3, codificando una proteína de 16,5 kDa conformada por 142 aa (Mahotka *et al.*, 1999); basados en el número de veces que *Surv* es transcrito en tumores, comparado con células y tejidos normales, se sitúa entre los 5 genes humanos más expresados como tumor específico, (Reed, 2001). Existen 4 “*splicing*” alternativos para el gen humano de *Surv*, los que se traducen en 4 diferentes proteínas: *Surv*, *Surv-2B*, *Surv-ΔEx3* (Mahotka *et al.*, 1999), y *Surv-3B* (Badran *et al.*, 2004), para las cuales se han establecido diferencias en su rol en el desarrollo tumoral de acuerdo a su nivel de expresión y localización intracelular. Por ejemplo, se reportó que la expresión de *Surv-2B* es predominante en algunos neuroblastomas con buen pronóstico, pero es expresada en bajos niveles en la mayoría de los tejidos malignos (Islam *et al.*, 2000), así como en etapas tardías tumorales (Mahotka *et al.*, 2002), a diferencia de lo que ocurriría en estadios tempranos (Krieg *et al.*, 2002; Meng *et al.*, 2004). Esto podría indicar una improbable relación con el desarrollo del cáncer y una correlación inversa con la diferenciación e invasión tumoral. Curiosamente, al analizar 79 casos de cáncer gástrico encontramos que *Surv*, *Surv-2B* y *Surv-ΔEx3* se expresan en el 100, 78,5 y 64,6% de los casos, respectivamente (Meng *et al.*, 2004). Estas observaciones, y otras, sugieren que la expresión de las variantes de *Surv* son reguladas diferencialmente (Li, 2005).

Generalmente, Surv es expresada en el tejido embrionario, pero es indetectable en tejidos adultos normales, a excepción del timo y placenta (Ambrosini *et al.*, 1997), hígado (Deguchi *et al.*, 2002), testículos (Wang *et al.*, 2004) y epitelio gástrico humano (Valenzuela *et al.*, 2010), es decir, en tejidos que se caracterizan por su auto-renovación y proliferación. Además, se le atribuye un rol regulador de las células endoteliales vasculares, polimorfonucleares, células T, eritroides y progenitoras hematopoyéticas, sin embargo esta expresión es significativamente menor que en las células transformadas (Altieri, 2003; Pennati *et al.*, 2007).

El mecanismo de acción por el cual Surv bloquea el proceso de apoptosis es aún una controversia, sin embargo, parece basarse en su interacción con otras moléculas. Es así como, en lugar de la inhibición directa de caspasas efectoras, Surv mitocondrial controla la liberación de SMAC/DIABLO inducida por los fármacos quimioterapéuticos desde las mitocondrias y con ello reduce el índice de células apoptóticas. Además, Surv se ha asociado con la inhibición de la liberación del factor inductor de apoptosis (AIF) desde las mitocondrias y su translocación al núcleo. En conjunto, estos resultados sugieren que la expresión de la Surv es importante en la prevención de la apoptosis dependiente e independiente caspasas (Revisado en (Lladser *et al.*, 2011).

Por otra parte, la expresión de Surv se asocia a su unión a los microtúbulos del huso mitótico, manifestando características oncogénicas por el arresto celular en el punto de chequeo entre G2/M (Takeuchi *et al.*, 2005). La alta prevalencia de Surv en cánceres coincide con su habilidad para promover directamente la viabilidad celular tumoral, controlando, además de la apoptosis, de distintos niveles de la mitosis y progresión del ciclo celular. Es así como, se ha descrito su presencia en carcinomas gastrointestinales (Kawasaki *et al.*, 2001; Mesri *et al.*, 2001), esofágico (Tu *et al.*, 2003), pulmonar (Altieri, 2006), mamario (Ryan *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2006), ovárico (Cohen *et al.*, 2003), hepático (Bachinsky *et al.*, 2005), pancreático (Siegel *et*

al., 2003), prostático (Kishi *et al.*, 2004), de células renales (Byun *et al.*, 2007), así como en leucemia (Adida *et al.*, 2000a; Ambrosini *et al.*, 1997), entre otros.

La complejidad de la vía de Surv puede extenderse más allá de poblaciones de células tumorales, particularmente por el incremento de su expresión en las células endoteliales durante la fase proliferativa y de remodelación de la angiogénesis tumoral (Altieri, 2008). De esta forma, durante la angiogénesis, Surv es sobre expresada por las células endoteliales, con estímulos angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), *in vitro* e *in vivo*, pero es indetectable en células endoteliales quiescentes (O'Connor *et al.*, 2000; Papapetropoulos *et al.*, 2000; Tran *et al.*, 1999).

Además, Surv promueve la resistencia a drogas y radiación (un factor determinante en la respuesta del tumor a la radioterapia es la inducción del apoptosis endotelial vascular, proceso mediado por Surv) (Capalbo *et al.*, 2010; Grossman and Altieri, 2001; Lu *et al.*, 2004). Clínicamente, la presencia de Surv en células cancerígenas humanas se asocia con baja sensibilidad a la quimioterapia (Grossman and Altieri, 2001), incremento en la agresividad tumoral (Kishi *et al.*, 2004; Kosari *et al.*, 2005) y disminución de la supervivencia del paciente (Kawasaki *et al.*, 1998; Monzo *et al.*, 1999; Swana *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). Por otro lado, ensayos recientes han demostrado que el cultivo de células cancerosas con un medio acondicionado con Surv, tiene mayor potencial de replicación y capacidad metastásica, lo que sugiere que Surv, en el microambiente tumoral, puede estar directamente asociada a la progresión maligna y metástasis (Altieri, 2008; Khan *et al.*, 2009; Mehrotra *et al.*, 2010).

Algunos estudios pre-clínicos, demuestran que la supresión de la expresión y función de Surv es altamente perjudicial para la progresión del tumor. Así también, se ha detectado pacientes con

cáncer que presentan espontáneamente linfocitos T citotóxicos específicos para Surv (Andersen *et al.*, 2001a; Andersen *et al.*, 2001b). Éstos también pueden ser generados *in vitro* en pacientes normales (Schmitz *et al.*, 2000), inmunogenéticamente restringidos para los epitopos de Surv HLA-A*0201 (HLA-A2.1) (Andersen *et al.*, 2001a; Andersen *et al.*, 2001b; Casati *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 2000; Siegel *et al.*, 2004) y otros alelos de histocompatibilidad (Bachinsky *et al.*, 2005; Hirohashi *et al.*, 2002; Reker *et al.*, 2004a; Reker *et al.*, 2004b).

Por todo lo descrito, Surv es considerada un Antígeno Asociado a Tumores (TAA), recibiendo considerable atención como blanco potencial en el tratamiento del cáncer (Altieri, 2006; Pennati *et al.*, 2007) y como blanco ideal para una vacuna de DNA, prestándose para amplios usos terapéutico. Una alternativa atractiva para un ataque directo, solo sobre células tumorales, será inhibir el crecimiento tumoral y metástasis, mediante el ataque simultaneo, tanto al tumor como a su vasculatura, generando una respuesta efectiva de linfocitos T contra Surv. Así se posibilitará la apoptosis, tanto de la célula tumoral como de la endotelial, suprimiendo la angiogénesis (Xiang *et al.*, 2005).

Hasta la fecha, la inmunoterapia pre-clínica de fase I, básicamente usando células dendríticas cargadas con péptidos derivados Surv (Siegel *et al.*, 2003; Zeis *et al.*, 2003) ha sido parcialmente satisfactoria (Idenoue *et al.*, 2005; Otto *et al.*, 2005; Tsuruma *et al.*, 2004; Wobser *et al.*, 2006). Alternativamente, la inmunización con DNA emergió como alternativa más barata y segura, que induce inmunidad tumoral más fácilmente (Bronte, 2001; Gurunathan *et al.*, 2000b; Liu, 2003; Pecher, 2002; Reyes-Sandoval and Ertl, 2001). Así, la inmunización con DNA desnudo estimula la respuesta humoral y celular contra Surv (Decker *et al.*, 2006; Lladser *et al.*, 2006). Esto combinado con estrategias mejoradas de entrega del antígeno para la activación de la respuesta de linfocitos T anti-Surv, reduce el crecimiento tumoral (Lladser *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2005).

En el Laboratorio de Comunicaciones Celulares clonamos el cDNA de Surv humana desde células tumorales de adenocarcinoma de colon humano HT-29 en diferentes vectores para su expresión en células eucariontes y bacterianas. Las construcciones plasmidiales *pcDNA3.1-Surv* (*pSurv*) y *pSecTag2b-Surv* (*pSec-Surv*) produjeron las formas intracelular y secretable de la proteína, respectivamente. Así también, ambas construcciones fueron utilizadas para la inmunización en el modelo murino Balb/c, donde se logró determinar que la inmunización intramuscular con DNA plasmidial desnudo (acompañados del plasmidio *pGM-CSF*) que puede mediar en forma apropiada una inmunorespuesta contra Surv, *in vivo* (Lladser *et al.*, 2006). Se realizaron ensayos posteriores en el modelo murino C57BL/6, con el plasmidio *pSurv*, cambiando la modalidad de inmunización (desde intramuscular al cojinete plantar). Como adyuvantes se utilizó secuencias CpGs no metiladas (frecuentes en el DNA bacterial) (TLR-L 9) y ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C) (secuencias de doble hebra de RNA que sirven de ligando para receptores tipo Toll, asociados a infección viral) (TLR-L 3). Como resultado de estas variaciones se logró la reducción del crecimiento tumoral (volumen), acompañado de una mayor sobrevivencia de los ratones. Sin embargo, dado que las respuestas son moderadas, en los estudios presentados aquí intentamos innovar sobre estos resultados, incorporando otra molécula con efectos anti-angiogénicos y anti-tumorales (datos no publicados).

III.4. Inmunización Genética y Cáncer

Uno de los acercamientos al desarrollo de una inmunoterapia para el cáncer, depende de la identificación de mecanismos que interfieren con el crecimiento de las células tumorales, por ejemplo, induciendo la inactividad, destrucción celular o supresión de la proliferación. En este contexto, la inmunización genética corresponde a la entrega *in vivo* de genes funcionales en vectores eucariontes que expresan el antígeno en cantidades relevantes (pico a nanogramos por ml de plasma), y a su presentación a las células inmunocompetentes (Donnelly *et al.*, 2000). Los péptidos derivados del procesamiento proteosomal de proteínas

intracitoplasmáticas se unen a moléculas MHC I para su presentación en la superficie de la célula tumoral. El receptor del linfocito T se une al complejo péptido/MHC I iniciando una respuesta inmune que culmina en muerte celular (Gordan and Vonderheide, 2002). De esta forma se induce fuertes respuestas humorales B y T CD4+ y CD8+ contra una variedad de antígenos, incluyendo los tumorales (Feltquate, 1998; Gurunathan *et al.*, 2000a). La entrega del gen o vacuna de DNA que estimule una respuesta inmune contra varios antígenos tumorales puede utilizarse con éxito, puesto que la mayoría de las células cancerosas expresará por lo menos uno de los antígenos. Sin embargo, se puede esperar mejores resultados si la vacuna incluye específicamente un “TAA universal” reconocido por linfocitos T (Renkvist *et al.*, 2001), como es Surv.

La inmunización genética ofrece ventajas sobre las vacunaciones convencionales, como el ser altamente efectiva al inducir memoria duradera, mediada principalmente por linfocitos T, en modelos pre clínicos. Por otro lado, se utilizan moléculas adyuvantes, coexpresándolas en el plasmidio, como citoquinas o quimioquinas apropiadas que potencian la eficiencia de la vacuna y generan una respuesta inmune efectiva (Zhou *et al.*, 2005). Además, la eficacia de las vacunas de DNA se puede mejorar mediante el uso de adyuvantes, moléculas de que potencian la respuesta inmune. Una gran gama de citoquinas que estimulan las diversas vías del sistema inmune se han usado como adyuvantes. Las citoquinas pueden ser administradas directamente o estar codificadas en un vector de expresión (vectores virales, plasmidios), ya sea en el mismo vector del antígeno o en un vector distinto (fusión o plasmidio bicistrónico). Otra posibilidad es utilizar secuencias de DNA o RNA, bacterianas o virales, que actúan como inmunoestimulantes, conocidos agonistas de “Receptores Tipo Toll” (TLR-L). Un ejemplo de estas últimas son las secuencias CpGs no metiladas. Se ha demostrado que combinando agonistas de distintos TLRs se generan efectos sinérgicos sobre la activación de las DCs y una respuesta de CTLs potente (Napolitani *et al.*, 2005; Warger *et al.*, 2006; Whitmore *et al.*, 2004).

A pesar de todas estas características atractivas, las actuales vacunas basada en DNA todavía requieren mejoras considerables, sobre todo en la selección de blancos antigénicos y de coadyuvantes moleculares más eficaces.

III.5. Angiogénesis

La angiogénesis corresponde a la formación de nuevos vasos sanguíneos desde otros pre-existentes. Dicho proceso cumple una función crítica en el desarrollo del cáncer. Los tumores menores a 2 mm³ no requieren vascularización, sin embargo, para tamaños mayores la difusión no es un mecanismo eficiente para la recepción de nutrientes y oxígeno, así como la remoción de desechos metabólicos. Se genera un estado de hipoxia celular, la que constituye un factor desencadenante para la angiogénesis (Moeller *et al.*, 2004), por lo que, este proceso biológico es considerado como blanco estratégico para el tratamiento anti-cancerígeno.

La angiogénesis es esencial en muchas condiciones fisiológicas, como el desarrollo embrionario, ovulación y reparación, o patológicas como artritis, retinopatía diabética, endometriosis y tumores. El proceso es controlado por un fino balance entre moléculas reguladoras negativas y positivas, lo que nos lleva al concepto de "switch" angiogénico, el cual depende del incremento de uno o más factores reguladores positivos. Estos pueden ser exportados desde células tumorales, movilizadas desde la matriz extracelular o liberados desde células inflamatorias. Es así como, numerosos inductores de angiogénesis han sido identificados, incluyendo miembros de la familia de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de permeabilidad vascular/factor de crecimiento endotelial (VPF/VEGF), angiogenina, factor de transformación del crecimiento alfa y beta (TGF- α y $-\beta$), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquinas, quimoquinas y angiopoyetinas (Ribatti *et al.*, 2000). Existen

además, una gran cantidad de agentes que retrasan este proceso, promoviendo la regresión de tumores en crecimiento o ya establecidos (Cao, 2005; Ferrara and Kerbel, 2005; Griffin *et al.*, 2006).

III.7. Sistema del Complemento

El Sistema del Complemento corresponde a un sistema de reconocimiento y destrucción de virus, bacterias, hongos, parásitos, células apoptóticas y neoplásicas. Está conformado por aproximadamente 40 moléculas, presentes en el plasma o sobre membranas biológicas. Tal como ocurre con los procesos de activación de la coagulación, la activación del complemento implica la activación sucesiva de precursores de serino proteasas plasmáticas. El encuentro, reconocimiento y destrucción, genera un estado de inmunidad que permite al individuo reaccionar en forma más efectiva en el eventual de reencuentro con el agresor, mediante mecanismos de defensa inmune innata y adaptativa.

Las vías de activación del sistema del complemento son tres: clásica, de las lectinas y alterna. La activación de las rutas clásica y de las lectinas es iniciada por los complejos C1 (q, r, s) y MBL-MASP, respectivamente. La ruta alterna puede ser activada por ciertos tipos de membranas biológicas y cumple un importante rol amplificador. Estas actividades generan péptidos opsonizantes, proinflamatorios, destructores de membranas biológicas y estimuladores de las inmunidades innata y adquirida. Las convertasas de C3 (C4b,2b ó C3b,Bb), generan C3b que, junto con C4b, se unen covalentemente y opsonizan a membranas extrañas antigénicas, “direccionándolas” hacia órganos linfoides, donde se inicia la respuesta inmune adaptativa. Las convertasas de C3 y de C5 (C4b,2b,3b ó (C3b)_n,Bb) median la generación de verdaderos canales líticos macromoleculares ó complejos de ataque a membranas (MAC ó C5b-9). El arte del sistema consiste en focalizar las acciones líticas, opsonizantes e inmunoestimuladoras sobre

membranas biológicas de agresores y no sobre membranas propias, vecinas, “inocentes”. Las anafilotoxinas (C3a, C4a, C5a), generadas durante la activación, facilitan el acceso de células inmunocompetentes al sitio de la agresión. La activación del sistema es estrictamente controlada por proteínas reguladoras, presentes en fase soluble y unidas a membranas, que median la degradación enzimática de componentes activos, impiden la generación de convertasas, desensamblan aquellas ya generadas, bloquean a serino-proteasas ó inhiben la generación del MAC. La activación descontrolada del sistema, ó la deficiencia de algunos componentes, genera una variedad de patologías (Ferreira, 2005).

Desde su descubrimiento, el sistema del complemento ha sido considerado como un efector primario de la inmunidad con la habilidad de limpiar de patógenos mediado por anticuerpos, disponer de las células muertas y causar cuadros inflamatorios. Este último es un factor patogénico reconocido en un amplio espectro de enfermedades inflamatorias crónicas como artritis reumatoide, glomerulonefritis, aterosclerosis, asma y esclerosis múltiple, causado principalmente por la ausencia, alteración o la hiperactividad de las proteínas del complemento (Rutkowski *et al.*, 2010). En el caso del cáncer, existen evidencias de la contribución de la activación del complemento en su progresión. Las células tumorales adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas que determinan su crecimiento maligno. Debido a estas alteraciones, el sistema del complemento puede reconocer las células tumorales, depositando sus componentes en la superficie de ellas. Sin embargo, estas células pueden resistir sus efectos dañinos por mecanismos intra y extracelulares. Es así como, se ha descrito que las proteínas del complemento pueden facilitar la carcinogénesis mediante la desregulación de las vías de señalización mitogénica, sostener la proliferación celular, angiogénesis, insensibilidad a la apoptosis, invasión y metástasis, y escape de la inmunovigilancia (Rutkowski *et al.*, 2010). Por ejemplo, estudios en un modelo murino de cáncer cervical muestran que la generación de la anafilotoxina C5a en el microambiente tumoral conduce a la progresión de este mediante por el reclutamiento de células supresoras derivadas de la línea mieloide, generando un microambiente inmunosupresor. Además, en un modelo de cáncer pulmonar se ha demostrado que C5a puede estar relacionado con la angiogénesis, al inducir genes que promueven los

efectos de VEGF, proliferación y migración de células endoteliales *in vitro*, sin embargo su rol *in vivo* aun es controversial (Corrales *et al.*, 2012).

Por otra parte, en este trabajo nos centraremos en la capacidad de C1 de interactuar con proteínas chaperonas como calreticulina, con consecuencias en la inmunogenicidad del modelo tumoral usado en estos estudios (*vide infra*).

III.7. Calreticulina

Calreticulina (CRT) ha sido aislada de todas las células eucariontes, excepto eritrocitos y levaduras, siendo bien conservada a lo largo de la evolución, tanto en su organización genómica como en su secuencia amino acídica, lo que sugiere un importante rol en la función celular. Es una molécula de 46 kDa, que se inicia con una secuencia líder seguida de tres dominios funcionales: N, P y C. Los dominios N y P muestran el mayor grado de conservación en las distintas especies, sugiriendo importantes roles en la función básica de la proteína. Aunque presenta una secuencia KDEL de retención en el retículo endoplásmico (RE), CRT también ha sido localizada en los gránulos citoplásmicos de linfocitos T citotóxicos, en el acrosoma de los espermios, en glándulas salivales, en la superficie celular (pese a no poseer dominio de transmembrana) e incluso en circulación sanguínea (Gelebart *et al.*, 2005; Michalak *et al.*, 1999; Yokoyama and Hirata, 2005). Además, recientemente hemos identificado la presencia de CRT en la saliva humana y canina (Coddou, 2012).

CRT participa en la regulación de la homeostasis del calcio y como chaperona en el plegamiento de las nuevas glicoproteínas formadas. El rol fundamental de esta proteína se hace evidente en ratones “knock out” para CRT. Estos mueren *in útero* 14,5 - 16,5 días post fecundación, debido

al incorrecto desarrollo cardiaco, como resultado de la desregulación de la homeostasis del calcio en el RE.

CRT es una chaperona tipo lectina que se asocia a péptidos entregados en el RE por los transportadores TAP, con MHC I- β 2 microglobulina, involucradas en el procesamiento y presentación antigénica (Gao *et al.*, 2002; Sadasivan *et al.*, 1996; Turnquist *et al.*, 2002; Wearsch *et al.*, 2004). CRT interfiere en la unión de las células endoteliales a componentes de la MEC (Yao *et al.*, 2002), modula la expresión génica y la fagocitosis de células apoptóticas e inhibe la actividad del sistema del complemento dependiente de C1q (Ferreira *et al.*, 2004b). Recientemente, hemos demostrado que CRT de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), no solo compite con el complejo tetramérico (C1r-C1s)₂ para unirse a las colas colagenosas de C1q, sino que también interfiere con la actividad de C1s, sin la liberación de las serino proteasas del módulo de reconocimiento de C1q. Esto media una disminución importante en la generación de C4b, interfiriendo así con la activación de la vía clásica y por ende, con importantes consecuencias en la relación huésped/parásito (Valck *et al.*, 2010).

CRT y su extremo amino de 180 aa (dominio tipo vasostatina) inhiben la proliferación celular, la angiogénesis y el crecimiento tumoral *in vivo* (Pike *et al.*, 1998; Pike *et al.*, 1999). La co-administración de complejos MHC /péptido-CRT aumenta la repuesta péptido-específica de los linfocitos T citotóxicos (Nair *et al.*, 1999). Por otra parte, cuando se une a péptidos derivados de tumores, CRT tiene efectos anti-tumorales (Bronte, 2001). Así, la vacuna de DNA que codifica CRT fusionada a antígenos tumorales, aumenta la respuesta inmune antígeno-específica y promueve los efectos anti-tumorales independiente de células T (Cheng *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005). Además, la inmunización con DNA con cada uno de los tres dominios de CRT potencia la respuestas de linfocitos T, siendo la molécula completa y el dominio vasostatina los que muestran un mayor efecto anti-angiogénico (Cheng *et al.*, 2005).

Se ha planteado además, que la quimioterapia con drogas anti-neoplásicas como las antraciclinas y oxaliplatina, ó con radiación ionizante, genera una inducción de muerte celular inmunogénica, mediante la traslocación de CRT a la superficie de las células tumorales, promoviendo su fagocitosis por células dendríticas (Aguilera *et al.*, 2011; Obeid *et al.*, 2007; Zitvogel *et al.*, 2010).

Como se mencionó anteriormente, la alta homología en la secuencia de CRT entre las diferentes especies, incluyendo la molécula humana, especialmente en el fragmento tipo vasostatina, explica la posible función conservada de la proteína desde organismos evolutivamente distantes, incluyendo patógenos protozoarios, con un 46% de identidad y 60% de homología con el fragmento anti-angiogénico funcional de CRT humana (HuCRT) (aa 120-180) (Ferreira *et al.*, 2004b).

Desde 1931, los investigadores de las ex URSS Klyuyeva y Roskin, describieron que la infección con *Trypanosoma cruzi* inhibe el crecimiento tumoral en modelos experimentales murinos, y también en terapias en humanas (Klyuyeva and Roskin, 1946; Krementsov, 2004; Roskin and Kolomina, 1964). Estos autores, entre otros hallazgos concluyeron que los parásitos presentan un tropismo por tumores, además de los órganos y tejidos que ellos normalmente invaden. Las células tumorales infectadas presentan, según estos autores, un importante deterioro en su viabilidad, lo que también ocurriría con los parásitos que las infectan (Klyuyeva and Roskin, 1963; Krementsov, 2004; Roskin, 1946). (Los estudios de Klyuyeva y Roskin se realizaron en el contexto de la Guerra Fría, entre USA y la ex URSS y fueron interrumpidos por circunstancias políticas que se detallan en los libros citados anteriormente). Desde esa época a la fecha se han publicado un número importante de trabajos, por diversos laboratorios (Batmonkh *et al.*, 2006; Danilova and Kallinikova, 1968; Hauschka and Goodwin, 1948; Kallinikova *et al.*, 2001; Sheklakova *et al.*, 2003), sin que se haya identificado las bases moleculares que expliquen, al menos parcialmente, el efecto antitumoral de la infección parasitaria.

Durante 1991, en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), se describió una molécula de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Ramos *et al.*, 1991), que luego se identificó como Calreticulina (TcCRT) (Aguillon *et al.*, 2000). Más recientemente, en el LIAM se ha demostrado que TcCRT es una molécula importante en la definición de diversos parámetros de la interacción hospedero/parásito. Así, TcCRT inhibe la ruta clásica y de las lectinas del sistema del complemento humano (Ferreira *et al.*, 2004b; Valck *et al.*, 2012), promueve la infectividad parasitaria (Ramirez *et al.*, 2011; Valck *et al.*, 2010), inhibe la angiogénesis (Duaso *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 2005) y, por ende, el crecimiento de tumores, en diversos protocolos experimentales.

T. cruzi transloca CRT (TcCRT), desde el RE a la superficie celular, lo que podría mediar, al menos en parte, la inhibición tumoral que se ha reportado para la infección con *T. cruzi*, dadas las características anti-angiogénicas de TcCRT. Esta cualidad de la proteína parasitaria recombinante y nativa, se ha demostrado inhibiendo significativa y específicamente la angiogénesis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (*Gallus gallus*) en concentraciones absolutas de picogramos, *in vivo* (Molina *et al.*, 2005). Más aún, TcCRT y su dominio tipo Vasostatina inhiben fuertemente el ensamblaje *in vitro* de estructuras tipo capilar por células endoteliales venosas de cordón umbilical humano (HUVECs), interactuando directamente con ellas, y también la generación *ex vivo* de nuevos capilares arteriales, a partir de anillos de aorta de rata (*Rattus rattus*), ambos ensayos realizados en Matrigel (Lopez *et al.*, 2010). Así también, TcCRT inhibe la migración de endotelios murinos, hacia tapones de Matrigel implantados s.c. (Duaso *et al.*, 2012). Resultados recientes demuestran que, de manera similar a la Vasostatina, descrita en humanos (Pike *et al.*, 1998), TcCRT une laminina de manera específica y saturable (Lopez *et al.*, 2010). El conjunto de estos experimentos, y aquellos *in vivo*, indican un efecto anti-angiogénico de TcCRT sobre endotelios arteriales y venosos, en cuatro especies vertebradas. Estos efectos son, en general, más potentes que los de la proteína humana (HuCRT), cuando se las compara en términos equimolares. Los resultados antes mencionados (las bajas concentraciones requeridas para ejercer los efectos

anti-angiogénicos, el tropismo reportado de los parásitos por tejidos neoplásicos, la capacidad del parásito para translocar CRT hacia el exterior y, nuestra demostración del efecto anti-tumoral *in vivo* de TcCRT sobre un tumor mamario (Lopez *et al.*, 2010)), podrían explicar, al menos parcialmente la capacidad anti-neoplásica de la infección experimental de *T. cruzi*, propuesta por Roskin y Klyuyeva. En concordancia con estos autores, recientemente, en nuestro laboratorio, hemos determinado que la infección con *T. cruzi* inhibe el crecimiento de un adenocarcinoma mamario, resistente al Metotrexato (TA3-MTX-R) (Figura 3) (Aguilar, Valck *et al*, manuscrito en preparación).

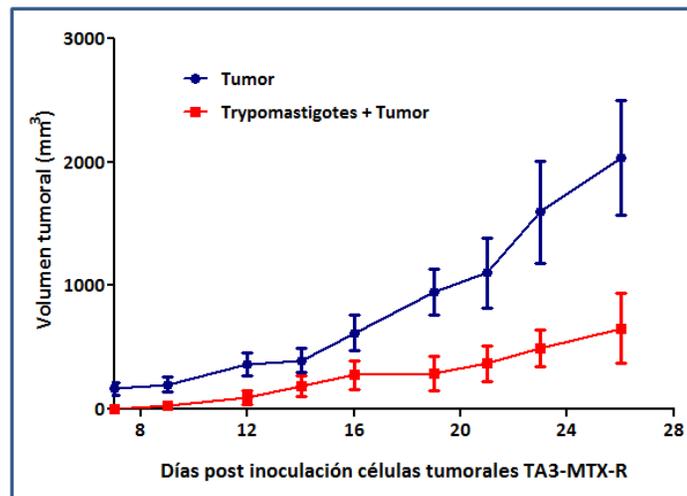


Figura 3: La infección con *Trypanosoma cruzi*, inhibe el crecimiento del adenocarcinoma mamario murino TA3-MTX-R. 7 ratones A/J fueron infectados con tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. Al día 12, peak de la parasitemia, se les inoculó las células tumorales, así como a un grupo control de otros 7 animales. Se midió el crecimiento tumoral de manera estándar, doble ciega, hasta que los tumores alcanzaron entre 2.500-3.000 mm³. (Wilconxon Run Test, p= 0,0039, con un poder estadístico del 98%).

La función anti-angiogénica de TcCRT se manifiesta en especies tan distantes evolutivamente como lo son el protozoo *T. cruzi* y humanos. Por ello, es evolutivamente aceptable que este fenómeno funcional haya emergido en protozoos, quizás para proteger a sus hospederos de agresiones prevalentes como lo son las neoplasias. Esto representaría una ventaja adaptativa obvia para el parásito. Por estas razones, proponemos aquí el uso de la proteína parasitaria

como paradigma anti-angiogénico. Reservando el uso de CRT humana como control comparativo.

III.8. Survivina y Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* combinadas como agentes antitumorales

Hasta el momento, las evidencias experimentales disponibles indican que los blancos moleculares que median la acción de la respuesta a la inmunización con *Surv*, son diferentes de aquellos que median la acción de TcCRT. Así, TcCRT interacciona con los endotelios, presumiblemente a través de un receptor tipo scavenger, puesto que esta interacción es inhibida por Fucoídina (Lopez *et al.*, 2010). Por otra parte, una de las acciones más relevantes a este estudio, es el mecanismo inhibidor de tumores mediado por de la inmunización genética con *Surv* sobre endotelios, u otros mecanismos, concomitantes o no, tema que será de discusión más adelante en este documento. Esto nos llevó a plantear la necesidad de evaluar el efecto de la combinación de la inmunización genética con *Surv*, conjunta con la administración de TcCRT recombinante. Trabajamos con el melanoma B16-F10 que nos permite evaluar las dos formas en que se puede presentar el cáncer, un tumor primario y la metástasis.

Basados en los antecedentes y elementos racionales anteriores, proponemos, como Hipótesis de Trabajo de esta tesis, que la inmunización genética con *Surv* y la administración concomitante de TcCRT, genera en el animal experimental un retardo del desarrollo de tumores, mayor que cuando los animales son tratados con solo uno de estos productos.

IV. Hipótesis

La inmunización plasmidial con Survivina humana y la administración de Calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi*, retarda el crecimiento tumoral y metástasis en un modelo de melanoma murino

V. Objetivo General

Contribuir al conocimiento de mecanismos inhibidores del crecimiento tumoral, usando productos de origen humano y parasitario, como lo son la Survivina y la Calreticulina, respectivamente.

VI. Objetivos Específicos

1. Evaluar la capacidad de inhibir la formación de tumores mediante la inmunización con *pSurv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria.
2. Evaluar la capacidad de inhibir la reincidencia de la formación del tumor subcutáneo, tras la resección del tumor primario, mediante la inmunización con *pSurv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria.
3. Evaluar la capacidad de inhibir la metástasis pulmonar, mediante de la inmunización con los plasmidios que codifican *Surv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria.

VII. Materiales y Métodos

VII.1. Soluciones y Reactivos Comerciales

VII.1.1. Soluciones

- Medio de cultivo para células eucariontes RPMI 10% Suero Fetal Bovino (SFB): RPMI 1640, glucosa 4500 mg/ml, L-glutamina 584 mg/ml, piruvato de sodio 110 mg/ml, suplementado con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, esterilizado mediante filtros de nitrocelulosa de 0,2 μm y complementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 0,1 mg/ml y SFB al 10%.
- Coctel de inhibidores de proteasas BAL 1000x: 220 μL benzamidina 100 mg/ml, 440 μL Antipaina 10 mg/ml, 880 μL Leupeptina 12,5 mg/ml y 460 μL H_2O .
- Tampón de sonicado 100x: 20 μl de detergente (2 ml de SDS 10%, 100 μl NP-40 (IGEPAL) y 40 μl Hepes 20 mM), 2 μl de BAL 1000x, 4 μl de PMSF 500x, 40 μl de OVA 50 nM.
- Medio de cultivo para células procariontes Luria Bertani (LB): peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5g/L, esterilizado por autoclave.
- Solución Fekete: 100 ml de etanol al 70%, 10 ml de formaldehido al 4% y 5 ml de ácido acético glacial al 100%.
- Tampón carbonato: Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH 9,5.

VII.1.2. Reactivos Comerciales

- Anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a FITC, BD Pharmingen (554020), San Diego, USA.
- Anticuerpo de conejo (IgG purificadas por afinidad) anti-Actina, Sigma (A5060), St Louis, USA.
- Anticuerpo de rata anti-CD14 murino conjugado a PE, BD Pharmingen (553740), San Diego, USA.
- Anticuerpo de conejo (IgG purificadas por afinidad) anti-Survivina humana, R&D Laboratories (AF886), USA.

- Anticuerpo (IgG2a) de rata anti-PECAM-1 (CD31) de ratón, clon ER-MP12, Hycult Biotech (HM1084), Pensilvania, USA.
- BCA Protein Assay, Pierce (23227), Illinois, USA.
- Endofree Plasmid Maxi Kid (12362), Qiagen, USA.
- Poly I:C (27-4729), Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA.
- CpGs ODN 5' T*C*C*A*T*G*A*C*G*T*T*C*C*T*G*A*T*G*C*T* 3' (* enlace de fosforotioato), Integrated DNA Technologies, Iowa, USA.
- Clorhidrato de Ketamina 10%, Alfasan Internacional B.V., Holanda. Distribuido por Agroland.
- Clorhidrato de Xilacina al 2%, Laboratorio Centrovvet, Santiago, Chile.
- Solución Fisiológica, Cloruro de Sodio al 0,9%, Baxter (ARB1323), Santiago, Chile.
- Seda-NC, sutura quirúrgica no absorbible de seda negra, calibre (USP) 2/0, 75 cm, estéril; aguja HR26, B. Braun Medical S.A. - Aesculap, Bogotá, Colombia.
- CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega (G5421), Madison, USA.
- HistoMouse™-MAX Kit, Invitrogen (87-9541), California, USA.
- Parafina Paraplast Plus (502004) Tissue Embedding Scientific, St Louis, USA.
- Flo-texx, Lerner Laboratories (137703), Pittsburgh, PA, USA.

VII.2. Métodos

VII.2.1. Objetivo específico I: Evaluar la capacidad de la inmunización con *pSurv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria, de inhibir la formación de tumores.

VII.2.1.1. Purificación de DNA plasmidial libre de endotoxinas para la inmunización de ratones C57BL/6

Se realizaron cultivos de las bacterias que contienen el plasmidio *pcDNA-Surv* o *pSecTag-Surv*, en 250 ml de medio LB, durante toda la noche a 250 rpm/min a 37 °C (Incubador con Agitador Orbital Barnstead Lab Line MaxQ 4000. Dubuque, Iowa, USA). Se centrifugó el cultivo a 2.100 x *g* a 4 °C durante 45 min (Centrifuga IEC Centra MP4R. Needham, USA). A continuación, se utilizó un kit de purificación de plasmidios libre de endotoxinas (Endofree Plasmid Maxi Kid (12362), Qiagen, USA.), según instrucciones del fabricante, obteniéndose en cada purificación aproximadamente 500 µg totales de DNA. La calidad e integridad de los plasmidios fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio para la visualización del DNA. A continuación, se evaluó la presencia del gen que codifica Surv en dichos plasmidios y sus respectivos controles de plasmidios vacíos. Para esto se realizó un PCR utilizando 0,5 µg de cada plasmidio, MgCl₂ 1,8 mM, dNTPs 0,2 mM y 0,5 mM de los partidores AQ01013 (5' GGA TCC GGC GGC ATG GGT GCC CCG ACG TTG 3') y AQ01014 (5' GGT ACC CTC AAT CCA TGG CAG CCA GCT GCT C 3') (Figura 4). Este protocolo fue establecido después de una serie de ensayos preliminares que determinaron la temperatura de apareamiento y concentración de Mg²⁺ adecuadas.

A		B		
	x1	Etapa	Tiempo	Tº
Buffer 10x	2,5 ul		2 min	94 ºC
MgCl ₂ (25mM)	1,8ul			
dNTPs (2,5mM)	2ul	Denaturación	1 min	94 ºC
Partidor SN (10uM)	1ul	Apareamiento	2 min	58 ºC
Partidor AS (10uM)	1ul	Extensión	1 min	72 ºC
H ₂ O	11,6		10 min	72 ºC
Pfu	0,1ul		infinito	4 ºC
plasmidios	5ul			

Figura 4: Protocolo de la Reacción en Cadena de Polimerasa para la amplificación del gen que codifica *Surv*. Condiciones de alineamiento y amplificación de *Surv* en los plasmidios evaluados.

VII.2.1.2. Inmunización genética intradérmica de ratones C57BL/6 con DNA plasmidial

En cada ensayo se utilizaron hembras de entre 6 y 8 semanas de edad, obtenidos mediante cruces de reproductores adquiridos en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) y reproducidos en el Bioterio del Programa Disciplinario de Inmunología, en la Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile. Esta cepa corresponde al modelo isogénico para la línea tumoral de melanoma B16-F10, lo que permite la formación en ella de un tumor sólido subcutáneo y el desarrollo de metástasis pulmonar. Los procedimientos experimentales aplicados a estos animales fueron aprobados por el Comité de Bioética Institucional (CBA# 0278 FMUCH) y se realizaron bajo supervisión veterinaria, siendo los animales mantenidos en condiciones estándar internacionalmente aceptadas (NRC, 1996).

Previo a la inmunización, los animales fueron anestesiados mediante una combinación de Ketamina 10% (100 mg/Kg) y Xilacina 2% (10 mg/Kg), vía i.p. Luego, fueron inyectados con 100 µg del DNA plasmidial, en conjunto con TLR-L (20 µg oligo CpG ODN y 10 µg Poly I:C/animal) en los cojinetes plantares de las extremidades posteriores vía i.d. Se utilizó solución fisiológica como vehículo para los plasmidios, en 100 µl totales, inyectando 50 µl en cada extremidad.

VII.2.1.3. Cultivo de células de melanoma B16-F10 como modelo experimental

Se utilizó la línea celular tumoral primaria de melanoma murino B16-F10 (Metastatic Murine Melanoma) donada por el laboratorio de la Dra. Laurence Zitvogel, de la Facultad de Medicina y Centro Regional de la Lucha Contra el Cáncer George François Leclerc, Francia. Esta línea tumoral fue generada mediante 10 ciclos de inyecciones de la línea celular B16-F0 (Primary Murine Melanoma) vía i.v. y la posterior recuperación de las células desde los pulmones de ratones C57BL/6 (tumor isogénico) (Fidler, 1975; Nicolson *et al.*, 1978; Zhu *et al.*, 1991).

Las células se sembraron 1×10^6 células B16-F10 en placas de poliestireno de 100 mm, con 10 ml de medio RPMI-SFB 10% en condiciones estándares de cultivo celular, esto es 37 °C, 5% de CO₂ y 80% de humedad (Incubador Shel Lab CO₂, Modelo TC2323). Una vez alcanzada un 60 - 70% de confluencia, las células fueron lavadas con PBS 1x y tratadas con 500 µl de Tripsina 0,25% - EDTA 1 mM, permitiendo la acción de la enzima por 2 a 5 min, para luego inactivarla con 2 ml de RPMI-SFB 10%. Tras recuperar las células, estas fueron centrifugadas a 100 x *g* durante 5 min. Para continuar el cultivo, las células fueron sembradas nuevamente, en las mismas condiciones iniciales, de lo contrario se resuspendieron en PBS 1x (para ensayos *in vitro*) o solución fisiológica (para ensayos *in vivo*).

VII.2.1.4. Evaluación de la expresión de Surv en las células B16-F10

Se utilizaron placas de 60 mm al 80-90% de confluencia. Se les retiró el medio RPMI-SFB 10%, y se la colocó en hielo para ser lavadas 3 veces con PBS 1x frío, luego se agregó 600 µl de PBS 1x frío conteniendo inhibidores de proteasas BAL (Benzamidina /Antipaina/ Leupeptina) PMSF y Ortovanadato de sodio. Con esta solución se rasparon las células y para luego ser centrifugadas rescatando el pellet. Luego se agregó el tampón de sonicado (SDS 10%, NP-40 (IGEPAL) y Hepes 20 mM) en conjunto con los inhibidores de proteasas antes descritos. Se sonicó la muestra 2 veces por 15 seg a nivel 3, manteniéndolas en hielo. Luego, se centrifugó a 15.690 x *g* por 2 min y se recuperó el sobrenadante. En esta solución se midió la concentración proteica (BCA Protein Assay, Pierce) y se cargaron 35 µg por carril de un gel de poliacrilamida al 12%. Luego

se transfirió a una membrana de nitrocelulosa, bloqueándola con PBS 1x/leche 2% (p/v). Se incubó con el Ac policlonal anti-Surv humana, 1/1.500, seguido por un Ac policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa, 1/1.500. Finalmente, se reveló utilizando el sustrato para peroxidasa ECL (Pierce 32106).

VII.2.1.5. Evaluación de la presencia de Surv intra y extracelular en células B16-F10 mediante citometría de flujo

Se trabajó con 300.000 células por condición en una placa de cultivo celular con fondo en V (Linbro, Cat N76-022-05, Flow Laboratories, Inc, Virginia, USA). Para la permeabilización se utilizó metanol PA frío durante 10 min a -20 °C. Luego, se centrifugó la placa a 450 x g durante 7 min a 4 °C (Centrifuga IEC Centra MP4R, Needham, USA), procedimiento que se repitió en cada lavado. Se lavó la placa con PBS 1x/BSA 2% y luego se incubó 30 min a temperatura ambiente con 50 µL del Ac anti-Surv diluido 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400 en PBS 1x/BSA 2% (p/v). Se lavaron las células 2 veces y se incubó 30 min a temperatura ambiente con 50 µL del Ac anti-conejo conjugado a FITC diluido 1/100 en PBS 1x/BSA 2%. Después del lavado se resuspendieron las células en PBS 1x/paraformaldehído (PFA) 1% (p/v) a 4 °C hasta el día siguiente para su análisis en el citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Bioscience) y la utilización del programa FCS Express 4 Flow para la interpretación de los datos obtenidos.

VII.2.1.6. Generación de tumor subcutáneo sólido

Los animales fueron inoculados s.c. en el dorso derecho con 300.000 células tumorales, llevadas a 100 µl totales con solución fisiológica. La inoculación de las células se realizó en el dorso del animal en una sola aplicación, evitando de esta forma la generación de un tumor bilobulado. El registro de volumen tumoral se realizó hasta que el tumor alcanzó los 2.500-3.000 mm³, momento en que fueron sometidos a eutanasia por dislocación cervical. La evaluación del crecimiento tumoral se realizó día por medio, registrando el diámetro largo y el

diámetro corto, utilizando un pie de metro digital. El cálculo del volumen tumoral se realizó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen tumoral} = [(\text{diámetro corto})^2 \times \text{diámetro largo}] \times \pi/6 \text{ mm}^3$$

siendo π igual a 3,1416.

VII.2.1.7. Purificación e Inyección rTcCRT

rTcCRT (o su dominio rTcCRT-R, aa 136-181) se purificaron por cromatografía de afinidad a través de la captura sus colas de histidina al Niquel unido a una fase sólida (Ferreira *et al.*, 2004b). Posteriormente, la proteína se utilizó en una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, inoculando 100 $\mu\text{l}/\text{día}$ por medio a los animales, ya sea s.c. para el ensayo de formación de tumores y de cirugía, o i.v. para el ensayo de metástasis.

En la figura 5 se muestra el esquema estructural de rTcCRT (A) y la proteína completa y su dominio R, purificadas (B). Las proteínas purificadas muestran cierto grado de degradación propio del proceso de purificación, así como dímeros, lo que explicaría el bandeo observado.

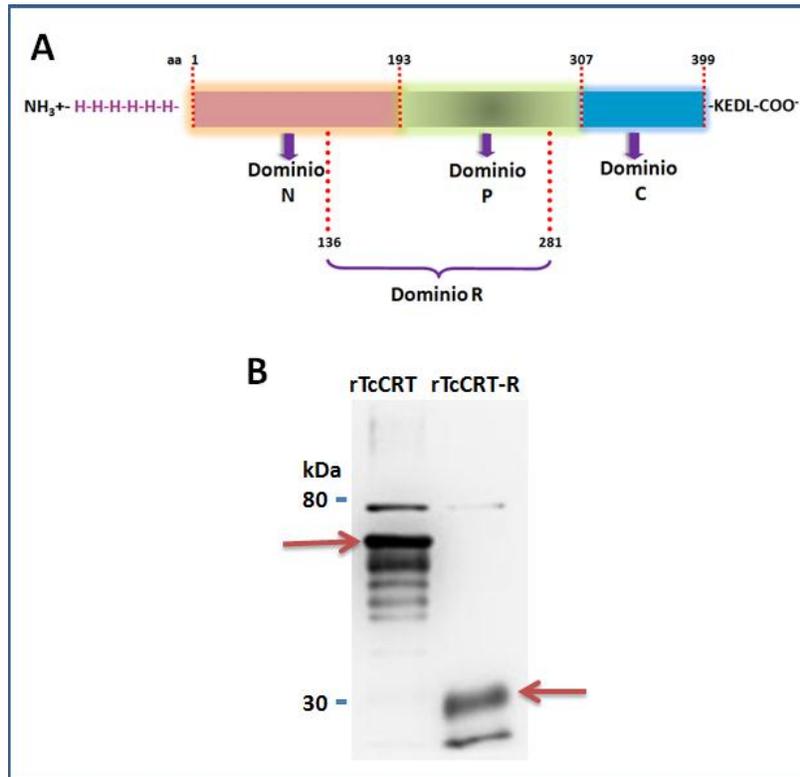


Figura 5: Proteínas rTcCRT y rTcCRT-R utilizada en ensayos *in vitro* e *in vivo*. **A.** Representación esquemática de los dominios N, P, C y R de la proteína rTcCRT. La proteína contiene una secuencia señal N-terminal y una secuencia C-terminal de retención en el retículo endoplásmico KDEL. **B.** Proteínas rTcCRT y rTcCRT-R purificadas mediante afinidad. (Las bandas ubicadas por debajo de los componentes principales corresponden a productos de degradación).

VII.2.1.8. Determinación de eventuales efectos tóxicos de rTcCRT sobre las células B16-F10, mediante un ensayo de proliferación MTS

En una placa de cultivo celular de 96 pocillos, se sembraron 2.500 células B16-F10/pocillo con RPMI-SFB 10%. Se consideró cada condición en triplicado y el número de placas para cada tiempo a evaluar, es decir 0, 24 y 48 h. Una vez que las células se adhirieron a la placa se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se agregó 200 μ l totales que de RPMI-SFB 15% con rTcCRT 9,5 μ M ó PBS ó solo RPMI-SFB 10% ó 15%. Una vez cumplido las 0, 24 ó 48 h, se retiró el medio

de cultivo tratamiento y se cambió por 100 µl RPMI-SFB 5% mas 20 µl de solución MTS/ pocillo (CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, USA) y se incubó la placa protegida de la luz a 37 °C durante 1 h. Finalmente, se analizó la reacción colorimétrica a 490 nm (Microplate Reader Molecular devices Versa Max tunable, Sunnyvale, CA, USA.)

VII.2.1.9. Determinación de la capacidad anti-angiogénica de rTcCRT en el modelo tumoral murino B16-F10/C57BL/6, mediante la cuantificación ciega de vasos sanguíneos en inmunohistoquímica

Los tumores fueron extraídos de todos los animales el día 20 post inoculación de las células tumorales y se fijados en formalina 10% durante 48 h, tras los cual fueron divididos por la mitad, para luego ser deshidratados y diafanizados (Prophet *et al.*, 1995). El tiempo de deshidratación dependió del tamaño de la muestra, alcanzando las 2 h para los tumores más grandes y de 1 h para los pequeños. El tiempo en los xiloles se prolongó por 1 h en cada uno, pasando luego durante 2 h por cada una de las parafinas, a 57 °C, excepto la última que se realizó a temperatura ambiente para su solidificación en los moldes. Utilizando un micrótopo, se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de espesor desde el centro de cada tumor (para asegurar muestras similares entres cada condición), los que fueron montados en los portaobjetos silanizados, siendo finalmente teñidos y/o incubados con el anticuerpo anti-CD31:

- Tinción Hematoxilina-Eosina-Azul Alcían: La muestra se desparafinó e hidrató hasta llegar al agua destilada. Luego, se lavó con agua corriente por 5 min. Se tiñó con solución de Azul Alcían durante 6 min, lavando luego con agua corriente por 5 min, y se contrastó la tinción con Hematoxilina de Harris por 3 minutos. Se lavó con agua destilada por 15 min y posteriormente, fue sumergida en alcohol de 80º y 96º, cada uno por 5 min. Finalmente, se tiñó con Eosina por 2 min. Se deshidrató el tejido con una batería alcoholes y luego se aclaró con Xiloles. Se aplicó solución de montaje Entellán® y se cubrió las muestras con un cubreobjetos.

- Tinción Arteta: La muestra se desparafinó e hidrató hasta llegar al agua destilada. Luego, se lavó con agua corriente por 5 min. Se tiñó con Hematoxilina de Harris por 3 minutos. Se lavó con agua corriente por 15 min. A continuación, se tiñó con solución de Eritrosina-Orange G por 5 minutos. Se enjuagó rápido en agua destilada y se utilizó el ácido Fosfotungstico por 3 minutos. Se lavó rápidamente en agua destilada y se tiñó con Azul de Anilina al 1% por 3 minutos. Finalmente, se lavó y se repitió el procedimiento descrito en la técnica anterior, hasta el montaje.
- Inmunohistoquímica anti-CD31: La muestra se desparafinó e hidrató hasta llegar al agua destilada. Se realizó la recuperación antigénica a baño María por 60 min a 37 °C (Target Retrieval Solution, Cat Nº S170084, Dako). Se dejó enfriar y sedimentar el tampón de recuperación antigénica por 20 min y luego, se lavó con agua destilada 20 min. Se neutralizó la peroxidasa endógena utilizando Metanol + Peróxido de Hidrogeno de 30 vol (9+1) por 10 min. Se lavó con PBS 1x, 3 veces por 2 min. Para el bloqueo se utilizó las soluciones 1A y 1B proporcionadas en el kit HistoMouse™-MAX (Invitrogen 87-9541, CA, USA), según instrucciones del fabricante. Se volvió a lavar la muestra con PBS 1x, 3 veces por 2 min y luego se incubó con el Ac anti-CD31-PECAM (1:10) durante 22 h a 4 °C. Se lavó con PBS 1x y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (2 gotas) por 60 min. Finalmente, se lavó con PBS 1x y se agregó la solución AEC del kit, por 15 min. Tras lavar por última vez, se agregó la solución de montaje y se dejó secar (sin cubreobjetos).
- Cuantificación de la densidad microvascular: Se cuantificaron los vasos sanguíneos en 90-120 campos de un área de 90.000 μm^2 a 400x, en los 5 individuos de cada grupo. La cuantificación ciega consideró todos los vasos presentes en la muestra.

VII.2.1.10. Determinación de la inducción de fagocitosis de las células B16-F10 por la presencia de rTcCRT

Las células B16-F10 fueron teñidas con CSFE 2,5 μ M/RPMI sin suero, durante 10 min a 37 °C. Luego, se lavaron 2 veces con 10 ml de RPMI-SFB 10%, 5 min a 250 x *g*. A continuación, en placas con pocillos fondo V, fueron incubadas con rTcCRT durante 30 min a 37 °C (40 μ g/300.000 células). Luego, se incubaron con 4 μ g de C1q durante 30 min a la misma temperatura. Paralelamente, se marcaron la células RAW 264.7 con el Ac anti-CD14 conjugado a PE, en dilución 1/10 durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se incubaron las células B16-F10 con las células RAW 264.7 marcadas, a 37 °C durante 3 h. Se las evaluó mediante citometría de flujo.

VII.2.1.11. Determinación de la generación de anticuerpos anti-rTcCRT inoculada subcutáneamente

Placas de microtitulación de cloruro de polivinilo (PVC) fueron sensibilizadas con 100 μ l/pocillo de rTcCRT (5 μ g/ml), en tampón carbonato. Tras su incubación durante toda la noche a 4 °C, se bloqueó cada pocillo con 200 μ l de PBS-BSA 1% p/v, previo 4 lavados con PBS-Tween 20 (0,05% v/v). Se incubó durante 90 min a 37 °C (Dynamic Incubator, ABBOTT). Posteriormente se lavó como se describió anteriormente, las placas fueron incubadas con 100 μ l de los sueros en dilución 1:100 y 1:50, en triplicado, durante 90 min a 37 °C. Nuevamente, se lavaron las placas y se incubaron con 100 μ l de IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada a peroxidasa (DAKO), 1/1.000, durante 90 min a 37 °C. Finalmente, y tras lavar las placas, se agregó en cada pocillo 200 μ l de solución sustrato para peroxidasa (ABTS) y se leyó a 405 nm (Microplate Reader, Bio-Rad), a los 0, 5, 10 y 15 min. Se utilizó el suero pre-inmune (SPI) de cada ratón como control negativo. Como control positivo se utilizó el Ac monoclonal anti-rTcCRT, E2G7.

VII.2.2. Objetivo específico II: Evaluar la capacidad de la inmunización con *pSurv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria, de inhibir la reincidencia de la formación del tumor subcutáneo, tras la resección del tumor primario.

Los procedimientos orientados a purificar plasmidios, inmunizar genéticamente, cultivar células, generar tumores subcutáneos sólidos y a purificar e inocular rTcCRT, se describieron anteriormente bajo el contexto del Objetivo Específico 1.

VII.2.2.1. Evaluación del tratamiento quirúrgico combinado con la respuesta inmune al plasmidio *pSurv* y la acción local de TcCRT

VII.2.2.1.1. Tratamiento quirúrgico: Los animales fueron inoculados con las células B16-F10 al igual que el ensayo de formación de tumores y se evaluó el crecimiento del tumor hasta alcanzar los 1.500-2.500 mm³. Luego, los ratones fueron anestesiados con Ketamina (100 mg/Kg) y Xilacina (10 mg/Kg) i.m. Posteriormente, se depiló y se esterilizó el área con alcohol al 70%. Se extrajo el tumor cuidadosamente, evitando romperlo y extrayendo todo el tejido circundante.

VII.2.2.1.2. Tratamiento local con TcCRT: Una vez extraído el tumor se hizo un lavado con 1 ml de solución fisiológica o con 100 µg de rTcCRT /ml. La sutura se realizó con 4-5 puntos independientes con hilo de seda 2/0. La leve pérdida de sangre durante la cirugía se compensó con la administración subcutánea de solución fisiológica y se inyectó 25 mg de ketoprofeno/animal, por la vía i.m. como analgésico, repitiéndolo 24 h mas tarde. Se evaluó la reaparición del tumor hasta 15 días post cirugía, cuando los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se evaluó la presencia de metástasis. Este ensayo contó con 3 grupos de experimentación: Grupo 1: solo recibió lavado de la zona de extracción del tumor con solución fisiológica; Grupo 2: inmunizado con *pSurv* durante dos semanas seguidas previas a la inyección de las células B16-F10 y se les realizó el lavado post-extracción del tumor con rTcCRT, además

se les inyectó la proteína por la vía s.c. día por medio; Grupo 3: el lavado post-extracción del tumor se realizó con solución fisiológica y además, se le inculó solución fisiológica s.c. día por medio (Gabri *et al.*, 2006; Lobos-González, 2011).

VII.2.3. Objetivo específico III: Evaluar la capacidad de la inmunización con los plasmidios que codifican *Surv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria, de inhibir la metástasis pulmonar.

Ya determinada la capacidad de inhibición del crecimiento tumoral por el tratamiento combinado con *pSurv-rTcCRT*, se evaluó dicho tratamiento en la metástasis pulmonar. La realización de este objetivo específico contempló las siguientes metodologías experimentales: purificación de plasmidios libre de endotoxinas bacterianas, inmunización genética intradérmica e intramuscular, cultivo celular (todos descritos en la metodología del objetivo I), inoculación de la proteína rTcCRT intravenosa y generación de metástasis pulmonar

VII.2.3.1. Efecto de la inmunización en un ensayo de metástasis pulmonar

Se utilizaron dos métodos de inmunización: intradérmico en los cojinetes plantares (ya descrito) y el intramuscular en las extremidades posteriores.

VII.2.3.1.1. Inmunización plasmidial intramuscular: Los ratones C57BL/6 fueron inoculados en sus extremidades posteriores con un total de 100 µg de DNA plasmidial en 100 µl solución fisiológica, inyectando 50 µl en cada extremidad. Este procedimiento se repitió dos veces más (refuerzos) cada 14 días. Se utilizaron los plasmidios *pSec-Surv*, *pSurv* y los correspondientes vectores vacíos.

VII.2.3.1.2. Inyección de células tumorales: Los ratones C57BL/6 fueron inoculados en la vena lateral de la cola con 200.000 células metastásicas B16-F10, disueltas en solución fisiológica, en 500 µl de volumen total. Tras 21 días se extrajeron sus pulmones, inmediatamente después de su sacrificio por dislocación cervical. Dichos órganos fueron fijados en solución Fekete (composición descrita en Sección Soluciones) y posteriormente evaluados

en cuanto al número de nódulos metastásicos y al porcentaje de peso del pulmón metastizado en relación al peso de tejido normal del pulmón (Lupa Olympus S261, Cámara Moticam 2000 y programa Motic Images Plus 2.0).

VII.2.3.1.3 Inoculación de la proteína rTcCRT intravenosa: Los ratones C57BL/6 fueron inoculados en la vena lateral de la cola con 100 µg de rTcCRT/ 100 µl de solución fisiológica día por medio hasta el día 21 post inoculación de las células tumorales.

VIII. Resultados

Los resultados de esta tesis muestran los datos que abordan los Objetivos propuestos.

Comenzamos evaluando los plasmidios que serían utilizados en los ensayos posteriores. De esta forma buscábamos determinar la presencia del gen que codifica Surv en los plasmidios *pSec-Surv* y *pSurv*, comparándolos con los plasmidios vacíos, como se muestra en la figura 6. Como observamos, los plasmidios que no contenían secuencias codificantes no amplificaron *Surv* (plasmidios vacíos), a diferencia de lo ocurrido con los plasmidios *pSec-Surv* y *pSurv*, desde donde si fue posible amplificar el gen de Surv.

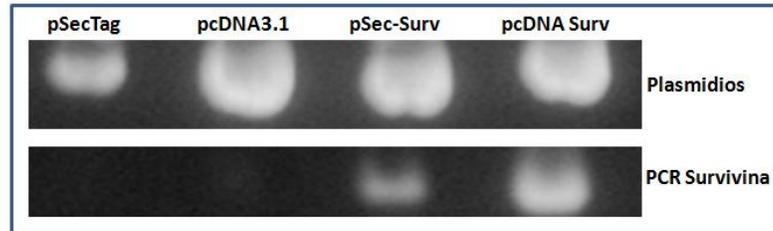


Figura 6: Los plasmidios *pSec-Surv* y *pSurv* contienen el gen que codifica Surv. Mediante un gel de agarosa al 1% visualizamos los plasmidios (**Panel superior**) y los insertos amplificados mediante PCR de los mismos plasmidios (**Panel inferior**).

A continuación, se evaluó la expresión de Surv por la línea de células embrionarias renales (HEK293T) transfectadas con el plasmidio *pSurv*. Como se observa en la figura 7, las células transfectadas con *pSurv* aumentan la expresión de Surv por sobre el nivel basal encontrada en las células HEK293T controles sin transfección o sólo transfectadas con el plasmidio vacío. Esto demuestra la capacidad del plasmidio *pSurv* de incrementar la presencia de la proteína que codifica en las células que lo incorporan.

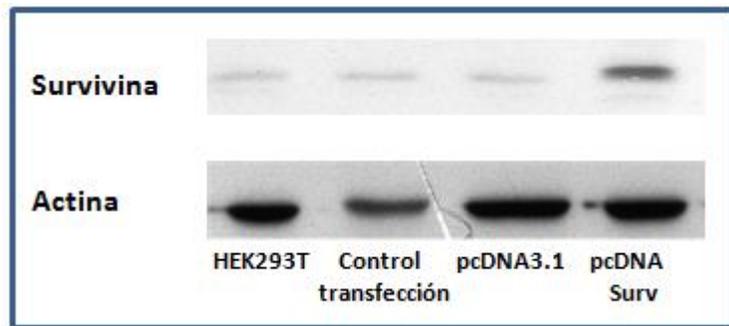


Figura 7: Las células HEK293T expresan intracelularmente la secuencia de *Surv* codificada en el plasmidio *pSurv*. Mediante Western Blot, se evaluó la expresión de Surv en las células HEK293T, tras la transfección transiente con el plasmidio *pSurv* y su contraparte vacía. Como control se determinó la expresión de actina en las mismas células. **Panel superior:** expresión de la proteína Surv. **Panel inferior:** expresión de la proteína actina, como control de carga.

Por otra parte, la línea celular B16-F10 seleccionada para ser utilizada en esta tesis, correspondiente a un melanoma murino, singénico para la cepa murina C57BL/6. La principal característica morfológica en cultivo es la conformación alargada, similar a un fibroblasto, y la presencia de gránulos de melanina citoplasmáticos (Figura 8A y B), los que aumentan significativamente cuando las células se encuentran en condiciones de estrés, como lo es la sobreconfluencia (> 100% de la superficie de la placa de cultivo cubierta de células). La presencia de esta melanina le otorga una coloración café oscura a las células, lo que nos permitió la visualización a nivel macroscópico de los nódulos metastásicos pulmonares.

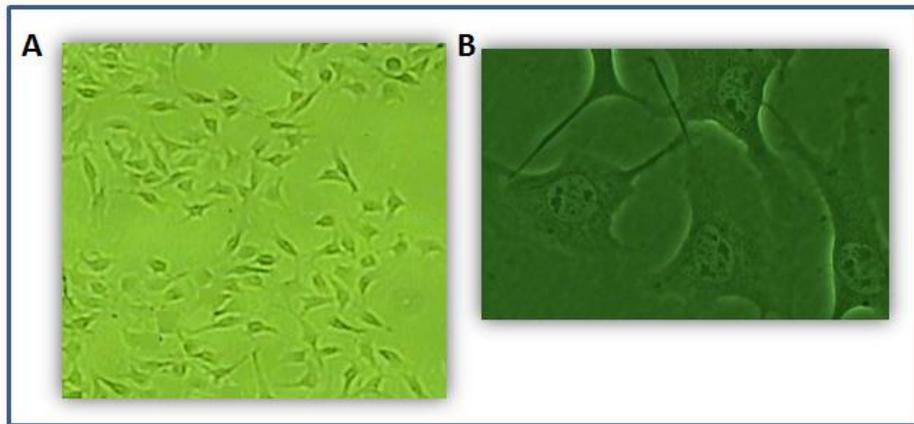


Figura 8: Visualización microscópica del cultivo de células B16-F10. Se observa la morfología de las células. **A.** Amplificación 40x y en **B.** amplificación 100X, de una placa de cultivo celular al 70% de confluencia.

Previo a la utilización las células B16-F10 en ensayos *in vitro* o *in vivo* se evaluó la presencia de Surv en los extractos celulares de pasajes 6 al 8 (Figura 9A), que corresponden a los utilizados en todos los ensayos de esta tesis, así como también la expresión de la proteína ya sea intra y extracelularmente (Figura 9B).

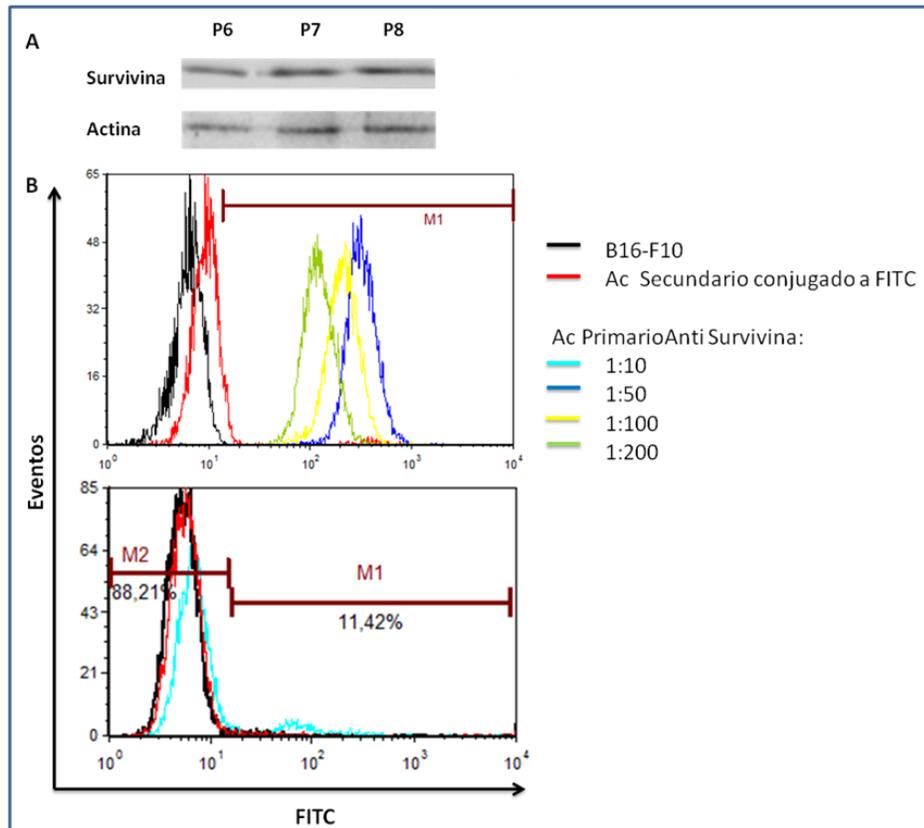


Figura 9: Las células B16-F10 expresan Surv intra y extracelularmente. **A.** Mediante Western blot se evaluó la presencia de Surv en el extracto celular utilizando un Ac anti-Surv humana en dilución 1/1.500 y el Ac policlonal de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa, en dilución 1/1.500. **B.** En un ensayo *in vitro*, las células fueron permeabilizadas (**B panel superior**) o sin permeabilizar (**B panel inferior**), e incubadas con el Ac policlonal anti-Surv humana en las diluciones indicadas. (La dilución 1:10 se usó solo para la detección en células sin permeabilizar) y posteriormente marcadas con el Ac anti-IgG de conejo conjugado a FITC y analizadas mediante citómetro de flujo. En A y B se utilizó el mismo Ac policlonal anti-Surv humana. La figura es representativa de tres ensayos independientes.

Finalmente, se determinó la cantidad de células con las que se realizaría los ensayos de formación tumoral subcutánea ya que en la literatura reciente se han encontrado gran discrepancia en este punto. Los animales fueron inoculados s.c. en el dorso con 50.000, 100.000, 200.000 y 300.000 células tumorales (Figura 10).

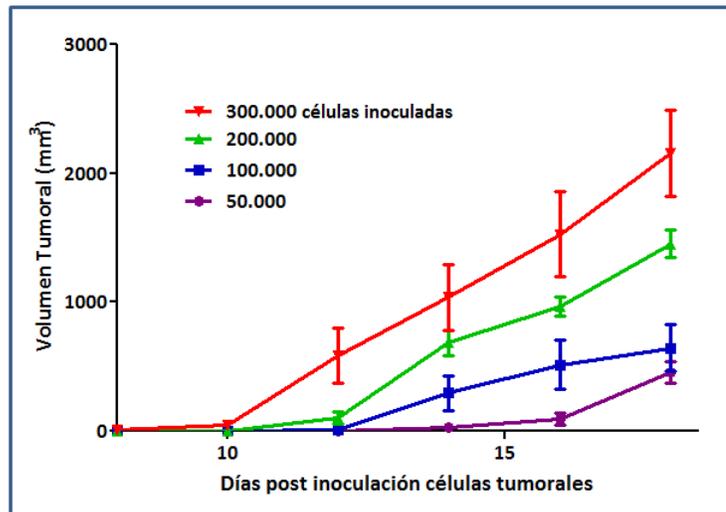


Figura 10: Crecimiento tumoral diferencial entre grupos inoculados con distintos números de células B16-F10. Se utilizaron 5 animales por grupo, evaluando el crecimiento del tumor inducido por la inoculación de distintos números de células de acuerdo a lo encontrado en la literatura. Se realizó el análisis estadístico mediante el Wilcoxon Run test, encontrando solo diferencia entre el grupo inoculado con 300.000 células y los otros grupos evaluados ($p= 0,03$).

El análisis realizado a este ensayo nos mostró que dentro del grupo inoculado con 50.000 células, no todos los animales desarrollaron tumor. Los grupos tratados con 100 y 200 mil células no se diferencian estadísticamente del grupo antes descrito. El único grupo que se comporta diferente es el inoculado con 300.000 células, aunque presenta un error estándar mayor que los otros grupos. Según estos datos, se determinó la utilización de 300.000 células para la formación del tumor subcutáneo sólido.

VIII.1. Objetivo específico I

Evaluar la capacidad de la inmunización con *pSurv*, en conjunto con Calreticulina recombinante parasitaria, de inhibir la formación de tumores.

VIII.1.1. La inmunización conjunta con los plasmidios *pSurv* y *pTcCRT* no inhibe la formación de tumores

Usualmente, para generar una respuesta inmune contra una proteína extraña, se utiliza dicha proteína purificada y acompañada de otras moléculas (adyuvantes), que actúen simulando y amplificando una agresión. En este caso, buscamos evaluar el efecto de inyectar ratones con un gen que codifica una proteína directamente en la piel del ratón experimental, esperando obtener una respuesta inmune celular y/o humoral, que finalmente reconozca la presencia de dicho antígeno en células tumorales.

En primer lugar, determinamos el efecto de la inmunización de ratones C57BL/6 con los plasmidios que codifican *Surv* y *TcCRT* (*pSurv* y *pTcCRT*). Para esto, ambos genes que habían sido clonados en el vector pcDNA3.1, fueron inoculados en los animales, utilizando como adyuvantes Ligandos para los Receptores Tipo Toll (TLR-L). De esta forma, se estableció un protocolo de trabajo que se detalla en la Figura 11.

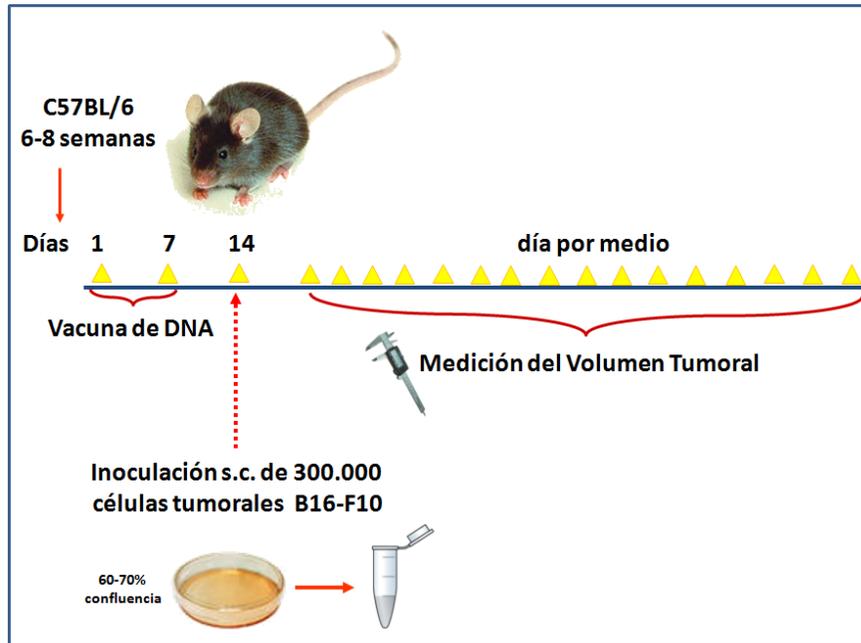


Figura 11: Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con los plasmidios codificantes de *TcCRT* y *Surv* en el crecimiento de melanoma murino. Ratones C57BL/6 hembras, de 6-8 semanas de edad, se inmunizaron los días 1 y 7. El día 14 se inocularon s.c. las células tumorales. A continuación, se midió el volumen tumoral hasta alcanzar entre 2.500 y 3.000 mm³.

La inmunización en conjunto con ambos plasmidios no genera diferencias en la curva de crecimiento tumoral al compararla con la inmunización con cada uno de los plasmidios por separado o con plasmidio vacío (Figura 12). En todos los casos utilizamos como adyuvante los TLR-L.

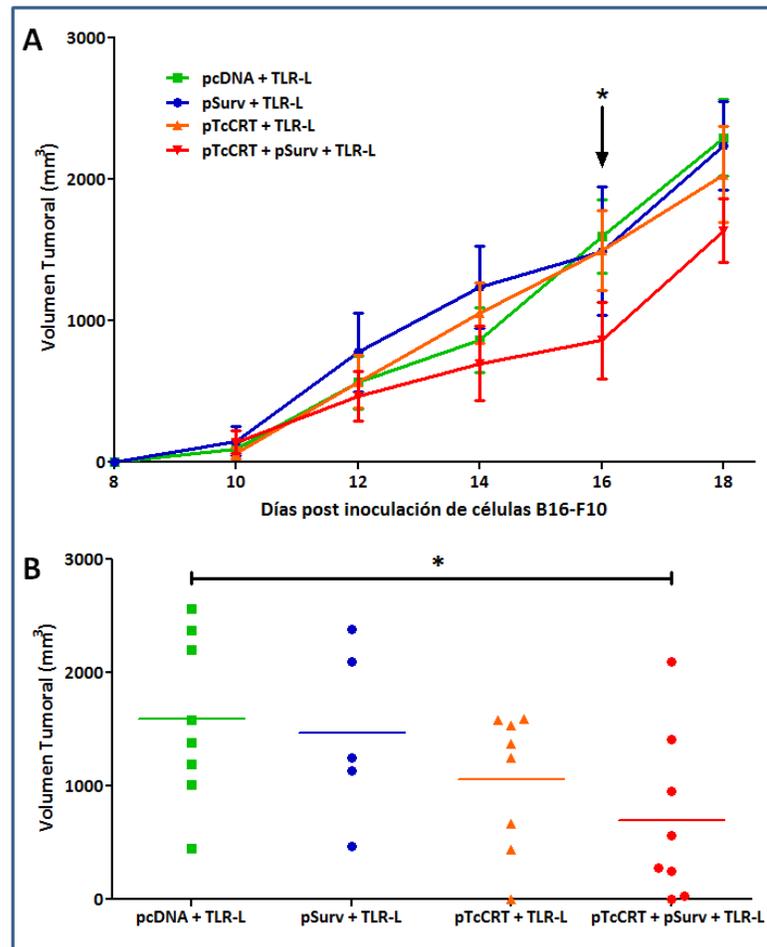


Figura 12: La inmunización genética con *pSurv* y *pTcCRT*, en conjunto, no afecta el crecimiento de un melanoma experimental murino, excepto en el día 16 de la dinámica de crecimiento tumoral. A. Curva temporal del crecimiento tumoral, comparando los animales inoculados con los plasmidios por separado o en conjunto, no observándose diferencias (Wilcoxon Run test). El ensayo corresponde a dos repeticiones con un total de 8 animales por condición. **B.** Distribución de los animales en cada grupo, el día 16 post inoculación de células tumorales, solo presentando diferencias los grupos tratados con ambos plasmidio y el tratado con el vector vacío (*: $p=0,029$, ANOVA, dos colas).

Los datos obtenidos de este ensayo nos permiten establecer que existen diferencias entre el grupo tratado con ambos plasmidios y el tratado con el plasmidio vacío (Figura 12B), aunque con una alta dispersión de los animales en todos los casos. Sin embargo, esta diferencia ocurre puntualmente el día analizado, ya que al comparar las curvas de crecimientos de los grupos inmunizados genéticamente, ya sea con *TcCRT*, sola o combinada con *Surv*, no se afecta el crecimiento tumoral (Figura 12A). Por esa razón, nos preguntamos si la combinación de *pSurv* y *rTcCRT* (inmunización genética con el primero, y tratamiento parenteral, con el segundo), retrasaría el crecimiento tumoral. Los resultados se describen en la sección siguiente.

VIII.1.2. Evaluación de la capacidad de inhibición de la formación de tumores del plasmidio *pSurv* en conjunto con rTcCRT

VIII.1.2.1. rTcCRT no afecta la proliferación *in vitro* de células B16-F10

Al igual que en el ensayo anterior, comparamos los efectos de las moléculas por separado y en conjunto. Sin embargo, fue necesario determinar previamente, si rTcCRT, *per se*, afecta la proliferación *in vitro* de las células tumorales. En la Figura 13 se observa que las células B16-F10 presentan una curva de proliferación similar, independientemente de la presencia o ausencia de rTcCRT. La concentración del 15% (v/v) de SFB se utilizó para compensar el efecto de dilución que pudiera ejercer el vehículo en que estaba suspendida la rTcCRT, sin embargo, no hubo diferencias entre los grupos evaluados y se evidenció que un 10% (v/v) de SFB es suficiente para sustentar una proliferación normal.

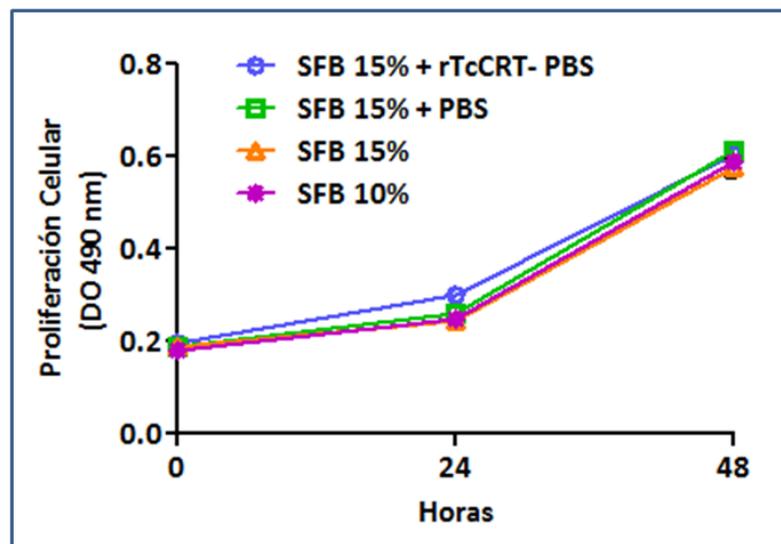


Figura 13: rTcCRT no afecta la proliferación *in vitro* de células B16-F10. Las células fueron cultivadas evaluando el efecto de dos concentraciones de SFB (10 y 15%) y una de rTcCRT (9,5 μ M), calculada en base a la concentración utilizada posteriormente *in vivo* ($p=0,8$, para todas las comparaciones, mediante ANOVA de dos colas). Gráfico representativo de tres ensayos independientes, realizados en triplicado, indicando la desviación estándar.

VIII.1.2.2. La inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con rTcCRT, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino

Demostrado que rTcCRT no afecta la proliferación de las células tumorales, realizamos el ensayo de formación de tumores usando la inmunización genética junto a la inoculación s.c. de rTcCRT. Para esto se modificó el protocolo de trabajo como sigue:

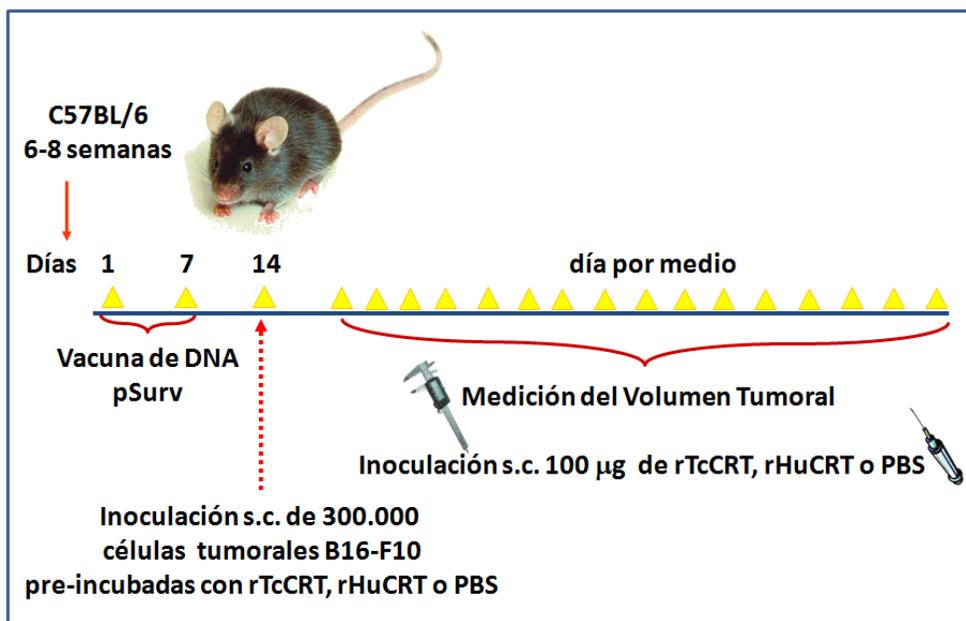


Figura 14: Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plasmidio *pSurv* y la inoculación de rTcCRT s.c. en el crecimiento de melanoma murino. Ratones C57BL/6 hembras, se inmunizaron como se indica. Luego se inocularon s.c. las células tumorales, previa incubación con las CRTs recombinantes en estudio. Luego, estas proteínas fueron administradas s.c. en zona de inoculación de las células tumorales hasta que el tumor alcanzó entre 2.500 y 3.000 mm³.

La Figura 15 nos informa acerca del efecto de la inmunización con *pSurv* y del tratamiento *in situ* con rTcCRT. La inclusión de rHuCRT en este diseño experimental obedece a que, en otros ensayos (Lopez *et al.*, 2010), se ha demostrado su menor efecto anti-angiogénico en comparación con la molécula parasitaria.

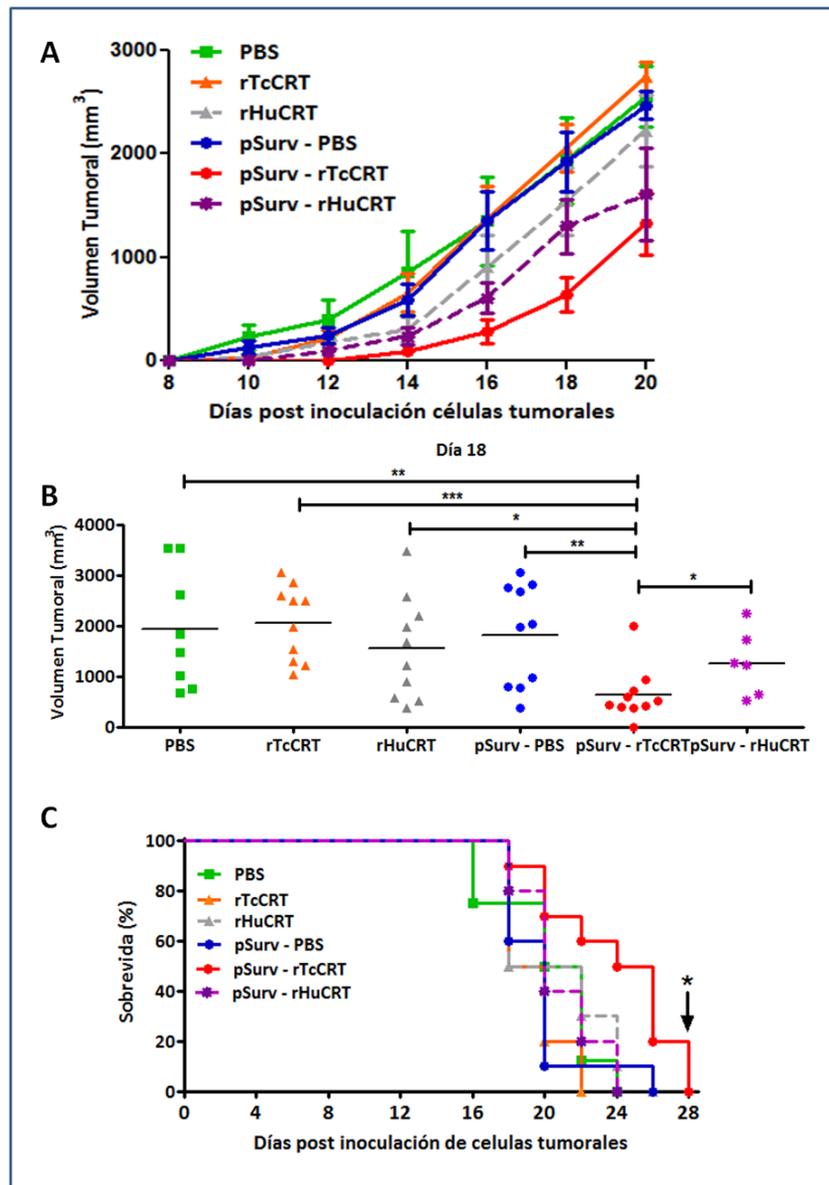


Figura 15: La inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con rTcCRT, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino. Los ratones fueron inmunizados con el plasmidio *pSurv* y luego inoculados s.c. con PBS, rTcCRT o rHuCRT. **A.** La combinación de inmunización genética con *pSurv* y con rTcCRT, inhibe el crecimiento tumoral (*: $p = 0,01-0,03$, para las diferentes comparaciones, Wilconxon Run test). **B.** Distribución de las mediciones de los tumores sólidos en diez animales de cada grupo, evaluadas al día 18 (Ver A) tras la inyección de las células tumorales, analizados mediante el Mann Whitney test (*: $0,02-0,04$; **: $0,003-0,006$; ***: $0,0002$). **C.** Curva de sobrevivida, registrada en porcentaje de animales vivos hasta el día 28 posterior al desafío con las células tumorales, analizadas con el Mantel Cox test (* muestra la diferencia entre *pSurv*-rTcCRT y los otros tratamientos: $p=0,01-0,0026$).

En la Figura 15A se observa las curvas de crecimiento tumoral de los 6 grupos de animales evaluados. Podemos observar 3 comportamientos entre las curvas de los grupos tratados. El primer set de curvas es el conformado por los animales tratados con PBS, rTcCRT y *pSurv*-PBS, no encontrándose diferencias entre TcCRT v/s PBS ($p=0,578$), TcCRT v/s *pSurv*-PBS ($p= 0,297$), pero sí entre PBS v/s *pSurv*-PBS ($p= 0,016$). A continuación, encontramos los grupos de animales tratados solo con rHuCRT ó con *pSurv*-rHuCRT. Entre estas dos curvas no encontramos diferencias ($p= 0,156$), pero sí con los grupos tratados con PBS ($p= 0,016$, en ambos casos), rTcCRT ($p= 0,047$ y $0,016$, respectivamente) y *pSurv*-PBS ($p= 0,031$, en ambos casos). Finalmente, encontramos el grupo tratado con *pSurv*-rTcCRT que presenta el mayor retardo en el crecimiento tumoral, en comparación con todos los grupos antes descritos (*pSurv*-rTcCRT v/s: PBS, rTcCRT y rHuCRT: $p= 0,016$; *pSurv*-PBS y *pSurv*-rHuCRT: $p= 0,031$).

Si evaluamos el comportamiento de cada animal dentro de su grupo de tratamiento, en la Figura 15B observamos nuevamente que el grupo tratado mediante inmunización con *pSurv* y la inoculación de rTcCRT parenteral, es el que presenta el menor tamaño tumoral, pero además, los animales de dicho grupo se comportan de manera más homogénea que con los otros tratamientos: *pSurv*-rTcCRT v/s PBS: $p=0,0031$; *pSurv*-rTcCRT v/s rTcCRT: $p= 0,0002$; *pSurv*-rTcCRT v/s *pSurv*-PBS: $p= 0,0068$, *pSurv*-rTcCRT v/s *pSurv*-rHuCRT: $p= 0,042$; *pSurv*-rTcCRT v/s rHuCRT: $p= 0,0433$.

Finalmente, se observa una sobrevida estadística entre el grupo de animales tratados con la combinación *pSurv*-rTcCRT, al compararlos con los animales tratados sólo con PBS ($p=0,025$) ó rTcCRT ($p=0,0026$) ó *pSurv* ($p=0,01$) ó rHuCRT ($p=0,045$). Sin embargo, no hubo diferencia con los animales tratados con la combinación *pSurv*-rHuCRT ($p=0,057$) (Figura 15C).

VIII.1.3. La inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con rTcCRT-R, retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino, al igual que con la proteína completa

En este caso repetimos el protocolo experimental mostrado en la figura 14, incorporando el dominio R de rTcCRT (rTcCRT-R), correspondiente a los aa 136-281 de rTcCRT. Este dominio fue utilizado anteriormente en ensayos de proliferación y morfogénesis capilar *in vitro* con células HUVEC, determinándose que no inhibe ni afecta dichos procesos fundamentales de la angiogénesis (Lopez *et al.*, 2010). De forma similar a lo ocurrido en los ensayos *in vitro*, al utilizar rTcCRT-R en el ensayo *in vivo* de formación de tumoral observamos que por sí solo no inhibe el crecimiento tumoral, al igual que la molécula completa. Sin embargo y nuevamente, al combinar la inmunización convencional con rTcCRT-R y la inmunización genética con *pSurv* (Figura 16A), se inhibe la formación de tumores, como ocurre con *pSurv*-rTcCRT (Figura 15A). De esta forma, encontramos diferencias al comparar los animales tratados con *pSurv*-rTcCRT-R v/s rTcCRT, rTcCRT-R y PBS ($p=0,0313$), pero no cuando se compara con *pSurv*-rTcCRT o *pSurv*-PBS. Así también, existe diferencia entre los grupos tratados con *pSurv*-rTcCRT v/s rTcCRT ó rTcCRT-R ó PBS ($p=0,0313$), *pSurv*-PBS v/s rTcCRT ó rTcCRT-R ($p=0,0313$) y rTcCRT v/s rTcCRT-R ó PBS ó PBS ($p=0,0313$).

Por otra parte, al evaluar el comportamiento de cada animal dentro de su grupo de tratamiento al día 18 post desafío con células tumorales (Figura 16B), observamos que el grupo tratado con la combinación *pSurv*-rTcCRT-R se comporta de manera más homogénea, al igual que ocurrió en el ensayo anterior con la combinación *pSurv*-rTcCRT. Además, podemos determinar que *pSurv*-rTcCRT-R presenta un menor crecimiento tumoral que los animales tratados con PBS (**: $p=0,0079$), rTcCRT (**: $p=0,0079$), rTcCRT-R (**: $p=0,0079$) y *pSurv*-PBS (*: $p=0,0159$). Así también, se observan diferencias entre los grupos tratados con *pSurv*-rTcCRT v/s PBS (*: $p=0,0317$), *pSurv*-rTcCRT v/s rTcCRT (**: $p=0,0079$) *pSurv*-rTcCRT v/s *pSurv*-PBS (*: $p=0,0317$), PBS v/s rTcCRT (*: $p=0,0159$) y rTcCRT v/s *pSurv*-PBS (*: $p=0,0317$).

Por último, se determinó una diferencia en la supervivencia estadística entre el grupo de animales tratados con la combinación *pSurv*-rTcCRT-R, al compararlos con los animales tratados sólo con PBS ($p=0,025$) ó rTcCRT ($p=0,0026$) ó *pSurv* ($p=0,01$) ó rHuCRT ($p=0,045$). Sin embargo, no hubo diferencia con los animales tratados con la combinación *pSurv*-rHuCRT ($p=0,057$) (Figura 16C).

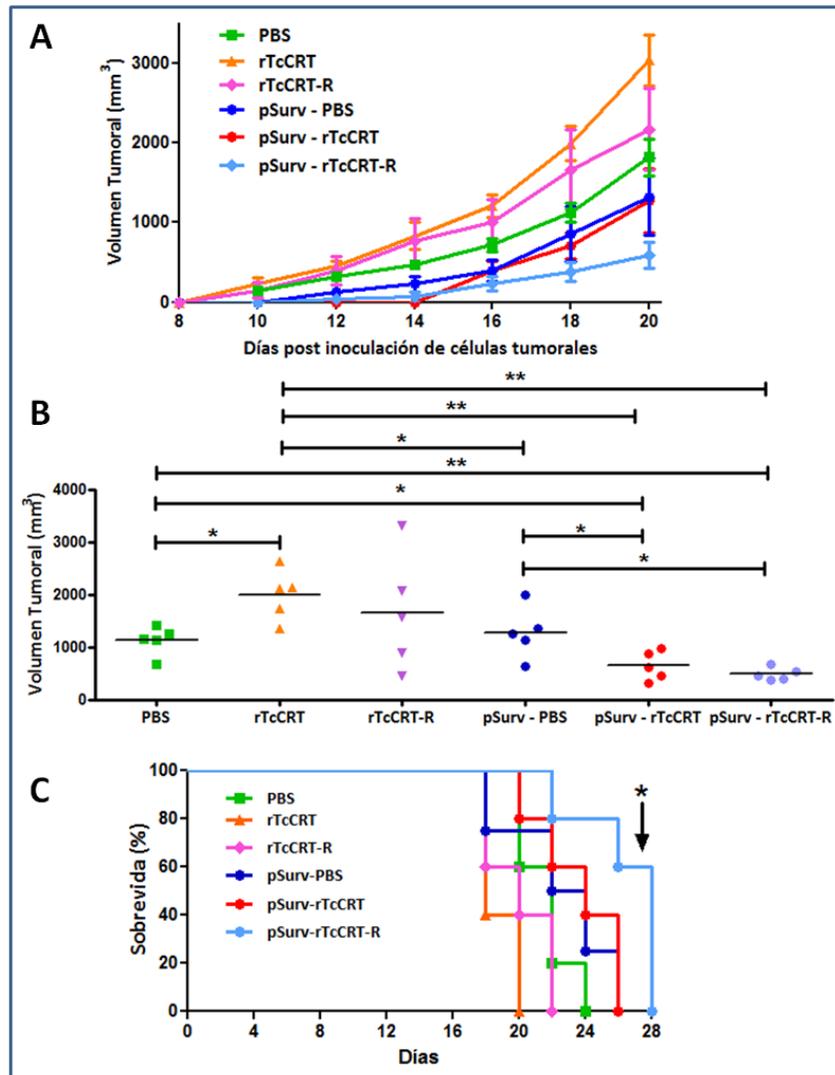


Figura 16: La inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con el dominio R de TcCRT (rTcCRT-R), retrasa el crecimiento de un melanoma experimental murino. A. Curva de crecimiento tumoral, analizado mediante el Wilcoxon Run test. **B.** Distribución de las mediciones de los tumores sólidos, evaluadas 18 días tras la inyección de las células tumorales, analizados mediante el Mann Whitney test (*: 0,01-0,03; **: 0,007). El grupo tratado con *pSurv*-rTcCRT no difiere de los grupos *pSurv* y *pSurv*-rTcCRT-R ($p= 0,06$ (*) y 0,3, respectivamente), pero si difiere de los grupos tratados con las proteínas por si solas ($p=0,03$ en todos los casos). *pSurv*-rTcCRT-R presenta una diferencia de con todos los grupos evaluados (*, $p=0,03$), excepto con *pSurv*. **C.** Curva de sobrevida, registrada en porcentaje de animales vivos hasta el día 28 posterior al desafío con las células tumorales, analizadas con el Mantel Cox test (* muestra la diferencia entre *pSurv*-rTcCRT-R v/s PBS, rTcCRT, rTcCRT-R y *pSurv*-PBS: $p= 0,0159-0,0079$).

Dados los resultados obtenidos, intentamos evaluar los mecanismos mediante los cuales trabaja el tratamiento con *pSurv-rTcCRT* para generar esta inhibición del crecimiento tumoral que lo diferencia de la utilización de los tratamientos por separado. Para esto, abordamos la angiogénesis, la estimulación del proceso de fagocitosis y la respuesta humoral frente a la combinación de los tratamientos.

VIII.1.4. Determinación de la capacidad anti-angiogénica de la inmunización con *pSurv* en conjunto con la inoculación *in situ* de rTcCRT

VIII.1.4.1. Descripción histológica del tumor experimental subcutáneo melanoma murino B16-F10

Pese a que el tumor subcutáneo B16-F10 es un modelo de melanoma de ratón ampliamente utilizado para muchos estudios de la biología y la terapéutica del cáncer, no encontramos en la literatura una descripción general de su morfología. Es por esto que aquí hacemos una mención de la estructura de este tumor.

Cuando los tumores fueron extraídos de los animales, en todos los casos, éstos se encontraban ubicados subcutáneamente, adherido a la piel (Figura 17A). Podemos observar las capas correspondientes a la epidermis (epitelio plano estratificado cornificado) y dermis (tejido conectivo laxo y denso, folículos pilosos, tejido adiposo y tejido muscular) (Figura 17B).

Bajo el tejido muscular, encontramos una delgada capa de tejido conectivo laxo, que va haciéndose mucho más gruesa hacia la cara ventral. Esta capa, corresponde a un área rica en fibras colágenas, de regular a abundante presencia de células y una alta densidad de vasos de pequeño calibre que rodean al área tumoral. Estos se caracterizan además, por ser tortuosos, con ausencia de la túnica media y con presencia de fibras colágenas correspondientes a la adventicia.

Hacia el interior del tumor, encontramos abundantes células de carácter tumoral, con relativa abundancia de melanosomas y moderada presencia de figuras mitóticas, que dan cuenta de la alta tasa de proliferación que presenta esta línea tumoral. Morfológicamente, son bastante homogéneas, no existiendo una anaplasia, que demuestre lo contrario. La matriz extracelular

(MEC) presenta una escasez de fibras de colágeno y gran cantidad de MEC no fibrilar (Figura 17C), todo lo cual da la consistencia no compacta o “gelatinosa” que caracteriza a este tumor, impidiendo su seccionamiento en fresco y hace necesaria su fijación para su estudio. La mayor parte de los vasos del área central, son tortuosos, de pequeño calibre, existiendo algunos, con un calibre levemente mayor, alargados y con presencia solo de endotelio y adventicia.

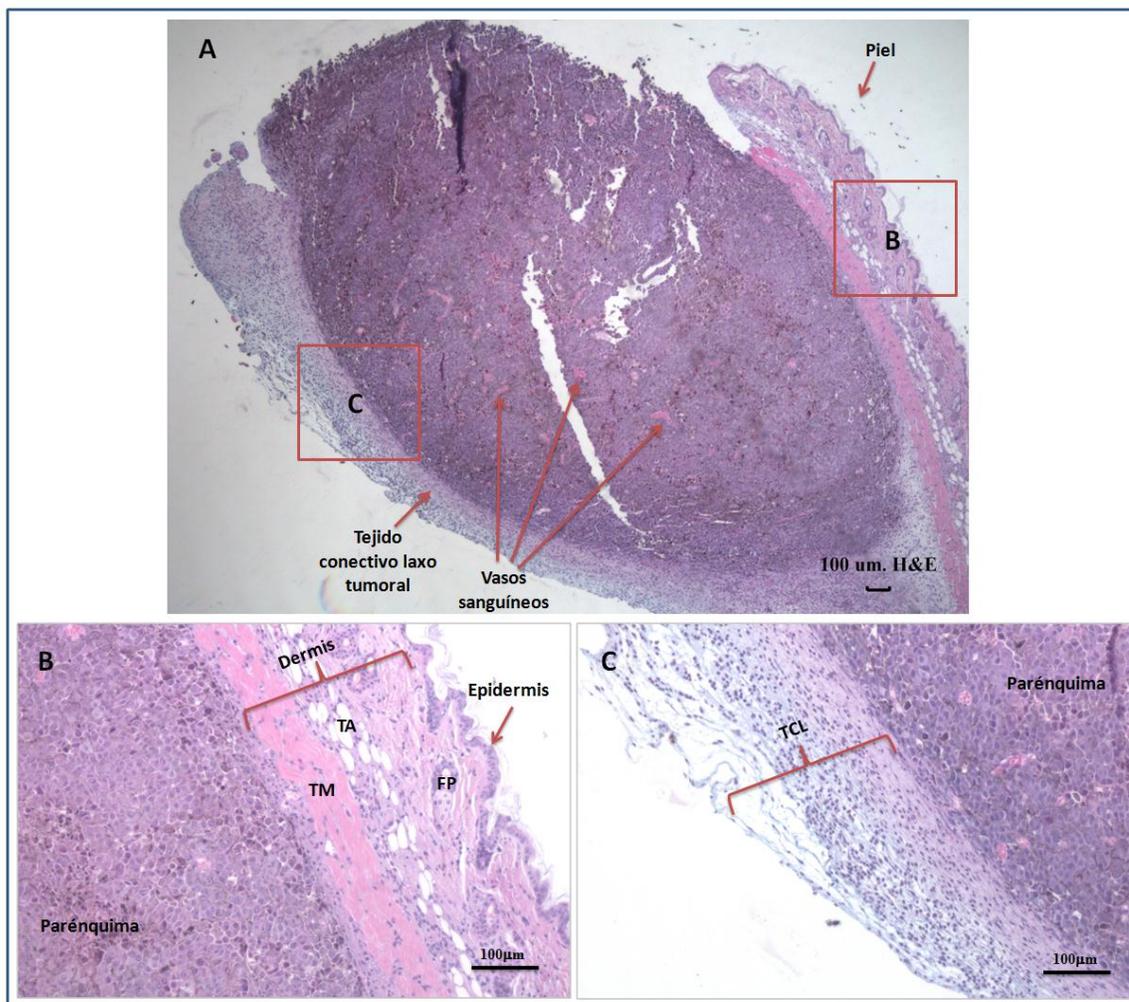


Figura 17: Corte histológico de tumor melanoma murino B16-F10. A. Tinción Hematoxilina-eosina, amplificación 4x. Se puede describir la presencia de piel en una porción del tumor, tejido conectivo laxo que rodea completamente el tumor y el parénquima tumoral que contiene abundantes vasos sanguíneos de diversos calibres en todo su extensión. **B.** Tinción Hematoxilina-Eosina, amplificación 10x. Epidermis y dermis (TA= Tejido Adiposo; FP= Folículos Pilosos; TM= Tejido Muscular) y parénquima tumoral. **C.** Tinción Hematoxilina-Eosina, amplificación 10x. Tejido conectivo laxo peri tumoral (TCL) y parénquima tumoral.

VIII.1.4.2. La combinación de tratamientos *pSurv*-rTcCRT inhibe la angiogénesis tumoral

Una vez establecidas las condiciones morfológicas del tejido tumoral, procedimos a evaluar la cantidad de vasos sanguíneos de manera ciega. El análisis del proceso angiogénico fue realizado extrayendo los tumores de los animales el mismo para todos los grupos de tratamiento, esperando ver las diferencias de irrigación entre los diferentes tamaños tumorales.

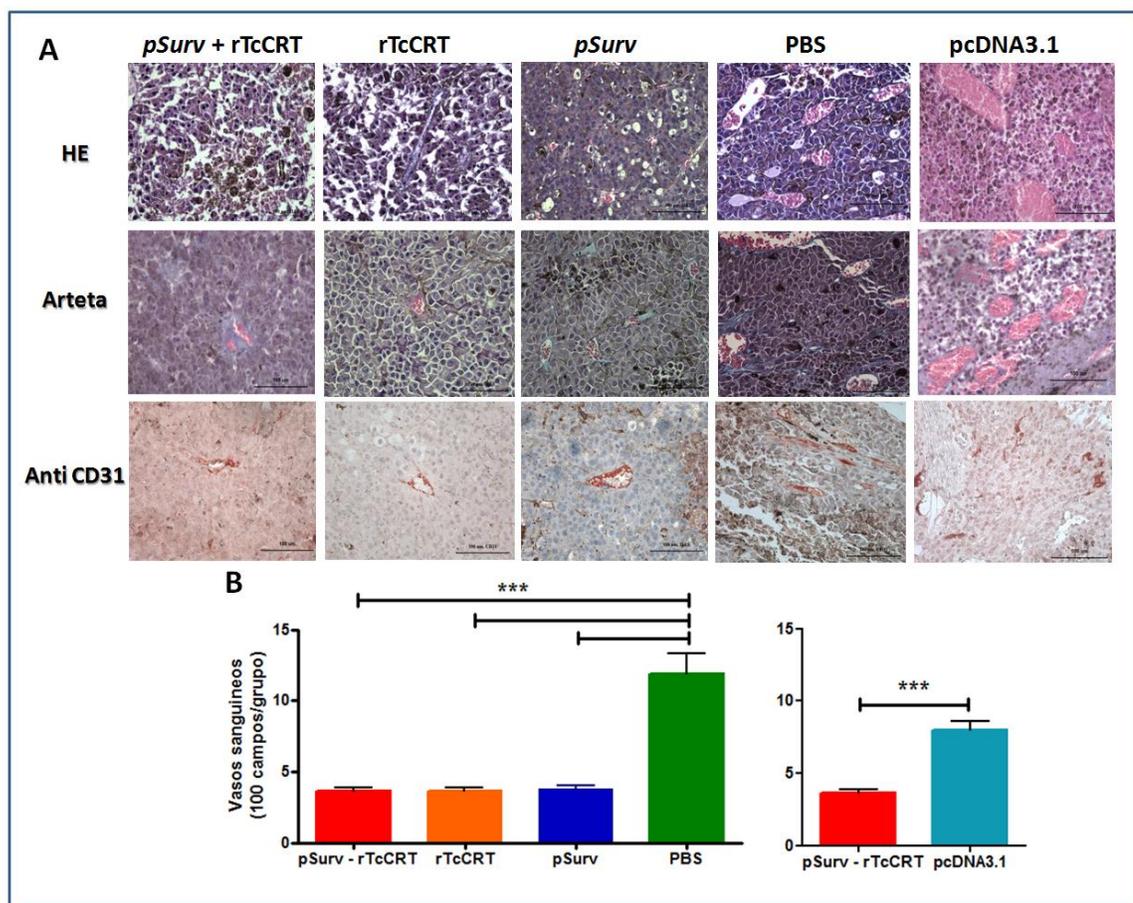


Figura 18: La inmunización con el plasmidio que codifica *Surv* y la inoculación con rTcCRT, ya sea en conjunto o por separado tienen efecto anti-angiogénico. **A.** Mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E), tinción con Arteta e Inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-CD31, se realizó el análisis y cuantificación (40x) **(B)** del proceso angiogénico, en cortes histológicos de tumores del melanoma murino B16-F10 (** $p < 0,0001$, Mann Whitney test de dos colas).

Los tumores extraídos fueron evaluados histológicamente estableciéndose la presencia de vasos sanguíneos tanto en el estroma como en el “parénquima” del tejido. Realizamos la marcación de los vasos mediante el anticuerpo anti-CD31, que identifica endotelios, y con la tinción con Arteta, específica para colágeno (Figura 18A).

La cuantificación doble ciego de la vasculatura presente en el total del tejido tumoral (estroma y parénquima) establece que tanto el tratamiento con el *pSurv* y rTcCRT por separado, como su uso en conjunto, ejercen un efecto anti-angiogénico sobre el tumor. De manera distinta, la inoculación del PBS y el tratamiento con el plasmidio sin la secuencia de *Surv*, no afecta la angiogénesis tumoral, observándose abundante irrigación, de gran calibre y gran tortuosidad (Figura 18B).

VIII.1.5. Determinación de la unión de rTcCRT a la membrana celular de los melanocitos y del reclutamiento C1q, primer componente de complemento humano, efectivo promotor de señales profagocíticas

VIII.1.5.1. rTcCRT se une a los melanocitos B16-F10

Así como se determinó anteriormente que la presencia de rTcCRT en el cultivo de células B16-F10 no tiene efecto tóxico, ahora quisimos evaluar si la proteína recombinante era capaz de unirse a la superficie de las células tumorales y facilitar de esta forma, su fagocitosis por macrófagos (Figura 19).

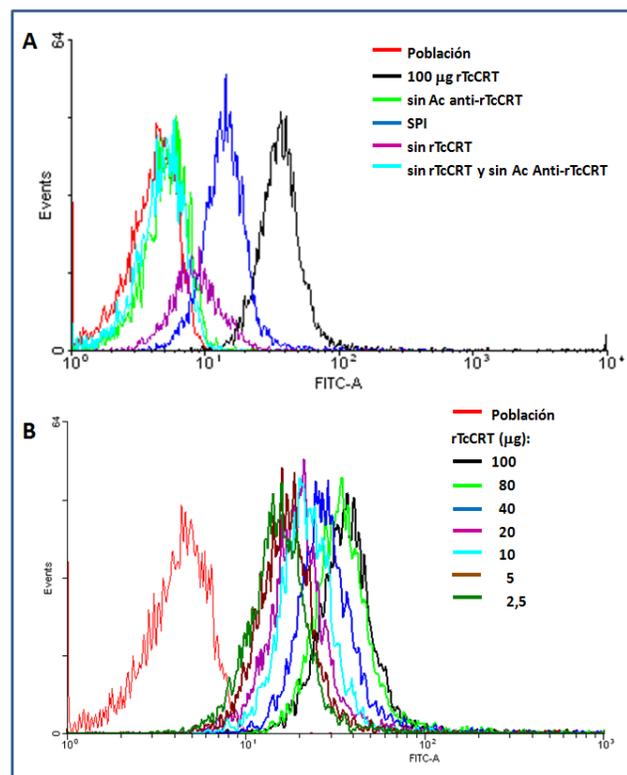


Figura 19: rTcCRT se une a las células B16-F10: Mediante citometría de flujo se evaluó la unión de rTcCRT, detectado mediante anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante. **A.** Evaluación de la unión de rTcCRT a las células B16-F10 y sus diversos controles. **B.** Determinación de la unión de en distintas concentraciones de rTcCRT a las células tumorales.

Las células B16-F10 son capaces de unir la proteína rTcCRT en la misma proporción que es utilizada en los ensayo *in vivo* (Figura 19A), cual podría a la vez unir C1q, primer componente del Sistema del Complemento. Según trabajos anteriores, se había establecido que una buena relación de trabajo *in vitro* es de 1:10 (C1q : rTcCRT), por lo que decidimos buscar una concentración menor de rTcCRT, que nos permitiera evaluar dicha unión. Es por esto que evaluamos concentraciones decrecientes de rTcCRT entre 100 y 2,5 μg para las 300.000 células (Figura 19B).

VIII.1.5.2. C1q, primer componente de la ruta clásica del complemento humano, es pro-fagocítico, al unirse a los melanocitos en forma independiente de la presencia de rTcCRT

C1q se adhiere a la membrana de las células B16-F10, aún en ausencia rTcCRT (Figura 20A). Más adelante se discutirá la posibilidad de la presencia de otra molécula en la superficie de las células tumorales, incluida la CRT murina, que pudieran explicar esta unión (*vide infra*). Esta posibilidad es consistente con la incapacidad de distintas concentraciones de fragmentos F(ab')₂ para inhibir dicha interacción, como se muestra en la Figura 20B. (revisar Anexo I, pag 121)

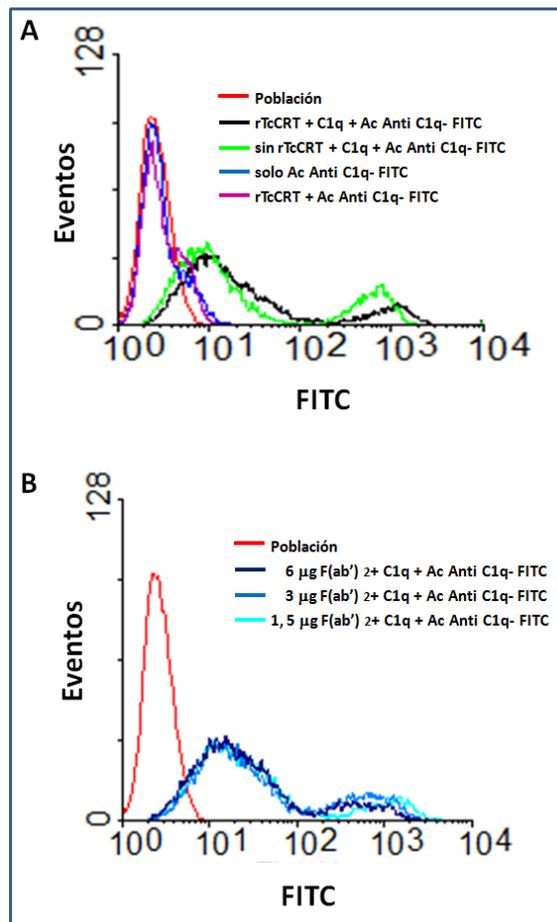


Figura 20: El primer componente del Sistema del Complemento, C1q, se une a las células B16-F10, independiente de la presencia de rTcCRT. Mediante Citometría de flujo se evaluó: A. la unión de C1q a las células B16-F10, en presencia de rTcCRT y B. la inhibición de dicha unión, mediante distintas concentraciones de fragmentos F(ab')₂.

VIII.1.5.3. rTcCRT y C1q, juntas o por separado, aumenta la fagocitosis de las células B16-F10 por los macrófagos RAW 264.7

Aunque las células tumorales fueron fagocitadas en presencia o no de rTcCRT y C1q, el gráfico muestra una mayor densidad de eventos que pudiera indicar una mayor fagocitosis en presencia de la molécula parasitaria y del primer componente del complemento (Figura 21).

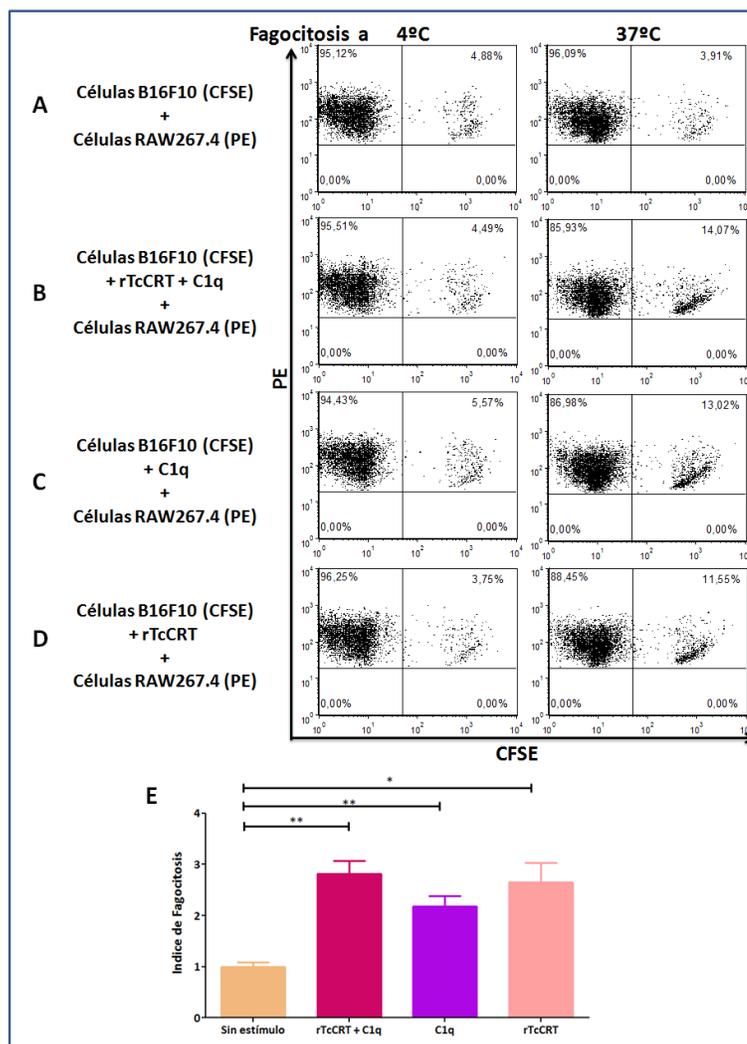


Figura 21: La presencia de rTcCRT y C1q aumenta la fagocitosis de las células B16-F10 por los macrófagos RAW 264.7. Mediante Citometría de flujo se determinó la fagocitosis de las células tumorales marcadas con el fluorógeno CFSE, por macrófagos detectadas mediante anticuerpos anti la molécula de membrana CD14. Análisis estadístico mediante Prueba de T (* p= 0,0146 ; **: p= 0,0029 – 0,0064).

VIII.1.6. La inoculación de rTcCRT promueve una respuesta inmune

Pese a la ausencia de un adyuvante en la inoculación de la rTcCRT, en el gráfico podemos establecer la presencia de anticuerpos anti dicha proteína, en la mayoría de los animales solo inoculados con la proteína (ratones 11 al 15) y en todos los animales inmunizados y luego inoculados con rTcCRT (ratones 16 al 20) (Figura 22).

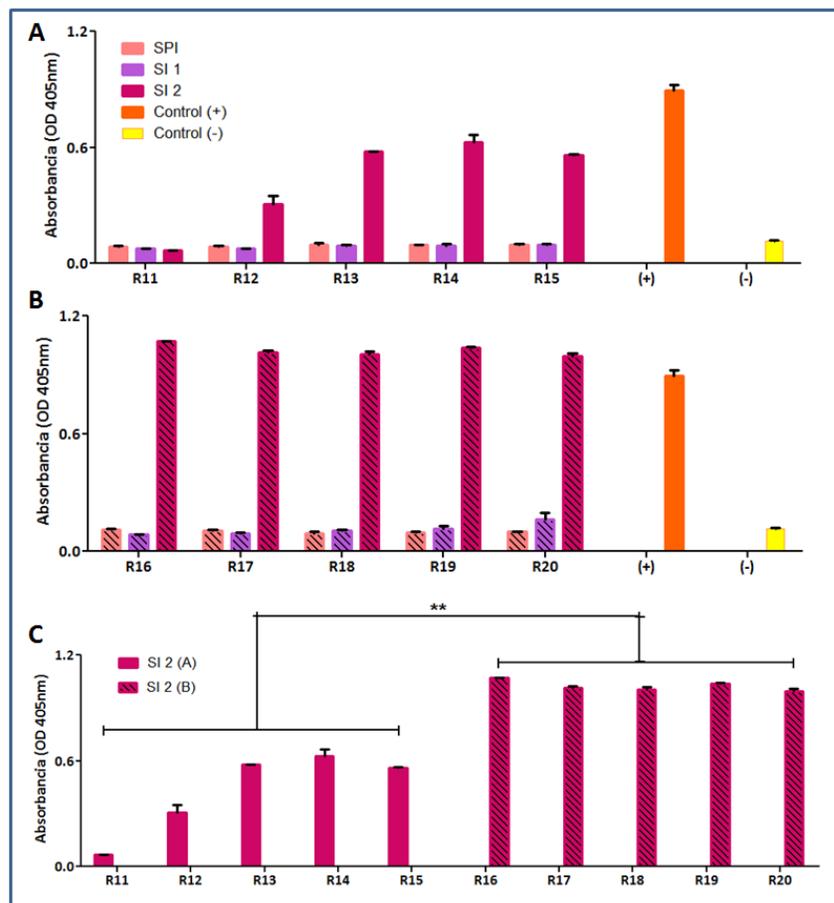


Figura 22: La inoculación de rTcCRT subcutáneamente generar anticuerpos en los animales tratados. Mediante ELISA se determinó la presencia de anticuerpos anti-rTcCRT en los sueros en dilución 1:100 de 2 grupos de animales (R11-R15 y R16-R20) inoculados s.c. con dicha proteína (A. R11-15), o previamente inmunizados con *pSurv* (B. R16-20), siendo posteriormente detectados con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a peroxidasa. En C. se muestra la comparación de los SI2 de ambos grupos (**: $p=0,004$, Mann Whitney test de una cola).

Se eligieron para este ensayo las diluciones 1:100 y 1:50 dados los resultados obtenidos en ensayos preliminares, donde se probaron las diluciones 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 y 1:400.

En relación a una posible estimulación de una respuesta inmune celular, verificable en el tejido tumoral, antecedentes de la literatura indican que CRT a nivel tumoral aumentaría la presencia de moléculas de adhesión facilitando la llegada de linfocitos al tumor (Wang *et al.*, 2012). Por ello, planteamos la posibilidad que la inoculación con rTcCRT facilitaría la infiltración linfocitaria tumoral, previa activación por la inmunización con *pSurv* (Lladser *et al.*, 2006), lo cual se traduciría en una mayor respuesta citotóxica con inhibición del crecimiento tumoral. En un experimento preliminar, se intentó definir si el tratamiento de los animales con *pSurv*-rTcCRT afecta la infiltración linfocitaria tumoral. Sin embargo, el número de animales usados, no resultó suficiente para una validación estadística (resultados no mostrados).

VIII.2. Objetivo específico II

Evaluar la capacidad de inhibición de *pSurv* con TcCRT, sobre la reincidencia de la formación del tumor subcutáneo y la metástasis, tras la resección de éste

El abordaje de este objetivo buscó encontrar la mayor aproximación de los resultados obtenidos en el objetivo anterior con nuestro modelo tumoral experimental, a un estudio pre-clínico. Se desarrollo un protocolo, basado en experiencias antes realizadas en nuestro laboratorio y en publicaciones internacionales (Gabri *et al.*, 2006; Lobos-González, 2011), pero estableciendo modificaciones específicas que permitieran incorporar tanto la inmunización con el plasmidio *pSurv* como el uso en lavados e inyecciones con rTcCRT, el cual se detalla en la Figura 23.

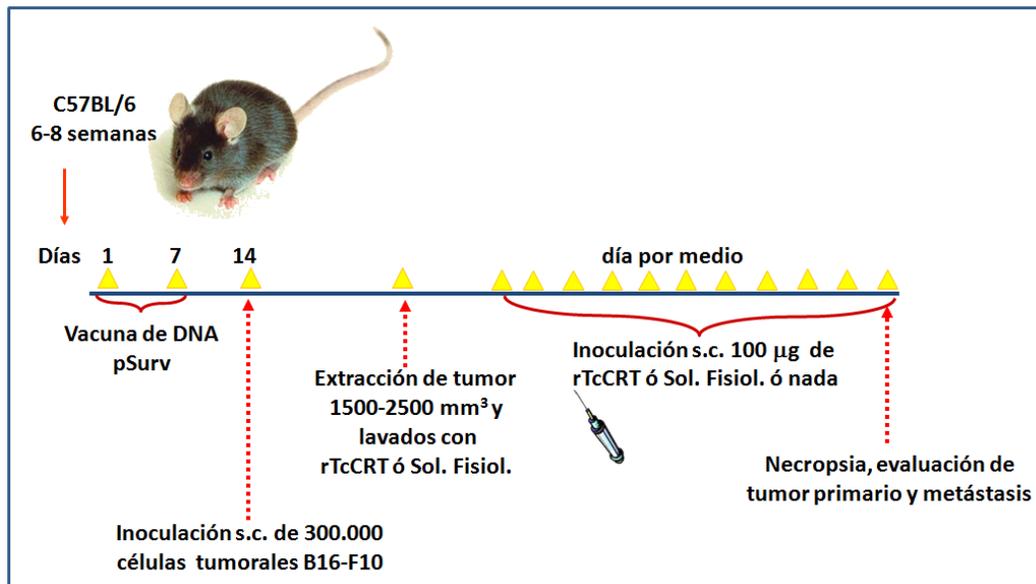


Figura 23: Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plasmidio *pSurv* y la inoculación de rTcCRT s.c. en la incidencia y metástasis de un melanoma murino. Ratones C57BL/6 hembras, se inmunizaron como se indica. Luego se inocularon s.c. con las células tumorales. Una vez alcanzados los 1.500 - 2.500 mm³ se les extrajo el tumor y se realizó un lavado local con rTcCRT o solución fisiológica. Posteriormente, la proteína ó la solución fisiológica, fue inoculada día por medio hasta el día 14 post cirugía, momento en que se eutanasiaron los animales y se evaluó el tumor primario y la metástasis.

Previo a la implementación de este protocolo, se evaluó el efecto del uso tópico de rTcCRT. Si consideramos que la razón de la utilización de esta proteína en esta tesis fue su capacidad anti-angiogénica, esta misma capacidad podría tener un efecto inhibitor de la cicatrización, y por lo tanto, evitar el cierre de la herida.

Para esto se desarrolló un ensayo piloto en el cual los animales fueron anestesiados y luego se les realizó una incisión quirúrgica. Se aplicó localmente 50, 100 y 150 μg de rTcCRT, tras lo cual se cerró la herida con puntos discontinuos. Se siguió la evolución de la herida, determinándose que al tercer día en los tres casos, las heridas estaban cerradas y sanas (Figura 24) por lo que se decidió utilizar la concentración de 100 μg de rTcCRT, dado que estaba en un punto medio de las concentraciones probadas, asegurando la obtención del efecto ya observado con la proteína, ya que corresponde a la misma concentración utilizada en el objetivo anterior.

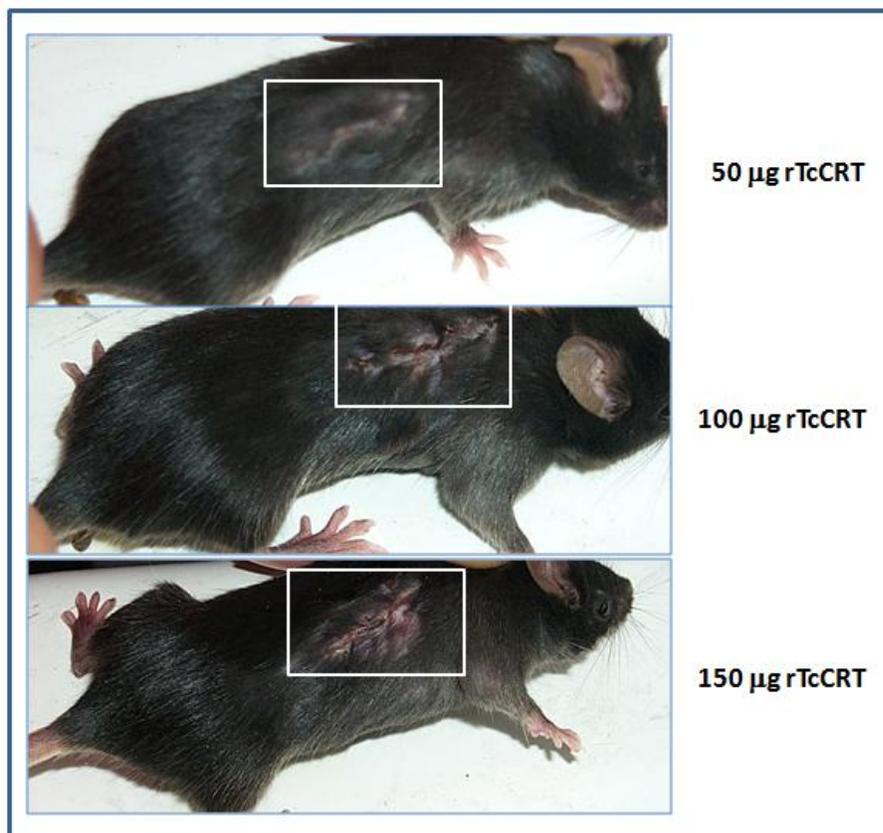


Figura 24: El proceso de cicatrización, tres días post herida quirúrgica, es macroscópicamente normal, cuando la herida se trata tópicamente con tres concentraciones de rTcCRT. Tres ratones C57BL/6 fueron sometidos a este ensayo piloto. Bajo anestesia, se les realizó una incisión de 4 cm, posterior lavado con la rTcCRT en las distintas concentraciones probadas, para finalmente, cerrar la herida con puntos discontinuos. Se evaluó la condición del animal y la herida diariamente, hasta el 7^o día post operatorio.

Una vez establecida las condiciones de uso de la proteína, se realizaron las cirugías en dos periodos, alcanzando un total de 14 animales por grupo: *pSurv*-rTcCRT (lavado e inyección subcutánea con rTcCRT), solución fisiológica (solo lavado) y solución fisiológica (lavado e inyección subcutánea).

Los animales fueron operados cuando el tamaño tumoral alcanzaba entre 1.500 – 2.500 mm³, establecido como se mencionó anteriormente. Estos tumores, pese a ser de gran volumen, son fácilmente extraíbles, sin descompensar al animal. Además, cada cirugía fue realizada en paralelo con animales del grupo tratado con *pSurv*-rTcCRT y un animal control, para evitar la variabilidad experimental derivada de la anestesia, el cirujano u otras condiciones.

Al graficar el tamaño de los tumores previo a la cirugía, podemos observar una distribución similar entre los grupos en estudio, estableciéndose condiciones pre-quirúrgicas semejantes (Figura 25).

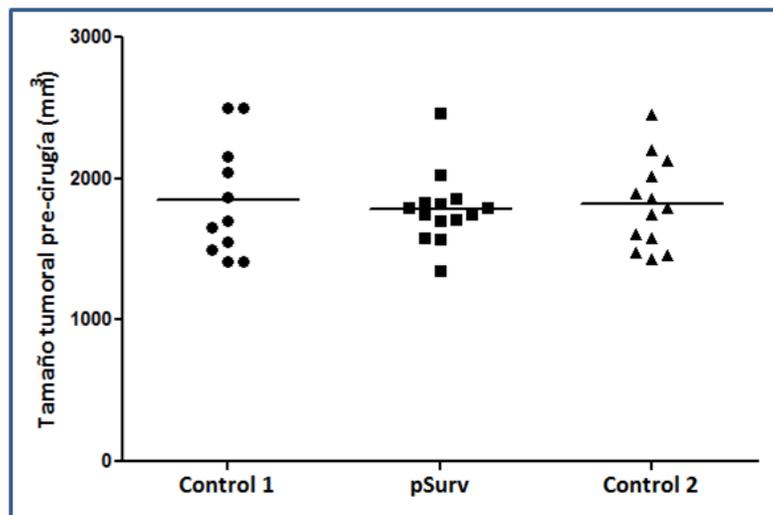


Figura 25: La inmunización con *pSurv*, previo a la remoción quirúrgica no afecta el tamaño del tumor B16-F10 en ratones. Según métodos establecidos, los tumores fueron medidos y seleccionados para cirugía siempre resectando en paralelo tumores de todos los grupos. No hubo diferencias entre los tamaños tumorales de los grupos evaluados (análisis estadístico mediante Kruskal-Wallis test, $p= 0,9898$).

VIII.3. Objetivo Específico III: Evaluar la capacidad de inhibición de la metástasis pulmonar de las células tumorales B16-F10, por los plasmidios que codifican *Surv*

VIII.3.1. La inmunización intradérmica con *pSurv* o *pSec-Surv* no afecta la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10

El proceso de metástasis requiere de varias etapas, como se describió en la Introducción. En este objetivo evaluamos la capacidad de las células de concretar gran parte de este proceso, inoculando las células tumorales a través de la vena lateral de la cola murina, esperando que ellas sean capaces de adherirse a las células endoteliales pulmonares, atravesar la membrana basal y alojarse entre las células del tejido noble. Todo esto dado por la atracción que presenta la línea celular B16-F10 por este tejido ("homing").

En este caso, se utilizaron los plasmidios *pSurv* y *pSec-Surv*, buscando determinar si existen diferencias en el efecto entre ellos en el proceso de metástasis pulmonar, dadas las diferencias en la expresión de la proteína, intra o extracelular, respectivamente. Los plasmidios se inocularon asociados a los TLR-L, utilizando el protocolo que se describe en la Figura 28.

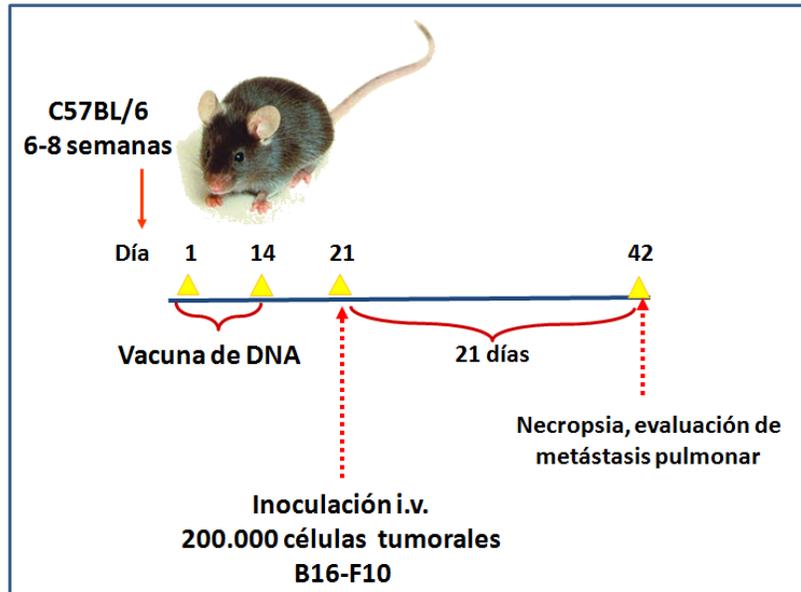


Figura 28: Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con el plásmido *pSec-Surv* y *pSurv* en la metástasis pulmonar. Ratones C57BL/6 hembras, se inmunizaron como se indica. Luego se inocularon las células tumorales i.v., evaluando los pulmones al día 21.

Tras 21 días de inoculación de las células tumorales a través de la vena lateral de la cola, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y luego sometidos a necropsia. Se les extrajo los pulmones y se verificó que no existieran tumores en otras zonas anatómicas. En los pulmones fijados se cuantificaron los nódulos metastásicos, lo que fue posible de visualizar gracias a la pigmentación natural de las células de melanoma. No fue posible establecer diferencias entre los grupos analizados (Figura 29).

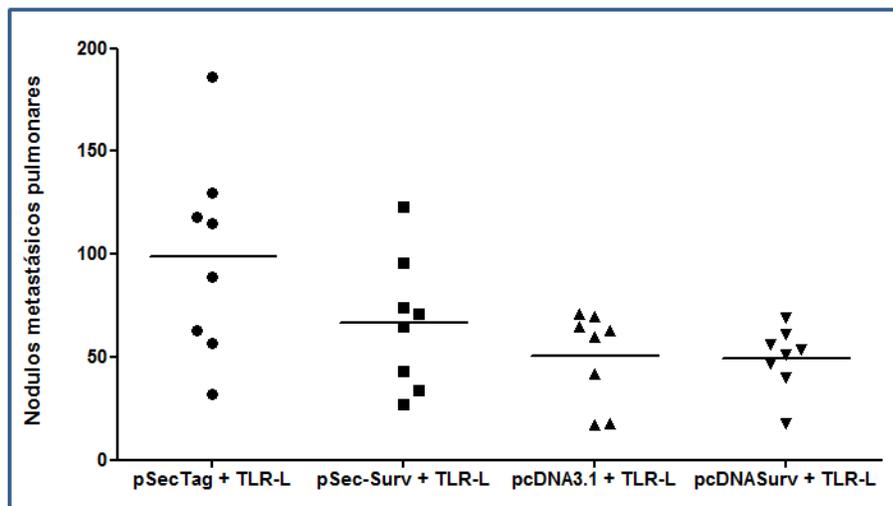


Figura 29: La inmunización con *pSurv* o *pSec-Surv* no afecta la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10. Se cuantificó el número de nódulos metastásicos pulmonar. Análisis estadístico con Mann Whitney test ($p > 0,5$).

VIII.3.2. La combinación de la inmunización con *pSurv* y *pSec-Surv*, más la inoculación i.v. con rTcCRT, inhibe la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10

Pese a que pcDNA3.1 y el pSecTag son plasmidios de distintas naturalezas, que generan proteínas de diferente distribución celular, estas mismas cualidades nos llevaron a evaluar su efecto en la metástasis pulmonar experimental. Sin embargo, y dado que no encontramos diferencias entre los plasmidios que codifican *Surv* (Figura 29) y sus respectivos controles (plasmidios vacíos) decidimos evaluar el efecto de los mismos plasmidios, pero utilizando la metodología probada en trabajos anteriores (Lladser *et al.*, 2006). En dicho trabajo se utilizaron ambos plasmidios vía i.m y con tres inmunizaciones semana por medio, pero en este caso combinando los dos plasmidios que codifican *Surv*, *pSec-Surv* y *pSurv*, con la inoculación, en este caso i.v., de la rTcCRT (Figura 30).

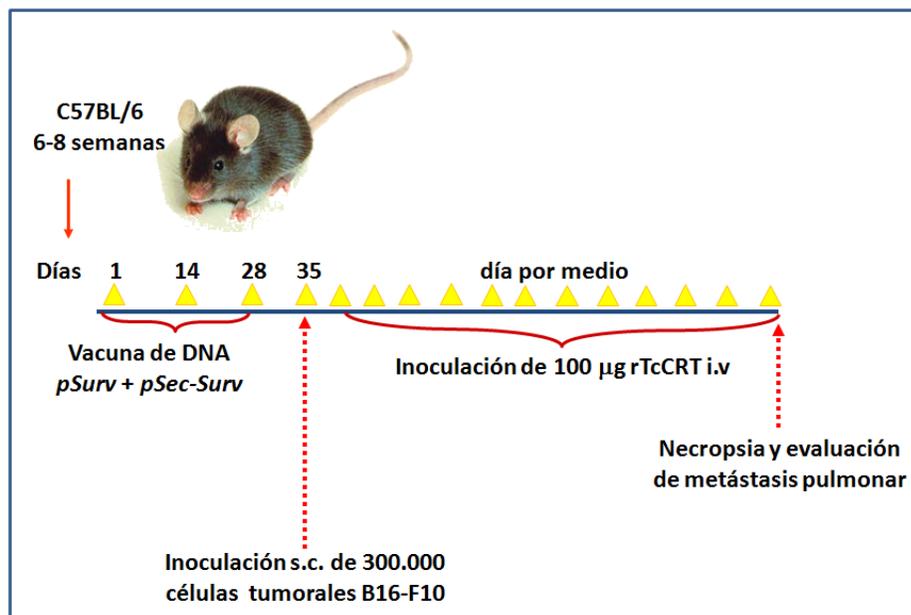


Figura 30: Diseño experimental para definir el rol de la inmunización con los plasmidios *pSec-Surv* y *pSurv* en la metástasis pulmonar. Ratones C57BL/6 hembras, se inmunizaron i.m. con ambos plasmidios, como se indica. Luego se inocularon las células tumorales i.v., seguidas de la inoculación día por medio de rTcCRT. Finalmente, se evaluó la metástasis pulmonar el día 21 post inoculación de las células tumorales.

La evaluación pulmonar nos permitió definir el grado de invasión metastásicas de las células tumores.

En la Figura 31 observamos, nuevamente, que al combinar rTcCRT, esta vez con ambos plasmidios que codifican *Surv*, obtenemos un efecto sinérgico.

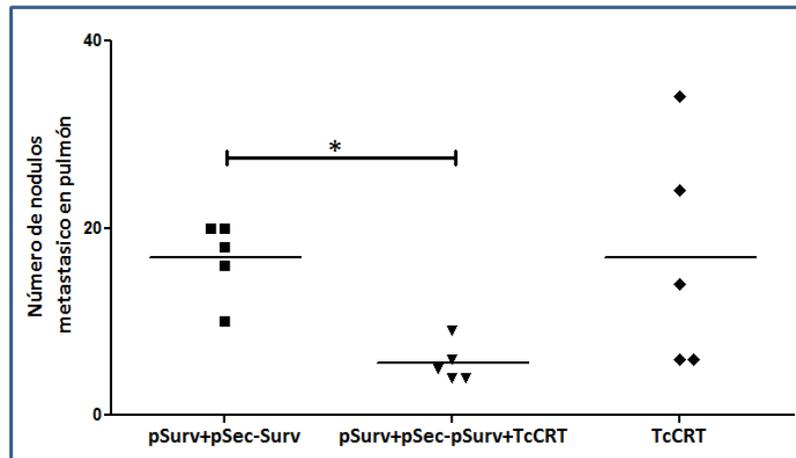


Figura 31: La combinación de la inmunización con *pSurv* y *pSec-Surv*, más la inoculación i.v. con rTcCRT, inhibe la metástasis pulmonar experimental de las células tumorales B16-F10. Se observan los pulmones fijados de los ratones inoculados con células tumorales, comparando la invasión del parénquima pulmonar con células metastásicas. Análisis estadístico mediante Mann Whitney test (*: p= 0,0119).

IX. Discusión

El desarrollo tumoral es un proceso complejo, que consta de diversas etapas que deben ocurrir en orden para alcanzar estadios tardíos de la enfermedad. Con este objeto, las células tumorales adquieren una serie de capacidades que les permite evadir al sistema inmune, replicarse en forma sostenida e inducir angiogénesis desde vasos sanguíneos cercanos para garantizar el aporte de oxígeno y nutrientes, entre otras características. En este contexto, existen una serie de moléculas que favorecen o restringen el crecimiento tumoral, y que actúan sobre distintos blancos a través de diferentes mecanismos de acción.

Así, en esta Tesis Doctoral hemos sometido a experimentación el efecto de la combinación de la inmunización genética con *Surv*, conjunta con la administración de rTcCRT, sobre un melanoma murino, focalizándonos en tumores primarios y sus metástasis. La inmunización con *Surv*, según antecedentes de la literatura, genera activación de linfocitos T CD8, pudiendo ejercer su acción sobre células endoteliales o tumorales (Lladser *et al.*, 2010; Lladser *et al.*, 2006). En el caso de TcCRT, se ha descrito, entre otras propiedades, su interacción con endotelios, presumiblemente a través de un receptor tipo "scavenger", puesto que esta unión es inhibida por Fucoidina, un ligando específico para estos receptores (Lopez *et al.*, 2010). En ambos casos no es posible descartar otros mecanismos.

Adicionalmente, la literatura nos proporciona una serie de elementos que fundamentan el tratar experimentalmente tumores mediante inmunización genética con *Surv*, acompañada de la administración de rTcCRT (Adida *et al.*, 1998; Adida *et al.*, 2000a; Adida *et al.*, 2000b; Altieri, 2008; Ambrosini *et al.*, 1997; Eggleton *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2010; Lladser *et al.*, 2010; Lladser *et al.*, 2006; Obeid *et al.*, 2007): **i)** Los tumores sobreexpresan *Surv*, **ii)** La inmunización genética con *Surv* genera una respuesta inmune adaptativa, específica, persistente y preferentemente celular, contra células tumorales y/o endotelios, **iii)** TcCRT es anti-

angiogénica y anti-tumoral *in vivo*, y equimolarmente más eficiente que HuCRT, **iv**). Células tumorales estresadas translocan CRT mamífera a sus membranas, **v**). CRT tumoral translocada captura C1 del Complemento (señal de fagocitosis), **vi**). Las células dendríticas reconocen C1 en la membrana de las células tumorales, fagocitándolas y procesando sus antígenos, lo que se traduce en un efecto inmune anti-tumoral.

Basados en los elementos racionales expuestos en la Introducción y en los párrafos anteriores de esta sección, propusimos como Hipótesis de Trabajo, que la inmunización genética con *Surv* y la administración parenteral concomitante de rTcCRT, actúan sinérgicamente, generando una resistencia al desarrollo de tumores. Para satisfacer esta Hipótesis nos propusimos evaluar la capacidad inmunogénica del plasmidio codificante de *Surv* (*pSurv*), en conjunto con rTcCRT, para inhibir la formación de tumores. También decidimos determinar la capacidad de esta combinación para inhibir la reincidencia tumoral *in situ* y las metástasis, tras la resección quirúrgica del tumor principal. Por último, evaluamos la capacidad de inhibición de las metástasis pulmonares de las células tumorales B16-F10, por los plasmidios que codifican *Surv*.

En relación a la inmunización genética, los resultados obtenidos señalan que el éxito de este procedimiento depende, entre otros, de la elección correcta de la o las moléculas codificadas y del tipo de plasmidio a utilizar. La inmunización genética con *Surv* debiera generar una respuesta inmune, humoral y/o celular, la cual pudiera reconocer en la membrana de las células tumorales a péptidos derivados del procesamiento de dicha proteína, ya sobreexpresada.

La presencia del gen codificante de *Surv* en el plasmidio *pSurv* (Figura 6) y la determinación de su capacidad de aumentar la expresión de *Surv* cuando es transfectado en células HEK293T (Figura 7) confirman la posibilidad de que genere dicha respuesta inmune. Las células B16-F10

(Figura 8), con la cuales fueron desafiados los animales, expresan Surv, de localización intracelular, principalmente. Extracelularmente, se detectó un 11% de reactividad de los anticuerpos policlonales anti-Surv (Figura 9). Esto podría corresponder, alternativa o concomitantemente, a Surv translocada ó péptidos derivados de capacidad residual presentadora de antígenos, vía MHC-I de las células tumorales. En relación a una posible traslocación de Surv, pese a que no se le ha descrito un dominio de transmembrana, es posible que ésta se una a otra proteína extracelular, que sí lo tenga.

La inmunización de ratones Balb/c con los plasmidios que codifican *Surv* estimula la respuesta citotóxica (Lladser *et al.*, 2006), por esto nuestra primera propuesta fue combinar Surv y TcCRT, ambas mediante inmunización genética. Propusimos un protocolo de inmunización genética con *Surv* y *TcCRT* con fines principalmente profilácticos (Figura 11). Sin embargo, no encontramos efecto en la curva temporal de crecimiento tumoral (Figura 12). Muy probablemente, la inmunización contra estas moléculas no generó la respuesta inmune esperada o no fue lo suficientemente efectiva como para intervenir en el crecimiento tumoral.

Dado lo anterior, propusimos insistir en las propiedades, ya reportadas, anti-angiogénicas y anti-tumorales de TcCRT, utilizándola como proteína recombinante, administrada s.c. Primero, verificamos que la proteína u otras moléculas (*i.e.* LPS, derivado de los cultivos bacterianos recombinantes), no fueran responsables *per se* del efecto anti-tumoral. Las células tratadas con rTcCRT no difirieron, en su proliferación, de las tratadas con el medio de cultivo RPMI, con 10 ó 15% SFB (Figura 13).

Considerando las propiedades anti-angiogénicas y anti-tumorales de TcCRT, propusimos su inoculación día por medio (Figura 14), en dosis mayor que la descrita en nuestro laboratorio

(Lopez *et al.*, 2010), pero un 75% menos de lo utilizado en otros estudios, con HuCRT (Pike *et al.*, 1998).

La característica sinérgica de la inmunización genética con *pSurv*, en conjunto con rTcCRT, en cuanto a retrasar el crecimiento de un melanoma experimental murino (Figura 15), queda en evidencia al comparar los grupos inmunizados con *pSurv* y tratados con rTcCRT (designado como *pSurv*-rTcCRT en la Figura), con aquel inmunizado con *pSurv*, sin tratar con TcCRT (*pSurv*-PBS), ó con aquel solo tratado con solo rTcCRT. En la misma Figura, se observa que el grupo *pSurv*-rTcCRT presenta un menor crecimiento tumoral que el tratado con rHuCRT, solo o combinado con inmunización mediada por *pSurv*. Esto último concuerda con las propiedades anti-angiogénicas y anti-tumorales más eficientes de la proteína parasitaria, comparada con la contraparte humana (Lopez *et al.*, 2010). En cuanto a la supervivencia de los animales sometidos a los diferentes tratamientos, no se detectó diferencias. (El compromiso bioético indica que los animales deben ser sacrificados cuando el tumor alcanza un tamaño máximo de 3.000 mm³). Esto tiende a homogeneizar los efectos que las variables experimentales pudieran haber inducido. Otra variable imponderable en estos experimentos, es el rol que las metástasis pudieran jugar, aunque en estos animales no fueron detectadas al examen anatómo-patológico macroscópico.

El efecto anti-angiogénico/ anti-tumoral de rTcCRT ha sido restringido a los aa 1 a 193 (dominio N). Por otra parte, el dominio R, se extiende entre los aa 136 y 281. Como entre los dominios N y R hay un traslape de solo 57 aa (Figura 5) (Ferreira, 2004; Ferreira *et al.*, 2004a), nos preguntamos si el dominio R podría servir como control negativo del efecto anti-angiogénico. Sin embargo, los resultados de la Figura 16 indican que el dominio R conserva la actividad anti-tumoral. El mapeo más preciso de la actividad anti-angiogénica/anti-tumoral, dentro de los 57 aa comunes a los dominios R y N, es tema de investigación actual en nuestro laboratorio.

Al analizar el tejido tumoral, pudimos distinguir varias características histológicas peculiares de este melanoma, como la invasión que hace de la dermis y la gran cantidad de tejido conectivo laxo en su parénquima. Además, encontramos una gran cantidad de vasos sanguíneos muy tortuosos, aunque principalmente de pequeño calibre (Figura 17). Con esta información, decidimos evaluar el efecto de la inmunización con *pSurv*, la inoculación de rTcCRT o la combinación de ambas sobre la angiogénesis, muy necesaria para la nutrición, oxigenación y la eliminación de desechos en tumores mayores a los 2 a 3 mm. La inmunohistoquímica, utilizando un Ac anti-CD31, molécula característica, entre otras, de los endotelios, permite visualizar y cuantificar los vasos sanguíneos presentes en el tejido. Así, detectamos que la molécula parasitaria tiene un efecto inhibitorio de la angiogénesis, como también lo tienen la inmunización con *pSurv* ó la combinación de ambos tratamientos (Figura 18). Aunque, observamos el mismo efecto, muy probablemente los mecanismos y blancos moleculares por los cuales funcionan ambas moléculas son distintos. Las células endoteliales sobre expresan de manera momentánea a *Surv*, cuando se encuentra en periodo proliferativos (Altieri, 2003; Pennati *et al.*, 2007). Si *Surv* es inmunogénica, su reconocimiento en las células endoteliales, podría tener efecto anti-angiogénico y, por ende, anti-tumoral. Por su parte, rTcCRT actuaría inhibiendo la proliferación, morfogénesis capilar y desarrollo de capilares, como hemos descrito (Lopez *et al.*, 2010).

Al detectar la unión de rTcCRT a las células B16-F10, observamos que la proteína se une a las células murinas, incluso en cantidades menores a las utilizadas en el tratamiento *in vivo* (Figura 19). Sin embargo, C1 del Sistema del Complemento se une a la membrana de células no incubadas previamente con rTcCRT. Quizás, la CRT murina (MmCRT) translocada a la membrana de las células B16-F10, une C1 y esta unión no sería revertida por fragmentos F(ab')₂ (Figura 20).

Si consideramos que cC1qR corresponde a Calreticulina de la célula mamífera que, translocada a la superficie, actúa como receptora de C1 (Eggleton *et al.*, 2000). Por lo tanto, si se pre-incuba células tumorales con TcCRT y, luego de lavarlas, se las incuba con C1q, éste debiera interactuar con cC1qR de los macrófagos. El resultado de la Figura 21B, concuerda con esa predicción. Sin embargo, también hubo fagocitosis en células incubadas solo con rTcCRT (Figura 21D) ó solo con C1q (Figura 21C). En el primer caso, la fuente de C1q pudo haber sido endógena, proveniente de los fagocitos, cuya capacidad de sintetizar y secretar C1 es conocida (Morley B.J., 2000) (Figura 21D). En la situación recíproca, representada por el segundo caso, la fuente de CRT también pudo ser endógena, ya que se ha reportado que las células tumorales murinas pueden translocar CRT a la membrana (Obeid *et al.*, 2007) (Figura 21D). El resultado negativo de fagocitosis obtenido cuando se co-cultivaron estas células, en ausencia de ambas moléculas exógenas, podría explicarse por una deficiencia relativa del ligando (C1q) ó del receptor soluble (CRT), en relación al receptor translocado, unido a la membrana de la célula tumoral (Figura 21A). En otras, palabras, es probable que en esta última situación hubo fagocitosis mediada sólo por las moléculas endógenas, pero a un nivel marginal no detectable.

Así también, determinamos que la administración de rTcCRT genera una respuesta humoral contra ella, especialmente en los animales previamente inmunizados con *pSurv*. Esto ocurre, pese a que la proteína no es inoculada en conjunto a algún adyuvante, que potencie su reconocimiento por el sistema inmune como molécula extraña. Es probable que la inmunización haya generado un ambiente inmunológico privilegiado, favoreciendo la presentación antigénica de rTcCRT y la generación de anticuerpos contra ella (Figura 22).

Más tarde, decidimos someter nuestro protocolo de tratamiento a un modelo pre-clínico quirúrgico (Figura 23). A pesar de las evidencias en cuanto a la capacidad anti-angiogénica de TcCRT (Lopez *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2010), la proteína no afectó negativamente la cicatrización de la incisión quirúrgica, según apreciación macroscópica (Figura

24). Sin embargo, aunque en la literatura se ha descrito que CRT es pro-cicatricial, dependiendo del contexto tisular en que se encuentre (Gold *et al.*, 2010; Gold *et al.*, 2006; Nanney *et al.*, 2008), no podemos descartar que TcCRT, en estos experimentos, haya tenido un rol similar, pues no nos focalizamos en la medición de parámetros cicatriciales a nivel microscópico.

Las cirugías se realizaron una vez establecidos los tumores pre-quirúrgicos, los cuales no diferían de tamaño (Figura 25), independientemente de que los animales hayan sido inmunizados, o no, similar a lo ocurrido en los ensayos de crecimiento tumoral (Figura 15). Sin embargo, contrario a lo esperado, el tumor primario no reapareció en los animales controles, como sí había ocurrido en los ensayos preliminares. Esto impidió la evaluación de lo que ocurre con animales inmunizados con *pSurv* y tratados con rTcCRT, por no tener punto de comparación (Figura 26). Dadas estas dificultades, decidimos evaluar la metástasis ganglionar (Figura 27A) ó pulmonar (Figura 27B), sin detectar diferencias. Es probable entonces que, aunque la cirugía fue lo suficientemente radical como para evitar la reaparición del tumor primario, no impidió las metástasis, ganglionar y pulmonar, presumiblemente por células tumorales que migraron previo al acto quirúrgico.

Finalmente, evaluamos el efecto de la inmunización con *Surv* en metástasis pulmonar, incluyendo los plasmidios *pSurv*, además del *pSec-Surv*. Este último, induce expresión de la proteína secretable. Sin embargo, no se observó inhibición (Figura 29), a diferencia de la inmunización con ambos plasmidios combinada con el tratamiento con rTcCRT, observándose una inhibición metastásica sinérgica (Figura 31). Muy probablemente, la generación de respuesta humoral contra la *Surv* secretada por las células transfectadas favorece la detección y posterior destrucción de las células tumorales que pudieran viajar vía sanguínea a los pulmones.

En síntesis, aunque los efectos de la combinación propuesta sobre metástasis fueron básicamente marginales, proponemos que los resultados principales obtenidos en el desarrollo de esta Tesis satisfacen la Hipótesis propuesta (*i.e.*...*"la inmunización genética con Surv y la administración parenteral concomitante de TcCRT, actúan sinérgicamente, generando una resistencia al desarrollo de tumores"*), considerando que: **i)** La combinación de la administración parenteral de rTcCRT, en conjunto con la inmunización genética con *Surv*, interfiere sinérgicamente con el crecimiento tumoral, **ii)** aumentando la supervivencia de los animales tratados. **ii)** En términos equimolares, la sinergia anti-tumoral de rTcCRT/inmunización con *pSurv*, es mayor que la de rHuCRT/inmunización *pSurv*, **iii)** Tanto la administración de rTcCRT, como la inmunización con *pSurv*, o combinaciones, inhiben la angiogénesis tumoral, **iv)** TcCRT se une a las células tumorales y recluta al primer componente de la Ruta Clásica del Complemento, C1q, y, finalmente, **v)** Muy probablemente, C1q, unido a rTcCRT actúa como una señal de fagocitosis, facilitando la fagocitosis y, por ende, la inmunogenicidad tumoral (resultados resumidos en la Figura 32).

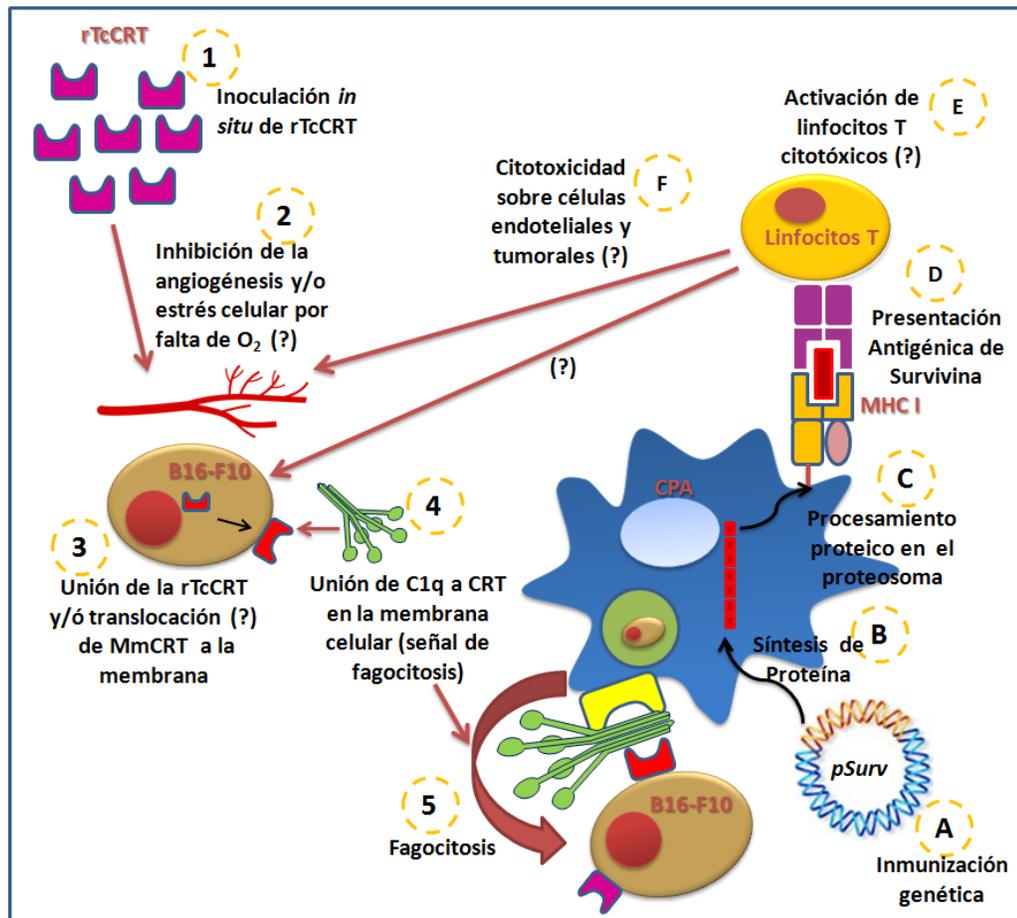


Figura 32: Modelo esquemático que explica el efecto sinérgico de la inmunización genética con survivina, en conjunto con la administración de TcCRT recombinante. (Este modelo se basa en hechos experimentales ya publicados o generados en esta Tesis. Se señala con signos interrogativos algunos eventos hipotéticos, aún no investigados). La presencia de TcCRT (1) inhibe la angiogénesis y, por ende, el crecimiento tumoral. La consecuente falta de nutrientes y de oxigenación generaría estrés sobre las células tumorales (2). Lo anterior podría mediar la translocación de CRT de la célula tumoral murina (MmCRT) a la superficie (3). TcCRT y/o MmCRT recluta C1q, primer componente del sistema del complemento (4), que actúa como señal de fagocitosis para las células presentadoras de antígeno (CPA) (5). Por otra parte, la inmunización con el plasmidio que codifica Surv (A), genera la síntesis de la proteína por la CPA (B), procesándola en el proteosoma (C) y presentándola en moléculas MHC I (D). En consecuencia se activarían linfocitos T citotóxicos (E), los cuales actuarían sobre las células endoteliales (inhibiendo la angiogénesis) y/o sobre las células tumorales (F). El crecimiento tumoral sería así inhibido en forma directa (citotoxicidad) e indirecta (anti-angiogénesis). La originalidad de esta tesis consiste en haber demostrado un efecto anti-tumoral sinérgico cuando se usan ambas estrategias experimentales combinadas.

X. REFERENCIAS

Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC (1998). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* **152**: 43-9.

Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J *et al* (2000a). Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* **96**: 1921-5.

Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P *et al* (2000b). Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* **111**: 196-203.

Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, Gonzalez FE, Ramirez M, Reyes D *et al* (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* **17**: 2474-83.

Aguillon JC, Ferreira L, Perez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A *et al* (2000). Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg* **63**: 306-12.

Altieri DC (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**: 8581-9.

Altieri DC (2006). Targeted therapy by disabling crossroad signaling networks: the survivin paradigm. *Mol Cancer Ther* **5**: 478-82.

Altieri DC (2008). New wirings in the survivin networks. *Oncogene* **27**: 6276-84.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* **3**: 917-21.

Andersen MH, Pedersen LO, Becker JC, Straten PT (2001a). Identification of a cytotoxic T lymphocyte response to the apoptosis inhibitor protein survivin in cancer patients. *Cancer Res* **61**: 869-72.

Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Brocker EB, Becker JC, Straten P (2001b). Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* **61**: 5964-8.

Bachinsky MM, Guillen DE, Patel SR, Singleton J, Chen C, Soltis DA *et al* (2005). Mapping and binding analysis of peptides derived from the tumor-associated antigen survivin for eight HLA alleles. *Cancer Immun* **5**: 6.

Badran A, Yoshida A, Ishikawa K, Goi T, Yamaguchi A, Ueda T *et al* (2004). Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem Biophys Res Commun* **314**: 902-7.

Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin HS, Valentine C *et al* (2007). MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol* **178**: 1164-71.

Batmonkh Z, Kallinikova VD, Pakhorukova LV, Kravtsov EG, Karpenko LP, Dalin MV (2006). In vivo anticancer activity of lysates from trypanosoma cruzi of different genetic groups. *Bull Exp Biol Med* **142**: 470-3.

Bronte V (2001). Genetic vaccination for the active immunotherapy of cancer. *Curr Gene Ther* **1**: 53-100.

Byun SS, Yeo WG, Lee SE, Lee E (2007). Expression of survivin in renal cell carcinomas: association with pathologic features and clinical outcome. *Urology* **69**: 34-7.

Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A *et al* (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* **50**: 127-34.

Cao Y (2005). Tumor angiogenesis and therapy. *Biomed Pharmacother* **59 Suppl 2**: S340-3.

Capalbo G, Dittmann K, Weiss C, Reichert S, Hausmann E, Rodel C *et al* (2010). Radiation-induced survivin nuclear accumulation is linked to DNA damage repair. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **77**: 226-34.

Casati C, Dalerba P, Rivoltini L, Gallino G, Deho P, Rini F *et al* (2003). The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res* **63**: 4507-15.

Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* **77**: 1303-10.

Coddou F, Weinberger, K., Ferreira, A. (2012). Possible CRT Biological Rol in the Saliva of Two Evolucionary Distant Species. *Submitted*.

Cohen C, Lohmann CM, Cotsonis G, Lawson D, Santoianni R (2003). Survivin expression in ovarian carcinoma: correlation with apoptotic markers and prognosis. *Mod Pathol* **16**: 574-83.

Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JJ, Lambris JD *et al* (2012). Anaphylatoxin c5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol* **189**: 4674-83.

Cromme FV, van Bommel PF, Walboomers JM, Gallee MP, Stern PL, Kenemans P *et al* (1994). Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br J Cancer* **69**: 1176-81.

Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**: 563-72.

Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M *et al* (2001). Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* **108**: 669-78.

Cheng WF, Hung CF, Chen CA, Lee CN, Su YN, Chai CY *et al* (2005). Characterization of DNA vaccines encoding the domains of calreticulin for their ability to elicit tumor-specific immunity and antiangiogenesis. *Vaccine* **23**: 3864-74.

Danilova NM, Kallinikova VD (1968). [Cytological and cytochemical changes of human malignant cells under the effect of inoculation with *Trypanosoma cruzi* in tissue culture]. *Med Parazitol (Mosk)* **37**: 666-72.

Decker WK, Qiu J, Farhangfar F, Hester JH, Altieri DC, Lin AY (2006). A retrogen plasmid-based vaccine generates high titer antibody responses against the autologous cancer antigen survivin and demonstrates anti-tumor efficacy. *Cancer Lett* **237**: 45-55.

Deguchi M, Shiraki K, Inoue H, Okano H, Ito T, Yamanaka T *et al* (2002). Expression of survivin during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **297**: 59-64.

Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB (2000). Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: S190-3.

Duaso L, Duaso J, Coddou F, Weinberger K, Maldonado I, Ramírez G *et al* (2012). *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits endothelial cell migration in vivo in a mammal model. *Submitted*.

Eggleton P, Tenner AJ, Reid KB (2000). C1q receptors. *Clin Exp Immunol* **120**: 406-12.

Feltquate DM (1998). DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J Cell Biochem Suppl* **30-31**: 304-11.

Ferrara N, Kerbel RS (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**: 967-74.

Ferreira A (2005). *Inmunología Básica y Clínica*. Mediterránea, 486pp.

Ferreira V. (2004). *Programa Disciplinario de Inmunología, Vol. PhD*. Universidad de Chile: Santiago, Chile.

Ferreira V, Molina MC, Valck C, Rojas A, Aguilar L, Ramirez G *et al* (2004a). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol* **40**: 1279-91.

Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC *et al* (2004b). The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **172**: 3042-50.

Fidler IJ (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* **35**: 218-24.

Friedl P, Alexander S (2011). Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell* **147**: 992-1009.

Gabri MR, Mazorra Z, Ripoll GV, Mesa C, Fernandez LE, Gomez DE *et al* (2006). Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model. *Clin Cancer Res* **12**: 7092-8.

Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB *et al* (2002). Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* **16**: 99-109.

Gelebart P, Opas M, Michalak M (2005). Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 260-6.

Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM *et al* (2010). Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* **24**: 665-83.

Gold LI, Rahman M, Blechman KM, Greives MR, Churgin S, Michaels J *et al* (2006). Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *J Invest Dermatol Symp Proc* **11**: 57-65.

Gordan JD, Vonderheide RH (2002). Universal tumor antigens as targets for immunotherapy. *Cytotherapy* **4**: 317-27.

Griffin RJ, Molema G, Dings RP (2006). Angiogenesis treatment, new concepts on the horizon. *Angiogenesis* **9**: 67-72.

Grossman D, Altieri DC (2001). Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* **20**: 3-11.

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA (2000a). DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. *Annu Rev Immunol* **18**: 927-74.

Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA (2000b). DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* **12**: 442-7.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-74.

Hauschka TS, Goodwin MB (1948). Trypanosoma cruzi Endotoxin (KR) in the Treatment of Malignant Mouse Tumors. *Science* **107**: 600-2.

He H, Genovese KJ, Nisbet DJ, Kogut MH (2007). Synergy of CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA (poly I:C) on nitric oxide induction in chicken peripheral blood monocytes. *Mol Immunol* **44**: 3234-42.

Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T *et al* (2002). An HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* **8**: 1731-9.

Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H *et al* (2005). A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res* **11**: 1474-82.

Igney FH, Krammer PH (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2**: 277-88.

Islam A, Kageyama H, Hashizume K, Kaneko Y, Nakagawara A (2000). Role of survivin, whose gene is mapped to 17q25, in human neuroblastoma and identification of a novel dominant-negative isoform, survivin-beta/2B. *Med Pediatr Oncol* **35**: 550-3.

Kallinikova VD, Matekin PV, Ogloblina TA, Leikina MI, Kononenko AF, Sokolova NM *et al* (2001). [Anticancer properties of flagellate protozoan Trypanosoma cruzi Chagas, 1909]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*: 299-311.

Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N (1998). Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* **58**: 5071-4.

Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T *et al* (2001). Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* **91**: 2026-32.

Khan S, Aspe JR, Asumen MG, Almaguel F, Odumosu O, Acevedo-Martinez S *et al* (2009). Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential. *Br J Cancer* **100**: 1073-86.

Kishi H, Igawa M, Kikuno N, Yoshino T, Urakami S, Shiina H (2004). Expression of the survivin gene in prostate cancer: correlation with clinicopathological characteristics, proliferative activity and apoptosis. *J Urol* **171**: 1855-60.

Klyuyeva NG, Roskin G (1946). Cancerolytic substance of *Schizotrypanum cruzi*. *Am Rev Sov Med* **4**: 127-9.

Klyuyeva NG, Roskin GI (1963). [The antibiotic cruzin and its mechanism of action on cancer cells]. *Izv Akad Nauk Kirg Ssr Biol* **3**: 366-90.

Kosari F, Parker AS, Kube DM, Lohse CM, Leibovich BC, Blute ML *et al* (2005). Clear cell renal cell carcinoma: gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clin Cancer Res* **11**: 5128-39.

Krementsov N (2004). *The Cure: A Story of Cancer and Politics from the Annals of the Cold War*, Illustrated edn, 277pp.

Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S *et al* (2002). Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br J Cancer* **86**: 737-43.

Lauffenburger DA, Horwitz AF (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**: 359-69.

Li F (2003). Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* **197**: 8-29.

Li F (2005). Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* **92**: 212-6.

Liu MA (2003). DNA vaccines: a review. *J Intern Med* **253**: 402-10.

Lobos-González L. (2011). *Vol. PhD*. Universidad de Chile: Santiago, pp 148.

Lopez NC, Valck C, Ramirez G, Rodriguez M, Ribeiro C, Orellana J *et al* (2010). Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e730.

Lu B, Mu Y, Cao C, Zeng F, Schneider S, Tan J *et al* (2004). Survivin as a therapeutic target for radiation sensitization in lung cancer. *Cancer Res* **64**: 2840-5.

Lladser A, Ljungberg K, Tufvesson H, Tazzari M, Roos AK, Quest AF *et al* (2010). Intradermal DNA electroporation induces survivin-specific CTLs, suppresses angiogenesis and confers protection against mouse melanoma. *Cancer Immunol Immunother* **59**: 81-92.

Lladser A, Parraga M, Quevedo L, Carmen Molina M, Silva S, Ferreira A *et al* (2006). Naked DNA immunization as an approach to target the generic tumor antigen survivin induces humoral and cellular immune responses in mice. *Immunobiology* **211**: 11-27.

Lladser A, Sanhueza C, Kiessling R, Quest AF (2011). Is survivin the potential Achilles' heel of cancer? *Adv Cancer Res* **111**: 1-37.

Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M *et al* (2002). Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int J Cancer* **100**: 30-6.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD (1999). Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res* **59**: 6097-102.

Mehrotra S, Languino LR, Raskett CM, Mercurio AM, Dohi T, Altieri DC (2010). IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* **17**: 53-64.

Meng H, Lu CD, Sun YL, Dai DJ, Lee SW, Tanigawa N (2004). Expression level of wild-type survivin in gastric cancer is an independent predictor of survival. *World J Gastroenterol* **10**: 3245-50.

Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC *et al* (2001). Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* **158**: 1757-65.

Michalak M, Corbett EF, Mesaali N, Nakamura K, Opas M (1999). Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* **344 Pt 2**: 281-92.

Moeller BJ, Cao Y, Vujaskovic Z, Li CY, Haroon ZA, Dewhirst MW (2004). The relationship between hypoxia and angiogenesis. *Semin Radiat Oncol* **14**: 215-21.

Molina MC, Ferreira V, Valck C, Aguilar L, Orellana J, Rojas A *et al* (2005). An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol* **140**: 133-40.

Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J *et al* (1999). A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* **17**: 2100-4.

Morley B.J. WMJ (2000). *The Complement FactsBook*. Academic Press: London, UK, 228pp.

Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D (2004). The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* **14**: 231-43.

Nair S, Wearsch PA, Mitchell DA, Wassenberg JJ, Gilboa E, Nicchitta CV (1999). Calreticulin displays in vivo peptide-binding activity and can elicit CTL responses against bound peptides. *J Immunol* **162**: 6426-32.

Nanney LB, Woodrell CD, Greives MR, Cardwell NL, Pollins AC, Bancroft TA *et al* (2008). Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol* **173**: 610-30.

Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* **6**: 769-76.

Nicolson GL, Brunson KW, Fidler IJ (1978). Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res* **38**: 4105-11.

NRC NRC (1996). *Guide for the care and use of laboratory animals*. . National Academy Press: Washington, D.C.

O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F *et al* (2000). Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* **156**: 393-8.

Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL *et al* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* **13**: 54-61.

OMS. (2012).

Otto K, Andersen MH, Eggert A, Keikavoussi P, Pedersen LO, Rath JC *et al* (2005). Lack of toxicity of therapy-induced T cell responses against the universal tumour antigen survivin. *Vaccine* **23**: 884-9.

Papapetropoulos A, Fulton D, Mahboubi K, Kalb RG, O'Connor DS, Li F *et al* (2000). Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway. *J Biol Chem* **275**: 9102-5.

Pecher G (2002). DNA-based tumor vaccines. *Onkologie* **25**: 528-32.

Pennati M, Folini M, Zaffaroni N (2007). Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* **28**: 1133-9.

Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K *et al* (1998). Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* **188**: 2349-56.

Pike SE, Yao L, Setsuda J, Jones KD, Cherney B, Appella E *et al* (1999). Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* **94**: 2461-8.

Prophet E, Mills B, Arrington J, Sobin L (1995). *Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de los Estados Unidos de América (AFIP)*. Registro de patología de los Estados Unidos de América ARP.: Washington D.C.

Ramirez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, Lopez N, Sanchez G *et al* (2011). Trypanosoma cruzi calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology* **216**: 265-73.

Ramos R, Juri M, Ramos A, Hoecker G, Lavandero S, Pena P *et al* (1991). An immunogenetically defined and immunodominant Trypanosoma cruzi antigen. *Am J Trop Med Hyg* **44**: 314-22.

Reed JC (2001). The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest* **108**: 965-9.

Reed JC, Bischoff JR (2000). BIRinging chromosomes through cell division--and survivin' the experience. *Cell* **102**: 545-8.

Reker S, Becker JC, Svane IM, Ralfkiaer E, Straten PT, Andersen MH (2004a). HLA-B35-restricted immune responses against survivin in cancer patients. *Int J Cancer* **108**: 937-41.

Reker S, Meier A, Holten-Andersen L, Svane IM, Becker JC, thor Straten P *et al* (2004b). Identification of novel survivin-derived CTL epitopes. *Cancer Biol Ther* **3**: 173-9.

Renkvist N, Castelli C, Robbins PF, Parmiani G (2001). A listing of human tumor antigens recognized by T cells. *Cancer Immunol Immunother* **50**: 3-15.

Reyes-Sandoval A, Ertl HC (2001). DNA vaccines. *Curr Mol Med* **1**: 217-43.

Ribatti D, Vacca A, Presta M (2000). The discovery of angiogenic factors: a historical review. *Gen Pharmacol* **35**: 227-31.

Roskin G (1946). Toxin therapy of experimental cancer; the influence of protozoan infections upon transplanted cancer. *Am Rev Sov Med* **4**: 111-5.

Roskin GI, Kolomina SM (1964). [Cytochemical Studies on Potassium and Organic Substances Connected with Phosphorus and Iron in Schizotrypanum Cruzi]. *Tsitologiya* **36**: 175-83.

Rutkowski MJ, Sughrue ME, Kane AJ, Mills SA, Parsa AT (2010). Cancer and the complement cascade. *Mol Cancer Res* **8**: 1453-65.

Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, Wang HJ, Untch M, Meng G *et al* (2006). Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. *Ann Oncol* **17**: 597-604.

Sadasivan B, Lehner PJ, Ortman B, Spies T, Cresswell P (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* **5**: 103-14.

Sahai E (2007). Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* **7**: 737-49.

Salvesen GS, Duckett CS (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 401-10.

Schmitz M, Diestelkoetter P, Weigle B, Schmachtenberg F, Stevanovic S, Ockert D *et al* (2000). Generation of survivin-specific CD8+ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Res* **60**: 4845-9.

Sheklakova LA, Kallinikova VD, Karpenko LP (2003). Genetic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* and its direct anticancer effect in cultured human tumor cells. *Bull Exp Biol Med* **135**: 89-92.

Siegel S, Steinmann J, Schmitz N, Stuhlmann R, Dreger P, Zeis M (2004). Identification of a survivin-derived peptide that induces HLA-A*0201-restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. *Leukemia* **18**: 2046-7.

Siegel S, Wagner A, Schmitz N, Zeis M (2003). Induction of antitumour immunity using survivin peptide-pulsed dendritic cells in a murine lymphoma model. *Br J Haematol* **122**: 911-4.

Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, Lim CW, Lee MH, Cho MS *et al* (2006). Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer. *Biomed Pharmacother* **60**: 289-92.

Steffensen B, Hakkinen L, Larjava H (2001). Proteolytic events of wound-healing--coordinated interactions among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**: 373-98.

Stuart L, Hughes J (2002). Apoptosis and autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant* **17**: 697-700.

Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC (1999). Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* **341**: 452-3.

Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS (2005). Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* **117**: 1032-8.

Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N (2000). Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* **6**: 127-34.

Toledo V, Ramirez G, Valck C, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I *et al* (2010). Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. *Biol Res* **43**: 287-9.

Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG *et al* (1999). Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **264**: 781-8.

Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, Furuhashi T, Idenoue S, Kurotaki T *et al* (2004). Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med* **2**: 19.

Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT *et al* (2003). Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* **63**: 7724-32.

Turnquist HR, Vargas SE, McIlhenny MM, Li S, Wang P, Solheim JC (2002). Calreticulin binds to the alpha1 domain of MHC class I independently of tapasin. *Tissue Antigens* **59**: 18-24.

Valck C, Kenawy H, Sánchez G, Ramírez G, Maldonado I, Gaboriaud C *et al* (2012). *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. *Submitted*.

Valck C, Ramirez G, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sanchez G *et al* (2010). Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Mol Immunol* **47**: 1516-21.

Valenzuela M, Perez-Perez G, Corvalan AH, Carrasco G, Urra H, Bravo D *et al* (2010). *Helicobacter pylori*-induced loss of the inhibitor-of-apoptosis protein survivin is linked to gastritis and death of human gastric cells. *J Infect Dis* **202**: 1021-30.

Wang HT, Lee HI, Guo JH, Chen SH, Liao ZK, Huang KW *et al* (2012). Calreticulin promotes tumor lymphocyte infiltration and enhances the antitumor effects of immunotherapy by up-regulating the endothelial expression of adhesion molecules. *Int J Cancer* **130**: 2892-902.

Wang Y, Suominen JS, Hakovirta H, Parvinen M, Martinand-Mari C, Toppari J *et al* (2004). Survivin expression in rat testis is upregulated by stem-cell factor. *Mol Cell Endocrinol* **218**: 165-74.

Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B *et al* (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* **108**: 544-50.

Wearsch PA, Jakob CA, Vallin A, Dwek RA, Rudd PM, Cresswell P (2004). Major histocompatibility complex class I molecules expressed with monoglucosylated N-linked glycans bind calreticulin independently of their assembly status. *J Biol Chem* **279**: 25112-21.

Whitmore MM, DeVeer MJ, Edling A, Oates RK, Simons B, Lindner D *et al* (2004). Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. *Cancer Res* **64**: 5850-60.

Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC (2006). Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol Immunother* **55**: 1294-8.

Xiang R, Mizutani N, Luo Y, Chiodoni C, Zhou H, Mizutani M *et al* (2005). A DNA vaccine targeting survivin combines apoptosis with suppression of angiogenesis in lung tumor eradication. *Cancer Res* **65**: 553-61.

Yao L, Pike SE, Tosato G (2002). Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. *J Leukoc Biol* **71**: 47-53.

Yokoyama M, Hirata K (2005). New function of calreticulin: calreticulin-dependent mRNA destabilization. *Circ Res* **97**: 961-3.

Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A *et al* (2006). Efficient immunization and cross-priming by vaccine adjuvants containing TLR3 or TLR9 agonists complexed to cationic liposomes. *J Immunol* **176**: 7335-45.

Zeis M, Siegel S, Wagner A, Schmitz M, Marget M, Kuhl-Burmeister R *et al* (2003). Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol* **170**: 5391-7.

Zhou H, Luo Y, Kaplan CD, Kruger JA, Lee SH, Xiang R *et al* (2006). A DNA-based cancer vaccine enhances lymphocyte cross talk by engaging the NKG2D receptor. *Blood* **107**: 3251-7.

Zhou H, Luo Y, Lo JF, Kaplan CD, Mizutani M, Mizutani N *et al* (2005). DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10846-51.

Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU (1991). Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9568-72.

Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G (2010). Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clin Cancer Res* **16**: 3100-4.

XI. PUBLICACIONES, COMO AUTOR O COAUTOR, DURANTES EL DESARROLLO DE ESTA TESIS DOCTORAL

XI.1. Publicaciones en revistas ISI:

1. **L. Aguilar**, L Lobos-González, C Rosas, I Maldonado, F. Coddou, G. Vallejos, E. Sosoniuk, C. Valck, L. Leyton, D. Lemus, A. F.G. Quest*, A. Ferreira*. Synergistic effect of genetic immunization with human *Survivin*, together with the administration of recombinant *Trypanosoma cruzi* Calreticulin on a murine melanoma model *in vivo*. 2012. Manuscript in preparation (*corresponding authors)
2. G. Ramírez, C. Valck, **L. Aguilar**, U. Kemmerling, R. López-Muñoz, G. Cabrera, A. Morello, J. Ferreira, J.D. Maya, N. Galanti, A. Ferreira. Roles of *Trypanosoma cruzi* calreticulin in parasite-host interactions and in tumor growth. *Molecular Immunology*. 2012 Jun 4;52(3-4):133-140.
3. G. Ramírez, C. Valck, MC Molina, CH Ribeiro, N. López, G. Sánchez, VP Ferreira, R. Billetta, **L. Aguilar**, I. Maldonado, P. Cattán, W. Schwaeble, A. Ferreira. 2011 *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology*. 216(1-2):265-73.
4. NC López, C. Valck, G. Ramírez, M. Rodríguez, C. Ribeiro, J. Orellana, I. Maldonado, A. Albini, D. Anaconda, D. Lemus, **L. Aguilar**, W. Schwaeble, A. Ferreira. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. 2010. *PLoS Negl Trop Dis*. Jul 6;4(7):e730.
5. V. Toledo, G. Ramírez, C. Valck, N. López, CH Ribeiro, I. Maldonado, **L. Aguilar**, D. Lemus, A. Ferreira. 2010. Comparative *in vivo* antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens sapiens*. *Biol Res*. 43(3):287-9.
6. CH. Ribeiro, NC López, GA Ramírez, CE Valck, MC Molina, **L. Aguilar**, M. Rodríguez, I. Maldonado, R. Martínez, C. González, R. Troncoso, S. Lavandero, AR. Gingras, W. Schwaeble, A. Ferreira. 2009. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol Immunol*. 46(6):1092-9.

XI.2. Publicación Capítulo libro:

L Lobos-González, **L Aguilar**, G Fernández, C Sanhueza and AFG Quest (2011). Caveolin-1 in Melanoma Progression, Advances in Malignant Melanoma - Clinical and Research Perspectives, Dr. April Armstrong (Ed.), ISBN: 978-953-307-575-4, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-malignant-melanoma-clinical-and-research-perspectives/caveolin-1-in-melanoma-progression>

XII. PRESENTACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES (desde 2007 a la fecha, de un total de 29 presentaciones)

1. **L Aguilar**, L Lobos., A.F.G Quest, A Ferreira. Synergistic effect of plasmid pcDNA-Surv in conjunction with the parasitic Calreticulin on B16-F10 tumor model *in vivo*. XXV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 1-5 de noviembre de 2011. Puerto Varas, Chile **Presentación Oral**
2. L Lobos, **L Aguilar**, H Urra, L Leyton, AFG Quest. Tyrosine-14 of Caveolin-1 is required to promote metastasis *in vivo* but is dispensable for tumor suppression XXIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 1-5 de noviembre de 2010. Pucón, Chile. **Panel**
3. **L Aguilar.**, L Lobos, L Leyton, A Ferreira., AFG Quest. Immunization with DNA encoding a non-secreted form of Survivin inhibits metastasis *in vivo*. XXIV Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 1-5 de noviembre de 2010. Pucón, Chile. **Panel**
4. L Lobos, **L Aguilar**, H Urra, L Leyton, AFG Quest. Caveolin-1 functions both as a tumor suppressor and promotes metastasis in an *in vivo* melanoma model. Meeting of the European Society for Pigment Cell Research (ESPCR – 2009) September 20–23, Münster, Germany. **Panel**
5. L Lobos, **L Aguilar**, L Leyton, AFG Quest. Caveolin-1 is an efficient tumor suppressor in the absence of E-cadherin. The American Society for Cell Biology, 49th Annual Meeting, Diciembre 5-9, 2009. San Diego, Convention Center San Diego, CA, USA. **Panel**
6. CH Ribeiro, MC Molina, **L Aguilar**, M Rodríguez, I Maldonado, C Valck, N Lopez, G Ramirez, R Martínez, R Troncoso, S Lavandero, C González, A Gingras, W Schwaeble and A Ferreira *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: A Possible Role in Chagas' Disease Autoimmunity. 8th International Calreticulin Workshop. Viña del Mar, Chile. 6-8 January, 2009. **Panel**
7. L Lobos, **L Aguilar**, H Urra, G Fernández, N Muñoz, L Leyton y AFG Quest. Caveolina-1 suprime la formación tumoral y promueve metastasis en un modelo post-cirugía de melanoma. XXII Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 5-9 de octubre de 2008. Pucón, Chile. **Panel**

8. G Ramírez, C Valck, **L Aguilar**, N López, C Ribeiro, V Ferreira, A Ferreira. Modulación *in vitro* por anticuerpos de la interacción Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*/C1q del complemento humano. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 7-11 de octubre de 2007. Pucón, Chile. **Panel**
9. CH Ribeiro, MC Molina, **L Aguilar**, M Rodríguez, I Maldonado, C Valck, R Martínez, C González, W Schwaeble y A Ferreira. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y el problema autoinmune en la enfermedad de Chagas. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 7-11 de octubre de 2007. Pucón, Chile. **Panel**
10. L Lobos-González, **L Aguilar**, V Torres, A Lladser, L Leyton, AFG Quest. Caveolina-1 funciona como un supresor de tumores y promueve metástasis en células de melanoma. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 7-11 de octubre de 2007. Pucón, Chile. **Panel**
11. **L Aguilar**, Á Lladser, Lorena Lobos, A Ferreira, A Quest. A Survivn DNA vaccine combined with Toll-Like receptor agonists reduced melanoma growth in C57BL/6 mice. XXI Reunión Anual Sociedad de Biología Celular de Chile. 7-11 de octubre de 2007. Pucón, Chile. **Panel**
12. G Ramírez, C Valck, **L Aguilar**, N López, C Ribeiro, W Schwaeble, V Ferreira, A Ferreira. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*: Modulación por fragmentos de inmunoglobulinas de su capacidad para inhibir el sistema del complemento humano *in vitro*. Congreso por X Aniversario de el Instituto de Ciencias Biomédicas. 12 de septiembre de 2007. Santiago, Chile. **Panel**
13. CH Ribeiro, MC Molina, **L Aguilar**, M Rodríguez, I Maldonado, C Valck, R Martínez, C González, R Troncoso, D Lavandero, W Schwaeble y A Ferreira. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y el problema autoinmune en la enfermedad de Chagas. Congreso por X Aniversario Instituto de Ciencias Biomédicas. 12 de septiembre de 2007. Santiago, Chile. **Panel**
14. **L Aguilar**, C Arredondo, C Calderón, L Corona, G Fernández, J Gutiérrez, M Henríquez, Á Lladser, L Lobos, D Rodríguez, M Val menzuela, S Nuñez, E Ñanculef, V Torres, J Tapia y A Quest. Rol de Caveolina -1 en el desarrollo del cáncer: ¿un supresor de tumores condicional?. Congreso por X Aniversario Instituto de Ciencias Biomédicas. 12 de septiembre de 2007. Santiago, Chile. **Panel**

15. A Ferreira, G Ramírez, C Valck, **L Aguilar**, N López, MC Molina, C Ribeiro. “Consideraciones Experimentales Sobre el Rol Inmunogénico de Calreticulina de *T. cruzi*”. Congreso de Prozoología. 2007. Argentina. **Panel**
16. G Ramírez, C Valck, **L Aguilar**, N López, C Ribeiro, W Schwaeble, V Ferreira, A Ferreira. *Trypanosoma cruzi* calreticulina: modulation, by immunoglobulin fragments of its capacity to inhibit the human complement system *in vitro*. 13th International Congress of Immunology. 21-25 de agosto de 2007. Rio de Janeiro, Brasil. **Panel**
17. A Lladser, **L Aguilar**, L Lobos, L Zitvogel, A Ferreira, R Billetta, AFG Quest “Naked survivin DNA vaccine combined with Toll-like receptor-3 and -9 agonists elicits a specific CD8+ T cell response and reduces tumor growth”. III International Conference DNA Vaccines. 23-25 de Mayo de 2007. Malaga, España. **Panel**
18. CH Ribeiro, MC Molina, P Williams, **L Aguilar**, C Valck, W Schwaeble, A Ferreira. “*Trypanosoma cruzi* Calreticulin and the autoimmune problem in Chagas’ disease”. X Congreso de la Sociedad Chilena de Inmunología. 11-14 de octubre de 2006. La Serena, Chile. **Panel**
19. M Rodríguez, MC Molina, G Ramírez, **L Aguilar**, A Ferreira. “Remoción de endotóxina desde proteínas recombinantes: aplicación de un método de inmuoafinidad”. X Congreso de la Sociedad Chilena de Inmunología. 11-14 de octubre de 2006. La Serena, Chile. **Panel**

Anexo I

Como se muestra en la figura 20A, C1q se adhiere a la membrana de las células B16-F10, aún en ausencia rTcCRT. Posteriormente, se utilizaron distintas concentraciones de fragmentos $F(ab')_2$ para inhibir dicha interacción, como se muestra en la Figura 20B. Sin embargo, esta inhibición no fue posible por lo que postulamos la posibilidad de que en la membrana de la célula tumoral existiera otra molécula que pudiera estar reclutando C1q.

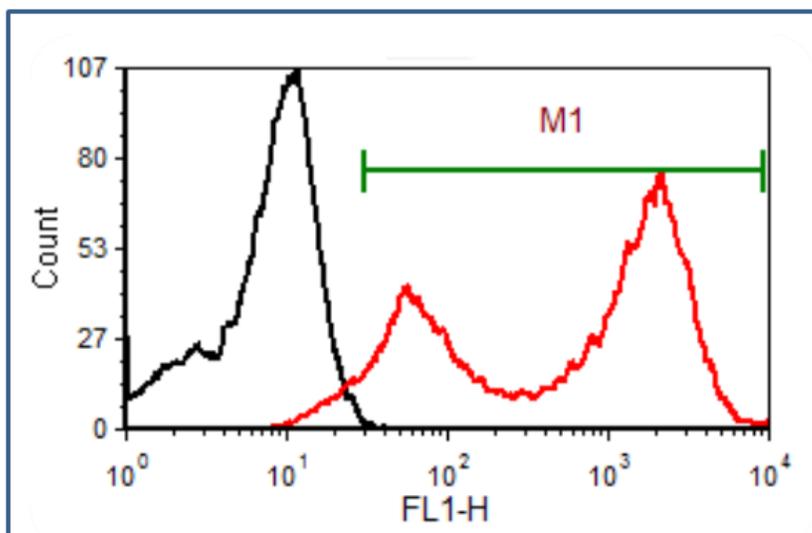


Figura 33. Las células tumorales de melanoma B16-F10 expresan en su membrana la molécula Calreticulina murina (MmCRT). Mediante citometría de flujo se determinó la presencia de MmCRT en la membrana de las células tumorales utilizando el Ac anti-MmCRT (Calbiochem, Cat #208912) dilución 1:25, seguido de un anticuerpo policlonal anti Ig de conejo, conjugado FITC en dilución 1:100.

Muy probablemente, el reclutamiento de C1q a la membrana de las células B16-F10, se produzca por su interacción con la MmCRT, así como también con rTcCRT, unida a la membrana de la célula tumoral.