



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES CARRIER Y ANTITUMORALES DE
HEMOCIANINAS ACOPLADAS A UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE UN
ANTÍGENO TUMORAL EN EL MODELO DE MELANOMA MURINO B16F10

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

MIRIAM BEATRIZ PALACIOS ESPINOZA

PROFESORA GUÍA:
MARÍA INÉS BECKER CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM
BARBARA ANDREWS FARROW

SANTIAGO DE CHILE
2014

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL
TÍTULO DE: Ingeniera Civil en Biotecnología
POR: Miriam Beatriz Palacios Espinoza
FECHA: 22/08/2014
PROFESORA GUÍA: María Inés Becker C.

EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES CARRIER Y ANTITUMORALES DE
HEMOCIANINAS ACOPLADAS A UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE UN ANTÍGENO
TUMORAL EN EL MODELO DE MELANOMA MURINO B16F10

El melanoma es un cáncer de alta incidencia y mortalidad, que posee una inmunogenicidad suprimida por mecanismos de evasión propios, como la expresión aberrante del gangliósido GD2 en la superficie de las células tumorales. Entre las terapias experimentales, la hemocianina de *Megathura crenulata*, conocida como KLH, generó una respuesta inmune protectora contra el tumor de melanoma al estar acoplada a un péptido que mimetiza a GD2 (péptido P10), induciendo anticuerpos anti-GD2 que dirigen la respuesta hacia el tumor. Así, se propuso que las hemocianinas de los moluscos del litoral chileno, *Concholepas concholepas* (CCH) y *Fissurella latimarginata* (FLH), acopladas a P10 generarían una respuesta inmune protectora frente al desafío de ratones C57BL/6, con melanoma murino de la línea B16F10.

Primero, los péptidos P10 y control (S266) fueron acoplados a las tres hemocianinas mediante el entrecruzador sulfo-SMCC. Luego, utilizando el adyuvante AddaVax, como potenciador inmunológico de los conjugados hemocianina-péptido, se inmunizó a los ratones encontrándose un elevado y similar título de anticuerpos contra las hemocianinas (de 1:2.500), y un menor título de anticuerpos específicos y predominantemente de clase IgG contra cada péptido (de 1:300). Posteriormente, se evaluó la terapia anti-tumoral inducida por tres inmunizaciones con los conjugados y con hemocianinas no acopladas, en ratones desafiados con células B16F10 y previamente sensibilizados con cada antígeno. Se encontró que FLH indujo una mayor respuesta inmune protectora contra el tumor que CCH, dado que inhibió la incidencia y la velocidad de crecimiento tumoral, similar al control positivo con KLH, estando o no conjugada, y sin efectos tóxicos colaterales. Con ello, y según se verificó por inmunofluorescencia y indirecta citometría de flujo, los anticuerpos anti-hemocianinas presentaron reacción cruzada con epítopos presentes en las células B16F10 y en líneas de melanoma humano.

En conclusión, no se encontraron diferencias entre las hemocianinas al actuar como *carrier* de péptidos miméticos, pero sí hubo diferencias significativas en la respuesta inmune antitumoral inducida por FLH y KLH, respecto a los controles y a CCH, resultados que son promisorios para continuar los estudios preclínicos con FLH, que potencien su uso como adyuvante o inmunomodulador en la terapia del melanoma.

*"No hay barrera, cerradura, ni cerrojo que
puedas imponer a la libertad de mi mente"*

Virginia Woolf

A mi familia...

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo agradezco a la vida por darme la oportunidad de crecer con libertad, por otorgarme más de una razón para disfrutar lo que me rodea y expresarme en diferentes formas, porque en sí misma es un éxtasis.

Agradezco enormemente a la profesora María Inés Becker por permitirme realizar esta tesis y porque desde un inicio se alió a mí para sacarla adelante, respetando y escuchando mis planteamientos e inquietudes. Muchas gracias por el apoyo y la confianza depositada, la intuición para notar mis flaquezas, animarme y aconsejarme, siempre a fin de concluir esta etapa. Agradezco también a los chicos del laboratorio por el grato ambiente de trabajo y por entregarme la ayuda intelectual que requerí, muchas gracias Claudia, Ta-Ying, José, Daniel y Javiera, y especialmente a Miguel, por sus consejos, y a Ricardo, por su disposición para responder mis preguntas y ayudarme con todo el trabajo experimental. Agradezco también a todo el equipo de Biosonda, siempre muy acogedores, en especial a Rodolfo y Marcela por su ayuda con los equipos y los péptidos.

Agradezco también a las profesoras Ziomara Gerdtzen y Barbara Andrews por las gestiones realizadas para desarrollar la tesis y por sus correcciones como parte de mi comisión. A Gina, Irene y Érica, muchas gracias por estar ahí e intentar solucionar todo cuanto requerí.

A Felipe, gracias por formarnos con dedicación, por no centrarse en la academia y por siempre buscar superarse para nuestro aprendizaje. A mi querido curso IQBT 2010, gracias por toda la felicidad y apoyo que me brindaron en este periodo, la universidad fue una hermosa etapa junto a ustedes. A mis amigos de plan común, gracias por enseñarme, por las risas y porque plan común habría sido tanto más tortuoso sin su ayuda.

A mis amigas y amigos, muchas gracias por estar, porque en ustedes puedo contemplarme y crecer, por tolerarme y darme energías para nunca detenerme, especialmente a Camila y María José, mil gracias por el apoyo y la contención en este periodo. A Ivo, gracias por enseñarme lo que es la voluntad, la virtud, la lealtad y lo valioso por descubrir en el mundo.

A mi familia, a mis tíos y primos, gracias por guiar mi camino y por recibirme siempre con amor y ternura. A mis abuelos, gracias por mostrarme el valor de hacer lo correcto. A mis padres, Miriam y Juan, les agradezco tanto el amor, la entrega y la comprensión, sé que les ha costado entenderme, gracias por nunca dejar de intentarlo. Y finalmente a mi hermano Javier, gracias por enseñarme todo cuanto puedes para reflexionar.

FINANCIAMIENTO

El trabajo de título fue financiado por el proyecto Fondecyt 1110651, de la profesora María Inés Becker Ph.D., que se titula "*Immunological basis involved in the immunomodulatory effects of mollusk hemocyanins in the immune system of mammals*". Éste se desarrolló en colaboración con la empresa Biosonda S.A. y la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT	Antígeno asociado a tumor
ACAT	Antígeno de carbohidrato asociado a tumor
ACF	Análisis de citometría de flujo
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
AdV	Adyuvante AddaVax
AMC	Anticuerpo monoclonal
ANOVA	Test estadístico, del inglés <i>Analysis of Variance</i>
CCH	Hemocianina del molusco <i>Concholepas concholepas</i>
CD	Células dendríticas
CDC	Citotoxicidad dependiente del complemento
CPAs	Células presentadoras de antígenos
LTC	Linfocitos T citotóxicos o células T CD8 ⁺
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6-Diamino-2-fenilindol
DE	Desviación estándar
DGG	Péptido circular mimético de GD2, de secuencia C-GRLKMV PDLE-C
DMEM	Medio de cultivo modificado por Dulbecco, del inglés <i>Dulbeccos' Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenceno
DO	Densidad óptica
DTH	Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada, del inglés <i>Delayed-Type Hypersensitivity</i>
EDTA	Etilendiaminotetraacético
EEM	Error estándar de la media
ELISA	Ensayo inmunoenzimático em fase sólida, del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FAL	Fosfatasa alcalina
FCR	Fase de crecimiento radial del tumor de melanoma primario
FCV	Fase de crecimiento vertical del tumor de melanoma primario
FDA	Agencia federal de alimentos y medicamentos de USA, del inglés <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLH	Hemocianina del molusco <i>Fissurella latimarginata</i>
FSC	Canal del tamaño de células en el análisis de citometría de flujo, del inglés <i>Forward Scatter</i>
GD2	Gangliósido con dos ácidos sialicos y 3 azúcares no cargados (equivalente a 5-2).

GD3	Gangliósido con dos ácidos sialicos y 2 azúcares no cargados (equivalente a 5-3).
GM2	Gangliósido con un ácido sialico y 3 azúcares no cargados (equivalente a 5-2).
GRAVY	Valor del promedio de hidropaticidad, del inglés <i>Grand average of hydrophobicity</i>
GRL	Péptido circular mimético de GD2, de secuencia C-DGGWLS KGSW-C
Hc	Hemocianina
ip	Inyección intraperitoneal
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina de clase G
IgM	Inmunoglobulina de clase M
IL	Interleuquina
KLH	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> , hemocianina del molusco <i>Megathura crenulata</i>
MHC	Antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés <i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pNPP	p-Nitrofenilfosfato
P10	Péptido mimético de GD2, de secuencia GVVWRYTAPVHL GDG
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	R-ficoeritrina
PMC	Péptidos miméticos de carbohidratos
sc	Inyección subcutánea
S266	Péptido derivado del VIH, de secuencia IRIQRGPGRAFVTI GKI
Sham	Grupo de animales con intervención simulada
SFB	Suero fetal bovino
SSC	Canal de forma o granulosidad de células en el análisis de citometría de flujo, del inglés <i>Side Scatter</i>
Sulfo-SMCC	Sulfo-succinimidil-4-N-maleimidometil-ciclohexano-1-carboxilato
Th1	Respuesta celular de linfocitos T ayudadores de tipo 1, Th del inglés <i>T helper</i>
Th2	Respuesta celular de linfocitos T ayudadores de tipo 2, Th del inglés <i>T helper</i>
TNF	Factor de necrosis tumoral, del inglés <i>Tumor Necrosis Factor</i>
Tregs	Linfocitos T reguladores

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo 1	1
Introducción	1
1.1. Antecedentes Generales	1
1.2. Descripción del Proyecto	5
1.3. Motivación del Proyecto	6
Capítulo 2	9
Hipótesis, Objetivos y Limitaciones	9
2.1. Hipótesis	9
2.2. Objetivos	9
2.2.1. Objetivo general	9
2.2.2. Objetivos específicos	9
2.3. Limitaciones	11
Capítulo 3	12
Marco Teórico	12
3.1. Melanoma Maligno	12
Tabla 1: Progresión del tumor en el sistema melanocítico.	13
3.1.1. Inmunoterapia contra melanoma	14
3.2. Antígenos Asociados a Tumores	16
3.2.1. Gangliósidos: disialogangliósido GD2	16
3.2.2. Inmunoterapia anti-GD2 contra melanoma	17
3.3. Anticuerpos Anti-Idiotipo	20
3.3.1. Mimetismo de epítopos de carbohidrato	20
3.3.2. Péptidos miméticos de GD2	21
3.4. Hemocianinas	25
3.4.1. Características estructurales e inmunológicas de KLH, CCH y FLH	25
3.4.2. Hemocianinas KLH, CCH y FLH en la inmunoterapia del melanoma	26
3.5. Bioconjugación de Proteínas	29
3.5.1. Conjugación mediante sulfo-SMCC	29
Capítulo 4	31
Materiales y Métodos	31
4.1. Materiales Biológicos	31
4.1.1. Hemocianinas	31
4.1.2. Adyuvante	31
4.1.3. Animales de experimentación	31
4.1.4. Líneas celulares	32
4.2. Reactivos y Materiales	32
4.2.1. Acoplamiento de péptidos a hemocianinas	32
4.2.2. Test de ellman para hemocianinas activadas	32
4.2.3. Cultivo celular	32

4.2.4.	Reacción de ELISA	33
4.2.5.	Reacción de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	33
4.2.6.	Medición del tamaño del tumor	33
4.2.7.	Reacción de DTH	33
4.3.	Soluciones	33
4.3.1.	Acoplamiento de péptidos a hemocianinas	33
4.3.2.	Test de Ellman para hemocianinas activadas	34
4.3.3.	Cultivo celular	34
4.3.4.	Reacción de ELISA	34
4.3.5.	Reacción de inmunofluorescencia indirecta	34
4.3.6.	Análisis de citometría de flujo (ACF)	34
4.3.7.	Reacción de DTH	34
4.4.	Equipos	35
4.4.1.	Área de cultivo celular	35
4.4.2.	Otros equipos	35
4.5.	Métodos	35
4.5.1.	Acoplamiento de péptidos a hemocianinas	35
4.5.2.	Evaluación de la respuesta inmune humoral	37
4.5.3.	Evaluación de la respuesta inmune protectora contra el tumor de melanoma murino de la línea B16F10	40
Figura 9: Diagrama del curso temporal del bioensayo y sus hitos.		41
4.5.4.	Evaluación de la respuesta inmune celular	43
4.5.5.	Análisis estadístico	43
Capítulo 5		44
Resultados		44
5.1.	Acoplamiento Hemocianina-Péptido	44
5.2.	Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral Inducida por los Conjugados Hemocianina-Péptido	48
5.2.1.	Título de anticuerpos contra hemocianinas <i>carrier</i> , conjugados hemocianina-péptido y péptidos	48
5.2.2.	Clase IgM o IgG de los anticuerpos contra P10 y S266	51
5.2.3.	Reactividad de los antisueros de ratón anti-hemocianina-péptido con melanoma murino (B16F10) y líneas de melanoma humano (BE, RQ y AK)	53
5.3.	Evaluación de la Respuesta Inmune Protectora Inducida por los Conjugados Hemocianina-Péptido contra el Tumor de Melanoma Murino B16F10	59
5.3.1.	Respuesta inmune humoral contra hemocianinas y péptidos	66
5.3.2.	Respuesta inmune celular contra P10 y S266	71
Capítulo 6		73
Discusión		73
6.1.	Preparación e Inmunogenicidad de los Conjugados Hemocianina-Péptido	73
6.2.	Efecto Anti-Tumoral de los Conjugados Hemocianina-Péptido contra Melanoma B16F10	78
6.3.	Respuesta Inmune Anti-Tumoral Inducida por las Hemocianinas	81

Capítulo 7	84
Conclusiones	84
Bibliografía	86
Anexo	96
A. Datos y Resultados Obtenidos	96
A.1. Test de Ellman	96
A.2. Ensayo de ELISA	100
A.3. Análisis de Citometría de Flujo	106
A.4. Reacción de DTH	111
A.5. Sobrevida y Autopsia	113
B. Memoria de Cálculo	115
B.1. Test de Ellman: Hemocianinas Activadas con Sulfo-SMCC	115
B.2. Titulación de Sueros mediante Test de Elisa	115
B.3. Reacción de DTH	116
C. Propiedades de los péptidos P10 y S266 ⁹⁹	116

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Progresión del tumor en el sistema melanocítico. _____	13
Tabla 2	Agentes químicos e inmunológicos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de melanoma ^{2,3,35} . _____	15
Tabla 3	Ejemplos de péptidos miméticos aislados con anticuerpos monoclonales anti-GD2 ¹⁰ . _____	23
Tabla 4	Condiciones terapéuticas evaluadas en cada uno de los grupos de animales del bioensayo. _____	41
Tabla 5	Activación de hemocianinas (CCH y FLH) con sulfo-SMCC, post desalación. _____	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Principio de una vacuna antitumoral mimética ¹⁹ . _____	4
Figura 2	Tasas de mortalidad por melanoma estandarizadas por edad y sexo según regiones, Chile 1990-2008 ²⁷ . _____	8
Figura 3	Progresión del melanoma según niveles de Clark y Breslow ³⁵ . _	13
Figura 4	Ilustración esquemática de la estructura general de los glicosfingolípidos ⁶ . _____	19
Figura 5	Inmunofluorescencia de GD2 en células de melanoma M21 ⁸ . _	23
Figura 6	Efecto de la inmunización con P10-KLH en el crecimiento de células tumorales D142.34, en un estudio terapéutico ¹¹ . _____	24
Figura 7	La microscopía electrónica de tinción negativa de las moléculas de hemocianinas de molusco purificadas, mostrando su característica forma de cilindro hueco ²⁸ . _____	28
Figura 8	Esquema del principio de acoplamiento hemocianina-péptido vía sulfo-SMCC ^{69,71} . _____	30
Figura 9	Diagrama del curso temporal del bioensayo y sus hitos. _____	41
Figura 10	Activación de hemocianinas con el grupo maleimida de sulfo-SMCC. _____	47
Figura 11	Título de anticuerpos séricos de ratones C57BL/6 inmunizados con dos dosis de los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266. _____	50
Figura 12	Título de anticuerpos séricos de la clase IgM e IgG específicos contra los péptidos P10 y S266 conjugados a CCH, FLH y KLH. _____	52
Figura 13	Morfología de diferentes líneas celulares de melanoma, murino (B16F10) y humano (BE, RQ y AK), crecidas in vitro y observadas al microscopio de luz con contraste de fase. _____	54
Figura 14	IFI de células de la línea de melanoma murino B16F10, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. _____	55
Figura 15	IFI de células de la línea BE, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. _____	56
Figura 16	IFI de células de la línea RQ, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. _____	57
Figura 17	IFI de células de la línea AK, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. _____	58
Figura 18	Sobrevivencia de ratones C57BL7/6 desafiados con melanoma murino B16F10 y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266. _____	62
Figura 19	Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en la incidencia tumoral del melanoma murino B16F10. _____	63

- Figura 20** Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en el crecimiento tumoral del melanoma murino B16F10. _____ 64
- Figura 21** Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en la incidencia tumoral del melanoma murino B16F10, tras un segundo desafío. _____ 65
- Figura 22** Título de anticuerpos séricos inducidos por CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados a los péptidos P10 y S266, en ratones C57BL/6 desafiados con melanoma murino de la línea B16F10. 68
- Figura 23** IFI de células de la línea B16F10, de melanoma murino, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6, desafiados con B16F10 y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH o con los conjugados a P10 y a S266. _____ 69
- Figura 24** Detección de anticuerpos por ACF que unen a células de melanoma B16F10, en sueros diluidos a razón 1:25 de ratones C57BL/6 desafiados con el tumor y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH, conjugadas o no a P10 y S266. _____ 70
- Figura 25** Reacción de DTH inducida con los péptidos antigénicos P10 y S266, en ratones C57BL/6 desafiados con células de melanoma B16F10 y tratados terapéuticamente con los conjugados hemocianina-péptido. _____ 72

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES GENERALES

Durante los últimos años, el desarrollo de vacunas para el tratamiento y prevención de enfermedades ha tomado un papel protagónico en la investigación científica, con un especial interés en la inmunoterapia del cáncer. Así, y dado que el cáncer de piel, conocido como melanoma maligno, es uno de los cánceres más agresivos a nivel mundial^{1,2}, en las últimas décadas ha existido una gran dedicación por encontrar una terapia inmunológica contra el melanoma que sea igualmente efectiva y menos invasiva a los actuales tratamientos quirúrgicos y quimioterapéuticos. Tal investigación se ha visto fomentada por la importancia de la terapia sistémica en pacientes de melanoma en estado IV, la que incluye quimioterapia citotóxica, inmunoterapia, o una combinación de enfoques, tales como la bioquimioterapia³.

En este sentido, se han desarrollado las vacunas dirigidas a antígenos asociados a tumores (AATs), debido a que la sobreexpresión de dichas moléculas en células tumorales, en relación a células normales, las hace un blanco idóneo para dirigir la respuesta inmunológica contra el tumor, sin afectar otros tejidos⁴⁻⁶. Un AAT de melanoma ampliamente reconocido es el disialogangliósido GD2, el cual presenta una mayor sobreexpresión en estadios avanzados de la enfermedad y en células metastásicas^{1,7}.

Debido a su naturaleza glicolipídica, GD2 presenta una baja inmunogenicidad⁸, por lo que se han diseñado diversas estrategias para lograr estimular la respuesta inmunológica contra el gangliósido⁽¹⁾, de modo que ésta sea efectiva como terapia contra el melanoma. Tales estrategias incluyen el acoplamiento de GD2 a moléculas transportadoras (*carriers*)⁹ y la generación de péptidos miméticos⁽²⁾ capaces de inducir anticuerpos que reconozcan al epítipo del gangliósido^{4,8,10,11}. En este contexto, el trabajo de título desarrollado se centró en la evaluación de las propiedades *carrier* y antitumorales de hemocianinas⁽³⁾ de moluscos del litoral chileno como inmunoestimuladores en la terapia contra el cáncer de melanoma en un modelo murino, al acoplarles un péptido que mimetiza al gangliósido GD2.

Las hemocianinas son glicoproteínas cuya función más conocida es el transporte de oxígeno en la sangre de diversos artrópodos y moluscos. Éstas últimas tienen la particularidad de que al ser purificadas e inyectadas en mamíferos inducen una poderosa respuesta inmune^{12,13}. Asimismo, se ha visto que son capaces de mejorar la inmunogenicidad de antígenos de diversa naturaleza química, ya sea como adyuvante inmunológico o como proteína *carrier* de haptenos y péptidos antigénicos, a la vez que estimulan y modulan el tipo de respuesta¹⁴.

Tales propiedades de las hemocianinas han sido ampliamente estudiadas en KLH o *Keyhole limpet hemocianyn*, proteína proveniente de la lapa californiana *Megathura crenulata*, incentivando su uso en vacunas contra patógenos y antitumorales^{15,16}. Por su parte, la empresa de biotecnología Biosonda S.A. y FUCITED han investigado las hemocianinas conocidas como CCH¹⁷ (*Concholepas concholepas* hemocianyn) y FLH¹⁸ (*Fissurella latimarginata* hemocianyn). Dichas proteínas provenientes de los moluscos *Concholepas concholepas* y *Fissurella latimarginata*, respectivamente, han mostrado propiedades inmunológicas o estructurales comparables o superiores a KLH. FLH, por su parte, ha mostrado ser más inmunogénica¹⁸ y en el caso de CCH, se han visto diferencias estructurales que explicarían su mayor estabilidad^{15,18}.

Aun cuando las hemocianinas presentan un gran potencial inmunoestimulante, se ha visto que la inmunización de ratones con GD2 unido a KLH produce mayoritariamente anticuerpos del tipo IgM, de corta vida y bajo título. No obstante, recientemente se describió un péptido mimético de GD2, denominado P10, que acoplado a KLH genera una respuesta inmune humoral y celular, protectora contra el tumor de melanoma, en un modelo murino, puesto que es capaz de generar anticuerpos de clase IgG específicos contra el gangliósido¹¹.

Los péptidos miméticos de carbohidratos corresponden a secuencias cortas de aminoácidos desarrollados mediante la tecnología de despliegue de fagos, las que pueden obtenerse a partir de anticuerpos anti-idiotipo, que reconocen la región variable de otros anticuerpos^{19,20}. A la fecha se ha visto la efectividad de estos péptidos miméticos en la inmunoterapia del cáncer en estudios preclínicos¹⁹. El principio de funcionamiento de estas vacunas se esquematiza en la Figura 1.

[1]Gangliósido GD2: Glicolípido que posee una molécula de ceramida y dos residuos de ácido siálico. Se expresa en la superficie celular de células tumorales de origen neuroectodérmico, incluyendo melanoma, neuroblastoma y sarcoma⁸.

[2]Péptido mimético: Posee una estructura o naturaleza distinta a la molécula original, imitan los epítomos de ésta para la inducción de anticuerpos que reconocen al original⁴.

[3]Hemocianina: Glicoproteína que transporta el oxígeno en la hemolinfa de diversos moluscos y artrópodos¹².

Finalmente, cabe destacar que la alta inmunogenicidad que ha mostrado FLH y la mayor estabilidad de CCH frente a KLH, en investigaciones previas realizadas por el equipo de investigadores en que se ejecutó este trabajo^{15,18,21}, sugieren que dichas hemocianinas serían capaces de generar *in vivo* una respuesta inmune contra el tumor de melanoma, al actuar como *carrier* de AATs.

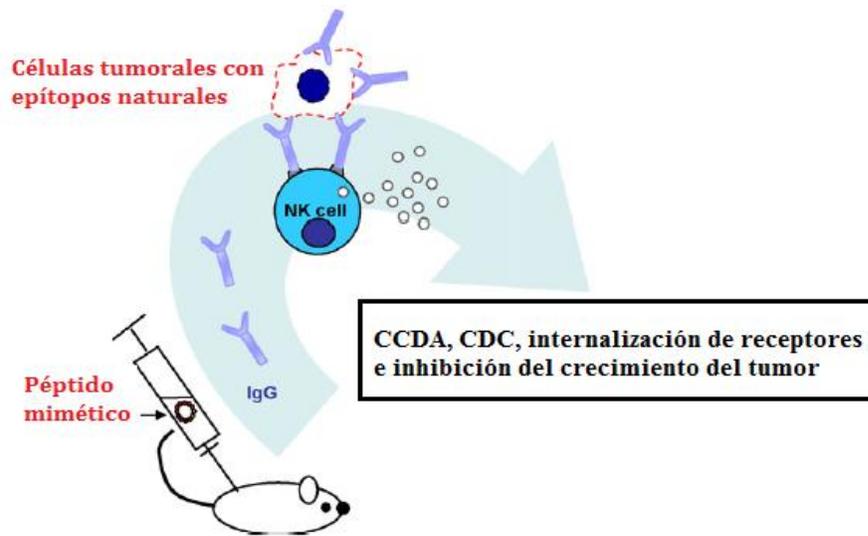


Figura 1: Principio de una vacuna antitumoral mimética¹⁹. Los péptidos miméticos son epítomos que mimetizan estructuras adecuadas para la vacunación. Ellos pueden ser péptidos lineares o circulares, o anticuerpos anti-idiotipos. En virtud del mimetismo molecular, estos péptidos pueden inducir anticuerpos no solo dirigidos contra el inmunógeno, sino también hacia epítomos naturales expresados o sobreexpresados en células cancerígenas. La respuesta del anticuerpo resulta policlonal y citotóxica contra las células tumorales, mediante la explotación de varias funciones efectoras del sistema inmune. CCDA: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo; CDC: Citotoxicidad Dependiente de Complemento.

1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El presente trabajo se enmarcó en el proyecto Fondecyt 1110651, de la profesora María Inés Becker Ph.D., cuyo título es "*Immunological basis involved in the immunomodulatory effects of mollusk hemocyanins in the immune system of mammals*", el cual se desarrolló en FUCITED y la empresa Biosonda S.A.

El trabajo de título contempló el uso de animales de experimentación, bajo cuidados éticos apropiados y aprobados por el Comité en Cuidado Animal de CONICYT. Por esta razón, incluyó la realización de un curso de Cuidado y Manejo de los Animales por parte de la tesista, impartido por la empresa MEDICHI, de la Universidad de Chile.

Se usó la cepa de ratones C57BL/6, los cuales fueron desafiados con células de melanoma murino de la línea B16F10. De esta forma se buscó evaluar la efectividad de CCH y FLH al estar acopladas a un péptido mimético del gangliósido GD2, para generar una respuesta inmune protectora contra el tumor de melanoma, bajo un protocolo terapéutico que fue definido en base a estudios previos^{18,22}. La secuencia del péptido mimético fue descrita por Wondimu et al.¹¹, el péptido fue sintetizado por una empresa especializada (Operon, Alemania).

La respuesta inmune dirigida hacia el tumor se logró gracias a las propiedades *carrier* e inmunoestimuladoras de las hemocianinas, al estar unidas al péptido P10, mimético de GD2. De esta forma, la inmunización de los animales tiene como consecuencia la producción de anticuerpos contra P10 que reconocen al epítipo de GD2, y por lo tanto reconocen una línea celular de melanoma que expresa GD2¹¹. La respuesta humoral se evaluó mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), al igual que la respuesta celular que induce el conjugado hemocianina-péptido, mediante una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH, del inglés *Delayed-Type Hypersensitivity*).

Cabe destacar que el trabajo contempló el acoplamiento de los péptidos a las hemocianinas en cuestión, utilizando KLH como control positivo y el péptido S266 como control negativo, para las evaluaciones de la respuesta inmune anti-tumoral contra melanoma. La calidad de los conjugados hemocianina-péptido fue evaluada mediante el test de Ellman^{23,24}. Asimismo, los resultados obtenidos en relación al título de anticuerpos, la inflamación inducida por DTH y el crecimiento del tumor y la sobrevivencia de ratones durante el protocolo terapéutico, fueron evaluados estadísticamente mediante un software computacional.

1.3. MOTIVACIÓN DEL PROYECTO

Como consecuencia de la alta agresividad y recurrencia del cáncer de melanoma, los tratamientos actuales para combatir la enfermedad suelen afectar las condiciones de vida de los pacientes, a tal punto que en ocasiones estos optan por abandonarlo. A través del proyecto Globocan, la Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que en el año 2012 se diagnosticaron cerca de 232.130 pacientes de melanoma en el mundo (un 1,6% de los casos de cáncer), lo que se traduce en una tasa de incidencia estandarizada por población mundial de 3,0 casos por cada 100.000 habitantes, y una tasa de mortalidad estandarizada de 0,7 casos²⁵. En Chile, en el mismo estudio, la OMS estimó tasas estandarizadas de incidencia y mortalidad de 1,3 y 0,6, respectivamente, por cada 100.000 habitantes. A su vez, el Gobierno de Chile, a través del Ministerio de Salud, estimó que entre 2003 y 2007 las tasas de incidencia y mortalidad del melanoma fueron de 2,6 y 1,0, respectivamente, por cada 100.000 habitantes, según el primer informe de Registros Poblacionales de Cáncer en el país²⁶, en 2012. La Figura 2 muestra las tasas de mortalidad debidas a melanoma de piel, estandarizadas según edad y sexo en Chile, por regiones, entre los años 1990 y 2008²⁷.

En este contexto, la inmunoterapia formulada en base a hemocianinas de moluscos resulta atractiva y prometedora, dado que se han destacado por ser inocuas en generar efectos colaterales tóxicos apreciables, tras reiteradas inmunizaciones^{12,16,28}. Así, con el presente trabajo de título se buscó contribuir a la biomedicina en relación al estudio de la inmunoterapia del cáncer de melanoma, pudiendo generar proyecciones importantes al respecto, en pro de mejorar la calidad de vida de los pacientes y evitar la reaparición del cáncer.

Por otra parte, y desde la perspectiva biotecnológica, la efectividad y seguridad de un tratamiento dado no dependen únicamente de la propiedad de la sustancia, sino está también relacionada a la dosis en que ésta es aplicada, puesto que existen ciertos límites dentro de los cuales va a resultar óptima para la salud del paciente. Así, la optimización de la dosis va a depender de una dinámica compleja en que la respuesta del paciente es clave. En este aspecto, el desarrollo experimental de la tesis puede dar pie para enmarcar criterios y definir aquellas variables que serían claves dentro de la etapa de dosificación vía modelamiento matemático y simulación, puesto que se tiene una relación directa con la terapia y sus efectos desde una perspectiva biológica.

La importancia de esto radica en que la optimización de un agente y su indicación a estados tempranos de la investigación permiten disminuir el periodo de validación requerido por instituciones, como la FDA (del inglés

Food and Drug Administration), así como también permiten descartar ciertas formulaciones que podrían no ser efectivas ni seguras en fases clínicas avanzadas, como suele ocurrir con una serie de vacunas que resultan tener efectos tóxicos colaterales significativos en los pacientes, por lo que no son aprobadas, tras haber invertido una vasta cantidad de recursos en su desarrollo.

Finalmente, mediante el estudio de las hemocianinas de moluscos chilenos, dotadas de cuantiosas propiedades inmunogénicas, será posible demostrar y exponer tales características y sus aplicaciones como moléculas transportadoras de haptenos y péptidos en la inmunoterapia del cáncer, incrementando el interés científico y biotecnológico en el mercado de sustancias naturales con potencial aplicación en vacunas terapéuticas para cáncer.

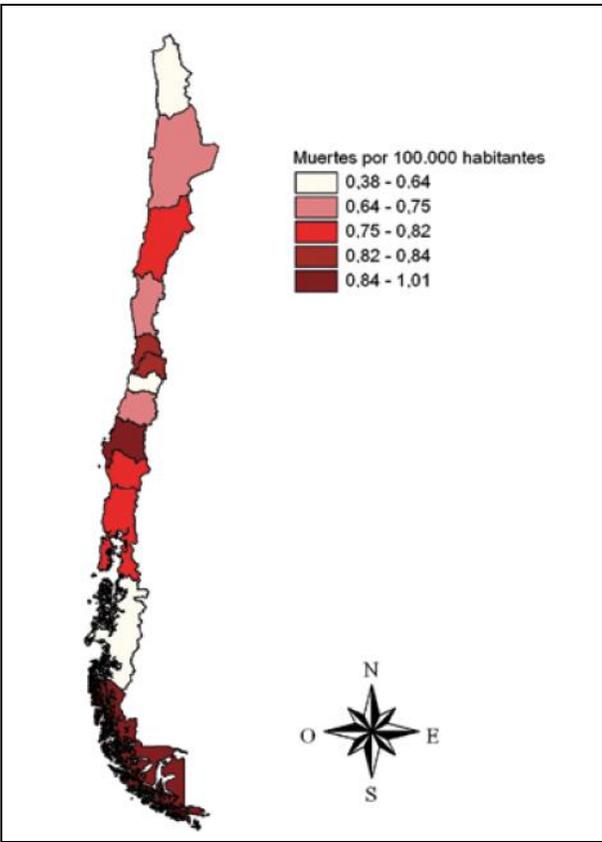


Figura 2: Tasas de mortalidad por melanoma estandarizadas por edad y sexo según regiones, Chile 1990-2008²⁷.

CAPÍTULO 2

HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y LIMITACIONES

2.1. HIPÓTESIS

La inmunización de ratones C57BL/6 con CCH o FLH, hemocianinas provenientes de los moluscos *Concholepas concholepas* y *Fissurella latimarginata*, respectivamente, acopladas al péptido P10, mimético del gangliósido GD2, generarán una respuesta inmune protectora frente al desafío ortotópico con células de melanoma de la línea B16F10.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades inmunológicas de hemocianinas provenientes de moluscos chilenos, CCH y FLH, como proteínas *carrier* de AATs y en consecuencia, como componente de potenciales vacunas terapéuticas para el cáncer, en el modelo de melanoma murino B16F10, usando un péptido mimético del gangliósido GD2, denominado P10 (secuencia GVVWRYTAPVHLGDG).

2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar la respuesta inmune humoral y celular de animales de experimentación anti-GD2.
 - i. Obtener los conjugados hemocianina-péptido mediante el acoplamiento de los péptidos P10, mimético de GD2, y S266,

como péptido control, a las hemocianinas CCH, FLH y KLH. Esta última se usó como control positivo.

- ii. Evaluar el efecto *carrier* de las hemocianinas en la cepa de ratón C57BL/6, comparando el título de anticuerpos anti-hemocianina, anti-conjugado, anti-péptido y anti-GD2 en el suero de los animales, mediante un ELISA contra las hemocianinas, los péptidos y GD2, y también evaluando su reactividad mediante inmunofluorescencia indirecta con líneas de melanoma murino y humano (BE, RQ y AK).
 - iii. Evaluar la clase, IgM o IgG, de los anticuerpos anti-GD2 producidos tras las inmunizaciones.
 - iv. Analizar los resultados estadísticamente.
2. Estudiar el efecto antitumoral del péptido P10 mimético de GD2, acoplado a hemocianinas, en el modelo de melanoma murino B16F10.
- i. Establecer un protocolo terapéutico con el péptido P10 acoplado a las hemocianinas, utilizando el péptido S266 como control.
 - ii. Evaluar el protocolo terapéutico en torno al crecimiento del tumor, la ocurrencia de metástasis y la supervivencia de los animales.
 - iii. Evaluar la respuesta humoral inducida por la terapia mediante ELISA contra las hemocianinas y los péptidos, y mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo con la línea de melanoma murino.
 - iv. Evaluar la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardía, o DTH, en ratones contra los péptidos, inducida tras la terapia con los conjugados hemocianina-péptido.
 - v. Analizar los resultados estadísticamente.

2.3. LIMITACIONES

El tipo de cáncer sobre el cual se realizó la inmunoterapia es el cáncer de melanoma, ya que además de ser uno de los cánceres más agresivos a nivel mundial, en el laboratorio de FUCITED se cuenta con la línea celular de melanoma murino B16F10, cuyo crecimiento es visualmente detectable. Esta línea es MHC clase I y II negativo, y sobreexpresa gangliósidos²⁹, por lo que es una buena representación del tumor desarrollado en seres humanos, dando sustento a proyecciones del estudio en humanos.

Se utilizó el péptido S266 como péptido control de P10, dado que Wondimu et al.¹¹ utilizaron dicho péptido de secuencia conocida como control negativo del mimetismo inmunológico de P10 con el gangliósido GD2, viendo que S266 conjugado a KLH no genera anticuerpos que reconozcan a GD2.

El objetivo específico 1 se limita a la evaluación de la especificidad de los anticuerpos generados por las inmunizaciones con péptido P10 o el control, contra cada hapteno, GD2 puro y GD2 presente en la línea celular de melanoma, entendiendo que estos se encontrarían en el suero de los ratones inmunizados¹¹. Igualmente se evaluará la clase IgG e IgM de tales anticuerpos, las cuales dan indicio del tipo de respuesta celular al que conduce la hemocianina y el péptido.

Respecto a la respuesta celular inducida por los conjugados, ésta estará limitada a la evaluación de la reacción de hipersensibilidad generada al inyectar con el péptido y con la hemocianina *carrier* a modo de control.

El objetivo específico 2 se limita al estudio terapéutico en un espectro de tiempo no mayor a 30 días para aquellos animales que incidencia tumoral, para evitar un mayor daño a los animales en estudio. A su vez, la toma de muestras fue desarrollada en la medida que ésta no afectase el bienestar de los ratones.

Las limitaciones dadas en los objetivos específicos estuvieron sujetas al tiempo disponible para la realización del trabajo de título, dado que éste tuvo un carácter netamente experimental. Por lo mismo, se desarrolló un solo bioensayo para evaluar el efecto antitumoral de los conjugados hemocianina-péptido, que permitió sentar las bases de los estudios posteriores que se requieren para determinar su reproducibilidad y también para afinar el protocolo terapéutico.

CAPÍTULO 3

MARCO TEÓRICO

3.1. MELANOMA MALIGNO

El melanoma maligno, conocido comúnmente como cáncer de piel, es una enfermedad altamente agresiva e invasiva^{1,2}. Este cáncer se desarrolla progresivamente en la capa basal de la epidermis², desde células no dañinas, que conforman un *nevus* o lunar, a tumores malignos y metastásicos. En la Tabla 1 se indican los cinco estados secuenciales de la progresión del tumor en el sistema melanocítico¹. Adicionalmente, se han descrito niveles de progresión del tumor de melanoma que permiten dar un pronóstico de la sobrevida de los pacientes en relación al espesor, según Breslow, y la invasión del tumor, según Clark³⁰⁻³² (ver Figura 3).

Se ha demostrado que la radiación UV genera supresión del sistema inmune, inestabilidad del DNA e inhibición de antioxidantes. Por tanto, la exposición a este tipo de radiación se señala como una de las principales causas del melanoma maligno, en tanto los factores genéticos implicarían entre un 5-10% de los casos⁷. Esto conlleva a una gran cantidad de polimorfismos en las células melanocíticas³³.

Es bien sabido que el sistema inmune no es capaz de erradicar el tumor de melanoma, aun cuando el tumor induce la secreción de mediadores como IFN- γ y TNF- α en linfocitos T CD4⁺. Esto se debe a que el melanoma maligno promueve mecanismos inmunomodulatorios para evadir la respuesta inmune², entre los que se han descrito los siguientes: i) secreción de citoquinas inhibitorias, como IL-10 y TNF- β , que disminuyen la actividad citolítica de células T CD8⁺ y células NK; ii) inducción de la infiltración de Tregs y macrófagos en la localización del tumor para que secreten citoquinas inhibitorias; iii) expresión de moléculas inhibitorias de linfocitos T, como la glicoproteína PD-L1; iv) sobre-regulación de Tregs, células altamente inmunosupresivas que incrementan la progresión del tumor³⁴ y v) la pérdida de expresión o expresión alterada de antígenos de histocompatibilidad de clase I (MHC clase I) en la superficie de células tumorales, haciéndolas invisibles a la respuesta inmune mediada por células presentadoras de antígenos (CPAs), entre los principales.

Tabla 1: Progresión del tumor en el sistema melanocítico.

Estadio	Lesión Melanocítica
1	Nevo adquirido común y congénito (atipia no citológica)
2	Nevo displásico (atipia arquitectural persistente y no citológica)
3	Fase de crecimiento radial de melanoma primario (FCR, no competente para metástasis)
4	Fase de crecimiento vertical de melanoma primario (FCV, competente para metástasis)
5	Melanoma metastásico

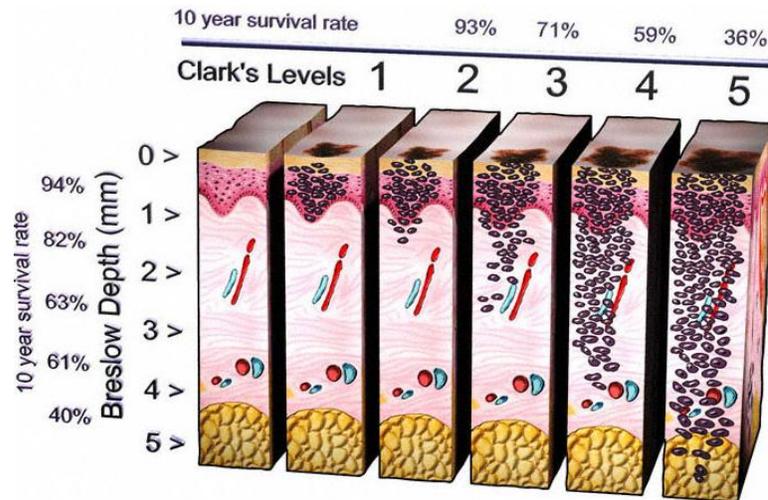


Figura 3: Progresión del melanoma según los niveles de Clark y Breslow³⁵. Pronóstico de supervivencia en pacientes con melanoma maligno según el nivel de invasión y el espesor del tumor.

3.1.1. INMUNOTERAPIA CONTRA MELANOMA

Los mecanismos de evasión antes mencionados han conducido al desarrollo de inmunoterapias para atacar el cáncer, de modo que se logre mejorar el pronóstico y la supervivencia de los pacientes portadores del tumor de melanoma maligno⁵.

Se han estudiado distintas estrategias entre las que destacan la activación de linfocitos T por administración de IL-2 y/o células dendríticas cargadas con lisados del tumor y el mejoramiento de la presentación antigénica con IFN- α ³⁶⁻³⁸. Del mismo modo, se han desarrollado terapias en base a anticuerpos contra moléculas inhibitorias de linfocitos T, anticuerpos contra Tregs y contra CD40 (que se expresa en tumores sólidos o células metastásicas) y anticuerpos contra moléculas sobre-expresadas en células tumorales. Asimismo, se ha estudiado la generación de una respuesta citotóxica específica contra el tumor, ya sea por administración de vacunas de DNA o virus, que contienen la secuencia de uno o más epítomos específicos de antígenos asociados al tumor, o por administración del antígeno mismo³. En la Tabla 2 se muestran los agentes químicos e inmunológicos que han sido aprobados por la FDA para el tratamiento contra el melanoma².

Pese a las investigaciones realizadas y a los distintos tratamientos evaluados, no se ha desarrollado una terapia efectiva contra el melanoma, vale decir, que sea superior al tratamiento quimioterapéutico con dacarbazina, aprobado por la FDA^{3,33}. Por otra parte, IFN- α 2b ha llegado a ser el tratamiento estándar para individuos con melanoma en alto riesgo, después de la terapia quirúrgica⁷. No obstante, IFN- α 2b es evitado por los médicos puesto que causa efectos colaterales como cansancio y depresión, en desmedro de la calidad de vida de los pacientes³⁹.

Tabla 2: Agentes químicos e inmunológicos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer de melanoma^{2,3,39}.

Droga	Naturaleza	Fecha de Aprobación	Indicación	Mecanismo de Acción
Dacarbazina ⁴⁰	Química	1975	Melanoma Estado IV	Detención del ciclo celular y apoptosis.
IFN- $\alpha 2\beta$ ⁴¹	Inmunológica: citoquina recombinante	1995	Melanoma Avanzado	Mejora la presentación antigénica, y tiene propiedades antiproliferativas, antiangiogénicas y proapoptóticas.
IL-2 ⁴²	Inmunológica	1998	Melanoma Estado IV	Proliferación y activación de linfocitos T.
IFN- $\alpha 2b$ ⁴³	Inmunológica: citoquina humana recombinante	2011	Melanoma Avanzado	Forma pegilada, con mayor eficacia terapéutica.
Ipilimumab ⁴⁴	Inmunológico: anticuerpo humano recombinante	2011	Melanoma Estado IV	Anticuerpo contra CTLA-4, mejora la activación de células T.
Verumafenib ⁴⁵	Químico	2011	Melanoma Estado IV	Inhibidor de proteína kinasa.

3.2. ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES

Debido a los cambios metabólicos que ocurren en la transformación oncogénica, las células tumorales son capaces de sobre-expresar ciertas moléculas, en contraste a las células de tejidos normales⁴⁶. Dichas moléculas, como se señaló anteriormente, se denominan antígenos asociados a tumores, o AATs, y permiten dirigir una respuesta inmunológica contra el tumor, sin afectar otros tejidos⁴⁻⁶.

En el tumor de melanoma y tumores de origen neuroectodérmico se han identificado diversos AATs, entre los que destacan los gangliósidos GD2, GD3, 9-O-acetil GD3, GM2 y GM2 acetilado, los cuales estarían involucrados en la adhesión celular, la supresión de linfocitos T y la regulación del crecimiento y la movilidad celular^{1,7,47,48}. Los cambios en la composición glicolípídica y la síntesis de nuevos glicoesfingolípidos en dichas células tumorales, se producen debido a bloqueos en la vía de síntesis y activación de glicosiltransferasas que no se expresan normalmente en los melanocitos⁴⁶.

3.2.1. GANGLIÓSIDOS: DISIALOGANGLIÓSIDO GD2

La mayor parte de los glicolípidos presentes en la superficie de células animales son los glicoesfingolípidos. Estos se caracterizan por tener una molécula de ceramida, y al poseer uno o más residuos de ácido siálico, se les denominan gangliósidos⁴⁷. En la Figura 4 se muestra la estructura liposacáridica general de los gangliósidos, cuya porción hidrofóbica está embebida en la membrana fosfolípídica de las células, mientras que la cadena sacarídica se dispone hacia el exterior celular. De este modo, tales moléculas participan en distintas interacciones intra e intermoleculares^{47,48} y son idóneos como blancos de inmunoterapia contra el cáncer⁶.

Los gangliósidos son ampliamente expresados en células tumorales y regulan las señales celulares transducidas a través de microdominios de la membrana plasmática, denominados "*lipid rafts*"^{46,49}. Dentro de las funciones en que están implicados los gangliósidos, son señalados como factores de inmunosupresión de células tumorales, puesto que suprimen la generación de linfocitos T citotóxicos y la activación y proliferación de linfocitos T ayudadores o *helper*⁴⁶. Además, promueven una diferenciación alterada⁴⁶ y maduración temprana de células dendríticas (CDs), lo que conduce finalmente a apoptosis⁵⁰.

En células melanocíticas, se ha visto que los gangliósidos GD2 y GD3 promueven una mayor invasión, crecimiento y movilidad, a la vez que participan en la adhesión celular. Así, ambas moléculas estarían implicadas

en fenotipos tumorales metastásicos y agresivos^{49,51,52}. Sin embargo, el disialogangliósido GD2 se asocia mayormente a melanoma⁷, dado que solo se expresa en células FCV y células metastásicas¹. A su vez, GD2 se indica como el gangliósido con mayor inmunogenicidad en humanos, dada su capacidad de inducir anticuerpos contra el tumor⁵³, y ha mostrado mejorar la respuesta de linfocitos T a IL-2, *in vitro*, lo cual es esencial para su proliferación y la generación de la respuesta inmune *in vivo* e *in vitro*⁵⁴.

3.2.2. INMUNOTERAPIA ANTI-GD2 CONTRA MELANOMA

Ya sea por la ubicación del gangliósido en la célula, como por su expresión aberrante en estados avanzados de la enfermedad, se han desarrollado diversas vacunas para promover una respuesta inmunológica contra GD2 como tratamiento del cáncer. En este contexto, se ha considerado la inmunización pasiva o activa dirigida a GD2, con el objeto de eliminar las células malignas y/o restablecer la respuesta inmune en pacientes portadores del tumor⁴⁶.

Dentro de las terapias de inmunización pasiva contra GD2 que han sido investigadas, se encuentran las terapias de infusión de anticuerpos monoclonales (AMCs) de ratón anti-GD2, tales como los AMCs 3F8 y 14G2a. En estudios clínicos en humano de fase I y II, dichos anticuerpos han mostrado efectos colaterales que incluyen fiebre, dolor neuropático, urticaria e hipotensión, sin que se observe una respuesta positiva contra el tumor de melanoma en los pacientes^{55,56}. La toxicidad y la reacción de hipersensibilidad inducidas por estas vacunas se deberían a la generación de anticuerpos humanos anti-idiotipo de ratón. Para reducir tales efectos, se desarrolló el anticuerpo quimérico Ch14.18, cuyas regiones Fc constantes son de origen humano. La terapia con este anticuerpo en pruebas clínicas de fase I con pacientes de melanoma, no mostró una respuesta inmune anti-tumoral efectiva y los efectos tóxicos comunes fueron dolor, taquicardia, hipertensión, fiebre y urticaria^{10,57,58}.

Por otra parte, la inmunización activa con GD2 como antígeno ha demostrado que al ser administrado con adyuvantes resulta en una respuesta inmunológica de baja memoria, corta vida y bajo título de anticuerpos IgM^{9,19,20,59}. Adicionalmente, pruebas de inmunoterapia con vacunas bivalentes de GM2 y GD2 acoplados a KLH, en pacientes con melanoma, no mostraron una producción de anticuerpos anti-GD2 capaces de unirse al gangliósido en la superficie de las células tumorales⁶⁰. En tanto, los ratones que han sido desafiados con el tumor, han presentado un aumento significativo en la supervivencia, al ser tratados con GD2 acoplado a KLH. Aquí, aquellos animales con mayor título de anticuerpos anti-GD2

presentaron una mayor respuesta protectora contra el melanoma, aunque la terapia resultó menos efectiva que la inmunización pasiva con anticuerpos⁹.

La baja efectividad de los gangliósidos como inmunógenos tiene relación con su naturaleza glicolipídica. Dado que las células T helper no están involucradas en la respuesta inmune, GD2 induce un título de anticuerpos de clase IgM relativamente bajo y sin memoria. Por lo tanto, se ha buscado introducir el epítipo del antígeno en una molécula de naturaleza proteica, ya sea un péptido o una proteína mimética del gangliósido⁸, y así estimular la producción de anticuerpos de clase IgG⁶¹.

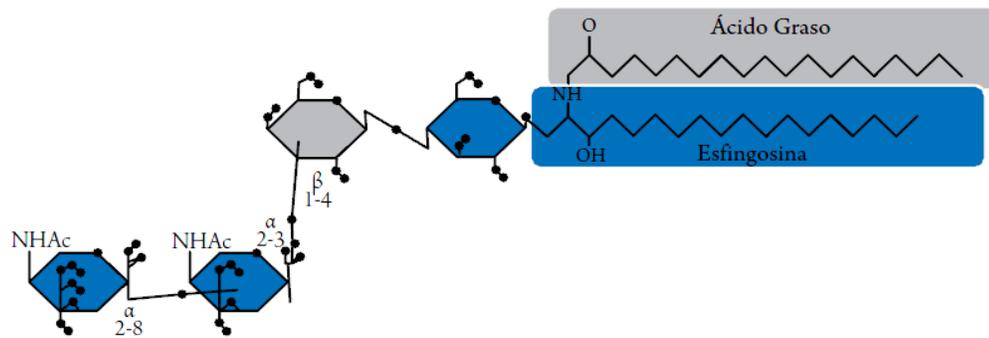


Figura 4: Ilustración esquemática de la estructura general de los glicosfingolípidos⁶. Se muestra la mitad lipídica, ceramida (ácido graso más esfingosina), y la cadena sacarídica.

3.3. ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

El idiotipo de un anticuerpo corresponde a la colección de las secuencias hipervariables del dominio variable de una inmunoglobulina, denominada paratodo, que corresponde a la región que une al antígeno. El idiotipo es, entonces, un epítipo capaz de inducir anticuerpos contra él, los que se denominan anticuerpos anti-idiotipo^{10,62}. En linfomas no Hodgkin se usan tales regiones de las inmunoglobulinas presentes en los clones oncogénicos de linfocitos B, para desarrollar vacunas anti-idiotipo dirigidas al paciente^{12,63}. De este modo, los anticuerpos anti-idiotipo tienen la particularidad de compartir epítipos de unión específicos con el antígeno del anticuerpo original^{8,10}.

3.3.1. MIMETISMO DE EPÍTIPOS DE CARBOHIDRATO

El mimetismo molecular radica en las similitudes entre moléculas químicamente diferentes¹⁰. Y dado que los anticuerpos anti-idiotipo, de estructura proteica, generan interacciones intermoleculares con anticuerpos específicos de carbohidratos, estos mimetizan al epítipo del carbohidrato⁸. Bajo este concepto, se han generado moléculas anti-idiotipo de anticuerpos anti-GD2, que han sido aplicadas para tratar el melanoma, en ratones¹⁰. Así, se ha observado la inducción de reacciones DTH específicas contra GD2 y anticuerpos IgG que reaccionan con células que expresan GD2^{4,11}. No obstante, las dificultades para su producción, el alto costo, el gran tamaño y la formación de anticuerpos anti-anti-idiotipo, en el huésped, que no reconocen al antígeno original, condujeron al desarrollo de péptidos de 6 a 20 residuos, que contienen al epítipo deseado. Estos se denominan péptidos miméticos, e inducen una respuesta humoral y celular específica⁴ al actuar como haptenos de proteínas *carriers*.

Las librerías de fagos admiten hasta alrededor de 10^9 péptidos de secuencias diferentes y tamaños similares⁴. En ellas, los péptidos son expresados hacia el exterior del fago, dado que el gen que codifica al péptido se inserta al extremo 5' terminal del gen que codifica las proteínas de la cápside, en el plasmidio viral⁶⁴. Mediante la tecnología de despliegue de fagos es posible amplificar y seleccionar péptidos miméticos de carbohidratos introducidos a una librería. Primero, un cultivo bacteriano, como *E. coli*, es infectado con la librería, donde los fagos, que transportan regiones hipervariables de inmunoglobulinas humanas, proliferan. Luego, se seleccionan aquellos fagos que expresan péptidos de mayor avidéz al anticuerpo original, el cual actúa como molécula diana^{10,64}. Al realizar este ciclo 3 a 4 veces, la solución de fagos resultante se enriquece por péptidos que se unen con mayor especificidad a la molécula de interés y, finalmente, los péptidos miméticos son aislados¹⁰.

3.3.2. PÉPTIDOS MIMÉTICOS DE GD2

Los péptidos miméticos, como xenoantígenos de antígenos de carbohidrato asociados a tumores (ACATs), presentan una serie de ventajas frente a la terapia activa con ACATs, las cuales son^{4,8}: i) están definidos químicamente y son más fáciles de producir a gran escala; ii) son estables, y pueden ser almacenados como pellets liofilizados por periodos prolongados; iii) son seguros, dado que su manufactura no implica material infeccioso, oncogénico o tóxico; iv) gracias a su naturaleza y estructura, exhiben un tipo predeterminado de respuesta inmune y se evitan epítomos no deseados; v) pueden ser acoplados a moléculas *carriers* para mejorar su inmunogenicidad y vi) proveen una estrategia para superar la tolerancia inmunológica hacia ACATs⁵⁹.

Se han descrito diversos péptidos miméticos de GD2, aislados con anticuerpos específicos contra GD2 mediante la tecnología de despliegue de fagos. Estos se mencionan en la Tabla 3.

La inmunización de ratones BALB/c con los péptidos GRL y DGG acoplados a KLH indujeron anticuerpos capaces de unirse a células de melanoma de la línea M21 y, por tanto, capaces de reconocer epítomos nativos de GD2. Los anticuerpos fueron detectados por inmunofluorescencia y KLH sola no generó anticuerpos que reaccionen cruzado contra la línea, tal como se observa en la Figura 5. Aquí se observa reacción positiva con los antisueros GRL-KLH y DGG-KLH. Adicionalmente, el título de anticuerpos anti-KLH resultó similar para sueros de ratones inmunizados con los conjugados y con KLH sola, lo cual indicaría una inmunización exitosa.⁸

Los péptidos P9 y P10 fueron aislados de una biblioteca de despliegue de fagos con péptidos de 15 residuos de largo, generados en forma aleatoria. Su selección se realizó por reconocimiento al anticuerpo ME361, que es específico contra GD2¹¹, aunque se ha descrito que también reacciona con GD3⁵⁹. Dichos péptidos fueron capaces de inhibir la unión entre el anticuerpo monoclonal ME361 y el antígeno GD2, en comparación al péptido control S266, derivado de VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana).

Tanto P9 como P10, acoplados a KLH, indujeron una respuesta inmune humoral, celular y protectora del tumor de melanoma en un modelo murino. P10 resultó más efectivo que P9, dada la capacidad del antisero en inhibir la unión del anticuerpo ME361 a células tumorales GD2⁺, al estar diluido en un factor igual a 3, y también por inducir una reducción en el crecimiento del tumor de melanoma en ratones C57BL/6. La velocidad de crecimiento del tumor fue menor en ratones inmunizados con P10-KLH, en comparación al control con el péptido S266, lo cual se muestra en la Figura 6. Por su parte, en ensayos de DTH la respuesta fue significativa entre líneas tumorales que expresan GD2 (GD2⁺) y que no lo expresan (GD2⁻), tanto para P10 y P9. En

el caso de P10-KLH, la respuesta celular sería dependiente de linfocitos T CD4⁺¹¹.

Así también, se ha evaluado que la pérdida de tres residuos del extremo aminoterminal (GVV) del péptido P10 (péptido denominado P10s) mejora la afinidad de la unión de los anticuerpos inducidos a GD2, incrementando su inmunogenicidad, en un estudio preclínico contra el cáncer de pulmón y melanoma^{4,59}. Además, Monzabi-Karbassi et al. encontraron que los residuos del anticuerpo ME361 por medio de los cuales el GD2 se une por puentes de hidrógeno coinciden con ciertos enlaces formados por los péptidos P10 y P10s con el mismo anticuerpo, lo que da cuenta de la avidéz de la unión⁵⁹.

Cabe destacar que en tales estudios preclínicos, tanto P10 como P10s no generaron daño en tejidos normales que expresan el antígeno, incluyendo cerebro y riñón, aun cuando se observó una leve inflamación en el hígado y leve hepatitis, con ambos PMCs (péptidos miméticos de carbohidrato). Esto resultó consistente con la carencia de signos clínicos y la ganancia normal de peso en los ratones.⁵⁹

Tabla 3: Ejemplos de péptidos miméticos aislados con anticuerpos monoclonales anti-GD2¹⁰.

Anticuerpo	Nombre del Péptido	Secuencia del Péptido
ME361	P9	LDVVLAWRDGLSGAS
	P10	GVVWRYTAPVHLGDG
	P10s	WRYTAPVHLGDG
Ch14.18	MD	CDGGWLSKGSWC
	MA	CGRLKMVPDLEC
	C3	CGRL <u>HL</u> VPDLEC
	GRL	C-DGGWLSKGSW-C
	DGG	C-GRLKMVPDLE-C
14.G2a	47	EDPSHSLGLDVALFM
	47-LDA	EDPSHSLGLD <u>A</u> ALFM
	94	RCNPNMEPPRCF

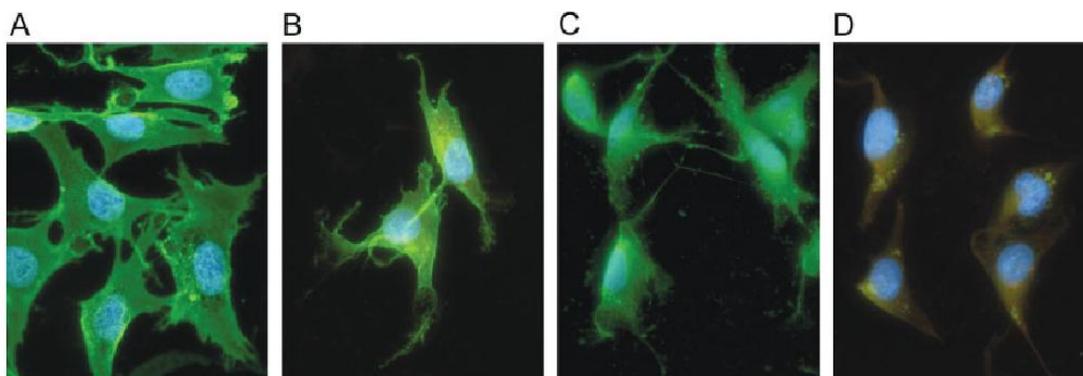


Figura 5: Inmunofluorescencia de GD2 en células de melanoma M21⁸. Anticuerpos de ratón IgG anti-GD2 fueron detectados indirectamente por anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados a FITC (fluorocromo fluoresceína). El núcleo fue teñido con Hoechst. Las células fueron vistas con un microscopio de fluorescencia Zeis Axioplan 2. **A)** AMC Anti-GD2 ch14.18 (control positivo). **B)** Suero de ratón inmunizado con GRL-KLH. **C)** Suero de ratón inmunizado con DGG-KLH. **D)** Suero de ratón inmunizado con KLH sola no reacciona específicamente con GD2.

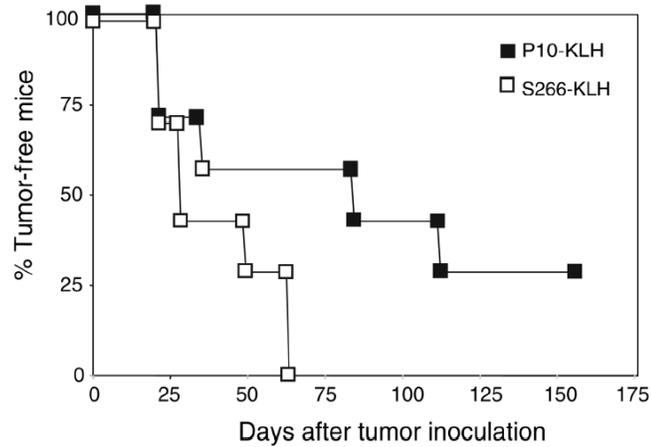


Figura 6: Efecto de la inmunización con P10-KLH en el crecimiento de células tumorales D142.34, en un estudio terapéutico¹¹. Ratones C57BL/6 (7 por grupo) fueron inoculados de manera subcutánea (sc) con 1.5×10^5 células tumorales GD2⁺. Diez días después del desafío, los ratones fueron inmunizados sc cuatro veces, en un intervalo de 2 semanas, con 50 μ g de P10-KLH o S266-KLH, mezclado con 10 μ g del adyuvante QS21. El crecimiento de tumor fue medido semanalmente. Se muestra el porcentaje de ratones libres de tumor en el tiempo, hasta el día 160 de medición.

3.4. HEMOCIANINAS

Las hemocianinas son glicoproteínas cuya función principal es transportar oxígeno en la hemolinfa de diversos moluscos y artrópodos, de modo tal que el oxígeno es fijado mediante un grupo prostético que contiene cobre, y que al estar en estado oxidado es responsable del tinte azul de la proteína. La poderosa respuesta inmunológica que induce la hemocianina al ser inyectada en mamíferos es atribuible a su xenogenocidad, a su enorme tamaño (entre 4 y 8 MDa), a los residuos oligosacáridos que posee y a su estructura cuaternaria con múltiples epítomos repetidos¹².

Se ha visto que las hemocianinas no solo mejoran la inmunogenicidad de antígenos, dadas sus propiedades *carrier* o como adyuvante inmunológico, sino que son claves para modular la magnitud, el tipo y el perfil de la respuesta inmune, por lo que aumentan la calidad protectora de una vacuna^{14,18}. Las hemocianinas desencadenan una respuesta inmune celular y humoral sin efectos tóxicos colaterales, lo que las hace ideales para un tratamiento repetitivo a largo plazo¹⁸.

Desde la década de los años 60 la KLH (*keyhole limpet hemocianyn*), proveniente de la lapa californiana *Megathura crenulata*, ha sido investigada en diversas aplicaciones tales como¹²: i) proteína *carrier* para la generación de anticuerpos contra péptidos y haptenos, acoplados a ella químicamente; ii) vacunas para patógenos, mediante antígenos acoplados a KLH; iii) vacunas antitumorales, usando la KLH como inmunomodulador en vacunas de CDs⁶⁵, como inmunoestimulante unida a antígenos tumorales^{4,9,11,12} y iv) por sí sola, como inmunoestimulante no específico en la terapia del cáncer superficial de vejiga, una vez que éste se ha extirpado^{21,22}.

Como consecuencia del amplio uso de KLH, dada las diversas aplicaciones biomédicas antes señaladas, su biodisponibilidad se ha visto afectada, conduciendo a la búsqueda de nuevas proteínas inmunoestimulantes. En este contexto, se descubrió e investigó la CCH, hemocianina proveniente del molusco chileno loco (*Concholepas concholepas*)¹⁷ y, más recientemente la FLH, proveniente de la lapa negra (*Fissurella latimarginata*)¹⁸. Ambas proteínas han demostrado tener propiedades inmunológicas comparables a KLH, lo que ha fomentado el interés por ellas¹².

3.4.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES E INMUNOLÓGICAS DE KLH, CCH Y FLH

Las hemocianinas de moluscos poseen una estructura cuaternaria con forma de cilindro hueco, apreciable por microscopía electrónica. Tal como se

ve en la Figura 7, tanto KLH, CCH y FLH tienen una estructura didecamérica, puesto que están compuestas por dos decámeros formados por 10 subunidades unidas no-covalentemente. KLH posee dos isoformas que coexisten en la circulación del animal, denominadas KLH1 y KLH2¹⁶. En tanto, los decámeros y didecámeros de FLH están compuestos de una sola subunidad¹⁸. En el caso de CCH, también posee dos subunidades, denominadas CCH1 y CCH2, que están entremezcladas en el decámero y, por ende, en el didecámero¹⁷. Desde el punto de vista estructural, KLH es más inestable que CCH, ya que la estructura cilíndrica de la proteína es dependiente de la presencia de los cationes Mg^{+2} y Ca^{+2} en los medios de mantención, mientras que CCH no los requiere^{12,28}.

Las tres hemocianinas ya mencionadas presentan propiedades inmunoestimuladoras elevadas por sí solas, al ser inyectadas en mamíferos. Es así que KLH y CCH han mostrado títulos de anticuerpos cercanos a 1:1.000 en ratones BALB/c y C57BL/6, luego de la segunda inmunización, mientras que FLH presentó títulos mayores, en torno a 1:10.000. Tal efecto se debería a que FLH estimula una rápida producción de citoquinas pro-inflamatorias en células presentadoras de antígeno, como células dendríticas¹⁸ y macrófagos⁶⁶, provocando un ambiente pro-inflamatorio.

En cuanto a los mecanismos inmunológicos que dan cuenta de las propiedades inmunomoduladoras de las hemocianinas señaladas, se ha visto que KLH, CCH y FLH son lentamente procesadas por las células dendríticas, lo cual mejoraría la respuesta inmunológica al aumentar el tiempo de su presentación antigénica a linfocitos T, en los ganglios regionales periféricos. Además, estas proteínas modulan la respuesta inmune hacia una respuesta celular de perfil Th1, caracterizado por la producción de linfocitos T $CD4^+$ y de $IFN-\gamma$ ²².

3.4.2. HEMOCIANINAS KLH, CCH Y FLH EN LA INMUNOTERAPIA DEL MELANOMA

KLH ha sido utilizada como adyuvante en el desarrollo de vacunas de células dendríticas⁶⁵ y como proteína *carrier* de diversos TAA de melanoma, entre los que se cuentan principalmente los gangliósidos GM2, GD3 y GD2, resultando en una baja efectividad^{60,67,68}. De igual forma, KLH ha sido utilizada para evaluar la respuesta inmune antitumoral de péptidos miméticos de gangliósidos, como se mencionó con anterioridad, resultando un efectivo agente inmunogénico para tales antígenos^{5,8,11,59}.

Por su parte, CCH ha mostrado una actividad antitumoral significativa en ratones C57BL/6 desafiados con células de melanoma B16F10, retrasando el crecimiento del tumor y aumentando la supervivencia de los ratones tratados

con la hemocianina, en comparación al control con PBS. Adicionalmente, no genera reacciones alérgicas o efectos tóxicos en los animales¹⁵.

Posteriormente, Arancibia et al.¹⁸ evaluaron la propiedad *carrier* de las hemocianinas unidas al antígeno DNFB, como hapteno modelo, reportando que los niveles de anticuerpos anti-DNFB en ratones C57BL/6 inmunizados con CCH-DNFB fue cercano a 1:10.000, mientras que con FLH-DNFB y KLH-DNFB fue de 1:1.000. Así, CCH presentó un mayor efecto como *carrier*. Por otra parte, Arancibia et al.¹⁸ reportó que FLH induce un mayor efecto anti-tumoral en el modelo de melanoma murino B16F10, dado que los ratones sujetos a la terapia con FLH tuvieron un alto porcentaje de sobrevivencia frente al desafío del tumor, en comparación a la terapia con CCH y KLH.

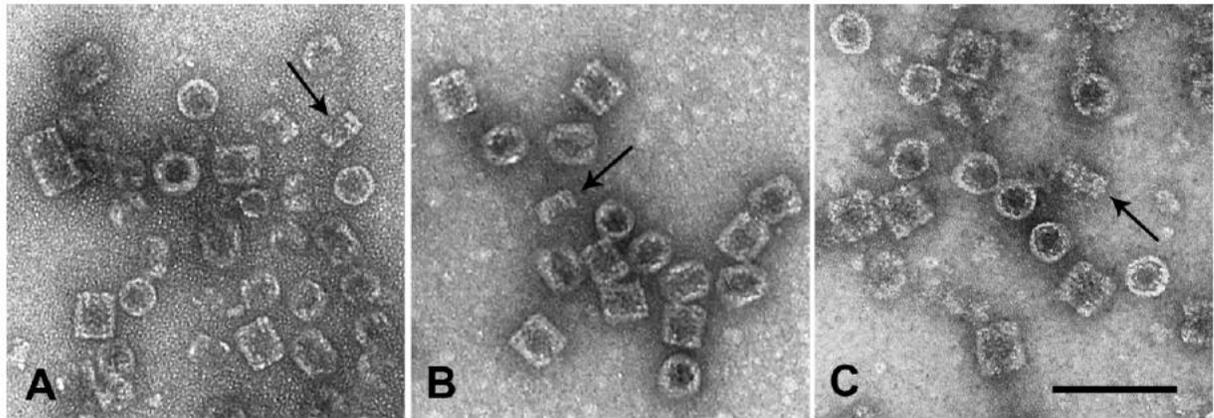


Figura 7: La microscopía electrónica usando tinción negativa de moléculas de hemocianinas de molusco purificadas, mostrando su característica forma de cilindro hueco²⁸. A) Hemocianina de la lapa ojo de cerradura (*Megathura crenulata*), conocida como KLH. **B)** Hemocianina de *Concholepas concholepas*, conocida como CCH. **C)** Hemocianina de *Fissurella latimarginata*, conocida como FLH. Las imágenes muestran vistas desde arriba (círculos) y laterales (rectángulos) de las moléculas. Las vistas laterales muestran la característica forma didecamérica de la proteína, con subunidades dispuestas en capas. La flecha muestra decámeros. La barra de escala representa 100 nm.

3.5. BIOCONJUGACIÓN DE PROTEÍNAS

En el marco de la inmunología, los péptidos o proteínas asociados a patógenos o tumores que son poco inmunogénicos suelen ser acoplados a moléculas *carrier* altamente inmunogénicas, para así mejorar la respuesta contra el antígeno⁶⁹. Existen diversas estrategias para generar tales conjugados, dependiendo de la naturaleza química de las moléculas involucradas. En este aspecto, el agente acoplante o entrecruzador debe ser seleccionado de acuerdo a los grupos funcionales disponibles de las proteínas o péptidos, entre otros, para mantener al complejo proteico en su estructura nativa⁷⁰.

En el caso de KLH como *carrier*, destaca el entrecruzador sulfo-SMCC (sulfo-succinimidil-4-N-maleimidometil-ciclohexano-1-carboxilato), que se usa para enlazar haptenos de estructura proteica, tales como péptidos miméticos, a la proteína *carrier*, a fin de preservar los epítomos de las moléculas y mejorar así la respuesta inmune⁶⁹⁻⁷¹.

3.5.1. CONJUGACIÓN MEDIANTE SULFO-SMCC

El sulfo-SMCC es un agente heterobifuncional que contiene un grupo maleimida, el cual es capaz de enlazarse libremente al grupo sulfhidrilo de la cisteína terminal de un péptido, y un grupo éster N-hidroxisuccinimidil, el cual reacciona específicamente con las aminas primarias del *carrier*^{70,71}.

De esta forma, la conjugación mediante el entrecruzador sulfo-SMCC consta de dos pasos. En primera instancia, el agente se deja reaccionar con la proteína *carrier*, de modo que ésta se activa con el grupo maleimida. Posteriormente, el complejo se deja reaccionar con el péptido, el cual contiene un grupo sulfhidrilo reducido, aportado por un residuo de cisteína. Lo anterior se encuentra esquematizado en la Figura 8, para la conjugación de péptidos a hemocianinas^{69,71}.

Cabe mencionar que se ha visto que el uso de sulfo-SMCC como agente de acoplamiento de KLH con un AAT de linfoma, en un modelo murino *in vivo*, mejora la eficacia antitumoral del conjugado induciendo una respuesta inmune mediada por células T CD8⁺ y anticuerpos^{69,71}. Además, los conjugados se mantuvieron estables al estar almacenados a 4°C en un periodo de 6 meses⁷¹.

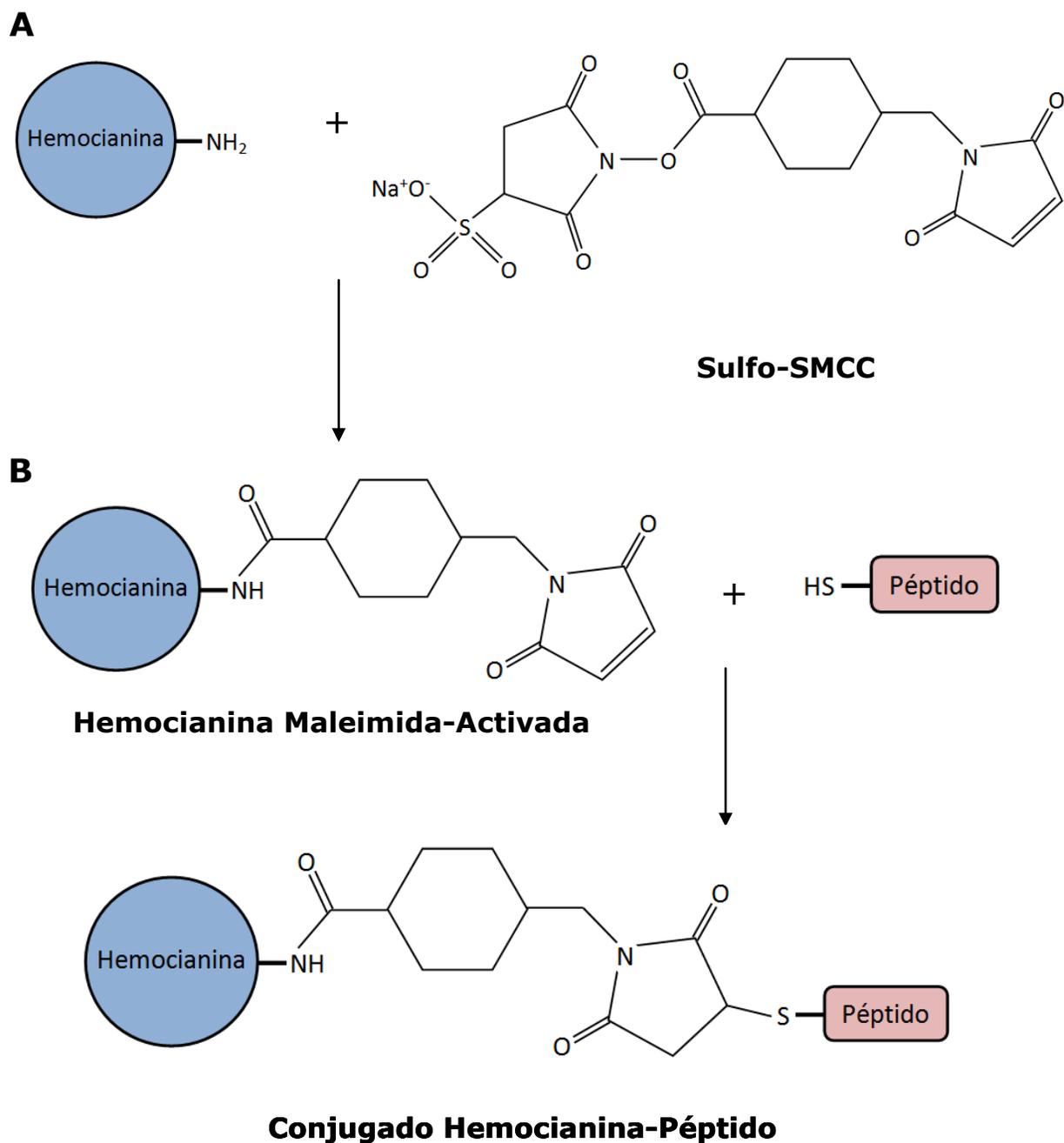


Figura 8: Esquema del principio de acoplamiento hemocianina-péptido vía sulfo-SMCC^{69,71}. A) Primer paso de conjugación, enlace a lisina. **B)** Segundo paso de conjugación, enlace a grupo sulfhidrilo (-SH).

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES BIOLÓGICOS

4.1.1. HEMOCIANINAS

Las hemocianinas de los moluscos *Concholepas concholepas* (CCH; en tampón PBS) y *Fissurella latimarginata* (FLH; en tampón PBS) fueron obtenidas desde la hemolinfa de dichos moluscos y fueron purificadas bajo condiciones de esterilidad y libres de pirógeno según lo establecido por Herskowitz et al.⁷², y modificado por De Ioannes et al.¹⁷, para CCH, y por Espinoza et al.⁷³, para FLH. Por otra parte, la hemocianina de *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet hemocyanin*, KLH; reconstituida en PBS) fue adquirida en Thermo Scientific (USA).

4.1.2. ADYUVANTE

El adyuvante AddaVax, de grado preclínico, fue proveído por InvivoGen (USA) y consiste en una nanoemulsión estéril de aceite en agua a base de escualeno. Además, está basado en la formulación del adyuvante MF59, el que ha sido aprobado en Europa para ser usado en vacunas contra la influenza⁷⁴.

4.1.3. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los ratones de la cepa C57BL/6, proveídos por ADG (Chile) y por GrupoBios S.A. (Chile), fueron mantenidos a temperatura ambiente entre 22° y 24°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno y suministrándoles agua y alimento *ad libitum*. Cabe destacar que los experimentos se realizaron acorde a las guías institucionales para el cuidado y tratamiento de los animales, según las normas éticas establecidas por CONICYT.

4.1.4. LÍNEAS CELULARES

La línea celular de melanoma murino B16F10 y las líneas celulares de melanoma humano BE, AK y RQ, fueron donadas por el Dr. Flavio Salazar-Onfray, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Las líneas fueron crecidas a 37°C en condiciones de 100% de humedad, con aire al 5% de CO₂ y en medio RPMI (Thermo), suplementado con un 10% de SFB (Suero Fetal Bovino, Hyclone, USA; inactivado a 56°C durante 30 min), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Sigma-Aldrich, USA) y 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco, USA). Los cultivos confluentes fueron cosechados con tripsina al 0,25% en EDTA (Thermo) y sembrados a razón de 2x10⁶ células/ml, aproximadamente.

4.2. REACTIVOS Y MATERIALES

4.2.1. ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDOS A HEMOCIANINAS

Se utilizó el entrecruzador heterobifuncional sulfo-SMCC y las columnas de desalación *Zeba Spin Desalting Columns*, ambos adquiridos de Thermo Scientific. Los péptidos P10 y S266, ambos con grado de pureza mayor al 95%, fueron suministrados por Eurofins MWG Operon (Alemania). Ver propiedades de los péptidos en sección C de Anexo.

4.2.2. TEST DE ELLMAN PARA HEMOCIANINAS ACTIVADAS

Tanto el reactivo de Ellman (*Ellman's Reagent*) como la cisteína monohidratada (*Cysteine-HCl*) usados para el test, fueron suministrados por Thermo Scientific.

4.2.3. CULTIVO CELULAR

Se emplearon los siguientes reactivos obtenidos de Thermo (USA): medio de cultivo RPMI 1640 con 25 mM de HEPES, SFB caracterizado y solución de tripsina 0,25% de páncreas porcino y formulada en EDTA. Por otro lado, aminoácidos no esenciales (100x MEM NEAA) se adquirieron de Gibco (USA), los antibióticos penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 mg/mL) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (USA) y se utilizó agua libre de pirógenos (Baxter, USA).

4.2.4. REACCIÓN DE ELISA

Se utilizaron los anticuerpos comerciales anti-GD2 11H3 y Q259 (Abcam, USA), el gangliósido GD2 puro (Sigma-Aldrich, USA) y como anticuerpos secundarios los conjugados a fosfatasa alcalina (FAL) anti-IgG (H+L) de ratón, anti-IgG (γ) de ratón y anti-IgM (μ) de ratón (Thermo Scientific). Cabe destacar que se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos y, para los péptidos, placas preactivadas con maleimida (*Reacti-Bind Maleimide Activated Clear Strip Plates*, Thermo Scientific).

4.2.5. REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Se usaron los siguientes materiales de Thermo Scientific: placas Lab-Tek *Chamber Slide* de 8 pocillos, antisuero de cabra conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón y solución de 4 ',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) a concentración 1 mg/mL.

4.2.6. MEDICIÓN DEL TAMAÑO DEL TUMOR

Para medir el tamaño del tumor se usó un caliper digital y electrónico, el cual mide entre 0 y 150 mm.

4.2.7. REACCIÓN DE DTH

Para anestésiar a los animales se usó Ketamina de uso veterinario, proveída por Agroland. Para medir el grosor, y la hinchazón, del pie de los animales se utilizó un medidor de espesor (*Thickness Gage*) proveído por Mitutoyo (Japón).

4.3. SOLUCIONES

4.3.1. ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDOS A HEMOCIANINAS

- Solución de conjugación: solución de tampón fosfato salino (PBS; fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2).
- Solución de DMSO al 50% en agua libre de pirógenos.

4.3.2. TEST DE ELLMAN PARA HEMOCIANINAS ACTIVADAS

- Solución de reacción: tampón PBS a pH 8,0 y EDTA 0,1 mM.
- Solución de reactivo de Ellman: solución de reacción con reactivo de Ellman en concentración de 4 mg/mL.

4.3.3. CULTIVO CELULAR

- Medio de cultivo RPMI suplementado con penicilina (100 U/mL) al 1%, estreptomycin (100 mg/mL) al 1%, aminoácidos no esenciales al 1% y SFB caracterizado y descomplementado al 10%.

4.3.4. REACCIÓN DE ELISA

- Solución de PBS-caseína 1%-azida 0,05%.
- Solución de PBS-Tween al 0,02%.
- Solución tampón FAL: Na_2CO_3 y NaHCO_3 a 0,2 M y pH 9,6.
- Solución tampón de reacción: tampón PBS pH 7,2 suplementado con EDTA 0,01 M.
- Solución de cisteína a concentración 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en tampón de reacción.

4.3.5. REACCIÓN DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA

- Solución de tampón PBS suplementado con p-formaldehído al 4%.

4.3.6. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO (ACF)

- Solución de tampón PBS con EDTA 0,02%.
- Solución de tampón PBS suplementado con p-formaldehído al 2%.

4.3.7. REACCIÓN DE DTH

- Solución de anestesia: Ketamina 10% a dilución 1:5 en suero fisiológico.

4.4. EQUIPOS

4.4.1. ÁREA DE CULTIVO CELULAR

- Cámara de Neubauer (Fisher Scientific, USA).
- Campana de flujo laminar (Clean Room Products Inc., USA).
- Centrífuga refrigerada Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Alemania).
- Microcentrífuga 5417C (Eppendorf, Alemania).
- Esterilizador Steri 250 (Keller, Suiza).
- Propipeta eléctrica Powerpette Plus (Jencons, UK).
- Estufa de cultivo de células con regulación de temperatura y CO₂ (Nuair, USA).

4.4.2. OTROS EQUIPOS

- Balanza granataria eléctrica (Sartorius, Alemania).
- pHmetro Orion 3 start (Thermo Electron Corporation, USA).
- Agitador magnético termorregulado Nuova II (Thermolyne, USA), Agitador magnético termorregulado Nuova (Thermolyne, USA), Agitador magnético tremorregulado Equilab (Velp Scientifica, Italia).
- Vortex Type 37600 Mixer (Thermolyne, USA).
- Lector de ELISA 7520 con filtros de absorción a 405 nm, 450 nm, 480 nm, 570 nm y 600 nm (Cambridge Technology Inc., USA).
- Micropipetas 20, 100, 200, 1.000, 10.000 µl (Gilson, Francia; Axygen USA), Multicanales 10, 100 µl (Costar, USA).
- Cámara Digital Nex-C3 16 Megapixels (Sony, Japón).
- Vitrina Refrigerada (Mimet, Chile), Refrigerador (Fensa, Chile).

4.5. MÉTODOS

4.5.1. ACOPLAMIENTO DE PÉPTIDOS A HEMOCIANINAS

CCH, FLH y KLH fueron conjugadas a los péptidos P10 y S266 usando el entrecruzador sulfo-SMCC, el cual actúa en dos pasos de acoplamiento. Primero, las hemocianinas, a concentración 10 mg/mL, fueron incubadas con

el sulfo-SMCC durante 1 hora, a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, el exceso de sal de las soluciones se eliminó mediante columnas de desalación. Las columnas fueron previamente equilibradas con PBS, para así evitar la precipitación de las proteínas. Finalmente, las hemocianinas activadas con maleimida fueron incubadas con cada péptido a razón 1:1 en masa, durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Los conjugados se guardaron a 4°C.

El protocolo de acoplamiento se estableció según modificaciones de Kafi et al.⁷¹ y del protocolo general señalado por Hermanson²⁴, y de acuerdo a pruebas experimentales con CCH y FLH, las cuales incluyeron la activación con sulfo-SMCC y la eliminación del exceso de sal por columnas de desalación.

4.5.1.1. Test de Ellman para hemocianinas activadas con maleimida

El Test de Ellman es un test de colorimetría que mide la cantidad de cisteína en solución (con el grupo tiol reducido) en términos de molaridad. Para ello se realiza una curva estándar de cisteína, con muestras de concentración conocida, de 0 a 1,5 mM, en relación a la absorbancia observada a 412 nm de longitud de onda^{23,75}, tras dejar reaccionar por 15 minutos con el reactivo de Ellman. Así, es posible calcular la cantidad de cisteína que se une al grupo maleimida de hemocianinas activadas con sulfo-SMCC, como la diferencia entre la concentración de cisteína en solución de muestras de CCH, FLH y KLH no activadas y CCH, FLH y KLH activadas con maleimida.

Luego de activar las hemocianinas con sulfo-SMCC, según el protocolo de acoplamiento antes descrito, se tomó una muestra de 100 µL de cada hemocianina activada y se incubó con cisteína durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad. Una misma cantidad, en masa, de hemocianina no activada se incubó con cisteína, en iguales condiciones experimentales. Luego, se prepararon las muestras para la curva estándar de cisteína en la solución de reacción y se agregaron 250 µL de cada muestra a 2,5 mL de la solución de reacción con 50 µL de reactivo de Ellman. Tras 15 minutos de reacción se midió absorbancia a 405 nm⁷⁵.

Una vez determinada la curva de regresión lineal de la curva estándar, la concentración de cisteína en las muestras de hemocianina se calculó como el cociente entre la absorbancia medida y la pendiente de la curva. La diferencia entre hemocianinas activadas y no activadas corresponde a la cisteína que se une a la maleimida de las hemocianinas incubadas con sulfo-SMCC, con lo que es posible predecir el porcentaje de SMCC que se unió a la proteína. Ver Anexo, sección B.1.

4.5.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

4.5.2.1. Inmunización de ratones C57BL/6

Ratones de la cepa C57BL/6 fueron designados en grupos de 3 animales cada uno para ser inmunizados con los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, o por sus respectivos conjugados control CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266. Adicionalmente, un grupo de ratones fue inmunizado con PBS, vehículo de las hemocianinas conjugadas, como control negativo.

Los ratones recibieron una inmunización primaria y, 15 días después, otra secundaria, mediante inyecciones intraperitoneales (ip). De acuerdo a Wondimu et al.¹¹, las inyecciones consistieron en 50 µg de conjugado en 100 µL de PBS, y AddaVax como adyuvante a razón 1:1 en volumen. A los 15 días tras la segunda inmunización se sangró a los ratones y se colectó alrededor de 100 µL de suero por ratón. Se guardó congelado hasta su uso a -20°C.

4.5.2.2. Ensayo inmunoenzimático en fase sólida de los sueros

De acuerdo a lo reportado por Arancibia et al.¹⁸, placas de 96 pocillos fueron activadas a 4°C, el día previo al ensayo, con 50 µl/pozo de una solución de antígeno a 10 µg/mL. Luego de bloquear los sitios libres de la placa durante 1 hora y a temperatura ambiente con 200 µL/pozo de PBS-Caseína 1%, se agregaron 100 uL de suero inmune (pool de 3 ratones) en diluciones seriadas en base 2, los cuales se dejaron incubando por 1,5 horas en baño húmedo a 37°C. Se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0,02% y se agregaron 100 uL de antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FAL, en dilución 1:2.500. Finalmente, tras tres lavados con PBS-Tween 0,02%, se agregaron 100 µL de p-nitrofenilfosfato (pNPP) en tampón FAL, se dejó reaccionar por al menos 15 minutos a 37°C y se midió absorbancia a 405 nm.

- I. ELISA contra la proteína *carrier*: Se usó hemocianina (CCH, FLH y KLH) como antígeno para sueros de ratones inmunizados con el conjugado respectivo. Las proteínas fueron diluidas en PBS para obtener una concentración de 10 µg/mL y seguir el protocolo ya mencionado.
- II. ELISA contra el conjugado hemocianina-péptido: Se utilizaron los conjugados hemocianina-péptido como antígeno, de tal modo que el suero de ratones tratados con el conjugado en cuestión fue titulado mediante ELISA. Se siguió el ensayo de la forma descrita con anterioridad. ELISA contra el gangliósido GD2: El gangliósido GD2 se usó como antígeno, el cual se diluyó en etanol para obtener una

concentración de 10 µg/mL. La placa fue activada por evaporación del etanol a temperatura ambiente. Se evaluó el título de los sueros de ratones tratados con los conjugados y de los anticuerpos monoclonales comerciales anti-GD2 11H3 y Q259, contra el gangliósido GD2.

- III. ELISA contra los haptenos: Se usó a los péptidos P10 y S266 como antígenos del ensayo, los cuales fueron diluidos en tampón de reacción para tener una concentración de 35 µg/mL. Las placas de 96 pocillos, preactivadas con maleimida, fueron cubiertas con 50 µL del antígeno y se dejó incubando a 4°C durante toda la noche, tal como lo indica el productor. Posteriormente, las placas fueron lavadas con PBS-Tween 0,02% y se bloqueó con 100 µL/pozo de cisteína monohidratada a concentración 10 µg/mL en tampón de reacción, durante 1 hora y a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,02% y se siguió el protocolo de la forma descrita previamente, sin considerar el bloqueo con PBS-Caseína 1%.
- IV. Determinación de la clase IgM e IgG de los anticuerpos contra los péptidos: Se realizó un ELISA contra los péptidos P10 y S266, utilizando placas preactivadas con maleimida. Se usaron como anticuerpos secundarios los sueros de conejo anti-isotipo de ratón IgG (γ) y IgM (μ), ambos unidos a FAL. Se agregaron 100 µL/pozo de dichos antisueros, diluidos a razón de 1:10.000.

4.5.2.3. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta de los sueros

Se realizó un ensayo IFI del pool de sueros de ratones inmunizados con CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266 contra la línea de melanoma murino B16F10 y células de melanoma humano de las líneas BE, RQ y AK, para evaluar la presencia de anticuerpos contra el gangliósido GD2, molécula que se ubica en la superficie de las células mencionadas. Se usaron como control positivo los anticuerpos comerciales anti-GD2 11H3 y 2Q59.

Primero, las células de melanoma fueron cultivadas en placas de 8 pocillos, en las condiciones descritas en el punto 4.1.3. Tras 2-3 días de cultivo se eliminó el medio, se agregó 300 µL de fijador PBS-Paraformaldehído 4% por pozo y se dejó por 30 minutos a temperatura ambiente⁸. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con 200 µL/pozo de PBS-Tween 0,02 % y se agregó el suero (pool de 3 ratones por grupo) diluido en PBS-Caseína 1% a razón de 1:50 y 1:100, además de los AMCs 11H3 y 2Q59, y se incubó durante toda la noche a 4°C. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,02% y se agregó el anticuerpo secundario, antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido al fluorocromo FITc, diluido a 1:100 en PBS-Caseína 1%, y se dejó por 1 h a temperatura ambiente. Se

volvió a lavar la placa con PBS-Tween 0,02%, se agregó 100 μ L/pozo de la solución de contraste para teñir núcleos (DAPI) y se incubó por 7 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS pH 7,2, se desarmó el aparato *Chamber Slide*, con lo que quedó el portaobjetos con las células fijadas. Con la placa seca, se puso una gota de medio de montaje DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano) y un cubreobjeto sobre las células tratadas. Finalmente, las muestras se observaron en un microscopio de luz Nikon equipado con epifluorescencia de la Unidad de Microscopía de la Pontificia Universidad Católica de Chile, donde se procesaron las imágenes mediante el software computacional NIS-Elements Microscope Imaging (Nikon, USA).

4.5.2.4. Análisis por citometría de flujo

Se realizó un ACF del pool de sueros de ratones inmunizados con CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266 contra la línea de melanoma murino B16F10, para evaluar la presencia de anticuerpos contra el gangliósido GD2, molécula que se ubica en la superficie de las células mencionadas. Se usaron como control positivo los anticuerpos comerciales anti-GD2 11H3 y 2Q59. El procedimiento se siguió de acuerdo a lo reportado por Arancibia et al.¹⁸ y Monzavi-Karbassi et al.⁵⁹, con modificaciones.

Las células fueron cosechadas con PBS-EDTA 0,02% 10 minutos y con tripsina EDTA por 5 minutos adicionales. Luego de centrifugar por 10 minutos y a temperatura ambiente, las células se resuspendieron por suave pipeteo con PBS-FSB 2% y se dispuso un volumen de 300 μ L, con 5×10^5 células, en tubos Eppendorff. Las células se centrifugaron a 3.000 rpm, por 3 minutos y a 4°C, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* de células en 300 μ L de PBS-FSB 2% y se volvió a centrifugar en iguales condiciones. El *pellet* de células se resuspendió con 300 μ L de PBS-FSB 2% y sueros a dilución 1:50 y 1:100, dejándose incubar por 1,5 horas a 4°C. Posteriormente las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 300 μ L de PBS-FSB 2% por centrifugación de las células en las mismas condiciones descritas anteriormente. El *pellet* de células fue resuspendido con 300 μ L de PBS-FSB 2% y anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de ratón asociado al fluorocromo FITc, diluido a razón 1:100. Las células se incubaron por 20 minutos a 4°C, luego fueron centrifugadas y lavadas con PBS-SFB 2%. El *pellet* se resuspendió en 300 μ L de PBS-Paraformaldehído 2% y se pasaron a tubos Khan, donde las células se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente⁸. El AFC se realizó en el Laboratorio de Inmunología dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Los resultados se analizaron en el programa FCS Express 4 Flow Citometry (De Novo, USA).

4.5.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA CONTRA EL TUMOR DE MELANOMA MURINO DE LA LÍNEA B16F10

Inicialmente se estableció un protocolo terapéutico para evaluar la respuesta inmune protectora contra el tumor de melanoma murino de la línea B16F10, en ratones de la cepa C57BL/6, el cual fue tomado y modificado de Wondimu et al.¹¹ y Arancibia et al.^{15,18}. El protocolo se encuentra ilustrado en la Figura 9, donde se observa que consta de una primera sensibilización de los ratones con el antígeno utilizado en la terapia, seguida de la inoculación del tumor y una terapia compuesta por tres inyecciones subcutáneas espaciadas por una semana. Para el experimento se consideraron 12 grupos, integrados por 5 animales cada uno, los que fueron numerados de 1 a 5 mediante una clave basada en cortes en las orejas. En la Tabla 4 se muestra el tratamiento que recibió cada grupo.

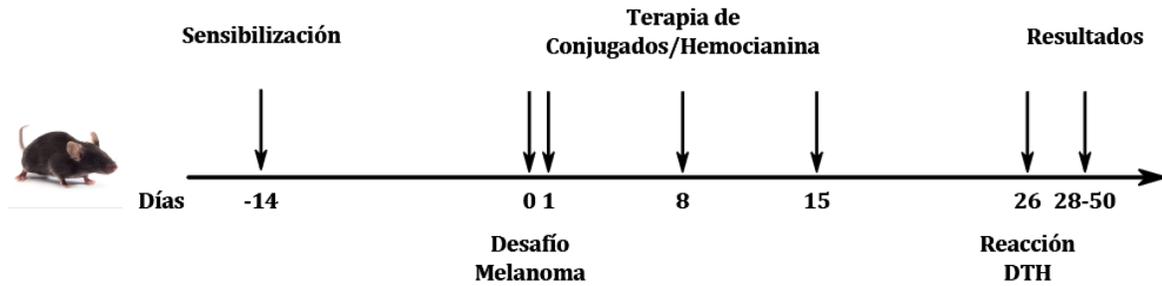


Figura 9: Diagrama del curso temporal del bioensayo y sus hitos.

Tabla 4: Condiciones terapéuticas evaluadas en cada uno de los grupos de animales del bioensayo.

Jaula/Grupo	Condición
J01	<i>Sham</i>
J02	Control: AddaVax
J03	Control: PBS
J04	Control CCH en PBS
J05	Control FLH en PBS
J06	Control KLH en PBS
J07	Conjugado CCH-P10 en PBS
J08	Conjugado FLH-P10 en PBS
J09	Conjugado KLH-P10 en PBS
J10	Conjugado control CCH-S266 en PBS
J11	Conjugado control FLH-S266 en PBS
J12	Conjugado control KLH-S266 en PBS

4.5.3.1. Sensibilización de los ratones C57BL/6

La sensibilización de los animales de experimentación consistió en una inmunización mediante una inyección subcutánea (sc) en la pared costal derecha del cuerpo, previamente rasurada, de 40 µL del adyuvante AddaVax y 40 µL de solución PBS con 50 µg de hemocianina o conjugado, según la terapia. Cabe destacar que el grupo control *sham* no fue inyectado, aunque los animales fueron manipulados simulando la inyección sc, y el grupo *Addavax* solo fue inyectado con 40 µL del adyuvante.

4.5.3.2. Inoculación del tumor de melanoma

La inoculación de la línea de melanoma murino B16F10 consistió en una inyección sc de $1,5 \times 10^5$ células en 100 µL de medio DMEM en la pared costal derecha del animal, tal como se determinó con anterioridad para asegurar el desarrollo del tumor en ratones de la cepa C57BL/6^{15,18}.

4.5.3.3. Terapia

La terapia consistió en inyecciones s.c. intralesionales de 50 µg de hemocianina o de conjugado hemocianina-péptido en 40 µL de PBS y adyuvante AddaVax a razón 1:1 en volumen. Al igual que en la sensibilización, los ratones *sham* no fueron inyectados, pese a que se simuló la manipulación, y los ratones *AddaVax* solo fueron inyectados con el adyuvante.

4.5.3.4. Estudio de la respuesta inmune protectora contra el tumor

Durante el experimento terapéutico se examinó el peso de los ratones, la presencia de tumor de melanoma en el sitio de inoculación, las dimensiones de largo y ancho del tumor a lo largo del bioensayo y la presencia de enrojecimiento y/o necrosis en la zona corporal de experimentación, cada 3 días aproximadamente. Asimismo, se registró la sobrevivencia de los ratones durante el periodo del bioensayo y se evaluó la existencia de metástasis en pulmones, bazo, riñones e hígado en aquellos ratones portadores de tumor que fueron sacrificados el día 29 del bioensayo. Cabe destacar que el volumen del tumor fue calculado según la ecuación del elipsoide que se indica a continuación¹⁸.

$$\text{Volumen Tumor} = 0,52 \cdot \text{Largo} \cdot \text{Ancho}^2$$

Adicionalmente, se evaluó la respuesta inmune humoral inducida por la terapia. Para ello, se realizó un ensayo de ELISA contra hemocianina, independiente para cada animal tratado con CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados a P10 y S266. También se realizó un ensayo de

ELISA para determinar la presencia de anticuerpos de clase IgG contra los péptidos, con el pool de sueros de animales de cada grupo tratado con hemocianina conjugada a P10 o S266 (ver sección 4.5.2.2). Asimismo se hizo una IFI y un ACF del pool de sueros de cada grupo incluido en la terapia contra la línea de melanoma murino B16F10 (ver secciones 4.5.2.3 y 4.5.2.4).

4.5.4. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

4.5.4.1. Reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en ratones inmunizados con los conjugados

Durante el bioensayo se evaluó la reacción de DTH contra los péptidos, en aquellos ratones inmunizados con los conjugados hemocianina-péptido, usando el grupo PBS como control negativo. La DTH se inició el día 26 del bioensayo, y se midió el grosor del cojinete del pie derecho y el pie izquierdo mediante un medidor de espesor de alta precisión, tanto en el instante previo a la inyección, como también a las 24, 48 y 72 horas. En cada oportunidad, se realizaron 3 mediciones y graficó el promedio.

Primero, los ratones fueron anestesiados con 100 μ L de Ketamina diluida en suero fisiológico, mediante inyecciones ip. Luego, se inyectó de manera sc 75 μ g de péptido P10 o S266, disuelto en 20 μ L de PBS, en el cojinete del pie izquierdo de los ratones, dejando el pie derecho como control sin inyección. El grupo control fue inyectado con 20 μ L de PBS. Posteriormente, los ratones se dejaron bajo calor, permitiéndoles recuperarse de la anestesia. La reacción fue graficada en términos de la diferencia de espesor entre el pie izquierdo y el pie derecho, a lo largo del tiempo⁷⁶.

4.5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del trabajo de título están expresados como el promedio \pm EEM (error estándar de la media). Las comparaciones hechas entre los grupos fueron evaluadas estadísticamente por t-test o según el método ANOVA de una vía, seguido de un post-test con Bonferroni, en el software computacional GraphPad Prism (USA), el cual también se utilizó como plataforma para dibujar los distintos gráficos mostrados en el trabajo.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1. ACOPLAMIENTO HEMOCIANINA-PÉPTIDO

El desarrollo de la tesis contempló una primera etapa de preparación de los conjugados hemocianina-péptido. Para evitar la modificación de epítomos en la molécula *carrier*, el acoplamiento se realizó vía sulfo-SMCC. Para ello, se realizaron pruebas que permitieron evaluar la solubilidad de FLH y CCH, al ser tratadas con el entrecruzador, a partir del protocolo recomendado para KLH²⁴, de modo tal de ajustar las condiciones experimentales. Adicionalmente, se evaluó la eficacia del acoplamiento con el método de Ellman, puesto que permite medir la unión de cisteína al grupo maleimida del sulfo-SMCC.

Los resultados de las pruebas de activación de CCH y FLH con sulfo-SMCC, así como los ajustes realizados al protocolo, se muestran en la Tabla 5. Debido a que las hemocianinas en estado soluble presentan un color azul, el cual está dado por la oxidación del cobre contenido en la molécula¹², fue posible determinar la precipitación de CCH y FLH por inspección visual. Así, se observó que el entrecruzador no afectó la solubilidad de dichas proteínas, durante el tiempo de reacción (1 hora a temperatura ambiente). Sin embargo, FLH precipitó al usar EDTA como agente quelante en el tampón de conjugación. También se observó precipitación al centrifugar la solución de FLH con sulfo-SMCC en las columnas de desalación, lo que se solucionó equilibrando previamente la columna con PBS. Con ello, las principales variaciones incluidas al protocolo de acoplamiento fueron: 1) eliminar el EDTA del tampón de conjugación con PBS, 2) equilibrar la columna con PBS, tras lavarla 3 veces con agua libre de pirógenos y 3) realizar la desalación de las soluciones a 4°C. Cabe señalar que al realizar el protocolo modificado, KLH no presentó precipitación en la etapa de activación ni en la de desalación.

Para evaluar el nivel de activación de las hemocianinas se determinó usar un factor de dilución igual a 3, y así medir la unión de los residuos de cisteína al grupo maleimida de estas proteínas activadas, mediante el test de

Ellman. Como se ve en Anexos, sección A.1, para factores de dilución mayores el error en la medición aumenta. La Figura 10A-C muestra los resultados del test de Ellman realizado en hemocianinas activadas con sulfo-SMCC y que fueron acopladas posteriormente con los péptidos P10 y S266, por separado. Estos resultados incluyen las curvas de calibración de cisteína obtenidas para el primer y segundo acoplamiento realizados durante el trabajo experimental, y los valores de concentración de cisteína en solución en las muestras de hemocianinas activadas y no activadas, cuya diferencia correspondería a la cisteína unida al grupo maleimida que se enlazó a las hemocianinas activadas con sulfo-SMCC (véase Figura 8, Marco Teórico).

De acuerdo al test de Ellman, CCH unió en promedio un 45% del sulfo-SMCC agregado inicialmente para la reacción de activación con maleimida, mientras que FLH unió en promedio un 85%, indicando que al agregar los péptidos a la solución habría un enlazamiento mediado por el residuo de cisteína reducida del péptido y la maleimida presente en las hemocianinas. Como se ve en la Figura 10B, el valor en la medición de KLH activada con maleimida y KLH no activada fue similar, y similar también a lo obtenido con CCH y FLH activadas con maleimida. Por tanto, se calculó la unión de cisteína a KLH no activada, pero pasada por columnas de desalación, para eliminar los estabilizantes del producto liofilizado, que podrían estar modificando el grupo tiol de los residuos, afectando así su unión al reactivo de Ellman. No obstante, se obtuvo los mismos resultados previos. Posteriormente, se evaluó la activación de KLH y CCH pre-activados con sulfo-SMCC que fueron proveídos por Thermo Scientific. Para CCH se encontraron resultados similares a los descritos, mientras que KLH pre-activada presentó menor unión a cisteína que KLH no activada (mayor concentración de cisteína en solución; Figura 10D-E). De esta forma, se descartó el método de Ellman, como test de análisis del nivel de activación de maleimida para KLH, no así para CCH y FLH.

Cabe destacar que en el primer acoplamiento de los péptidos a las hemocianinas se presentó el problema de la baja solubilidad de P10 y de S266. Aun cuando se intentó solubilizarlos con DMSO, al momento de agregar los péptidos a las hemocianinas activadas con maleimida, las soluciones se tornaron viscosas, dificultando las determinaciones y manipulaciones posteriores de los conjugados. Para el segundo acoplamiento, fue posible solubilizar los péptidos con DMSO al 50% en agua, lo cual disminuyó los inconvenientes al tener péptidos más solubles respecto al primer acoplamiento.

Tabla 5: Activación de hemocianinas (CCH y FLH) con sulfo-SMCC, post desalación. Se evaluó la ocurrencia de precipitación de las proteínas mediante inspección visual y los ajustes al protocolo de acoplamiento para evitar la precipitación. Hc: hemocianina.

Hc	Sal	Tampón	Modificación del Protocolo	Precipitación de Proteínas	Observaciones
FLH	NaCl	PBS-EDTA	Se eliminó EDTA	Sí	-
FLH	Sulfo-SMCC	PBS	Disolución de sulfo en baño a 50°C	Sí	No hubo precipitación tras 1 h de reacción, a temperatura ambiente.
CCH	Sulfo-SMCC	PBS	Disolución de sulfo en baño a 50°C	No	No hubo precipitación tras 1 h de reacción, a temperatura ambiente.
FLH	-	PBS	Equilibrio de la columna con PBS	No	Paso incorporado al protocolo.
FLH	Sulfo-SMCC	PBS	Centrifugación a 4°C	No	Se obtuvo la hemocianina totalmente soluble.

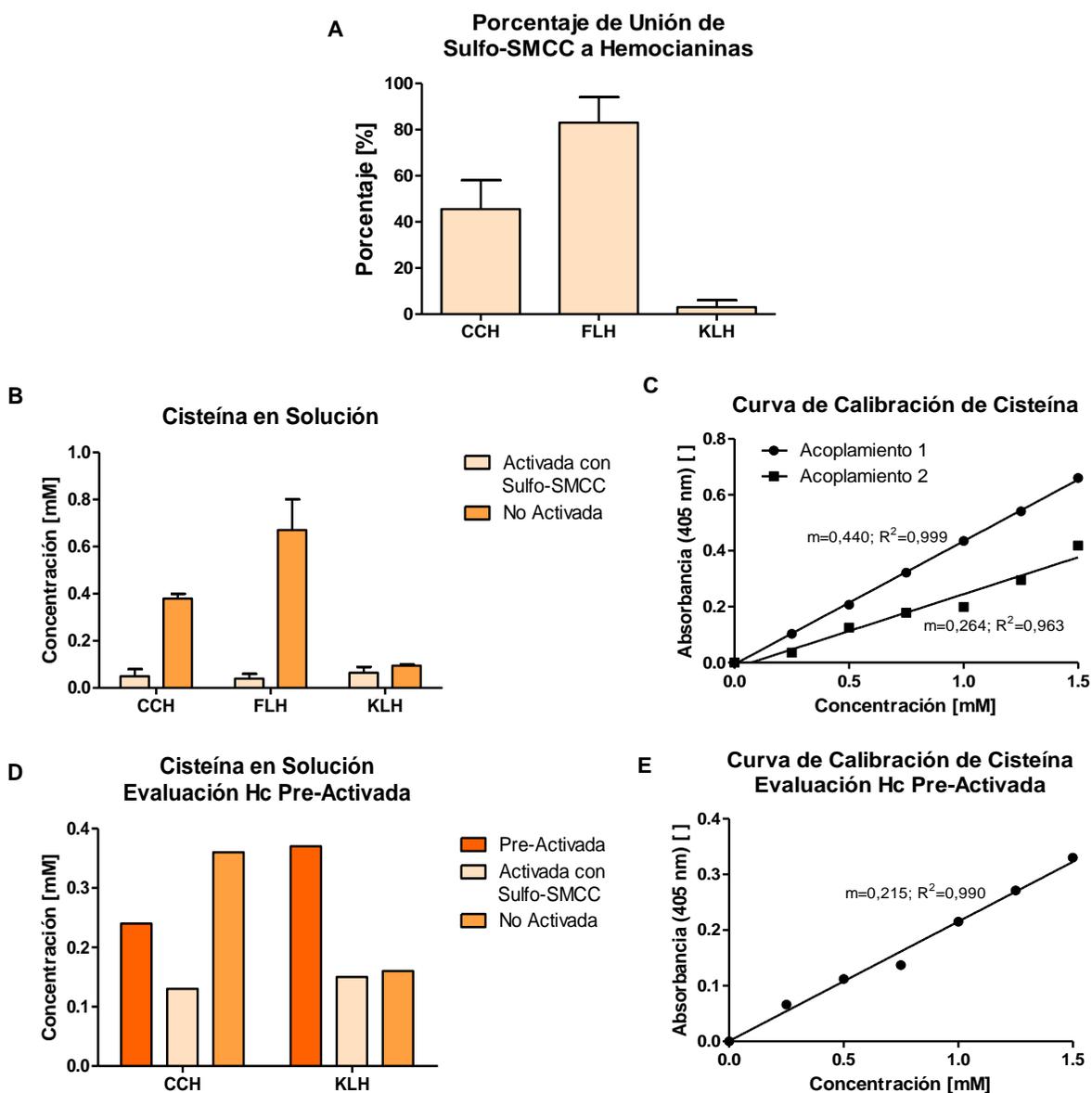


Figura 10: Activación de hemocianinas con el grupo maleimida de sulfo-SMCC. Medición de cisteína en solución mediante el test de Ellman por espectrofotometría (a 405 nm), de la reacción entre el reactivo de Ellman y el grupo tiol de la cisteína (-SH; que reacciona con la maleimida). La diferencia en la concentración de cisteína en solución entre hemocianinas activadas y no activadas corresponde a la cisteína unida al grupo maleimida. Los datos corresponden a dos experimentos independientes. **A)** Porcentaje de unión de sulfo-SMCC a CCH, FLH y KLH, respecto a la cantidad agregada inicialmente, **B)** concentración mM de cisteína en solución en muestras de CCH, FLH y KLH activadas y no activadas y **C)** curvas de calibración de cisteína; A-C resultados para el primer ($m=0,440$ y $R^2=0,999$) y segundo acoplamiento de péptidos ($m=0,264$ y $R^2=0,963$). **D)** y **E)** Resultados de concentración de cisteína y curva de calibración para la evaluación de hemocianinas pre-activadas con sulfo-SMCC por Thermo Scientific ($m=0,215$ y $R^2=0,990$). m : pendiente de la curva, R^2 : coeficiente de correlación de datos. [] indica adimensionalidad.

5.2. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL INDUCIDA POR LOS CONJUGADOS HEMOCIANINA-PÉPTIDO

Se evaluó la respuesta inmune humoral de los ratones C57BL/6 inmunizados con dos dosis intraperitoneales de los conjugados hemocianina-péptido (inmunización primaria y secundaria). Se realizaron dos experimentos independientes, en el primero se utilizaron machos y hembras y en el segundo se trabajó solo con hembras, por ser menos agresivas.

5.2.1. TÍTULO DE ANTICUERPOS CONTRA HEMOCIANINAS *CARRIER*, CONJUGADOS HEMOCIANINA-PÉPTIDO Y PÉPTIDOS

Con los sueros colectados tras la inmunización secundaria, se realizaron mediciones por ELISA contra cada hemocianina *carrier*, contra cada uno de los conjugados hemocianina-peptido, contra cada péptido y contra GD2. Los títulos de anticuerpos séricos para cada uno de los grupos experimentales se muestran en la Figura 11, como un promedio de dos experimentos independientes y el error estándar de la media asociado.

El título de anticuerpos contra la hemocianina *carrier* (Figura 11A) resultó cercano a las 4.000 diluciones en los grupos CCH-P10, FLH-P10, FLH-S266 y KLH-S266. De acuerdo al análisis estadístico por ANOVA de una vía, no se detectaron diferencias significativas entre tales grupos, así como tampoco con CCH-S266 y KLH-S266, con los cuales se obtuvo una reactividad inferior (de aproximadamente 1:2.800) contra el *carrier* CCH y KLH, respectivamente. Cabe mencionar que en el segundo ensayo de inmunización se indujo una mayor respuesta humoral contra la hemocianina, que atribuimos a que se lograron conjugados más solubles y, por lo tanto, más fáciles de manipular.

Respecto al título de anticuerpos contra el conjugado, hubo diferencias importantes entre un grupo y otro (Figura 11B). Así, para los conjugados CCH-P10, KLH-P10 y KLH-S266 se tuvo un título de anticuerpos cercano a las 800 diluciones, mientras que para CCH-S266, FLH-P10 y FLH-S266 se tuvo un título de anticuerpos inferior (de 200, 15 y 120 diluciones, respectivamente). Las diferencias vistas podrían explicarse por errores en la activación de la placa, como producto de la baja solubilidad de los conjugados.

De los resultados descritos anteriormente, se concluyó que en los animales de experimentación se desarrollaron anticuerpos contra las hemocianinas, así como también contra los péptidos P10 y S266 (Figura 11, gráficos C y D, respectivamente). Al disolver los péptidos en PBS-EDTA mejoró su solubilidad, y se unieron a las placas de ELISA pre-activadas con maleimida mediante el enlace del grupo tiol reducido de la cisteína terminal.

Dicho aminoácido fue agregado a la secuencia de los péptidos para facilitar su acoplamiento a las hemocianinas¹¹. De este modo, se supuso que en las placas de ELISA los péptidos adoptarían una conformación similar a la que presentan cuando se unen a CCH, FLH y KLH, favoreciéndose la unión de los anticuerpos séricos específicos contra el péptido inducidos por los conjugados.

Para P10, el título de anticuerpos séricos de los conjugados a dicho péptido (CCH-P10, FLH-P10 y KLH-P10) resultó en torno a las 230 diluciones, y para S266, el título inducido por los conjugados correspondientes (CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266) fue de 150 diluciones, aproximadamente. No se encontraron diferencias significativas entre los conjugados a P10 y entre los conjugados a S266 ($p > 0,05$), por lo tanto CCH, FLH y KLH no presentaron diferencias como proteínas *carriers* para inducir la respuesta inmune humoral contra los péptidos. Adicionalmente, como se ve en la Figura 11C-D, no hubo reacción cruzada entre los anticuerpos contra los péptidos, por lo que los conjugados a S266 no indujeron anticuerpos contra P10 y los conjugados a P10 no indujeron anticuerpos contra S266, en ninguno de los dos ensayos realizados.

Por análisis estadístico según ANOVA y post-test con Bonferroni, habría diferencias significativas en el título de anticuerpos contra P10 entre los conjugados a P10 y a S266, y en el título de anticuerpos contra S266 entre los grupos FLH-P10 y FLH-S266 ($p < 0,05$ en cada caso). Esto indica que los anticuerpos contra P10, inducidos por las hemocianinas conjugadas a P10, y los anticuerpos contra S266, inducidos por FLH-S266, son específicos para el péptido en cuestión.

Cabe señalar que no se detectó reactividad de los sueros contra GD2 puro en ningún grupo inmunizado. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal comercial anti-GD2 Q259 sí presentó reactividad contra GD2 (alrededor de 1:50), siendo negativo con P10 y S266. Con el anticuerpo comercial anti-GD2 11H3 no hubo reactividad contra GD2, así como tampoco con los péptidos. Estos resultados no son sorprendentes puesto que el anticuerpo ME361 que se utilizó para generar el péptido P10, mediante tecnología de despliegue de fagos, reconoce un epítipo de GD2 que podría diferir con el epítipo que es reconocido por los anticuerpos comerciales Q259 y 11H3⁵⁹.

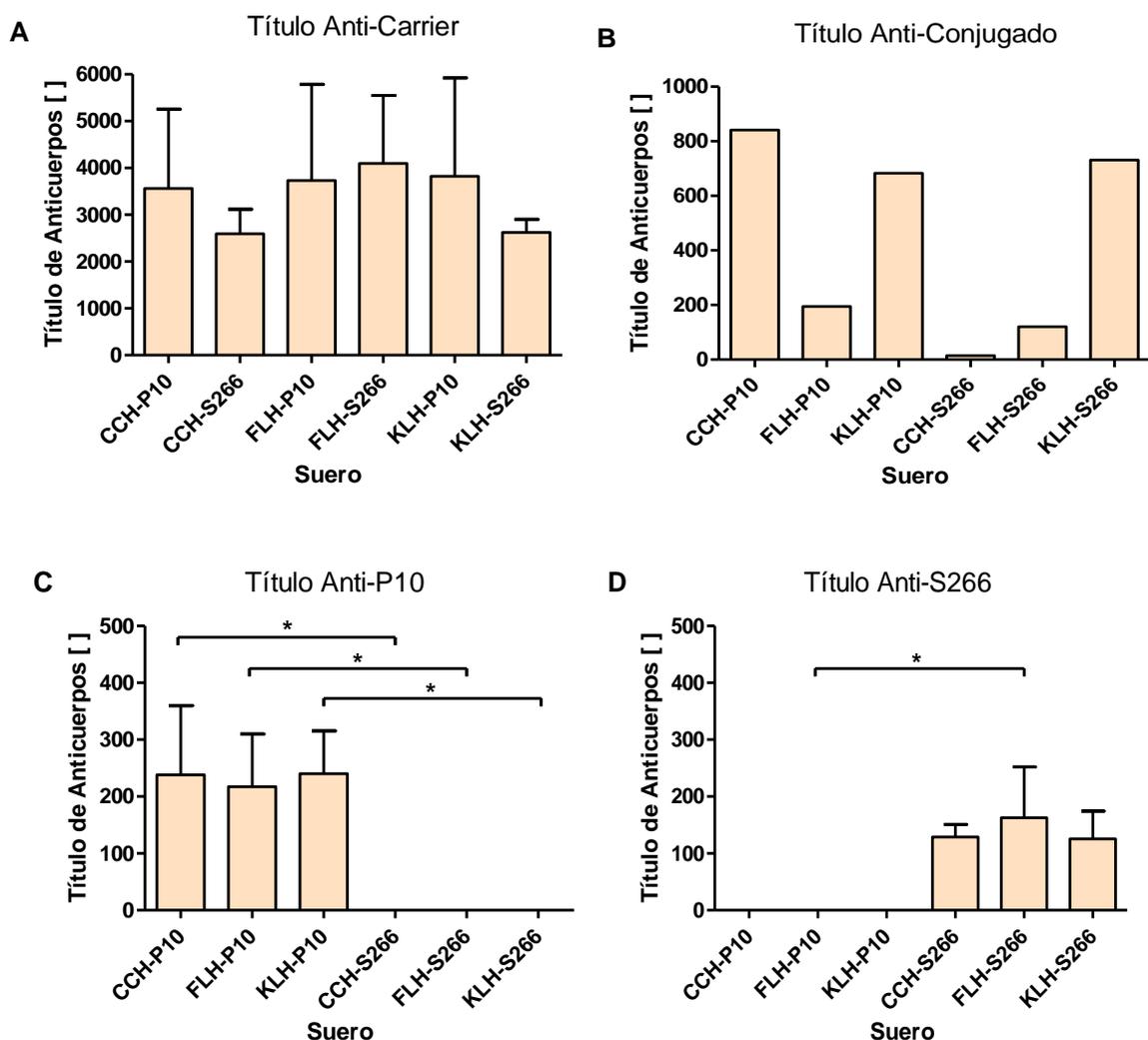


Figura 11: Título de anticuerpos séricos de ratones C57BL/6 inmunizados con dos dosis de los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266. Se muestran los resultados mediante ELISA de dos experimentos independientes **A)** contra cada hemocianina (CCH, FLH y KLH) respectiva al conjugado de inmunización, **B)** contra cada conjugado correspondiente a la inmunización (un solo experimento) y contra cada péptido: **C)** P10 y **D)** S266. Se utilizó un pool de suero de 3 ratones y como anticuerpo secundario se usó un antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FAL, se midió absorbancia a 405 nm. El título se calculó como la dilución del suero correspondiente al punto de inflexión de la curva dosis-respuesta de la reacción de ELISA (véase en Anexo, sección A.2). [] indica adimensionalidad.

5.2.2. CLASE IGM O IGG DE LOS ANTICUERPOS CONTRA P10 Y S266

Se analizó mediante ELISA la clase IgM o IgG de los anticuerpos inducidos por los conjugados hemocianina-péptido, tras una segunda inmunización ip en ratones C57BL/6. Como se observa en la Figura 12, los conjugados indujeron anticuerpos de la clase IgG específicos contra el péptido correspondiente al conjugado de inmunización, puesto que no se encontró reacción cruzada entre los péptidos. Vale decir, P10 conjugado a CCH, FLH y KLH indujo anticuerpos IgG específicos contra P10, de igual forma que ocurre con S266.

El título de anticuerpos IgG contra el péptido inducido por los conjugados fue cercano a las 300 diluciones, a excepción de CCH-S266, cuyo título contra el péptido S266 fue una dilución menor (150 diluciones), recordando que las diluciones fueron seriadas en base 2. Tales valores están dentro del orden del título de anticuerpos séricos detectado con el antisero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón (Figura 11C-D). Sin embargo, en este experimento se utilizó un anticuerpo específico contra el fragmento pesado de inmunoglobulinas G de ratón, a diferencia del experimento anterior, en que el anticuerpo puede reconocer epítomos constantes de las cadenas livianas de inmunoglobulinas de la clase M y G.

Por otra parte, se detectó la presencia de anticuerpos de la clase IgM contra el péptido, con un título inferior al que se observó para la clase IgG, y además hubo reacción cruzada entre los péptidos (Figura 12). Esta reacción cruzada, pese a tener bajos valores de título, es representativa de que las IgM corresponden a anticuerpos no específicos contra el péptido.

Anteriormente se mostró que los conjugados tienen un mismo efecto al inducir la respuesta inmune humoral contra los péptidos. Asimismo se mostró que no hay reacción cruzada entre P10 y S266, lo cual también descarta una reacción cruzada entre las hemocianinas y los péptidos. Teniendo esto en cuenta, se evaluó estadísticamente, mediante t-test, la diferencia entre la producción de anticuerpos IgM e IgG que son inducidos por cada uno de los péptidos, en experimentos independientes según si fueron acoplados a CCH, FLH o KLH. Los anticuerpos de la clase IgG inducidos por P10 presentaron un título significativamente mayor ($p < 0,001$) respecto al título de anticuerpos de clase IgM. Tal diferencia no fue significativa con S266 ($p = 0,25$).

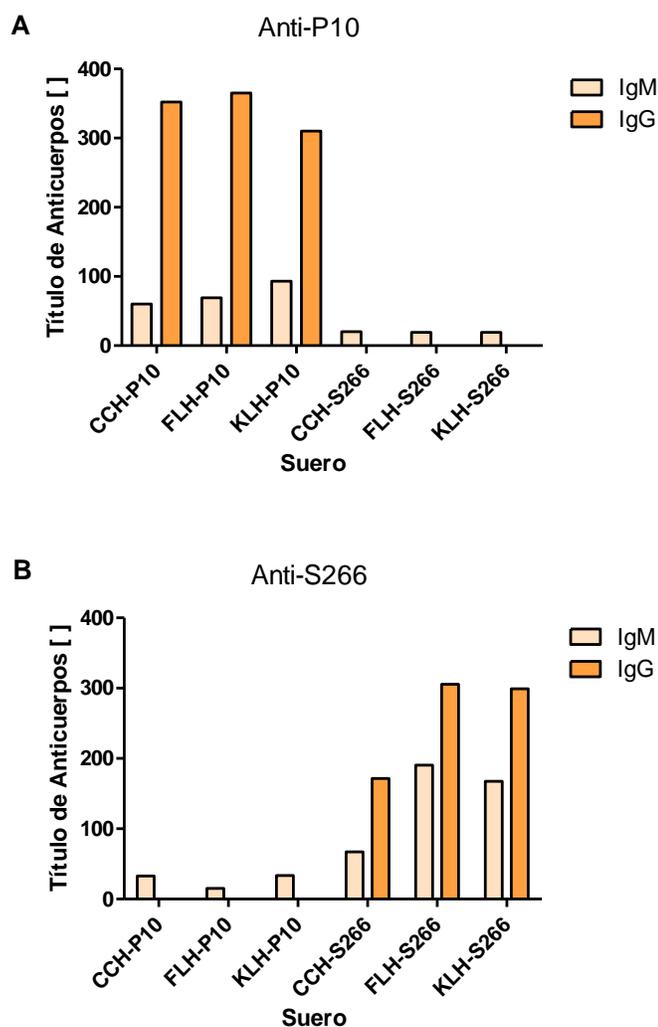


Figura 12: Título de anticuerpos séricos de la clase IgM e IgG específicos contra los péptidos P10 y S266 conjugados a CCH, FLH y KLH. Tres ratones C57BL/6 por grupo fueron inmunizados con dos dosis ip, espaciadas temporalmente por dos semanas, de 50 μ g de conjugado hemocianina-péptido, en 100 μ L de PBS y AddaVax 1:1 en volumen. Se usó un pool de sueros de 3 ratones por grupo y se utilizó como anticuerpos secundarios a los sueros de conejo específicos para las cadenas pesadas de la IgM (μ) e IgG (γ), unidos a FAL. Se midió absorbancia a 405 nm. Los resultados corresponden a un solo experimento. El título se calculó como la dilución de suero correspondiente al punto de inflexión de la curva dosis-respuesta de la reacción de ELISA, usando los péptidos como antígeno (ver en Anexo, sección A.2). [] indica adimensionalidad.

5.2.3. REACTIVIDAD DE LOS ANTISUEROS DE RATÓN ANTI-HEMOCIANINA-PÉPTIDO CON MELANOMA MURINO (B16F10) Y LÍNEAS DE MELANOMA HUMANO (BE, RQ Y AK)

En primer lugar se realizó una inspección visual de las células al microscopio de luz, para corroborar su morfología de carácter epitelial. El aspecto de las células de melanoma murino B16F10 y de melanoma humano BE, RQ y AK vistas en microscopía de luz con contraste de fases se ilustra en la Figura 13. Si bien las 4 líneas crecen en monocapa, se aprecia que las células de las líneas de ratón B16F10 y las humanas RQ y AK presentan una morfología similar, donde predominan células con diferente aspecto poligonal y numerosas extensiones citoplasmáticas, mientras que BE tiene una morfología en que se distinguen células redondeadas y células alargadas.

Los resultados de IFI realizadas en cultivos celulares de las líneas B16F10, BE, RQ y AK se muestran en la Figura 14, Figura 15, Figura 16 y Figura 17, respectivamente. Tales figuras muestran los resultados para los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados ip con los conjugados hemocianina-péptido, a una dilución de 1:50. Como control, se incluyeron los anticuerpos monoclonales comerciales anti-GD2 11H3 y 2Q59, además de un control del conjugado: antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a isotiocianato de fluoresceína.

Tanto para la línea murina como para las líneas de melanoma humano, los sueros evaluados presentaron una reacción positiva con las células fijadas en paraformaldehído, la cual se evidenció como una intensa fluorescencia verde en la célula y una coloración azul en el núcleo (teñido con DAPI), en relación a la ausencia de fluorescencia verde en el control de conjugado, concluyéndose que la reacción observada era específica. Tal reactividad observada con los antisueros se asemeja a lo reportado por Monzabi-Karbassi et al.⁵⁹, Figura 5, y además la morfología que presentan las células es coherente con la morfología presentada por las células vistas por microscopía de luz con contraste de fases (Figura 13). De esta forma, se infiere que los sueros de ratones inmunizados contienen anticuerpos que reconocen epítomos en las células de melanoma, ya sea murino o humano, los que serían inducidos por los conjugados hemocianina-péptido.

Cabe destacar que las células incubadas con los sueros de ratones inmunizados con KLH-S266 presentaron una intensidad de fluorescencia inferior, vista cualitativamente a una dilución 1:50, tanto en B16F10, como en RQ y AK (Figura 14F, Figura 16F y Figura 17F, respectivamente). Pese a que se aprecia una leve fluorescencia de los anticuerpos comerciales anti-GD2 11H3 y 2Q59 con las células B16F10 y las células AK, respecto al control, no se consideró que correspondiese a una reacción positiva. Así, no fue posible tener un control positivo de la reactividad de los anticuerpos específicamente contra el epítomo de GD2 en las células.

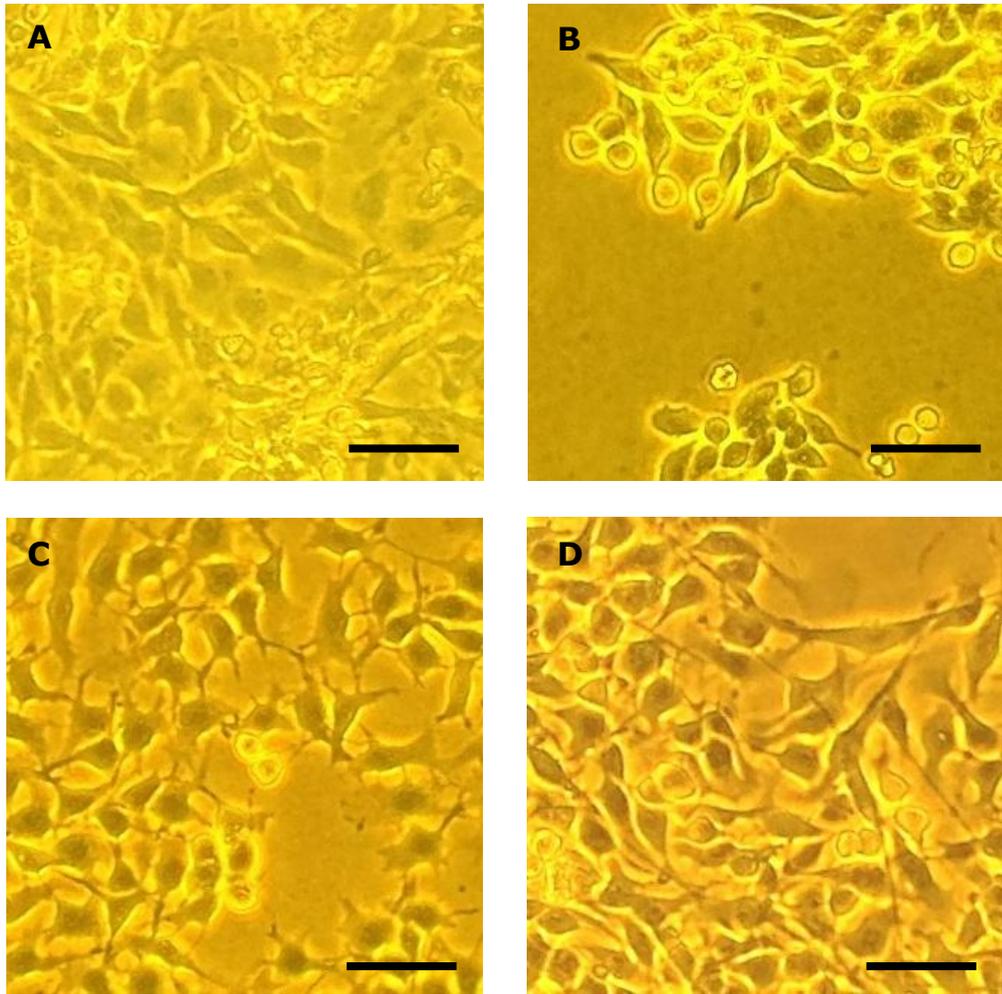


Figura 13: Morfología de diferentes líneas celulares de melanoma, murino (B16F10) y humano (BE, RQ y AK), crecidas *in vitro* y observadas al microscopio de luz con contraste de fase. Las células fueron crecidas en medio RPMI, con 10% de SFB, 1% de aminoácidos no esenciales y 1% de antibióticos penicilina y estreptomina. **A)** Línea de melanoma murino B16F10; **B)** línea de melanoma humano BE; **C)** línea de melanoma humano RQ y **D)** línea de melanoma humano AK. La barra representa 20 μm .

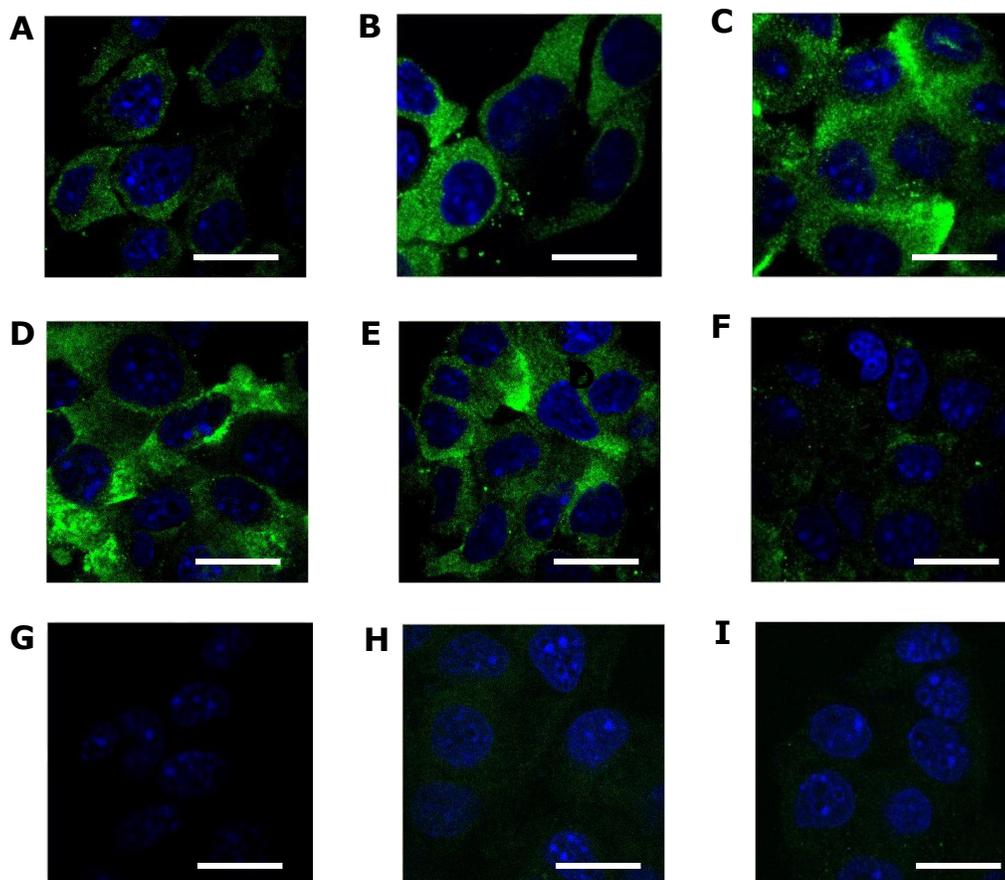


Figura 14: IFI de células de la línea de melanoma murino B16F10, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. Las células B16F10 fueron fijadas con paraformaldehído, incubadas con un pool de sueros de la respuesta secundaria de 3 animales a dilución 1:50 y reveladas con el conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A)** CCH-P10; **B)** FLH-P10; **C)** KLH-P10; **D)** CCH-S266; **E)** FLH-S266 y **F)** KLH-S266, en 100 μ L de PBS y AddaVax 1:1 en volumen. Además se realizaron controles **G)** suero de cabra anti-IgG de ratón unido a FITc (control negativo); **H)** anticuerpo 11H3 anti-GD2 (1:50) y **I)** anticuerpo 2Q59 anti-GD2 (1:100). La barra representa 10 μ m.

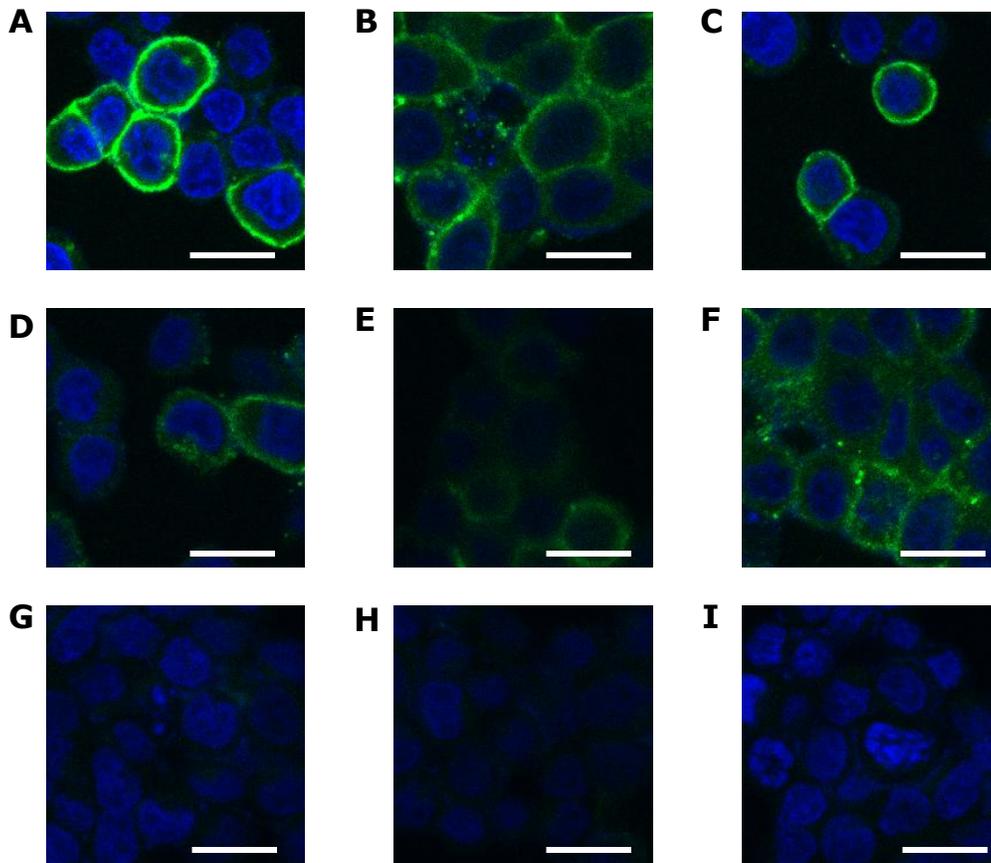


Figura 15: IFI de células de la línea BE, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. Las células BE fueron fijadas con paraformaldehído, incubadas con un pool de sueros de la respuesta secundaria de 3 animales a dilución 1:50 y reveladas con el conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A)** CCH-P10; **B)** FLH-P10; **C)** KLH-P10; **D)** CCH-S266; **E)** FLH-S266 y **F)** KLH-S266, en 100 μ L de PBS y AddaVax 1:1 en volumen. Además se realizaron controles **G)** suero de cabra anti-IgG de ratón unido a FITc (control negativo); **H)** anticuerpo 11H3 anti-GD2 (1:50) y **I)** anticuerpo 2Q59 anti-GD2 (1:100).

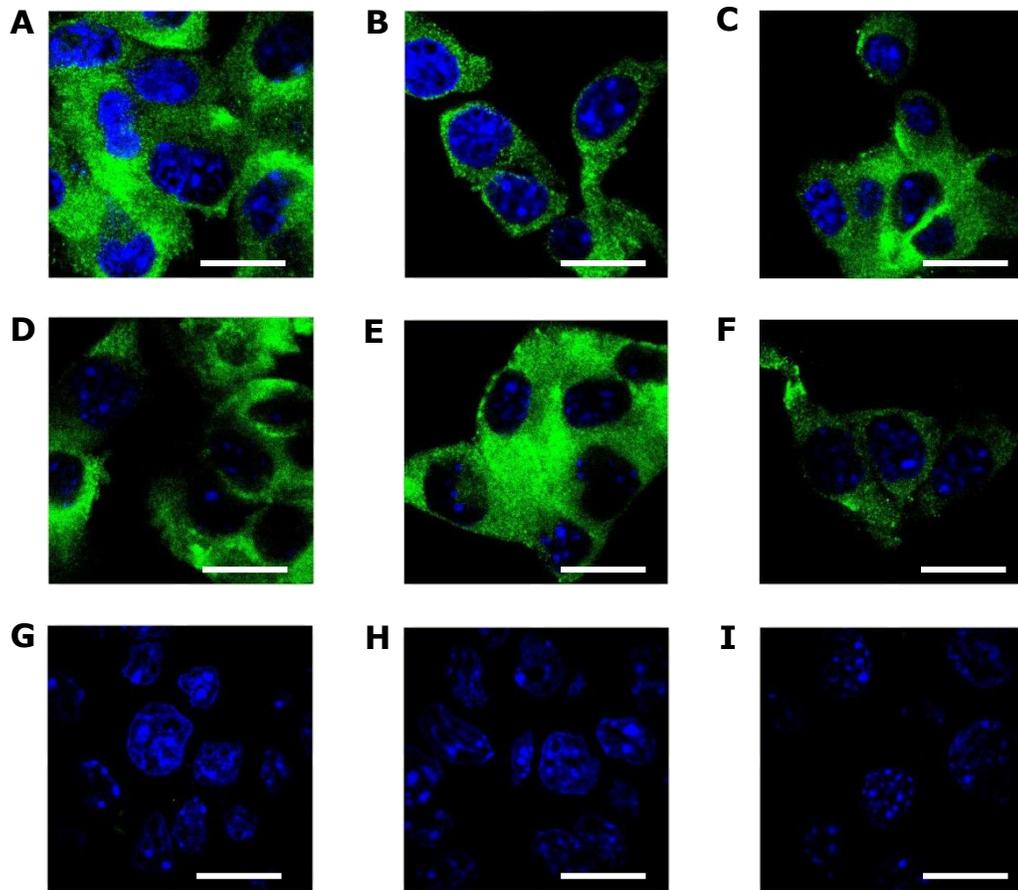


Figura 16: IFI de células de la línea RQ, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. Las células RQ fueron fijadas con paraformaldehído, incubadas con un pool de sueros de la respuesta secundaria de 3 animales a dilución 1:50 y reveladas con el conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A)** CCH-P10; **B)** FLH-P10; **C)** KLH-P10; **D)** CCH-S266; **E)** FLH-S266 y **F)** KLH-S266, en 100 μ L de PBS y AddaVax 1:1 en volumen. Además se realizaron controles **G)** suero de cabra anti-IgG de ratón unido a FITc (control negativo); **H)** anticuerpo 11H3 anti-GD2 (1:50) y **I)** anticuerpo 2Q59 anti-GD2 (1:100).

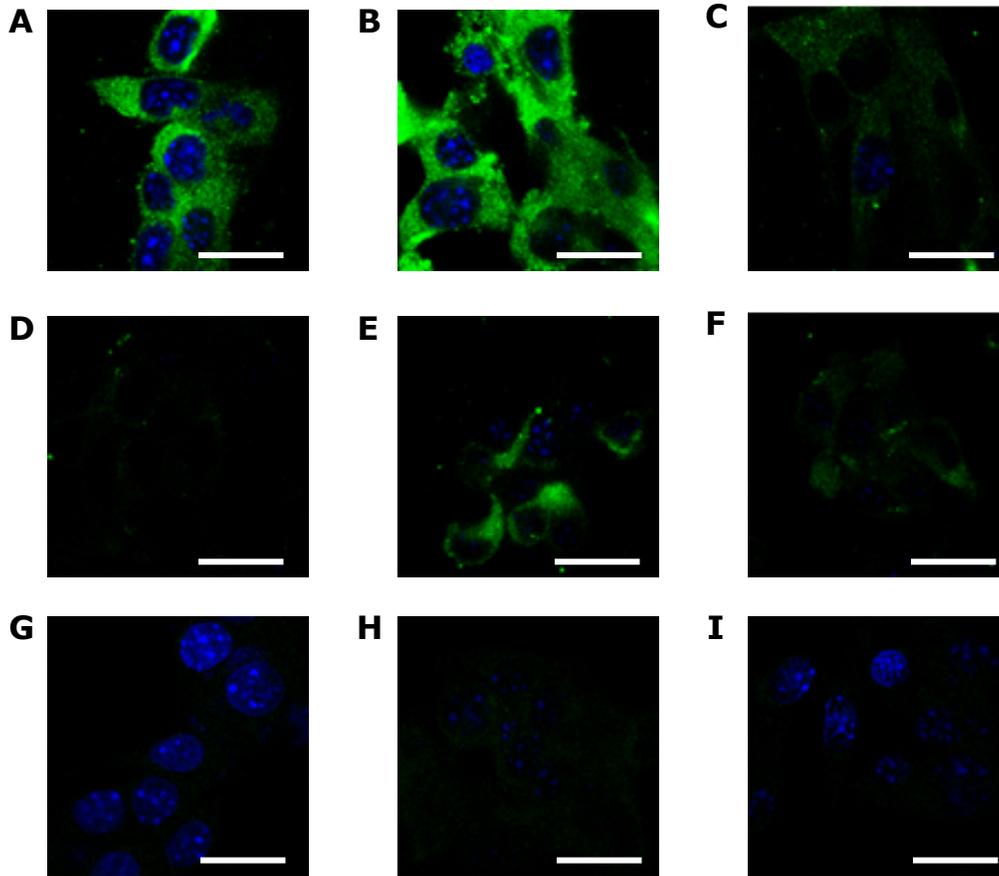


Figura 17: IFI de células de la línea AK, de melanoma humano, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 y a S266. Las células AK fueron fijadas con paraformaldehído, incubadas con un pool de sueros de la respuesta secundaria de 3 animales a dilución 1:50 y reveladas con el conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A)** CCH-P10; **B)** FLH-P10; **C)** KLH-P10; **D)** CCH-S266; **E)** FLH-S266 y **F)** KLH-S266, en 100 μ L de PBS y AddaVax 1:1 en volumen. Además se realizaron controles **G)** suero de cabra anti-IgG de ratón unido a FITc (control negativo); **H)** anticuerpo 11H3 anti-GD2 (1:50) y **I)** anticuerpo 2Q59 anti-GD2 (1:100).

5.3. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA INDUCIDA POR LOS CONJUGADOS HEMOCIANINA-PÉPTIDO CONTRA EL TUMOR DE MELANOMA MURINO B16F10

El bioensayo realizado para evaluar la respuesta inmune protectora inducida por la inmunización de los animales de experimentación con los conjugados hemocianina-péptido, contra el tumor de melanoma murino B16F10, tuvo una duración de tres meses. En la Figura 9 se muestra un esquema de las etapas con los procedimientos realizados en este período, durante el cual se observó un comportamiento normal de los ratones en estudio. Asimismo, no se observaron efectos tóxicos colaterales bajo ninguna de las terapias investigadas, vale decir CCH, FLH, KLH, CCH-P10, FLH-P10, CCLH-S266, FLH-S266 y KLH-S266 en PBS y conteniendo el adyuvante AddaVax a razón 1:1 en volumen.

La respuesta inmune protectora contra el melanoma murino B16F10 se evaluó de acuerdo a la supervivencia, la incidencia tumoral, el crecimiento tumoral y la incidencia de metástasis, desarrollada en los ratones en estudio tras ser desafiados con las células cancerígenas. En la Figura 18 se muestra la supervivencia de los animales a lo largo del bioensayo, graficadas según cada grupo de estudio, para una mejor comprensión. Así, en la Figura 18A se presentan los resultados de los 3 grupos controles. Debido a la intensidad de la inflamación y al acelerado crecimiento tumoral visto con el tratamiento de AddaVax, que provocó la muerte de un ratón al día 19 del bioensayo, se decidió sacrificar a los otros dos ratones que se encontraban en condiciones similares el día 22 del bioensayo.

Se consideró relevante evaluar la respuesta inmune celular inducida por los diferentes tratamientos, en estudios posteriores a la tesis, respecto a la infiltración de linfocitos T citotóxicos ($CD8^+$) y ayudadores ($CD4^+$), así como de células NK, entre otros, en el tumor de melanoma desarrollado en los ratones. Con este propósito, el día 29 del bioensayo se sacrificó a los ratones que portaban tumor, se examinó la presencia de metástasis en el bazo, hígado y pulmones⁵⁹ y, posteriormente, se colectaron y fijaron los tumores y los órganos metastásicos. Con el mismo objeto, el día 33 se sacrificó a los ratones en los que se había detectado incidencia tumoral el día previo. Así, la Figura 18 no es representativa de la supervivencia de los ratones por efecto del desafío y la terapia, dado que las muertes fueron inducidas casi en su totalidad.

En la sección A.5 de Anexo, se resumen el tipo de eutanasia, las características del tumor y la ocurrencia de metástasis. Cabe destacar que se encontró metástasis en algunos ratones control (tratados con AddaVax y PBS) y en algunos ratones tratados con CCH, CCH-P10, CCH-S266 y KLH-P10.

Los resultados de la incidencia tumoral de melanoma B16F10 en los ratones C57BL/6, a lo largo del tiempo, se muestran en la Figura 19. Se observa que en el día 30 del bioensayo, la incidencia tumoral alcanzó un máximo del 80% de animales con tumor en los grupos controles *sham*, AddaVax y PBS. De los ratones tratados con CCH (Figura 19B) el grupo que recibió CCH-P10 presentó una incidencia tumoral con tendencia similar a los controles, en cambio CCH no acoplada y conjugada al péptido S266 presentaron una incidencia de un 60%.

Por otro lado, los grupos de ratones tratados con FLH y KLH resultaron con una incidencia tumoral inferior, al día 29 del bioensayo, a los grupos de control negativo (Figura 19C-D), siendo de un 20% para cada hemocianina no conjugada, de un 40% para FLH-P10 y de un 20% para FLH-S266 y KLH-P10. Ningún animal tratado con KLH-S266 presentó tumor. De estos resultados es posible inferir que con FLH se obtiene un efecto antitumoral positivo al haber una menor incidencia tumoral que en los controles, similar a lo que ocurre con KLH, usada como control positivo, acoplada o no al péptido mimético del gangliósido GD2, o al péptido control S266.

El crecimiento del tumor de melanoma fue evaluado en aquellos ratones que desarrollaron tumor hasta el día 29 del bioensayo, previo al sacrificio de los ratones; los resultados se ilustran en la Figura 20. En el gráfico A, se observa que, tal como fue mencionado, el grupo control tratado solo con AddaVax tuvo una velocidad de crecimiento significativamente mayor ($p < 0,001$) a la que presentaron los animales de los grupos *sham* y PBS. Por otra parte, los animales tratados con CCH conjugada a los péptidos P10 y S266 presentaron una velocidad de crecimiento tumoral similar a la de los controles *sham* y PBS, en contraste con el grupo tratado con CCH no acoplada (Figura 20B), cuya velocidad de crecimiento tumoral fue similar al control positivo con KLH-P10 (Figura 20D). Lo mismo se observó con los grupos tratados con FLH, FLH-P10 y FLH-S266 (Figura 20C), donde la velocidad de crecimiento del tumor fue significativamente menor respecto a los controles ($p < 0,01$).

Finalmente, los ratones C57BL/6 que no presentaron tumor a los 29 días, fueron desafiados nuevamente el día 60 con células B16F10, inoculadas sc (ver sobrevida en Figura 18). Los resultados de la incidencia tumoral de este segundo desafío se muestran en la Figura 21. Se observa que en los controles (*sham*, AddaVax y PBS) todos los animales desarrollaron tumor, al igual que el grupo CCH-P10. FLH, FLH-P10 y KLH, que habían mostrado una baja incidencia tumoral tras el primer desafío, alcanzaron una incidencia tumoral del 80% (en el caso de FLH-P10 del 60%), a diferencia de los grupos CCH, FLH-S266 y KLH-P10, en que ninguno de los ratones desarrollaron el tumor. De este modo, y como se ve en la Figura 21, las terapias de CCH, FLH-S266, KLH y KLH-P10 mostraron un efecto anti-tumoral prolongado en el tiempo sobre la incidencia de melanoma B16F10. Esto sugiere la

generación de células inmunes de memoria contra el tumor y la consecuente inducción de la respuesta celular contra epítomos en las células de melanoma que presentan reacción cruzada con epítomos presentes en KLH y FLH, reconocidos por los anticuerpos específicos contra cada hemocianina.

Cabe destacar que KLH-S266 mostró un significativo efecto anti-tumoral, puesto que luego de un segundo desafío, ninguno de los ratones que recibieron dicho conjugado como terapia presentaron tumor en el periodo evaluado, apoyando fuertemente el carácter inmunomodulador *per se* de esta hemocianina frente a este tipo de tumor.

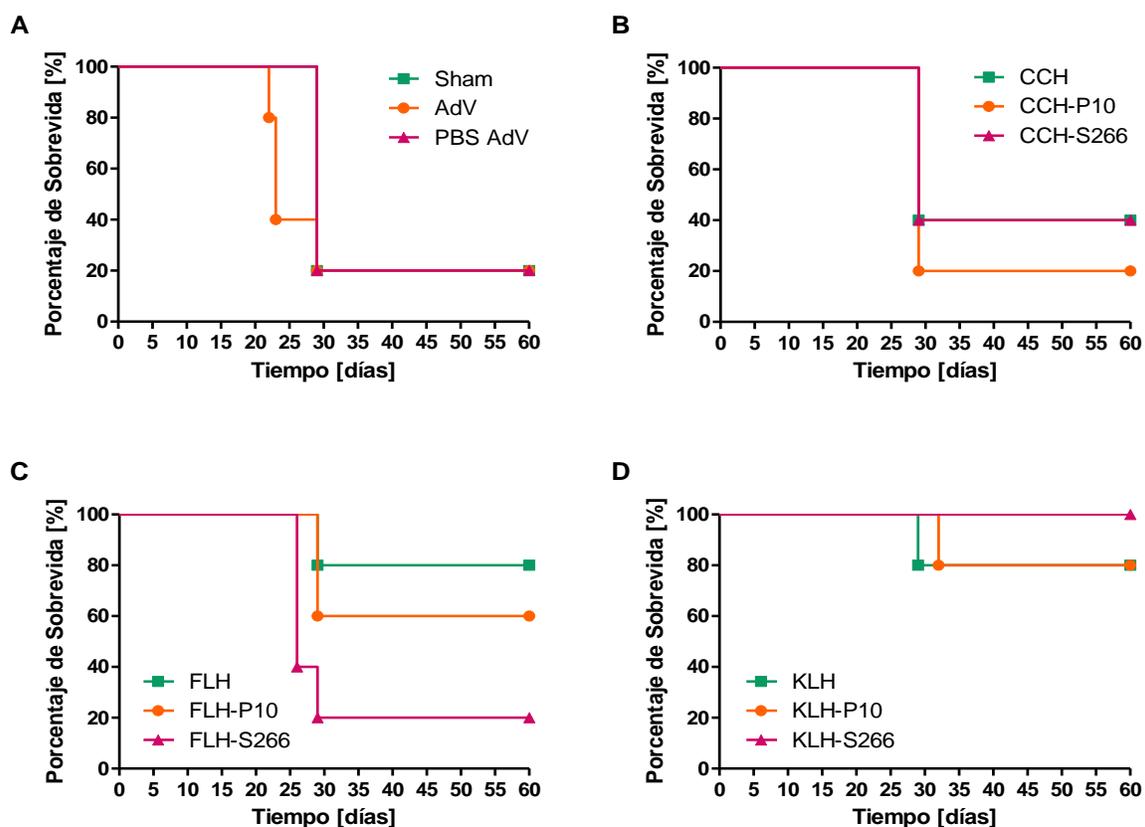


Figura 18: Supervivencia de ratones C57BL7/6 desafiados con melanoma murino B16F10 y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266. Se utilizaron 5 ratones C57BL/6 por grupo, los que fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10 el día 0. Los animales fueron tratados terapéuticamente con 50 μg de hemocianina o conjugado, en 100 μL de PBS y AddaVax 1:1 en volumen, mediante inyecciones sc los días 1, 8 y 15, habiendo sido sensibilizados previo a la inoculación del tumor. **A)** Supervivencia de ratones control de los grupos *sham*, PBS (más AddaVax 1:1 en volumen) y AddaVax. **B)** Supervivencia de ratones tratados con CCH, CCH-P10 y CCH-S266. **C)** Supervivencia de ratones tratados con FLH, FLH-P10 y FLH-S266. **D)** Supervivencia de ratones tratados con KLH, KLH-P10 y KLH-S266. Ver razón de muerte en sección A.5 de Anexo.

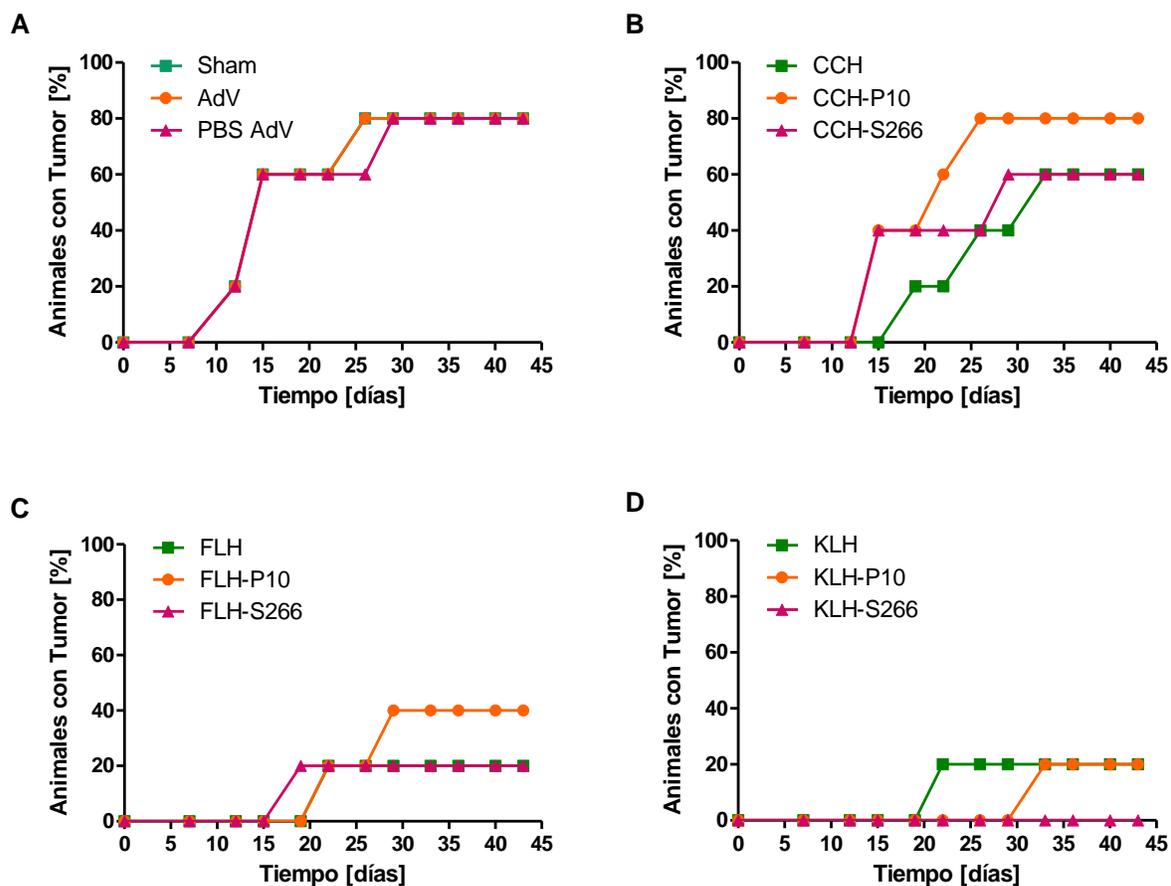


Figura 19: Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en la incidencia tumoral del melanoma murino B16F10. Se utilizaron 5 ratones C57BL/6 por grupo, los que fueron desafiados sc con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10 el día 0. Los animales fueron tratados terapéuticamente con 50 μg de hemocianina o conjugado, en 100 μL de PBS y AddaVax 1:1 en volumen, mediante inyecciones sc los días 1, 8 y 15, habiendo sido sensibilizados previo a la inoculación del tumor. **A)** Incidencia de melanoma en ratones control de los grupos *sham*, PBS (más AddaVax 1:1 en volumen) y AddaVax. **B)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con CCH, CCH-P10 y CCH-S266. **C)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con FLH, FLH-P10 y FLH-S266. **D)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con KLH, KLH-P10 y KLH-S266.

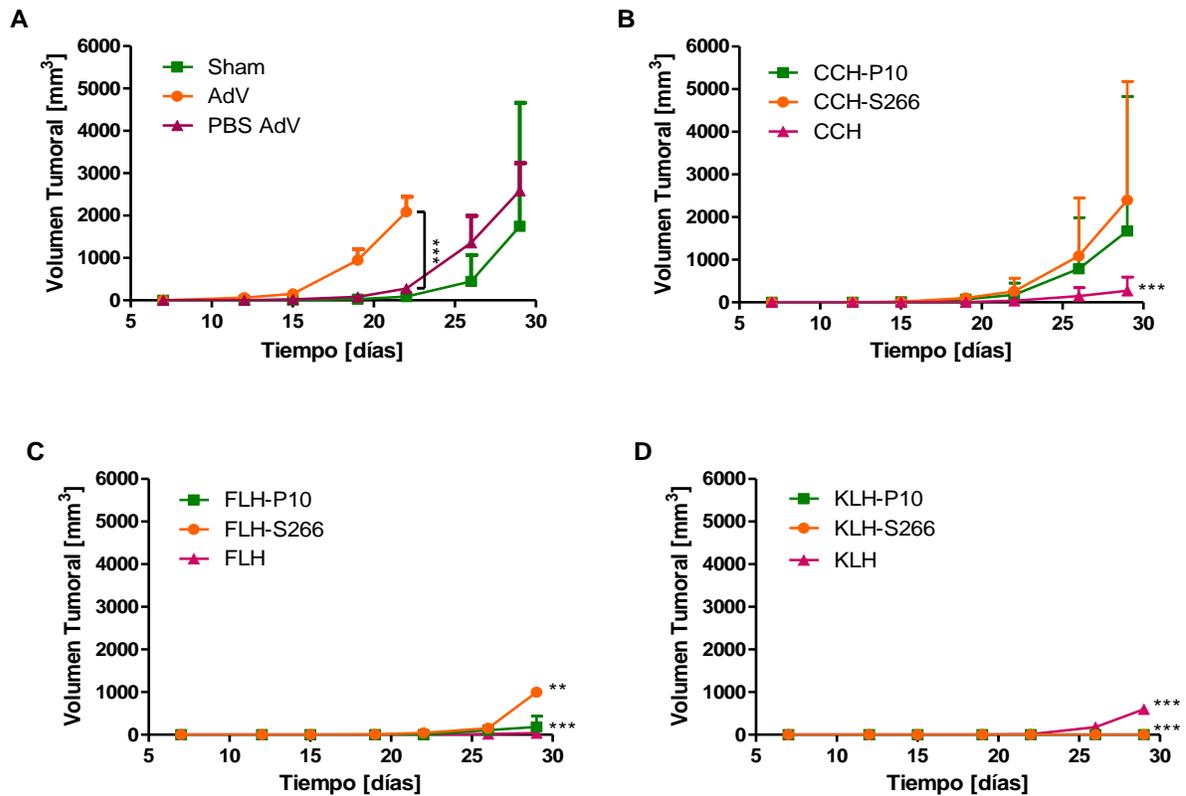


Figura 20: Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en el crecimiento tumoral del melanoma murino B16F10. Se utilizaron 5 ratones C57BL/6 por grupo, los que fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10 el día 0. Los animales fueron tratados terapéuticamente con 50 μg de hemocianina o conjugado, en 100 μL de PBS y AddaVax 1:1 en volumen, mediante inyecciones sc los días 1, 8 y 15, habiendo sido sensibilizados previo a la inoculación del tumor. **A)** Crecimiento de melanoma en ratones control de los grupos *sham*, PBS (más AddaVax 1:1 en volumen) y AddaVax ($***p < 0,001$ versus *sham* y PBS AddaVax). **B)** Crecimiento de melanoma en ratones tratados con CCH ($**p < 0,01$ versus PBS AddaVax), CCH-P10 y CCH-S266. **C)** Crecimiento de melanoma en ratones tratados con FLH, FLH-P10 (ambos $***p < 0,001$ versus PBS AddaVax) y FLH-S266 ($**p < 0,01$ versus PBS AddaVax). **D)** Crecimiento de melanoma en ratones tratados con KLH, KLH-P10 y KLH-S266 (todos $***p < 0,001$ versus PBS AddaVax).

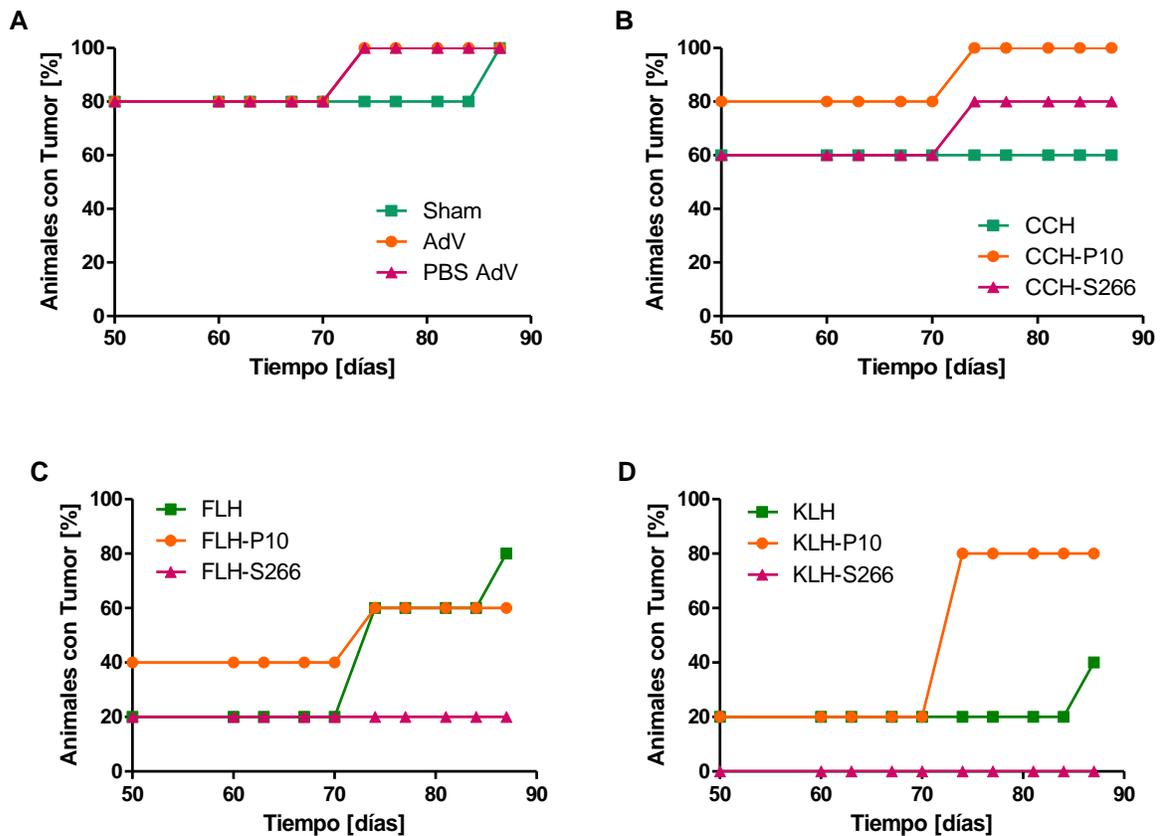


Figura 21: Efecto de CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados al péptido P10 y a S266, en la incidencia tumoral del melanoma murino B16F10, tras un segundo desafío. Se utilizaron los ratones C57BL/6 que sobrevivieron sin tumor del primer desafío y terapia, los que fueron desafiados nuevamente con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10 el día 60 y que desarrollaron el tumor antes del día 87 del bioensayo. Los animales habían sido tratados terapéuticamente con 50 μg de hemocianina o conjugado, en 100 μL de PBS y AddaVax 1:1 en volumen, mediante una sensibilización previa a la inoculación del melanoma e inyecciones sc los días 1, 8 y 15 tras el primer desafío. **A)** Incidencia de melanoma en ratones control de los grupos *sham*, PBS (más AddaVax 1:1 en volumen) y AddaVax. **B)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con CCH, CCH-P10 y CCH-S266. **C)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con FLH, FLH-P10 y FLH-S266 (solo sobrevivió un animal, y de los otros 4 solo 1 tuvo incidencia tumoral tras el primer desafío). **D)** Incidencia de melanoma en ratones tratados con KLH, KLH-P10 y KLH-S266.

5.3.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL CONTRA HEMOCIANINAS Y PÉPTIDOS

En los animales de experimentación utilizados en el bioensayo, se determinó mediante ELISA la presencia de anticuerpos contra las hemocianinas solubles, y también anticuerpos de clase IgG contra los péptidos P10 y S266. Como se muestra en la Figura 22A, el título de anticuerpos contra las hemocianinas fue menor en los sueros de los ratones tratados terapéuticamente con los conjugados hemocianina-P10 o hemocianina-S266, que en aquellos grupos tratados con CCH, FLH y KLH sin conjugar, en los cuales el título fue cercano a las 2.000 diluciones y no presentó diferencias significativas entre sí. Además, el título inducido por CCH, FLH y KLH conjugadas a P10 o a S266 fue inferior al obtenido en la fase de evaluación de la respuesta inmune humoral de los conjugados (Figura 11A), siendo que los ratones recibieron 2 dosis adicionales, dado el protocolo diseñado para la terapia anti-tumoral (Figura 9). Tal disminución también se observó con las hemocianinas no conjugadas, pero esta diferencia no fue mayor a una dilución en base 2, por lo que no se consideró significativa en términos de inmunogenicidad.

Como se aprecia en la Figura 22A, hubo diferencias significativas entre el título de anticuerpos anti-hemocianina inducido por CCH-P10 (1:650; $p < 0,05$) y CCH-S266 (1:1.000; $p < 0,05$) respecto al título inducido por CCH (1:2.300), y también entre FLH-P10 (1:1.300; $p < 0,05$) y FLH-S266 (1:1.200; $p < 0,01$) respecto a FLH (1:2.600). En cambio, no hubo diferencias significativas entre el título de anticuerpos inducido por KLH y sus conjugados a P10 y a S266, todos en torno a 1:1.800.

Por otro lado, el título de anticuerpos de clase IgG contra cada péptido resultó en torno a las 600 diluciones, para los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10 y para KLH-S266, según se aprecia en la Figura 22B-C. Así, el título aumentó en una dilución respecto a lo obtenido en los ensayos de inmunización previos (1:300, Figura 12), con una tendencia similar para CCH-S266 (1:340), aunque levemente inferior. Con el conjugado FLH-S266 se encontró un mayor título IgG contra S266, de 1:1.200. Aunque se encontró cierta reacción cruzada entre los péptidos, su nivel fue bajo (menor a 1:90) en comparación al título inducido por los péptidos respectivos.

Asimismo se realizó un análisis mediante IFI de los sueros de los animales de experimentación con las células de melanoma murino B16F10, cuyos resultados se muestran en la Figura 23. Se aprecia una reacción positiva en las células de los sueros de ratones tratados con CCH, FLH y KLH sin conjugar, así como también con dichas hemocianinas acopladas a los péptidos P10 y S266. Los grupos control *sham*, AddaVax y PBS no presentaron reacción positiva, dando cuenta de la especificidad de la reacción observada con los sueros de animales inmunizados con hemocianina

y hemocianina-péptido. Cualitativamente, para sueros diluidos a razón 1:50, se observó mayor intensidad de fluorescencia con los sueros de los animales tratados con FLH y KLH, conjugadas o no a los péptidos, en relación a lo observado con CCH.

Estos resultados fueron corroborados mediante un análisis adicional, utilizando citometría de flujo. Como se observa en la Figura 24, se encontraron resultados positivos (gráficos A, D, E, G, H e I) para los grupos CCH, FLH, FLH-P10, KLH, KLH-P10 y KLH-S266, respectivamente. Tales resultados corresponden a un pool de sueros de 5 ratones por grupo, diluidos a razón 1:25. Además, para la dilución 1:50 se tuvo reacción positiva con los sueros anti-FLH y anti-KLH-P10 (Anexo sección A.3). La definición de la población en términos de tamaño y granulosidad (FSC y SSC, del inglés *Forward Scatter* y *Side Scatter*, respectivamente) y los criterios para determinar el umbral de fluorescencia se muestran en la sección A.3 de Anexo. Se consideró reacción positiva a una población celular que presentó al menos un 60% de células con intensidad de fluorescencia.

Los resultados del análisis mediante ACF difieren de los obtenidos por IFI para CCH-P10, CCH-S266 y FLH-S266 (Figura 23B-C y F), en que los sueros sí presentaron reacción positiva, como se mencionó anteriormente. Sin embargo, y al igual que con IFI, los controles *sham*, AddaVax y PBS fueron negativos mediante citometría (Figura 24J-L), confirmándose de esta forma la especificidad de los casos positivos.

Del conjunto de resultados presentados anteriormente, se concluye de manera general que tanto CCH, FLH y KLH, como los conjugados FLH-P10, KLH-P10 y KLH-S266 inducen anticuerpos que reconocen epítomos presentes en la línea de melanoma murino B16F10.

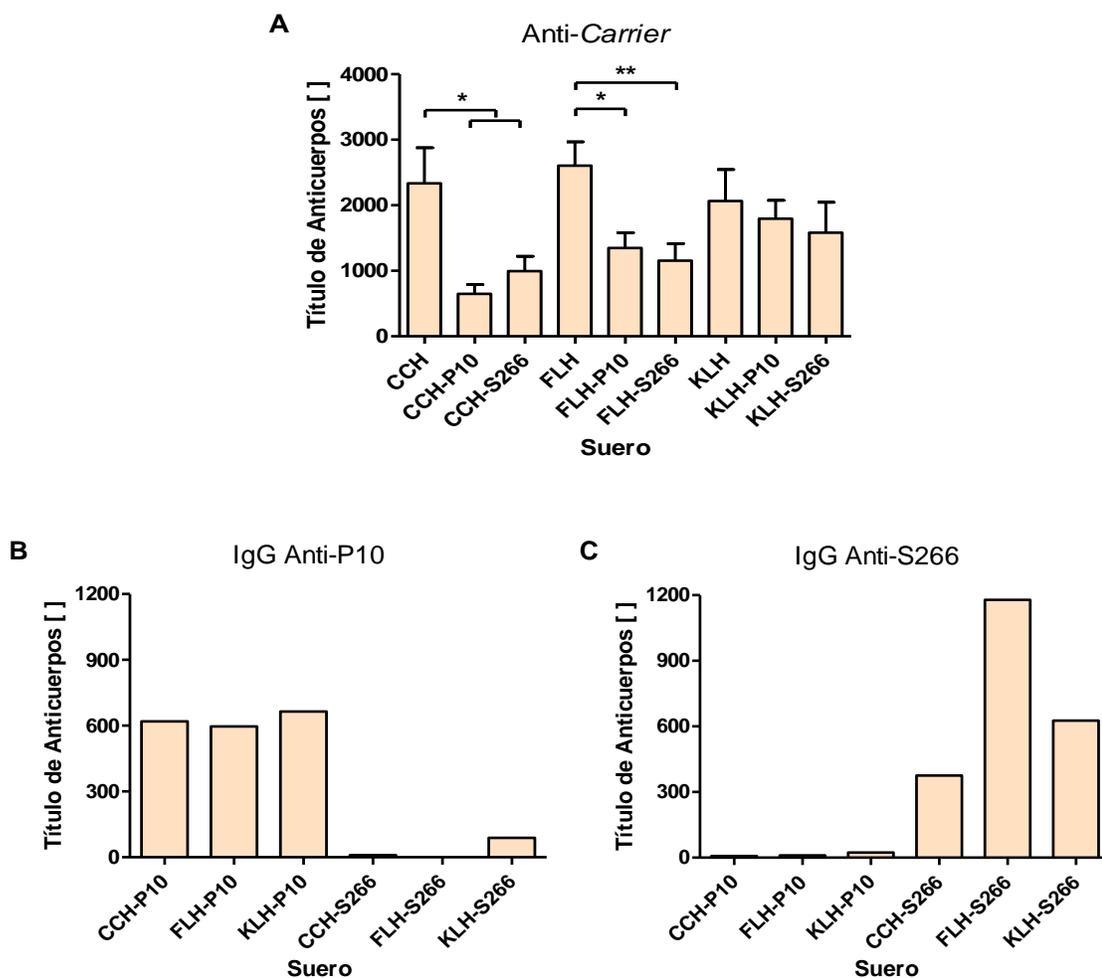


Figura 22: Título de anticuerpos séricos inducidos por CCH, FLH y KLH, y sus respectivos conjugados a los péptidos P10 y S266, en ratones C57BL/6 desafiados con melanoma murino de la línea B16F10. Se utilizaron 5 ratones C57BL/6 por grupo, los que fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10 y tratados terapéuticamente con 50 μg de cada hemocianina o su conjugado, en 100 μL de PBS y AddaVax 1:1 en volumen, mediante inyecciones sc los días 1, 8 y 15, habiendo sido sensibilizados previo a la inoculación del tumor. Se muestran los resultados del ELISA **A)** contra la hemocianina respectiva al tratamiento que recibió cada grupo de animales, como un promedio del título de anticuerpos detectado en cada ratón y el error estándar de la media asociado; $*p < 0,5$ para CCH versus CCH-P10 y CCH-S266 y para FLH versus FLH-P10; $**p < 0,01$ para FLH versus FLH-S266. Además, se muestra el título de anticuerpos específicos de la clase IgG en los grupos tratados con los conjugados, ya sea contra **B)** el péptido P10, o contra **C)** el péptido S266. En los últimos dos casos se realizó el ELISA con un pool de sueros de 5 ratones y los resultados corresponden a un solo experimento. El título se calculó como la dilución de suero correspondiente al punto de inflexión de la curva dosis-respuesta de la reacción de ELISA (véase Anexo, sección A.2). [] indica adimensionalidad.

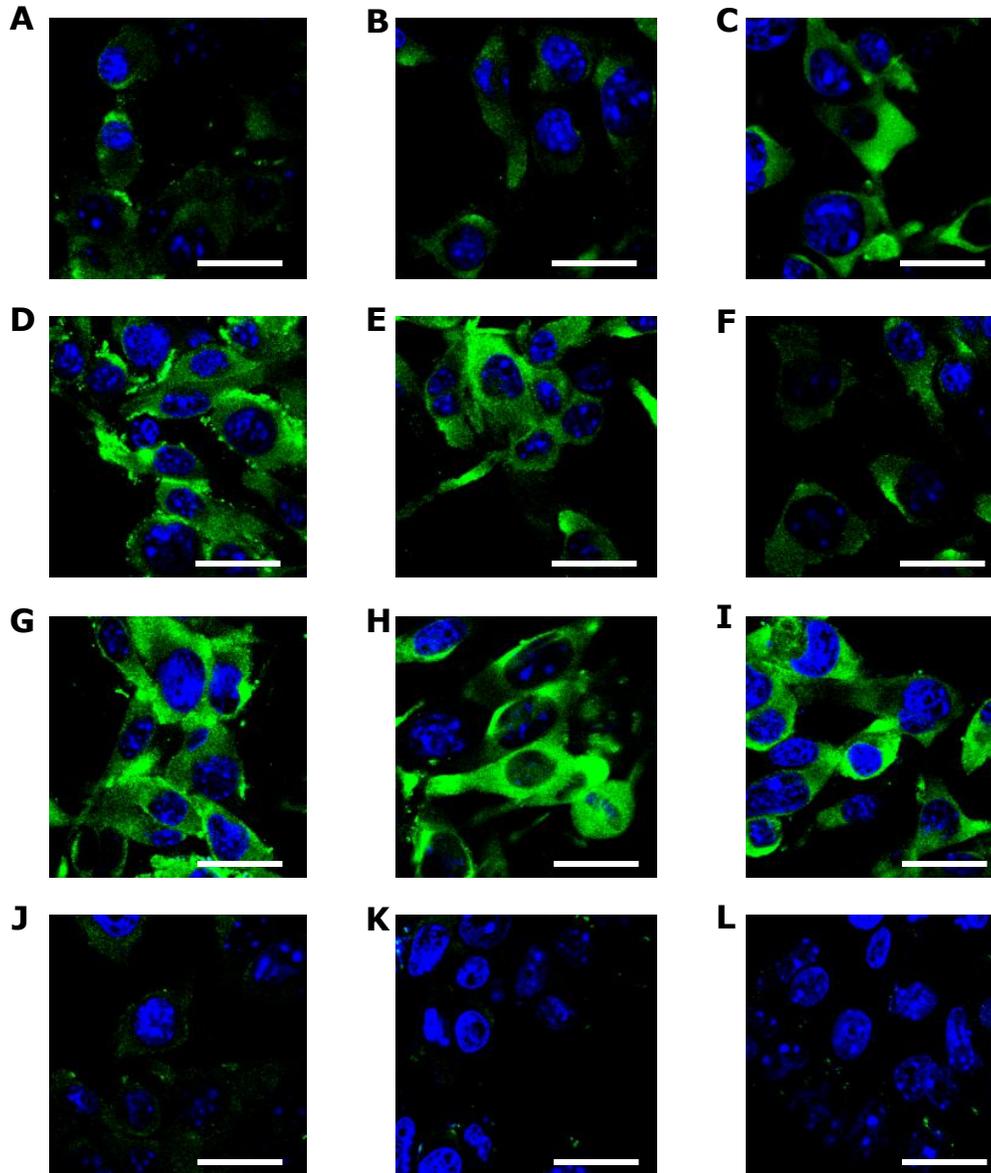


Figura 23: IFI de células de la línea B16F10, de melanoma murino, tratadas con los sueros de ratones C57BL/6, desafiados con B16F10 y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH o con los conjugados a P10 y a S266. Las células B16F10 fueron fijadas con paraformaldehído, incubadas con un pool de suero de 5 animales a dilución 1:50 y reveladas con el conjugado a fluoresceína anti-IgG (H+L) de ratón. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **A)** CCH; **B)** CCH-P10; **C)** CCH-S266; **D)** FLH; **E)** FLH-P10; **F)** FLH-S266; **G)** KLH; **H)** KLH-P10; **I)** KLH-S266; y los controles **J)** *sham*; **K)** AddaVax y **L)** PBS. La barra representa 10 μm .

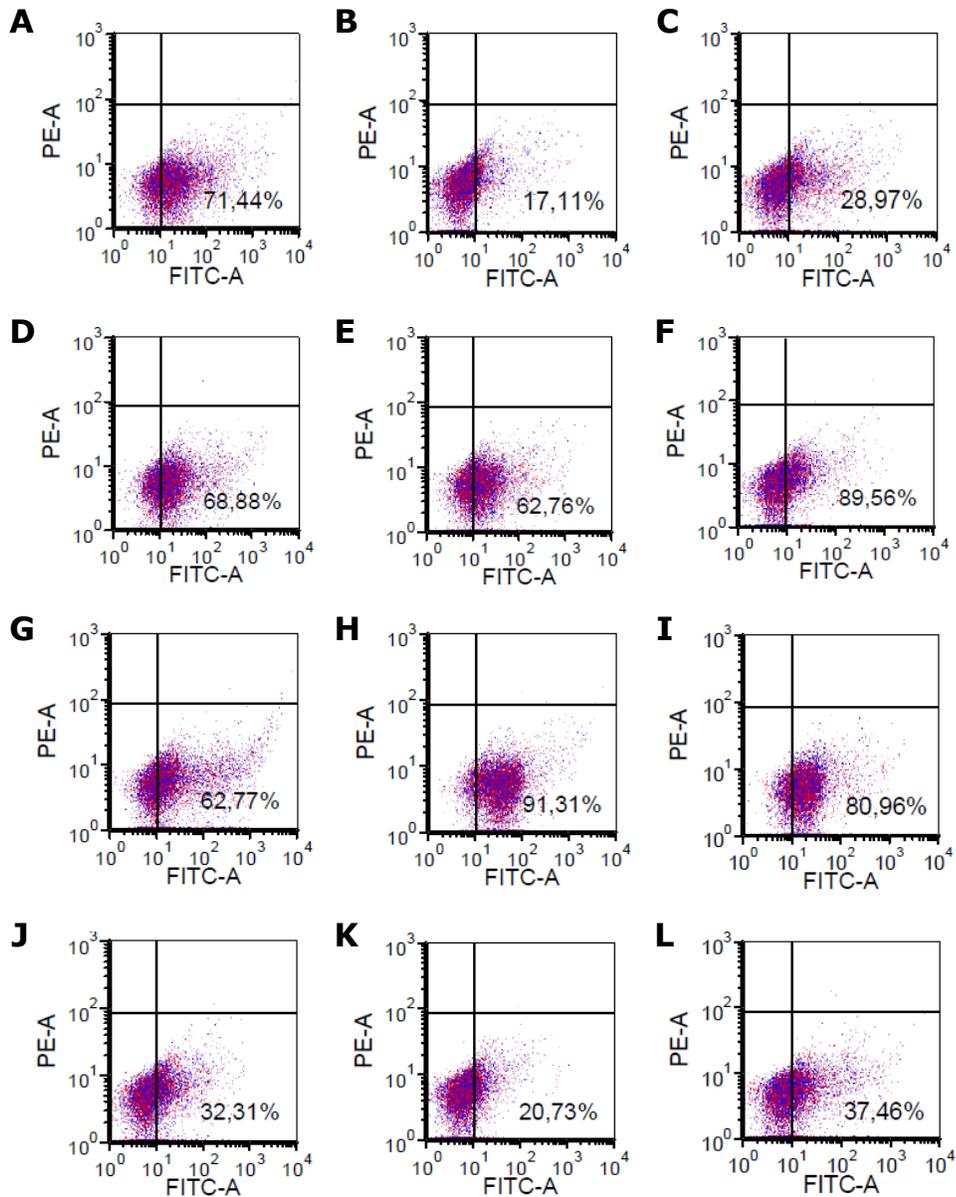


Figura 24: Reactividad mediante ACF de células de melanoma B16F10 tratadas con sueros de ratones C57BL/6 desafiados con el tumor y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH, conjugadas o no a P10 y S266. Las células fueron incubadas con un pool de sueros de 5 animales por grupo diluido 1:25 y luego fueron incubadas con un suero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FITC y, posteriormente, fijadas en paraformaldehído previo a su análisis en el citómetro de flujo. **A)** CCH; **B)** CCH-P10; **C)** CCH-S266; **D)** FLH; **E)** FLH-P10; **F)** FLH-S266; **G)** KLH; **H)** KLH-P10; **I)** KLH-S266; y los controles **J)** *sham*; **K)** AddaVax y **L)** PBS. Las imágenes corresponden a gráficos de *dots* de la intensidad del fluorocromo PE (R-ficoeritrina; rojo) versus FITC, para la población celular con características de tamaño y granulosidad definidas en Anexo, sección A.3. El porcentaje mostrado corresponde al porcentaje de células que presentaron intensidad de fluorescencia para FITC, respecto a los controles negativos (sección A.3 de Anexo).

5.3.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR CONTRA P10 Y S266

Los grupos de ratones C57BL/6 tratados con conjugados hemocianina-péptido fueron sometidos a una reacción de DTH, esto es inyectando sc el péptido correspondiente al conjugado de la terapia (P10 o S266 en PBS), en el cojinete del pie izquierdo. Así, la diferencia de espesor entre el pie izquierdo y el derecho (no inyectado) fue medida al tiempo 0, 24, 48 y 72 horas tras la inyección. Los resultados se muestran en la Figura 25, donde se observa que entre las 24 y 48 horas post-inyección los grupos CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266 presentaron un pick de hinchazón del pie, en concordancia a resultados previos obtenidos con KLH, pero en que la reacción de DTH se realizó en la oreja de los animales⁷⁷. Como control negativo se utilizó un ratón del grupo PBS al que se le inyectó PBS, y que no se presentó inflamación.

Los resultados fueron analizados estadísticamente con ANOVA de una vía y post-test de Bonferroni, y se encontró que de los grupos desafiados con P10 (Figura 25A), FLH-P10 presentó una reacción de DTH contra el péptido que es significativamente superior al control con PBS ($p < 0,05$), a las 24 horas post-inyección. Además, a las 24 horas post-inyección, los animales de los grupos CCH-P10, FLH-P10 y KLH-P10 sufrieron una diferencia de espesor del pie significativamente mayor ($p < 0,01$) a la diferencia mostrada en el tiempo 0, lo que se repitió a las 48 horas en CCH-P10. Por otra parte, de los grupos desafiados con S266 (Figura 25B), KLH-S266 presentó una reacción de DTH significativamente superior al control con PBS ($p < 0,05$), a las 24 y 48 horas, mientras que en CCH-S266 y KLH-S266 se indujo un aumento significativo de espesor del pie ($p < 0,01$) a las 24 y 48 horas, en relación al tiempo 0.

El control con PBS permitió descartar que el cojinete del pie izquierdo presentó inflamación como resultado de la inyección de la jeringa y no del estímulo. Por tanto, de los resultados se infiere que se indujo una reacción de DTH tanto para P10 como para S266, como resultado de la inmunoestimulación que generan estos péptidos al estar acoplados a las hemocianinas de moluscos, siendo consistente con la presencia de anticuerpos IgG contra los péptidos.

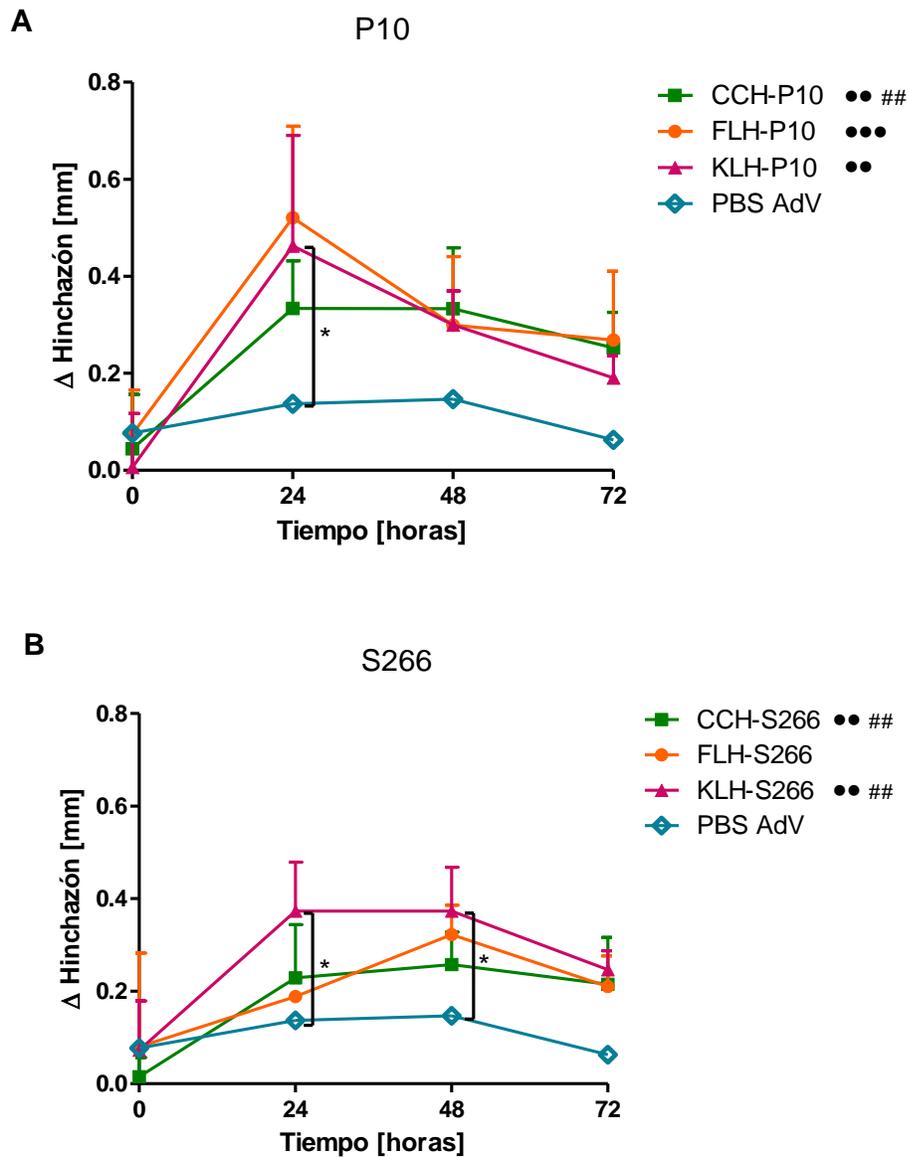


Figura 25: Reacción de DTH inducida con los péptidos antigénicos P10 y S266, en ratones C57BL/6 desafiados con células de melanoma B16F10 y tratados terapéuticamente con los conjugados hemocianina-péptido. Se inyectaron 75 μ g de péptido en 20 μ L de PBS sc en el cojinete del pie izquierdo de ratones tratados con conjugado y se midió el espesor del cojinete del pie izquierdo y derecho a las 0, 24, 48 y 72 hrs. Se utilizó un ratón del grupo PBS como control negativo. **(A)** DTH inducida por P10 en grupos tratados con conjugados a P10. **(B)** DTH inducida por S266 en grupos tratados con conjugados a S266. Se evaluó si los resultados presentaban un aumento significativo ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$) respecto al control con PBS y respecto al tiempo 0 para cada curva, ya sea a las 24 (\bullet) o 48 ($\#$) horas post inyección respectivamente. \bullet y $\#$ se muestran en la leyenda.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La inmunoterapia contra el cáncer, y en particular contra el melanoma maligno, ha sido desarrollada e investigada bajo distintas estrategias, con el objeto de lograr una inmunoestimulación en el paciente que genere una respuesta protectora humoral y celular contra el tumor^{2,3,11}. En varios de estos estudios, las hemocianinas de moluscos han resultado claves para generar la respuesta inmune deseada, como por ejemplo al ser usadas como adyuvante en vacunas de células dendríticas cargadas con lisados del tumor de melanoma, para potenciar la activación de linfocitos T CD8⁺ específicos contra el tumor¹². Por esta razón, se han analizado diversas propiedades de CCH y FLH, tanto estructurales como inmunogénicas, frente a la KLH, hemocianina modelo que actualmente se utiliza para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas a nivel mundial¹⁶. En este marco, el presente trabajo consistió en el desarrollo de conjugados terapéuticos contra el melanoma maligno, compuestos por hemocianinas de moluscos del litoral chileno y el péptido P10 mimético de GD2, con el objetivo general de evaluar las propiedades de CCH y FLH como *carrier* de AATs y, por ende, su efecto anti-tumoral contra el melanoma murino de la línea B16F10. Para ello se utilizó KLH acoplada al péptido P10, como control positivo, y acoplada al péptido S266, como control negativo, del mimetismo molecular de P10 con el gangliósido GD2¹¹.

6.1. PREPARACIÓN E INMUNOGENICIDAD DE LOS CONJUGADOS HEMOCIANINA-PÉPTIDO

El primer desafío experimental de la tesis, fue la preparación de los conjugados hemocianina-péptido. Uno de los principales problemas en su preparación, es que los agentes químicos clásicos usados para generar los conjugados modifican tanto a la proteína como al péptido, de manera tal que perjudican al propósito de dirigir la respuesta inmune específica contra el

péptido, como se quiere en el caso específico de esta tesis. Esto tiene el agravante adicional de generar complicaciones durante el proceso de estandarización y validación de los conjugados para asegurar la reproducibilidad en las pruebas de control de calidad. Con estas consideraciones, se decidió utilizar el entrecruzador sulfo-SMCC como agente acoplante de los péptidos, puesto que se une específicamente a los residuos de lisina de la proteína *carrier*, limitando la modificación de epítomos del conjugado, preservando la inmunogenicidad y evitando la aglomeración de moléculas y su subsecuente precipitado, fenómeno que habitualmente ocurre al utilizar glutaraldehído, que es el entrecruzador clásico para acoplar proteínas^{71,78}. Es así como CCH se destacó por su gran estabilidad durante las pruebas de activación con sulfo-SMCC, por sobre FLH y KLH. Por el contrario, FLH presentó problemas durante su paso por las columnas de desalación, dado que se ha demostrado que requiere ciertas condiciones de pH y temperatura para mantener su estructura cuaternaria y por ende, que no precipite en el medio de mantención, lo cual se evidenció al momento de equilibrar la columna con PBS y trabajar a 4°C (ver Tabla 5).

La explicación de tales diferencias entre las hemocianinas radica en sus peculiaridades estructurales. Por ejemplo, a diferencia de KLH, CCH no requiere de cationes divalentes adicionales en los tampones de mantención para estabilizar su estructura, lo cual hace a CCH sobresaliente respecto a KLH y FLH, dada su gran solubilidad²⁸. Estudios utilizando Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS), demuestran que CCH sería más hidrofóbica que KLH⁷⁹. Por otra parte, estudios usando espectroscopía de fluorescencia y colorimetría de barrido diferencial demuestran que el estado de oligomerización de CCH y la presencia de cobre-dioxígeno en su sitio activo son claves en la estabilización de su estructura⁸⁰. Además, siendo tan emparentadas filogenéticamente, FLH y KLH comparten numerosas características estructurales¹⁸, lo cual se corrobora con los resultados aquí mostrados.

Durante los protocolos de acoplamiento se obtuvo que un 45% del sulfo-SMCC agregado inicialmente se unió a CCH, mientras que un 85% lo hizo a FLH. Lo cual fue medido como la diferencia en la cantidad de cisteína que se une a dichas hemocianinas sin tratar con el entrecruzador (ver Figura 10). Consecuentemente, esto indicaría que al agregar P10 o el péptido control (S266), estos se unirían a las proteínas (al enlazarse al grupo maleimida presente en las hemocianinas activadas, a través del residuo de cisteína agregado a la secuencia de los péptidos) proporcionalmente. Esto es que FLH presentaría una mayor cantidad de péptido unido que CCH, de acuerdo a la Figura 10B.

En el caso de KLH, lamentablemente, no se pudo concluir nada al respecto, puesto que KLH sin tratar presentó una alta unión a cisteína, similar a la obtenida con KLH activada con maleimida (Figura 10B), sin una

diferencia que indicase la unión de cisteína a la maleimida del sulfo-SMCC presente en KLH activada. Este fenómeno lo atribuimos a que siendo KLH un producto adquirido comercialmente, no conocemos su formulación final, puesto que trae estabilizantes cuya naturaleza es confidencial. Sin embargo, al pasar KLH no activada por las columnas de desalación, para así eliminar los estabilizantes, se encontró una misma cantidad de cisteína unida a la proteína, por lo cual concluimos que los estabilizantes no estarían interfiriendo en la medición, a menos que estén unidos covalentemente. Asimismo, se midió la unión de cisteína a KLH y CCH preactivadas con maleimida y comercializadas por Thermo Scientific (Imject® Maleimide Activated mCKLH e Imject® Maleimide Activated Blue Carrier Protein, respectivamente), encontrándose resultados similares a los obtenidos durante esta tesis. Pensamos que sería necesario realizar esta determinación con KLH de otras fuentes, para descartar que el fenómeno observado sea solo de la KLH de Thermo o es una propiedad intrínseca de la hemocianina. Con lo anterior, se concluye que para la KLH, el test de Ellman no es un método de medición apropiado, y no es posible evaluar la activación de dicha proteína, a diferencia de cuando se utiliza CCH y FLH. Adicionalmente, dada la alta correlación de los datos de la curva de calibración, presentados en la Figura 10C y E, se infirió que el test de Ellman es un método robusto y los resultados son confiables.

Aun cuando los primeros conjugados producidos presentaron baja solubilidad, dada las características hidrofóbicas de los péptidos P10 y S266, se logró su acoplamiento, como lo demuestra la obtención de anticuerpos que reconocieron específicamente al péptido pegado a las placas de ELISA preactivadas con maleinimida (Figura 11C-D). Los conjugados hemocianina-péptido no presentaron reacción cruzada entre P10 y S266, y al evaluar la clase IgG, con anticuerpos específicos contra la cadena pesada de anticuerpos de dicha clase, tampoco presentaron reacción cruzada (Figura 11C-D y Figura 12). Esto demuestra que los conjugados generaron una respuesta inmune humoral adaptativa contra los péptidos, la cual es célula T-dependiente, y que es deseable para lograr una respuesta inmunológica potente contra el tumor, capaz de evitar la aparición de éste o erradicarlo^{19,61}. Por otra parte, y como era de esperar, las tres hemocianinas indujeron anticuerpos, sin diferencias significativas entre ellas. Con estos resultados, se concluyó que CCH, FLH y KLH inducen una respuesta inmune humoral muy similar al actuar como *carrier* de péptidos.

Un dato interesante surgió al comparar los niveles de anticuerpos obtenidos en este trabajo con los obtenidos por Arancibia et al.¹⁸, donde ratones C57BL/6 fueron inyectados ip con 200 µg de cada hemocianina en PBS. En estas condiciones, se encontraron títulos del orden de 1:1.000 tanto para CCH, como para KLH, con la excepción de FLH (1:10.000). En cambio, aquí se inyectaron 50 µg de cada proteína en 100 µL de PBS y con el adyuvante AddaVax 1:1 en volumen., condiciones en las cuales las tres

hemocianinas alcanzaron títulos en torno a 1:4.000 (Figura 11A). La disminución en el título de anticuerpos inducido por FLH estaría relacionada al hecho de que se inyectó un cuarto de la cantidad de antígeno inyectado por Arancibia et al.¹⁸, además de estar actuando como *carrier* de péptidos. Por otro lado, el factor determinante que explicaría el aumento en la respuesta humoral contra CCH y KLH sería el adyuvante AddaVax. La inmunoestimulación generalizada que induce el adyuvante también podría influir en las bajas diferencias entre los títulos para una u otra hemocianina⁸¹. Al igual que las hemocianinas, AddaVax promueve una respuesta inmune celular de tipo Th1, pero balanceada con Th2⁸¹⁻⁸³. Adicionalmente, promueve una respuesta inmune humoral robusta contra el antígeno, induciendo la producción de anticuerpos de clase IgG específicos⁸⁴, además de mejorar su título y avidéz⁸⁵. Así, AddaVax, potencia la inmunogenicidad de las proteínas y de ahí el interés actual de probar su eficacia en vacunas experimentales contra diferentes patógenos que afectan a humanos, tales como el virus de la influenza⁸⁶, y en vacunas terapéuticas para la enfermedad de Alzheimer⁸⁷.

Por otra parte, Arancibia et al.¹⁸ encontraron títulos mucho mayores contra el hapteno DNFB (2,4-dinitrofluorobenceno) con CCH, FLH y KLH como *carriers* (alrededor de 1:10.000, 1:1.000 y 1:1.000, respectivamente, en ratones C57BL/6 y de 1:1.000 con todos los conjugados en ratones BALB/c). Dicha molécula tiene una naturaleza química diferente de los péptidos, de hecho el procedimiento para acoplarlos es muy diferente. Por ello, no es esperable que tengan una inmunogenicidad similar, tanto por parte de las hemocianinas, así como del hapteno o péptido^{8,59}.

Un aspecto importante a considerar es que el suero de los ratones inmunizados con las diferentes hemocianinas no mostró reactividad con el gangliósido GD2 mediante un ensayo de ELISA, no obstante que KLH-P10 induce anticuerpos IgG específicos contra GD2, en contraste a KLH-S266, que no lo hace, según lo reportado por Wondimu et al.¹¹. Al respecto, GD2 puro ha mostrado ser inestable en reiterados ensayos de ELISA anti-GD2 con el anticuerpo monoclonal ch14.18, que es capaz de unirse a células que expresan dicho gangliósido, descartando su uso para este tipo de análisis⁸⁸.

Aun cuando no fue posible determinar la unión de los anticuerpos inducidos por los conjugados a GD2 puro, lo más relevante en este trabajo fue demostrar si había reactividad de los anticuerpos que fueron inducidos por los conjugados hemocianina-P10 con las células B16F10, ya que de lo contrario, la estrategia de usar conjugados miméticos del gangliósido no sustentaría la efectividad de la terapia inmunológica contra el tumor. Por otra parte, el mimetismo de P10 está ya descrito en literatura, indicando que los anticuerpos generados por P10 también son capaces de reconocer epítomos en otros gangliósidos y no solo en GD2, entre los que destacan GD1b, GD1a, GD3 y GM2⁵⁹. Además, se ha demostrado que los péptidos miméticos de

GD2, como P10^{11,59}, GRL y DGG⁸, inducen anticuerpos de clase IgG contra GD2 al estar conjugados a KLH, por lo tanto los anticuerpos inducidos por P10 acoplado a FLH por su similitud con KLH, y probablemente también con CCH, debieran ser capaces de unirse al gangliósido puro.

Considerando lo anterior, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta de los antisueros anti-hemocianina-péptido y células B16F10, encontrándose sorpresivamente resultados positivos con ambos tipos de conjugados (Figura 14). Este hallazgo sugirió fuertemente que dado que lo común en los conjugados eran las hemocianinas, esta reactividad tenía que ver con una reacción cruzada entre epítomos de dichas proteínas y epítomos presentes en la superficie de las células B16F10. Por la importancia de este hallazgo, se realizaron evaluaciones mediante IFI con líneas de melanoma humano (BE, RQ y AK), en las cuales se encontraron resultados similares (Figura 15, Figura 16 y Figura 17). Lo anterior no permite afirmar que los anticuerpos inducidos por los conjugados hemocianina-péptido se unen específicamente al GD2 expresado por las células. Sin embargo, esta reactividad se podría explicar porque los anticuerpos reconocen epítomos de carbohidratos en tales líneas celulares. Esto, dado que los conjugados hemocianina-S266 también reaccionaron con las líneas de melanoma mediante IFI, de modo que, como ya se ha señalado, los anticuerpos que son inducidos por las hemocianinas-S266 reconocen epítomos en las células tumorales, al igual que con los conjugados hemocianina-P10. Esta idea se sustenta en que las hemocianinas poseen una amplia variedad de glicosilaciones, algunas de las cuales pueden estar siendo compartidas con GD2 o con otros gangliósidos o glicanos presentes en la superficie de las líneas de melanoma analizadas. De hecho, ha sido descrito que KLH presenta el disacárido Gal-(β 1-3)-GalNAc, también denominado antígeno T o de Thomsen-Friedenreich^{89,90}, que se encuentra sobreexpresado en algunos tipos de cáncer⁹¹.

Lamentablemente, con los anticuerpos monoclonales comerciales anti-GD2 prácticamente no se detectó reacción contra las líneas de melanoma murino y humano mediante IFI. Esto no permitió confirmar la presencia de dicho gangliósido en las líneas celulares humanas, dado que dichos anticuerpos monoclonales fueron inducidos por GD2 purificado de masa cerebral bovina y podrían no presentar necesariamente los mismos epítomos conformacionales que adquiere la molécula al estar embebida en la membrana plasmática. En este respecto, se ha visto que un cambio en la porción hidrofóbica del gangliósido GD3 puede variar el ángulo u orientación de la cadena de azúcares⁶, de modo que la expresión antigénica del gangliósido en el melanoma difiere de su expresión en el cerebro⁹².

Adicionalmente, en la literatura del tema, se describe que la línea B16F10 expresa principalmente los gangliósidos GM3 y GM4²⁹, los cuales, al compartir ciertos grupos químicos con GD2, podrían ser igualmente

reconocidos por los anticuerpos inducidos por P10, o por el conjugado en cuestión. Sin embargo, esto no permite precisar que el reconocimiento de las células se deba únicamente al mimetismo de P10 con el gangliósido, lo que además es consistente con los resultados obtenidos por IFI con los antisueros de los ratones inmunizados anti-conjugados y las líneas de melanoma, tanto de ratón como humanas, empleadas en la tesis.

6.2. EFECTO ANTI-TUMORAL DE LOS CONJUGADOS HEMOCIANINA-PÉPTIDO CONTRA MELANOMA B16F10

Los resultados obtenidos en la evaluación de los conjugados hemocianina-péptido, sustentaron el paso siguiente de este trabajo que fue evaluar su comportamiento como "vacunas terapéuticas" para melanoma, en el modelo murino B16F10. En este estudio, los animales de experimentación recibieron una dosis de sensibilización con los conjugados hemocianina-péptido 14 días previos al desafío con las células B16F10, puesto que se ha mostrado que el efecto antitumoral inducido por CCH y KLH, no así el de FLH, es mediado por la respuesta adaptativa contra ellas para su efectividad antitumoral^{18,22}. Tanto la sensibilización como las 3 dosis terapéuticas, aplicadas los días 1, 8 y 15 tras la inoculación del melanoma, fueron realizadas subcutáneamente con 50 µg de conjugado, en 100 µL de PBS y 100 µL de adyuvante AddaVax. Dados los resultados anteriores, se esperaba encontrar un efecto positivo contra el melanoma por parte de los conjugados a P10, pero también, de los conjugados a S266. Además, dada la alta estimulación causada por el adyuvante se consideró necesario evaluar el efecto antitumoral de CCH, FLH y KLH no conjugadas, en presencia de AddaVax, usando PBS como vehículo de la preparación. Estos grupos, a su vez, permitieron realizar un control del efecto que tienen los conjugados, como producto del acoplamiento de los péptidos, respecto a la proteína sin acoplar y sin modificaciones. Asimismo, se consideró un control con AddaVax solo y otro con PBS.

Alrededor del día 12 después de haber inoculado las células de melanoma, aparecieron los primeros tumores en los grupos control, en CCH-P10 y en CCH-S266, consistente con trabajos anteriores con el mismo modelo celular¹⁸. No obstante, el número de ratones que presentaron incidencia tumoral no alcanzó el 100% en ninguno de los grupos evaluados, ver Figura 19. Así, la cantidad de células inyectadas es suficiente para que se arraigue el tumor o sea erradicado por mecanismos inmunológicos propios del animal, acercando el modelo a una evaluación de la terapia para prevenir la micrometástasis^{9,28}, lo cual podría no ser evidenciado luego de extirpar el tumor en los pacientes de melanoma de alto riesgo^{7,61}.

Al día 29 se observó que FLH ejerció un mejor efecto anti-tumoral sobre la incidencia de B16F10, tanto sola como conjugada a P10 y a S266, respecto al control positivo con KLH unida a P10, y a los controles negativos. Sin embargo, no se observó lo mismo con CCH sola o conjugada con los péptidos. Por otra parte, KLH sola también redujo la incidencia tumoral, y en el caso de KLH-S266, ningún ratón presentó tumor, contrario a lo reportado en el trabajo de Wondimu et al.¹¹, donde hubo un 72% de incidencia tumoral al día 25 tanto en ratones tratados con KLH-P10, como con KLH-S266 (Figura 6). De modo que KLH-P10 mostró una respuesta protectora contra el tumor de melanoma de la línea celular D142.34, que expresa GD2, no significativa respecto a KLH-S266.

Al analizar el crecimiento de los tumores de melanoma a lo largo del bioensayo se encontró que los ratones control que recibieron solo AddaVax, presentaron una velocidad de crecimiento del tumor significativamente mayor que los controles *sham* y PBS. Respecto a dichos controles y al control positivo con KLH-P10, los grupos de ratones tratados con CCH, FLH, FLH-P10, FLH-S266, KLH y KLH-S266 presentaron un efecto antitumoral al retardar la velocidad de crecimiento tumoral, de manera significativa respecto al control PBS. CCH-P10 y CCH-S266 no mostraron el mismo desempeño y tuvieron un efecto negativo, con una velocidad de crecimiento promedio similar a los controles y una elevada dispersión de los datos, al igual que el control *sham*. La alta dispersión de datos del control *sham* influyó en que la significancia estadística se evaluara respecto al control PBS.

El efecto inmune protector de FLH, FLH-P10, FLH-S266, KLH, KLH-P10 y KLH-S266, al disminuir la incidencia tumoral y retardar el crecimiento del tumor en los ratones, podría explicarse por mecanismos de citotoxicidad dependientes de anticuerpos¹⁹. Esta hipótesis radica en que los resultados son coherentes a la reactividad de los sueros con las células B16F10 mediante IFI y ACF. Por tanto, el estímulo dado durante la sensibilización y la terapia estaría induciendo anticuerpos que reconocen epítomos en las células de melanoma, haciendo efectiva la prevención del crecimiento de micrometástasis. De esta forma, también, la terapia podría ser efectiva sobre células tumorales circulantes, gracias a los anticuerpos generados^{7,28}.

Al evaluar los sueros de los ratones tratados terapéuticamente, tras ser desafiados con el tumor de melanoma, se vio que los conjugados indujeron títulos de anticuerpos inferiores a los obtenidos anteriormente contra las diferentes hemocianinas (Figura 22). Dado que los ratones recibieron 4 dosis a lo largo de la terapia, en lugar de las dos dosis recibidas durante el estudio de la respuesta inmune humoral contra los conjugados, se pensó que se encontrarían títulos más elevados de anticuerpos, tanto contra cada hemocianina como contra los péptidos. Sin embargo, los resultados podrían estar relacionados con el estrés causado por la terapia y el propio desafío con las células tumorales, así como también a una disminución de los anticuerpos

circulantes producto de la neutralización de los antígenos inyectados tan repetidamente. Es así que sería necesario a futuro modificar el protocolo terapéutico para ver si efectivamente se pueden alcanzar mejores títulos, que se manifiesten en un mejor resultado terapéutico contra el tumor.

Adicionalmente se evaluó la reacción de DTH ocasionada por la inyección de los péptidos P10 o S266 a los ratones desafiados con melanoma B16F10, previamente tratados con los conjugados hemocianina-péptido, y se usó el grupo PBS como control. Tal reacción resultó positiva para cada uno de los conjugados, dado que se logró un pick de inflamación dentro de las 24 y 48 horas tras la inyección (Figura 25), siendo mayor al control con PBS y con una cinética de inflamación característica de la reacción de DTH^{77,93}. La diferencia resultó significativa con FLH-P10 y KLH-S266. Sin embargo, con todos los conjugados se logró en promedio un pick de inflamación de a lo menos del doble de lo obtenido con PBS, de modo que se consideró que tanto FLH-P10 y KLH-S266, como CCH-P10, KLH-P10, CCH-S266 y FLH-S266 generaron una respuesta celular contra los péptidos, lo que se esperaba puesto que los conjugados promovieron anticuerpos específicos de la clase IgG contra los péptidos.

Se ha reportado que en pacientes con melanoma vacunados con células dendríticas pulsadas con péptidos de melanoma, al inyectarles el péptido antigénico y evaluar la respuesta de DTH, se produce un aumento de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, además de otras leucocitos positivos para IL-2, IL-4, Foxp3, CD1d e IFN- γ , con lo cual la presentación antigénica conduce a una respuesta inmune anti-tumoral⁹⁴. Al respecto, ha sido demostrado que la reacción de DTH para KLH-P10 depende de linfocitos T CD4⁺¹¹. Así, la DTH estimulada por P10 y S266 vía su acoplamiento a CCH y FLH, involucraría a linfocitos T CD4⁺ y también a linfocitos TCD8⁺, considerando que indujeron anticuerpos que se unen a las células de melanoma, lo cual esperamos confirmar próximamente mediante un análisis inmunohistoquímico de las células inmunes infiltradas en los tumores. Es así que se ha visto que péptidos miméticos de epítomos tumorales generan citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y citotoxicidad dependiente de complemento²⁰, como se puede ver en la Figura 1.

Aun cuando los conjugados indujeron una respuesta humoral y celular específica contra el péptido P10, mimético de GD2, sin variaciones respecto a la hemocianina *carrier*, el efecto antitumoral que fue inducido en los ratones contra la línea de melanoma B16F10, al ser tratados con FLH, FLH-P10, FLH-S266, KLH, KLH-P10 y KLH-S266, estaría ligado a la inmunoestimulación causada por las hemocianinas de moluscos, en particular por FLH y KLH, y la reacción cruzada de los anticuerpos con antígenos de superficie presentes en la línea tumoral. Esto estaría principalmente correlacionado con epítomos de naturaleza oligosacárida presentes en tales proteínas. Es así que, como se señaló anteriormente, se ha descrito que KLH y FLH poseen glicosilaciones

comunes entre sí, entre otras características estructurales, y tienen reacción cruzada con el antígeno T, presente en células cancerígenas de vejiga y otros cánceres epiteliales^{16,89}, lo cual no ocurre con CCH^{18,28}. Además, se ha visto que FLH induce un efecto anti-tumoral contra el melanoma B16F10, que estaría mediado por las glicosilaciones de la proteína¹⁸. Tal efecto se ha atribuido a la inmunoestimulación no específica de las hemocianinas de moluscos, puesto que KLH y CCH han generado un efecto antitumoral contra el cáncer superficial de vejiga^{15,16,21,22}.

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo avalan las conclusiones anteriormente mencionadas, dado que los sueros de ratones tratados con CCH, FLH y KLH sin conjugarse mostraron una reacción positiva con las células de melanoma B16F10, respecto a la respuesta inmune *per se* de los ratones al ser desafiados con el tumor (sueros de animales del grupo control *sham*), como se aprecia en la Figura 23 y en la Figura 24.

Tras un segundo desafío con células B16F10 en los ratones que no presentaron tumor hasta el día 60 del bioensayo, se encontró que los grupos tratados con KLH y KLH-S266 mostraron efecto antitumoral, puesto que los animales tuvieron una baja y nula presencia de tumores, respectivamente. De esta forma se corroboró que la respuesta inmune inducida por tales tratamientos generan memoria en los ratones, ya que el desafío se realizó 45 días después de la última dosis terapéutica. Cabe destacar que el ratón tratado con FLH-S266 tampoco presentó incidencia tumoral en este segundo desafío.

KLH-S266 mostró una notable respuesta inmune protectora contra el melanoma B16F10, no vista anteriormente contra melanoma murino¹¹, dado que ninguno de los ratones tratados con dicho conjugado presentó incidencia tumoral en los dos desafíos realizados. De esta forma, el adyuvante podría ser clave al inducir una respuesta inmune de memoria para mejorar la presentación antigénica^{85,95}, lo que estaría influyendo en la efectividad de KLH-S266, no vista con el adyuvante QS21 usado por Wondimu et al.¹¹.

6.3. RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL INDUCIDA POR LAS HEMOCIANINAS

Las hemocianinas, al ser incorporadas por las células presentadoras de antígenos, inducen tempranamente citoquinas proinflamatorias que son requeridas para iniciar la respuesta inmune, como se ha visto con KLH y FLH, pero no con CCH, en estudios *in vitro* utilizando macrófagos peritoneales, las cuales estimulan un proceso inflamatorio agudo tempranamente⁶⁶. En el presente trabajo KLH indujo una respuesta inmune protectora contra B16F10

superior a FLH, tras la segunda inmunización, resultando en una respuesta anti-tumoral robusta. Esta diferencia podría estar asociada a diferencias en los mecanismos inmunomodulatorios de cada hemocianina, relacionados con su efecto *bystander*; inducir una potente respuesta de memoria específica de células T con la secreción de citoquinas que indirectamente promueven la respuesta celular contra el antígeno de interés²⁸. Esto podría generar la respuesta citotóxica de células T (LTC, Linfocitos T Citotóxicos) deseada para erradicar la micrometástasis, ya que como se ha visto en la terapia anti-tumoral con células dendríticas, donde las hemocianinas han sido utilizadas como adyuvantes, una óptima respuesta inmune requiere la presencia de linfocitos T CD4⁺ y la expresión de determinantes antigénicos ayudadores y LTC^{96,97}. Teniendo esto en cuenta, con el análisis de los linfocitos infiltrados en los tumores colectados el día 29 del bioensayo, junto con la evaluación de las citoquinas en el suero de los ratones, se podrían tener antecedentes que permitan postular el mecanismo de estimulación por las terapias utilizadas, que expliquen su efectividad.

Las diferencias encontradas también pueden estar asociadas a la dosis de inmunización que se utilizó. Así, diferentes dosis podrían conducir a resultados óptimos tanto en FLH y KLH, como también en CCH, ya que CCH indujo una inhibición del crecimiento del tumor de manera significativa respecto al control PBS. Resultados similares obtuvo Arancibia et al.¹⁸. Además, los animales que no sufrieron incidencia tumoral en el primer desafío, tampoco lo hicieron en el segundo desafío con células de melanoma B16F10, por tanto las dosis inyectadas en estos ratones habría sido suficiente para generar una poderosa respuesta inmune anti-tumoral de memoria. Esto también está relacionado al diseño de la terapia, en términos de aplicación física y temporal de las inmunizaciones, que como se mencionó con anterioridad, repetidas dosis generan interferencia en el título de anticuerpos circulantes.

En este sentido, cabe destacar que se han realizado distintas pruebas clínicas con KLH como *carrier* de AATs o como adyuvante inmunológico, donde no se han visto efectos tóxicos colaterales, con resultados prometedores en la sobrevida de los pacientes de distintos tipos de cáncer, incluyendo el melanoma maligno^{16,28}. Así también CCH fue utilizada como adyuvante en vacunas basadas en CDs cargadas con lisados de células tumorales de cáncer de próstata, donde se vio la seguridad y efectividad de esta hemocianina en inducir una respuesta celular de memoria en los pacientes con dicho cáncer, por lo que CCH podría ser un sustituto de KLH⁹⁸. Con los resultados aquí descritos se puede inferir que las hemocianinas de moluscos tendrían una influencia importante en el efecto anti-tumoral en los diferentes tipos de vacunas en las cuales se adiciona, no solo por estimular una respuesta inmune modulada hacia una de tipo Th1, sino también por generar un efecto *bystander* que se suma a la generación de una respuesta robusta de anticuerpos que poseen reactividad cruzada con el tumor.

Finalmente y resumiendo, la tesis realizada permitió encontrar que una vez que las hemocianinas fueron acopladas a los péptidos P10 o S266 generaron una respuesta inmune humoral potente contra las tres hemocianinas, y específica contra los péptidos, generando anticuerpos de clase IgG, sin diferencias en sus propiedades como *carrier*. Sin embargo, al evaluar el efecto antitumoral de los conjugados, frente al efecto de las hemocianinas sin conjugar, se encontró que la terapia con FLH mostró superioridad sobre CCH, al generar una respuesta inmune protectora significativa contra el tumor, respecto al control positivo con KLH. Tal efecto se produjo sin importar si las hemocianinas estaban o no acopladas a los péptidos, aun cuando estas generaron una respuesta inmune humoral y celular contra ellos. De este modo, y según se demostró mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo, las hemocianinas de moluscos generan anticuerpos que reaccionan en forma cruzada con antígenos presentes en las células de melanoma murino y humano, lo que influye en sus propiedades antitumorales. Estos resultados podrían extenderse a pacientes de melanoma maligno, puesto que las hemocianinas conjugadas a P10 y S266 fueron capaces de generar anticuerpos que reconocen epítomos en diferentes líneas celulares de melanoma humano. Finalmente, aún cuando FLH fue efectiva para la terapia contra melanoma B16F10, KLH tuvo una respuesta robusta al desafiar por segunda vez a los ratones. No obstante, diferencias en el adyuvante utilizado, así como las dosis de las proteínas, podrían favorecer la efectividad de las hemocianinas de moluscos del litoral chileno, CCH y FLH, como inmunoterapia contra melanoma, así como también frente a otros tipos de cáncer.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Se estableció un protocolo de acoplamiento de los péptidos P10 y S266 a las hemocianinas de moluscos (CCH, FLH y KLH) mediante el entrecruzador sulfo-SMCC.
2. Los conjugados hemocianina-péptido indujeron un título de anticuerpos séricos específicos de clase IgG contra cada péptido, en torno a 300 diluciones. Además, fueron reactivos, mediante inmunofluorescencia indirecta, con células de melanoma murino (B16F10) y líneas humanas (BE, RQ y AK). Así, las hemocianinas mostraron un mismo comportamiento inmunológico al actuar como *carrier* de péptidos.
3. Los anticuerpos dirigidos contra cada hemocianina reconocen epítomos presentes en las células de melanoma B16F10, como lo demuestra la reactividad de los sueros anti-hemocianina sola y conjugada a S266 mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.
4. No se observaron diferencias en la incidencia y el crecimiento tumoral entre los grupos de ratones tratados con cada hemocianina sola y conjugada a P10 o S266.
5. En las condiciones del bioensayo, FLH, conjugada y no conjugada, mostró un efecto anti-tumoral superior a CCH y similar a KLH (control positivo).
6. Se encontró una respuesta DTH positiva para ambos péptidos (P10 y S266), consistente con la producción de anticuerpos IgG específicos anti-péptido, en ratones tratados con los conjugados hemocianina-péptido.
7. Aun cuando se generó una respuesta humoral y celular específica contra cada uno de los péptidos, esto no incidió en una mejor respuesta anti-tumoral, en comparación a las hemocianinas no conjugadas más el adyuvante AddaVax.

Para finalizar, de este trabajo de investigación, se concluye que de ambas hemocianinas provenientes de moluscos del litoral chileno, FLH sería la más promisoría para continuar estudios preclínicos que potencien su uso como adyuvante o inmunomodulador no específico en la terapia para melanoma. Así, el diseño, formulación y aplicación de la inmunoterapia con esta hemocianina, serían claves para potenciar el efecto antitumoral deseado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Herlyn, M. Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Rev.* **9**, 101–12 (1990).
2. Lacy, K., Karagiannis, S. & Nestle, F. Immunotherapy of melanoma. *Expert Rev. Dermatology* **7**, 51–68 (2012).
3. Bhatia, S., Tykodi, S. & Thomson, J. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology* **26**, 488–496 (2009).
4. Ohtaki, A., Kieber-Emmons, T. & Murali, R. Structure-based peptide mimicry of tumor-associated antigens. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* **32**, 1–5 (2013).
5. Hennings, L., Artaud, C., Jousheghany, F., Monzavi-Karbassi, B., Pashov, A. & Kieber-Emmons, T. Carbohydrate mimetic peptides augment carbohydrate-reactive immune responses in the absence of immune pathology. *Cancers (Basel)*. **3**, 4151–69 (2011).
6. Mulens, V., Marinello, P., Carr, A., Mazorra, Z. & Fernández, L. E. Gangliósidos en la biología e inmunoterapia del cáncer: la experiencia cubana. *Cancerología* **4**, 155–167 (2009).
7. Sauter, E. R. & Herlyn, M. Molecular biology of human melanoma development and progression. *Mol. Carcinog.* **23**, 132–43 (1998).
8. Riemer, A. B., Förster-Waldl, E., Brämshwig, K., Pollak, A., Zielinski, C., Pehamberger, H., Lode, H., Scheiner, O. & Jensen-Jarolim, E. Induction of IgG antibodies against the GD2 carbohydrate tumor antigen by vaccination with peptide mimotopes. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1267–74 (2006).
9. Zhang, H., Zhang, S., Cheung, N. V. & Livingston, P. O. Antibodies against GD2 ganglioside can eradicate syngeneic cancer micrometastases. *Cancer Res.* **58**, 2844–2849 (1998).
10. Horwacik, I. & Rokita, H. in *Neuroblastoma Present Futur.* 251–270 (2010).

11. Wondimu, A., Zhang, T., Kieber-Emmons, T. & Al, E. Peptides mimicking GD2 ganglioside elicit cellular, humoral and tumor-protective immune responses in mice. *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1079–1089 (2012).
12. Del Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., González, A., Moltedo, B., De Ioannes, P., Ferreira, J., Manubens, A. & Becker, M. I. Hemocyanins as immunostimulants. *Rev Med Chile* **139**, 236–246 (2011).
13. Coates, C. J. & Nairn, J. Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.* **45**, 43–55 (2014).
14. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 505–517 (2007).
15. Arancibia, S., Del Campo, M., Nova, E., Salazar, F. & Becker, M. I. Enhanced structural stability of concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur. J. Immunol.* **42**, 688–699 (2012).
16. Harris, J. R. & Markl, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* **30**, 597–623 (1999).
17. De Ioannes, P., Moltedo, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A. & Becker, M. I. Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 26134–42 (2004).
18. Arancibia, S., Espinoza, C., Salazar, F., Del Campo, M., Tampe, R., Zhong, T.-Y., De Ioannes, P., Moltedo, B., Ferreira, J., Lavelle, E., Manubens, A., De Ioannes, A. & Becker, M. I. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
19. Basak, S., Birebent, B., Purev, E., Somasundaram, R., Maruyama, H., Zaloudik, J., Swoboda, R., Strittmatter, W., Li, W., Luckenbach, A., Song, H., Li, J., Sproesser, K., Guerry, D., Nair, S., Furukawa, K. & Herlyn, D. Induction of cellular immunity by anti-idiotypic antibodies mimicking GD2 ganglioside. *Cancer Immunol. Immunother.* **52**, 145–54 (2003).
20. Riemer, A. B. & Jensen-Jarolim, E. Mimotope vaccines: epitope mimics induce anti-cancer antibodies. *Immunol. Lett.* **113**, 1–5 (2007).

21. Arancibia, S., Salazar, F. & Becker, M. I. in *Bl. cancer from basic Sci. to Robot. Surg.* 221–242 (2012).
22. Moltedo, B., Faunes, F., Haussmann, D., De Ioannes, P., De Ioannes, A., Puente, J. & Becker, M. I. Immunotherapeutic effect of Concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J. Urol.* **176**, 2690–5 (2006).
23. Ellman, G. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70–77 (1959).
24. Hermanson, G. in *Bioconjugate Tech.* 228–286 (Academic Press, 1996).
25. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D. & Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. *Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer* (2013). at <<http://globocan.iarc.fr>>
26. Sanzana, N., Galaz, J. C., Jofré, A. M., Cortés, J. *et al.* *Primer informe de registros poblacionales de cancer de chile.* 1–178 (2012).
27. Alonso, F. Epidemiology of cutaneous melanoma in Chile. *Rev Med Clin Condes* **22**, 459–465 (2011).
28. Becker, M. I., Arancibia, S., Salazar, F., Campo, M. Del & Ioannes, A. in *Immune Response Act.* (2014).
29. Kasuya, M. C. Z. & Hatanaka, K. in *Break. Melanoma Res.* 103–118 (2007).
30. Breslow, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann. Surg.* **172**, 902–8 (1970).
31. Balch, C. M., Gershenwald, J., Soong, S. J., Thompson, J., Atkins, M., Byrd, D., Buzaid, A., Cochran, A., Coit, D., Ding, S., Eggermont, A., Flaherty, K., Gimotty, P., Kirkwood, J., McMasters, K., Mihm, M., Morton, D., Ross, M., Sober, A. & Sondak, V. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol.* **27**, 6199–206 (2009).
32. Marghoob, A., Koenig, K., Bittencourt, F., Kopf, A. & Bart, R. Breslow thickness and Clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer* **88**, 589–95 (2000).

33. Parmiani, G., Castelli, C., Santinami, M. & Rivoltini, L. Melanoma immunology: past, present and future. *Curr. Opin. Oncol.* **19**, 121–7 (2007).
34. Arlen, M. & Arlen, P. Optimizing the immune system to achieve control of the metastatic malignant lesion. *J. Cancer* **4**, 427–32 (2013).
35. Skin-melanocytic tumor. at <<http://www.pathologyoutlines.com/topic/skintumormelanocyticbreslow.html>>
36. Redman, B. G., Chang, A., Whitfield, J., Esper, P., Jiang, G., Roessler, B. & Mulé, J. Phase Ib trial assessing autologous, tumor-pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* **31**, 591–598 (2009).
37. Hunder, N., Wallen, H., Cao, J., Reilly, J., Rodmyre, R. & Jungbluth, A. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2698–2703 (2012).
38. Borden, E. Interferons: pleiotropic cellular modulators. *Clin Immunol Immunopathol* **62**, 18–24 (1992).
39. Melanoma skin cancer: Treating melanoma. at <<http://www.cancerresearchuk.org/cancer-help/type/melanoma/treatment/>>
40. Hill, G., Kremenz, E. & Hill, H. Dimethyl triazeno imidazole carboxamide and combination therapy for melanoma. IV. Late results after complete response to chemotherapy (Central Oncology Group protocols 7130, 7131, and 7131A). *Cancer* **53**, 1299–1305 (1984).
41. Creagan, E., Ahmann, D., Frytak, S., Long, H., Chang, M. & Itri, L. Phase II trials of recombinant leukocyte A interferon indissemated malignant melanoma: Results in 96 patients. *Cancer Treat Rep* **70**, 619–24 (1986).
42. Keilholz, U., Conradt, C., Legha, S., Khayat, D., Scheibenbogen, C., Thatcher, N., Goey, S. H., Gore, M., Dorval, T., Hancock, B., Punt, C. J., Dummer, R., Avril, M. F., Bröcker, E. B., Benhammouda, A., Eggermont, A. M. & Pritsch, M. Results of interleukin-2-based treatment in advanced melanoma: a case record-based analysis of 631 patients. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2921–9 (1998).
43. Dummer, R., Garbe, C., Thompson, J., Eggermont, A., Yoo, K., Maier, T. & Bergstrom, B. Randomized dose-escalation study evaluating peginterferon alfa-2a in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1188–94 (2006).

44. Downey, S. G., Klapper, J., Smith, F., Yang, J., Richard, M., Royal, R., Kammula, U., Hughes, M., Allen, T., Levy, C., Michael, Y., Nichol, G., White, D., Seth, M. & Rosenberg, S. Prognostic factors related to clinical response in patients with metastatic melanoma treated by CTL-associated antigen-4 blockade. *Clin. Cancer Res.* **13**, 6681–6688 (2008).
45. Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., Day, S., Sosman, J. & Kirkwood, J. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2013).
46. Potapenko, M., Shurin, G. V & de León, J. in *Adv. Exp. Med. Biol.* **601**, 195–203 (2007).
47. Lopez, P. H. H. & Schnaar, R. L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 549–57 (2009).
48. Regina Todeschini, A. & Hakomori, S. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 421–33 (2008).
49. Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., Ohmi, Y. & Furukawa, K. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. *Glycoconj. J.* **29**, 579–84 (2012).
50. Péguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D. & Portoukalian, J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J. Immunol.* **170**, 3488–94 (2003).
51. Cheresch, D. a, Pierschbacher, M. D., Herzig, M. a & Mujoo, K. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J. Cell Biol.* **102**, 688–96 (1986).
52. Kailayangiri, S., Altvater, B., Meltzer, J., Pscherer, S., Luecke, A., Dierkes, C., Titze, U., Leuchte, K., Landmeier, S., Hotfilder, M., Dirksen, U., Harges, J., Gosheger, G., Juergens, H. & Rossig, C. The ganglioside antigen GD2 is surface-expressed in Ewing sarcoma and allows for MHC-independent immune targeting. *Br. J. Cancer* **106**, 1123–33 (2012).

53. Shiku, H. & Takahashi, T. Autologous typing: a tedious but orthodox approach for defining human tumor antigens with clarity. *Cancer Immun.* **12**, 3 (2012).
54. Hoon, D. S., Irie, R. F. & Cochran, a J. Gangliosides from human melanoma immunomodulate response of T cells to interleukin-2. *Cell. Immunol.* **111**, 410–9 (1988).
55. Albertini, M. R., Hank, J., Schiller, J., Khorsand, M., Borchert, A., Gan, J., Bechhofer, R., Storer, B., Reisfeld, R. & Sondel, P. M. Phase IB trial of chimeric antidisialoganglioside antibody plus interleukin 2 for melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1277–88 (1997).
56. Murray, J., Cunningham, J., Brewer, H., Mujoo, K., Zukiwski, A. A., Podoloff, D. A., Kasi, L. P., Bhadkamkar, V., Fritsche, H. A., Benjamin, R. S., *et al.* Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *J. Clin. Oncol.* **12**, 184–93 (1994).
57. Navid, F., Santana, V. & Barfield, R. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr. Cancer Drug Targets* **10**, 200–209 (2011).
58. Kushner, B., Kramer, K. & Cheung, N. Phase II trial of the anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **19**, 4189–94 (2001).
59. Monzavi-Karbassi, B., Hennings, L., Artaud, C., Liu, T., Jousheghany, F., Pashov, A., Murali, R., Hutchins, L. & Kieber-Emmons, T. Preclinical studies of carbohydrate mimetic peptide vaccines for breast cancer and melanoma. *Vaccine* **25**, 3022–31 (2007).
60. Chapman, P. B., Morrissey, D., Panageas, K., Williams, L., Lewis, J., Israel, R., Hamilton, W. & Livingston, P. Vaccination with a bivalent GM2 and GD2 ganglioside conjugate vaccine: A trial comparing doses of GD2-keyhole limpet hemocyanin. *Clin. Cancer Res.* **6**, 4658–4662 (2000).
61. Kieber-Emmons, T., Luo, P., Qiu, J., Chang, T.-Y., O, I., Blaszczyk-Thurin, M. & Steplewski, Z. Vaccination with carbohydrate peptide mimotopes promotes anti-tumor responses. *Nat. Biotechnol.* **17**, 660–5 (1999).
62. Inoges, S., Lopez-Diaz, A., Villanueva, H., Pastor, F., Soria, E. & Bendandi, M. Idiotype vaccines for lymphoma: potential factors

- predicting the induction of immune responses. *World J. Clin. Oncol.* **2**, 237–44 (2011).
63. Neelapu, S. S. & Kwak, L. W. Vaccine therapy for B-cell lymphomas: next-generation strategies. *Hematology* 243–9 (2007). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024636>>
 64. Fukuda, M. N. Peptide-displaying phage technology in glycobiology. *Glycobiology* **22**, 318–25 (2012).
 65. López, M., Pereda, C., Segal, G., Muñoz, L., Aguilera, R., González, F.E., Escobar, A., Ginesta, A., Reyes, D., González, R., Mendoza-Naranjo, A., Larrondo, M., Compán, A., Ferrada, C. & Salazar-Onfray, F. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor β -expressing T Cells. *J. Clin. Oncol.* **27**, 945–52 (2009).
 66. Zhong, T.-Y. Patrón de expresión de citoquinas y quimioquinas de células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estimulación in vitro con hemocianinas de moluscos. Tesis (Magíster en Bioquímica). Santiago, Chile. Universidad de Chile. 125 (2013).
 67. Ragupathi, G., Livingston, P., Hood, C., Gathuru, J., Krown, S., Chapman, P., Wolchok, J., Williams, L., Oldfield, R. & Hwu, W. J. Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5214–5220 (2003).
 68. Slovin, S. F., Keding, S. J. & Ragupathi, G. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 418–28 (2005).
 69. Timmerman, J. M. Comentario. Carrier protein conjugate vaccines. *Hum. Vaccin.* **5**, 181–183 (2009).
 70. Walker, J. M. *The protein protocols handbook*. (Human Press).
 71. Kafi, K., Betting, D., Yamada, R., Bacica, M., Steward, K. & Timmerman, J. Maleimide conjugation markedly enhances the immunogenicity of both human and murine idiotype-KLH vaccines. *Mol. Immunol.* **46**, 448–56 (2009).
 72. Herscovitz, H. B., Harold, W. W. & Stavitsky, A. B. Immunochemical and immunogenic properties of a purified Keyhole limpet haemocyanin. *Immunology* **22**, 51–61 (1972).

73. Espinoza, C. Caracterización bioquímica e inmunogénica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la familia *Fissurellidae*: *Fissurella latimarginata* (Lapa negra), *Fissurella cumingi* (Lapa frutilla) y *Fissurella maxima* (Lapa reina). Tesis (Bioquímico). (2007).
74. Mbow, M., De Gregorio, E., Valiante, N. & Rappuoli, R. New adjuvants for human vaccines. *Curr. Protoc. Immunol.* **22**, 411–416 (2010).
75. Eyer, P., Worek, F., Kiderlen, D., Sinko, G., Stuglin, A., Simeon-Rudolf, V. & Reiner, E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal. Biochem.* **312**, 224–7 (2003).
76. Luo, Y. & Dorf, M. E. in *Curr. Protoc. Immunol.* (Coligan, J. E.) **4**, Unit 4.5 (1993).
77. Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Li, Y., Chen, S.-C., Kinsley, D., Nelissen, R., Fine, J., Mihara, K. & Manfra, D. Characterization of a murine Keyhole limpet hemocyanin (KLH)-delayed-type hypersensitivity (DTH) model: role for p38 kinase. *Int. Immunopharmacol.* **9**, 1218–27 (2009).
78. Betting, D. J., Kafi, K., Abdollahi-fard, A., Hurvitz, S. & Timmerman, J. Sulfhydryl-based tumor antigen-carrier protein conjugates stimulate superior antitumor immunity against B cell lymphomas. *J. Immunol.* **181**, 4131–4140 (2013).
79. Leyton, P., Lizama, P., Campos, M., Becker, M. I., Clavijo, E., Cordova, I., Vera, M. & Jerez, C. Surface enhanced raman spectrum of nanometric molecular systems. *J. Chil. Chem. Soc.* **50**, 1–12 (2005).
80. Idakieva, K., Nikolov, P., Chakarska, I., Genov, N. & Shnyrov, V. L. Spectroscopic properties and conformational stability of *Concholepas concholepas* hemocyanin. *J. Fluoresc.* **18**, 715–25 (2008).
81. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. a. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* **33**, 492–503 (2010).
82. Li, H., Zhang, J., He, Y., Chen, L., Li, B., Liu, K. Y., Yang, W. C., Zhao, Z., Zou, Q. M. & Wu C. Systemic immunization with an epitope-based vaccine elicits a Th1-biased response and provides protection against *Helicobacter pylori* in mice. *Vaccine* **31**, 120–126 (2012).
83. Dubensky, T. W., Kanne, D. B. & Leong, M. L. Rationale, progress and development of vaccines utilizing STING-activating cyclic dinucleotide adjuvants. *Ther. Adv. Vaccines* **1**, 131–43 (2013).

84. Wu, C.-Y., Chang, C.-Y., Ma, H.-H., Wang, C.-W., Chen, Y.-T., Hsiao, P.-W., Chang, C.-C., Chan, C.-H., Liu, C.-C. & Chen, J.-R. Squalene-adjuvanted H7N9 virus vaccine induces robust humoral immune response against H7N9 and H7N7 viruses. *Vaccine* **32**, 4485–4494 (2014).
85. Garlapati, S., Facci, M., Polewicz, M., Strom, S., Babiuk, L. A., Mutwiri, G., Hancock, R. E., Elliott, M. R. & Gerdt, V. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **128**, 184–91 (2009).
86. Goff, P. H., Eggink, D, Seibert, C., Hai, R., Martínez-Gil, L., Krammer, F. & Palese, P. Adjuvants and immunization strategies to induce influenza virus hemagglutinin stalk antibodies. *PLoS One* **8**, 1–11 (2013).
87. Mantile, F., Trovato, M., Santoni, A., Barba, P., Ottonello, S., De Berardinis, P. & Prisco, A. Alum and squalene-oil-in-water emulsion enhance the titer and avidity of anti-A β antibodies induced by multimeric protein antigen (1-11)E2, preserving the Igg1-skewed isotype distribution. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
88. Soman, G., Yang, X., Jiang, H., Giardina, S. & Gautam, M. Comparison of GD2 binding capture ELISA assays for anti-GD2-antibodies using GD2-coated plates and a GD2-expressing cell-based ELISA. *J. Immunol. Methods* **373**, 181–191 (2012).
89. Wirquin, I., Suturkova-Milosevic, L., Briani, C. & Latov, N. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-Gal NAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* **40**, 307–10 (1995).
90. Geyer, H., Wuhler, M., Resemann, A. & Geyer, R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **280**, 40731–48 (2005).
91. Wolf, M. F., Koerner, U. & Schumacher, K. Specificity of reagents directed to the Thomsen-Friedenreich antigen and their capacity to bind to the surface of human carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **46**, 1779–1782 (1986).
92. Nudelman, E., Polewicz, M., Strom, S., Babiuk, L. A., Mutwiri, G., Hancock, R.E., Elliott, M.R. & Gerdt, V. Characterization of a human melanoma-associated ganglioside antigen defined by a monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **257**, 12752–12756 (1982).

93. Black, C. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol. Online J.* **5**, 7 (1999).
94. Nakai, N., Katoh, N., Germeraad, W., Kishida, T., Ueda, E., Takenaka, H., Mazda, O. & Kishimoto, S. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination. *J. Dermatol Sci* **53**, 40–47 (2009).
95. Marciani, D. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov. Today* **8**, 934–43 (2003).
96. Shimizu, K., Thomas, E. K., Giedlin, M. & Mule, J. J. Enhancement of tumor lysate-and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res.* **61**, 2618–2624 (2001).
97. Timmerman, J. M. & Levy, R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumorantigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J. Immunol.* **164**, 4797–4803 (2000).
98. Reyes, D., Salazar, L., Espinoza, E., Pereda, C., Castellón, E., Valdevenito, R., Huidobro, C., Becker, M. I., Lladser, A., López, M. & Salazar-Onfray, F. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* **109**, 1488–97 (2013).
99. Expaty Bioinformatics Resource Portal. ProtParam. at <<http://web.expasy.org/protparam/>>

ANEXO

A. DATOS Y RESULTADOS OBTENIDOS

A.1. TEST DE ELLMAN

Se realizó el test de Ellman para determinar el factor de dilución de CCH activada con maleimida (SMCC), con el fin de establecer el volumen más apropiado en cada reacción de acoplamiento de las hemocianinas a los péptidos, tomando en cuenta ocupar el menor volumen de solución posible. El volumen de CCH obtenido tras la activación con SMCC y tras pasar por la columna de desalación, fue de 685 μL . Con ello, se calculó la cantidad de cisteína requerida para tener un mismo exceso molar que Sulfo-SMCC (1.800 veces, aproximadamente), resultando igual a 1,67 mM. Debido a los bajos volúmenes de cisteína y a que debía ser debidamente leída mediante el test de Ellman, se determinó que la concentración de cisteína en todas las muestras sería equivalente a aquella con factor de dilución 2.

Dadas las diferencias entre las concentraciones obtenidas, se estableció que al utilizar una menor cantidad de muestra (factor de dilución 6) se tenía una mayor cantidad de SMCC unida a la proteína, lo que se podría interpretar como error de manipulación, por manejar un factor de dilución elevado. Esto podría indagarse evaluando el test de Ellman en muestras con factor de dilución de 1 al 6. De igual forma, se determinó usar factor de dilución 3 en la preparación de las muestras de hemocianina en tampón de reacción de Ellman, para evaluar su acoplamiento a cada péptido y la cantidad de cisteína equivalente para muestras con factor de dilución 2. La Figura A.1 muestra la curva de calibración para cisteína y la Tabla A.1 muestra los resultados de concentración de cisteína en cada muestra evaluada y la diferencia de cisteína en solución entre CCH activada y no activada con sulfo-SMCC.

Adicionalmente en la Tabla A.2 y A.3 se muestran los datos de absorbancia medida durante los dos acoplamientos, respectivamente, y la concentración de cisteína inicial en cada muestra, de acuerdo al volumen colectado al pasar las hemocianinas activadas con sulfo-SMCC por las columnas de desalación. En la Tabla A.4 se muestran los datos para CCH y

KLH pre-activadas y comercializadas por Thermo Scientific, utilizadas como control del procedimiento implementado en esta tesis.

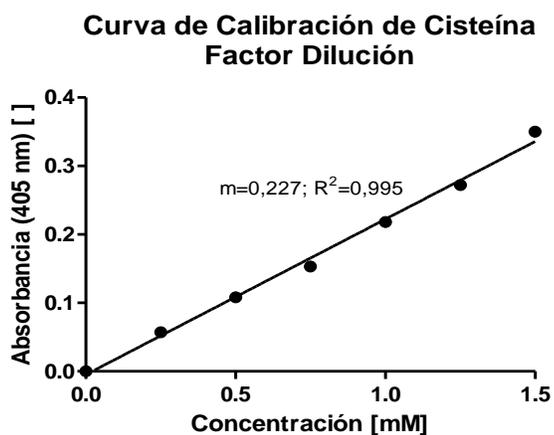


Figura A.1: Curva de calibración de cisteína para evaluar el factor dilución de las muestras de hemocianina activadas con sulfo-SMCC. Medición de cisteína en solución mediante el test de Ellman por espectrofotometría (absorbancia a 405 nm) de la reacción entre el reactivo de Ellman y el grupo tiol de la cisteína (-SH). La curva estándar muestra la absorbancia medida para muestras de concentración conocida. $m=0,227$ y $R^2=0,995$. m : pendiente de la recta, R^2 : coeficiente de correlación de datos.

Tabla A.1: Concentración de cisteína unida a SMCC en CCH activada, medida a distintos factores de dilución de las muestras. Promedio de absorbancia a 405 nm para muestras medidas en triplicado; Concentración de cisteína calculada con la pendiente de la curva estándar Figura A.1 ($m=0,227$); Factor de dilución de cada muestra; Diferencia de cisteína, que muestra la cisteína unida al SMCC de la hemocianina activada; Cisteína unida a SMCC según el factor de dilución asociado a cada muestra.

Muestra	Absorbancia (405 nm) []	Concentración Cisteína [mM]	Factor de Dilución	Diferencia de Cisteína [mM]	Cisteína unida a SMCC [mM]
CCH - SMCC	0,011	0,05	2	0,21	0,42
	0,019	0,09	3	0,15	0,45
	0,019	0,08	6	0,15	0,92
CCH	0,058	0,26	2	0	
	0,052	0,23	3	0	
	0,053	0,24	6	0	

Tabla A.2: Datos obtenidos usando test de Ellman para el primer acoplamiento de hemocianina a los péptidos en estudio. Concentración de cisteína agregada a las muestras; absorbancia medida a 405 nm, como promedio de un triplicado y concentración de cisteína calculada con la pendiente de la curva estándar de cisteína ($m=0,440$). Se usó factor de dilución 3.

Muestra	Concentración de Cisteína Inicial [mM]	Absorbancia (405 nm) []	Concentración Cisteína [mM]
CCH-SMCC	1,67	0,035	0,08
CCH		0,174	0,40
FLH-SMCC	1,53	0,028	0,06
FLH		0,234	0,54
KLH-SMCC	1,53	0,039	0,09
KLH		0,040	0,09

Tabla A.3: Datos obtenidos usando el test de Ellman para el segundo acoplamiento. Concentración de cisteína agregada a las muestras; absorbancia medida a 405 nm, como promedio de un triplicado y concentración de cisteína calculada con la pendiente de la curva estándar de cisteína ($m=0,264$). Se usó factor de dilución 2.

Muestra	Concentración de Cisteína Inicial [mM]	Absorbancia (405 nm) []	Concentración Cisteína [mM]
CCH-SMCC	0,87	0,006	0,02
CCH		0,090	0,36
FLH-SMCC	0,89	0,005	0,02
FLH		0,196	0,80
KLH-SMCC	0,81	0,009	0,04
KLH		0,025	0,10

Tabla A.4: Datos obtenidos usando el de Ellman para las pruebas con hemocianinas pre-activadas. Concentración de cisteína agregada a las muestras; absorbancia promedio medida en triplicado a 405 nm y concentración de cisteína calculada con la pendiente de la curva de calibración de cisteína ($m=0,216$). Se usó un factor de dilución de 2. mcCCH: *Blue carrier* (CCH) pre-activada, mcKLH: KLH pre-activada, ambos productos de Thermo Scientific.

Muestra	Concentración de Cisteína Inicial [mM]	Absorbancia (405 nm) []	Concentración Cisteína [mM]
mcCCH	0,75	0,051	0,24
CCH-SMCC		0,028	0,13
CCH		0,077	0,36
mcKLH	0,83	0,080	0,37
KLH-SMCC		0,032	0,15
KLH		0,035	0,16

A.2. ENSAYO DE ELISA

Las Figuras A.2-4 muestran las curvas dosis-respuesta, esto es dilución del suero versus la intensidad colorimétrica de la reacción, obtenidas mediante evaluación por ELISA del suero de los ratones C57BL/6 que recibieron una inmunización secundaria de los conjugados hemocianina-péptido. Adicionalmente, la Tabla A.5-7 contiene los resultados del $\log(EC_{50})$ de estas curvas, determinados mediante el software GraphPad Prism.

Asimismo las Figuras A.5 y A.6 muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas mediante reacciones de ELISA de sueros de ratones C57BL/6 que recibieron una terapia de CCH, FLH y KLH y sus respectivos conjugados a P10 y S266, y que fueron desafiados con células de melanoma murino de la línea B16F10. Adicionalmente, las Tabla A.8 y A.9 contienen los resultados del logaritmo de la EC_{50} de estas curvas, determinados mediante el software GraphPad Prism.

Los resultados en cada gráfico y tabla corresponden a un solo experimento, a excepción de la Figura A.5 en que se muestra un promedio de lo obtenido para la titulación de sueros de 5 animales por separado mediante reacción de ELISA.

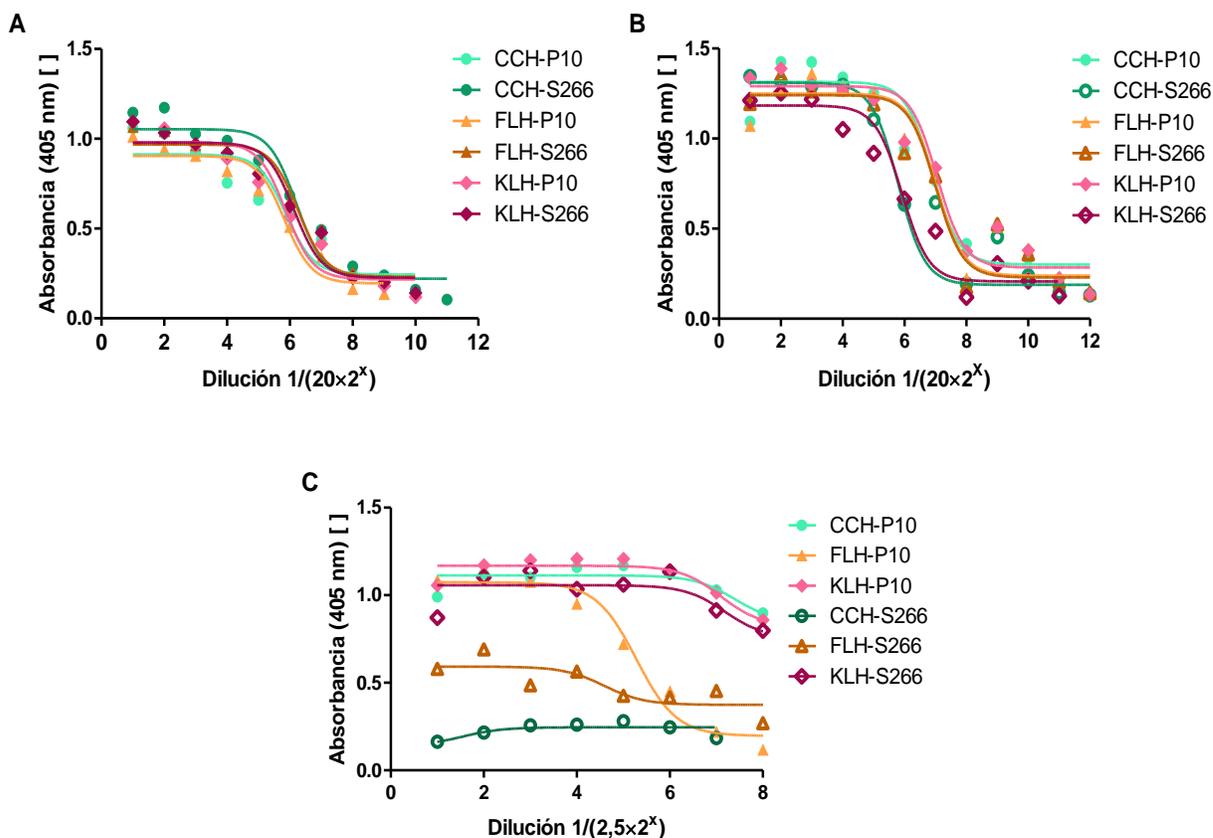


Figura A.2: Reactividad del suero contra cada hemocianina y cada péptido, de la respuesta secundaria de los animales inmunizados con los conjugados hemocianina-péptido, determinada mediante ELISA. En **A)** y **B)** se muestran los resultados del ELISA contra cada hemocianina (CCH, FLH y KLH) usada en la preparación del conjugado de inmunización en el primer y segundo ensayo, respectivamente. **C)** Resultado contra el conjugado correspondiente a la inmunización. Se utilizó un pool de sueros de 3 ratones y como anticuerpo secundario se usó un antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FAL, se midió absorbancia a 405 nm. Se consideró una absorbancia igual a 0,1 DO como punto de corte para la especificidad de la reacción.

Tabla A.5: Log(EC50) de las curvas dosis-respuesta de la Figura A.2. Se muestran los valores para cada grupo de animales de experimentación (designados por cada hemocianina-peptido). Hc: hemocianina, E1: primer ensayo de inmunización, E2: segundo ensayo de inmunización.

Conjugado de Inmunización	Log(EC50) Curva Anti-Hc E1	Log (EC50) Curva Anti-Hc E2	Log (EC50) Curva Anti-Conjugado
CCH-P10	5,885	6,895	7,394
FLH-P10	5,831	7,018	5,280
KLH-P10	5,869	7,052	7,094
CCH-S266	6,211	5,796	1,538
FLH-S266	6,265	7,001	4,586
KLH-S266	6,139	5,921	7,192

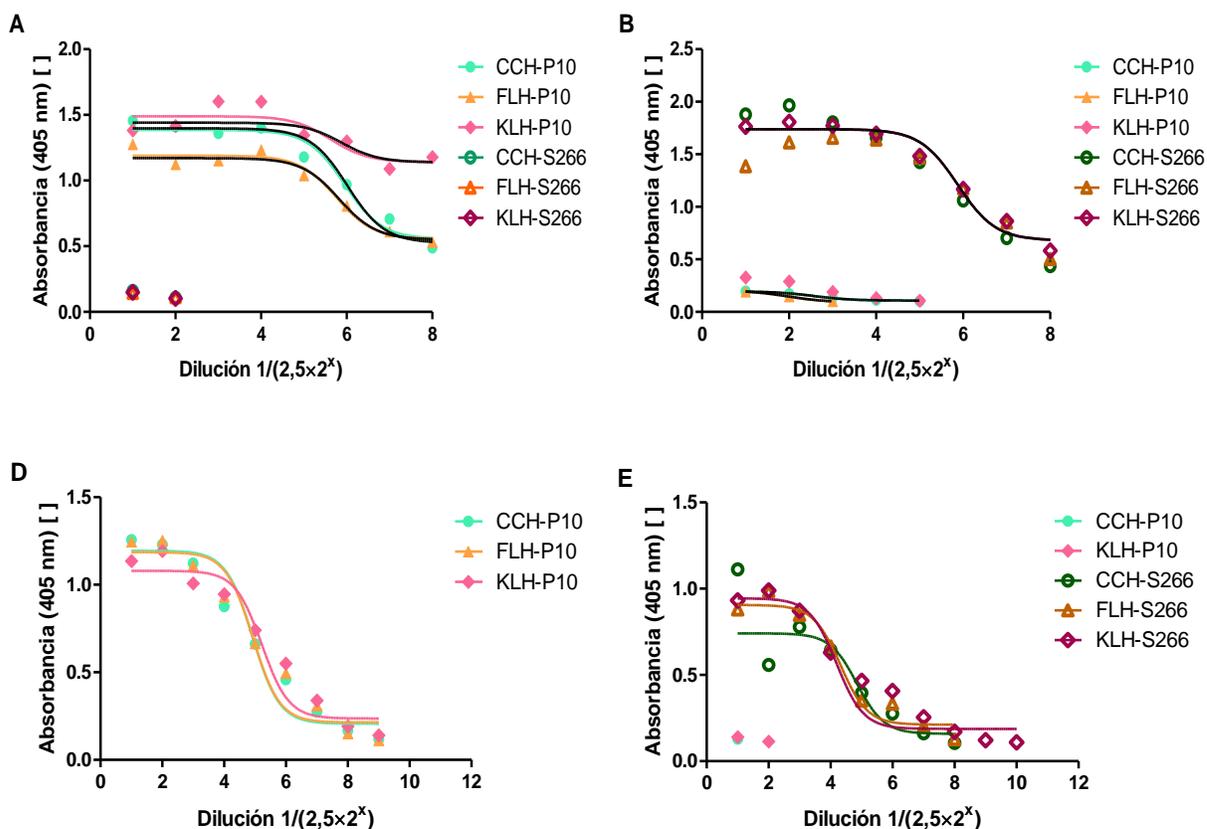


Figura A.3: Reactividad contra cada péptido del suero de animales de experimentación en la respuesta secundaria, luego de la inmunización con los conjugados hemocianina-péptido. Se muestran los resultados para los ELISA contra **A)** el péptido P10 y **B)** péptido S266, en el primer ensayo, y contra **C)** P10 y **D)** S266, en el segundo ensayo. Se utilizó un pool de sueros de 3 ratones y como anticuerpo secundario se usó un antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FAL, se midió absorbancia a 405 nm. Se consideró una absorbancia igual a 0,1 DO como punto de corte para la especificidad de la reacción.

Tabla A.6: Log(EC50) de las curvas dosis-respuesta de la Figura A.3. Se muestran los valores para cada grupo de animales de experimentación (según el conjugado de inmunización). E1: primer ensayo de inmunización, E2: segundo ensayo de inmunización.

Conjugado de Inmunización	Log(EC50) Curva Anti-P10 E1	Log(EC50) Curva Anti-S266 E1	Log (EC50) Curva Anti-P10 E2	Log (EC50) Curva Anti-S266 E2
CCH-P10	6,018	-	4,927	-
FLH-P10	5,823	-	4,925	-
KLH-P10	5,876	-	5,222	-
CCH-S266	-	4,498	-	4,853
FLH-S266	-	5,499	-	4,317
KLH-S266	-	5,878	-	4,193

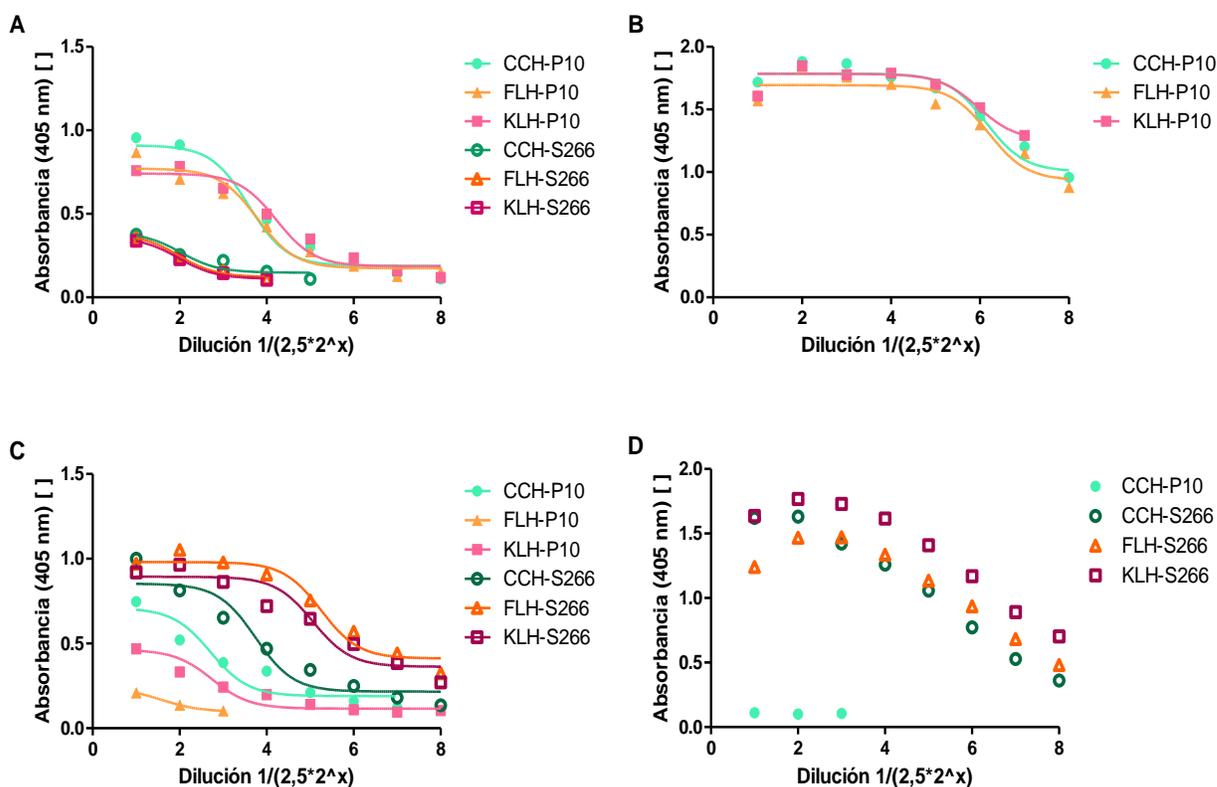


Figura A.4: ELISA para evaluar la clase (IgM o IgG) de los anticuerpos anti-péptido en el suero de la respuesta secundaria de los animales de experimentación inmunizados con los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266. Se muestran los resultados para los ELISA de (A) anticuerpos de la clase IgM anti-P10, (B) anticuerpos de la clase IgG anti-P10, (C) anticuerpos de la clase IgM anti-S266 y (D) anticuerpos de la clase IgG anti-S266. Se utilizó un pool del suero de 3 ratones y como anticuerpo secundario se usaron antisueros de conejo contra las cadenas pesadas de la IgM (μ) y anti-IgG (γ) de ratón, ambos unidos a FAL; se midió absorbancia a 405 nm. Se consideró una absorbancia igual a 0,1 DO como punto de corte para la especificidad de la reacción.

Tabla A.7: Log(EC50) de las curvas dosis-respuesta de la Figura A.4. Se muestran los valores para cada grupo de animales de experimentación (según el conjugado de inmunización).

Conjugado de Inmunización	Log(EC50) IgM Anti-P10	Log(EC50) IgG Anti-P10	Log (EC50) IgM Anti-S266	Log (EC50) IgM Anti-S266
CCH-P10	3,587	6,138	2,711	-
FLH-P10	3,787	6,190	1,592	-
KLH-P10	4,223	5,956	2,743	-
CCH-S266	2,023	-	3,746	5,099
FLH-S266	1,976	-	5,251	5,933
KLH-S266	1,970	-	5,067	5,902

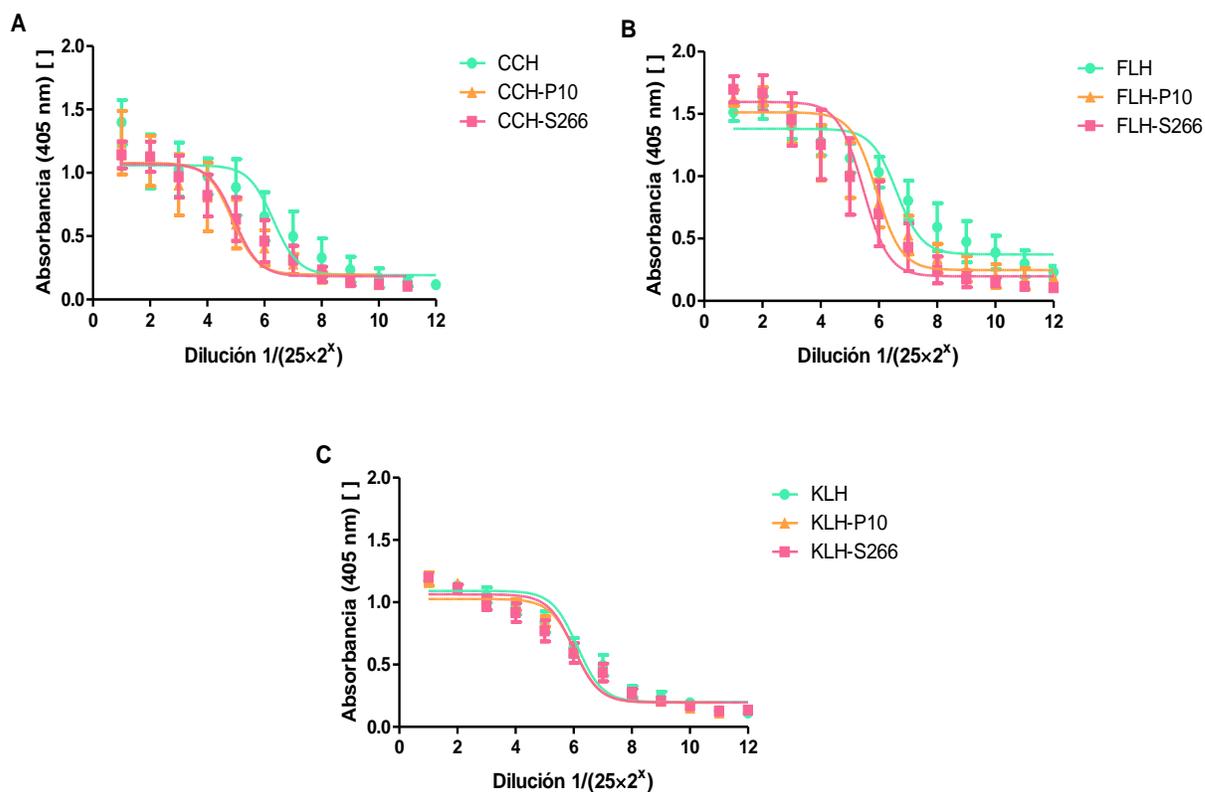


Figura A.5: Reactividad mediante ELISA de los sueros de los animales de experimentación inmunizados con los conjugados hemocianina-péptido, desafiados con melanoma murino de la línea B16F10. Se muestran los resultados para los ELISA contra **A)** CCH, de sueros de ratones inmunizados con CCH, CCH-P10 y CCH-S266; **B)** FLH, de sueros de ratones inmunizados con FLH, FLH-P10 y FLH-S266; y **C)** KLH, de sueros de ratones inmunizados con KLH, KLH-P10 y KLH-S266. Como anticuerpo secundario se usó el antisuero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a FAL, se midió absorbancia a 405 nm. Se consideró una absorbancia igual a 0,1 DO como punto de corte para la especificidad de la reacción.

Tabla A.8: Log(EC50) de las curvas dosis-respuesta de la Figura A.5. Se muestran los valores promedio para cada grupo de animales de experimentación (según la hemocianina o conjugado de inmunización). Hc: hemocianina CCH, FLH o KLH, según si los resultados son para la curva anti-CCH, anti-FLH y anti-KLH, respectivamente.

Conjugado de Inmunización	Log(EC50) Curva Anti-CCH	Log (EC50) Curva Anti-FLH	Log (EC50) Curva Anti-KLH
Hc	6,312	6,610	6,127
Hc-P10	4,861	5,919	6,041
Hc-S266	4,946	5,463	5,999

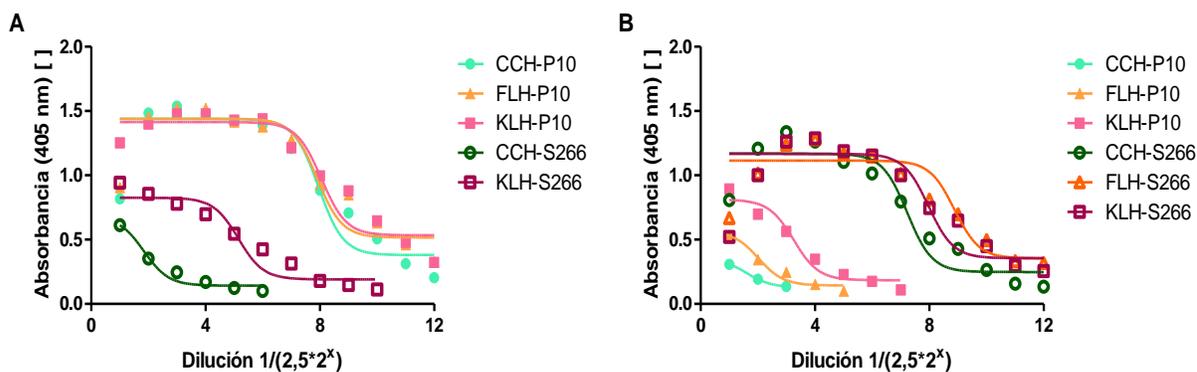


Figura A.6: Reactividad mediante ELISA de sueros de los animales de experimentación contra cada hemocianina-péptido inducido por los conjugados CCH-P10, FLH-P10, KLH-P10, CCH-S266, FLH-S266 y KLH-S266, desafiados con melanoma murino de la línea B16F10. Se muestran los resultados para los ELISA de (A) anticuerpos de clase IgG anti-P10 y (B) anticuerpos de clase IgG anti-S266. Se utilizó un pool de suero de 5 ratones y como anticuerpo secundario se usó suero de conejo anti-IgG Fc de ratón unido a FAL, se midió absorbancia a 405 nm. Se consideró una absorbancia igual a 0,1 DO como punto de corte para la especificidad de la reacción.

Tabla A.9: Log(EC50) de las curvas dosis-respuesta de la Figura A.6. Se muestran los valores para cada grupo evaluado (según el conjugado de inmunización).

Conjugado de Inmunización	Log(EC50) IgG Anti-P10	Log (EC50) IgM Anti-S266
CCH-P10	7,952	1,619
FLH-P10	7,899	2,025
KLH-P10	8,055	3,253
CCH-S266	1,845	7,229
FLH-S266	-	8,881
KLH-S266	5,148	7,969

A.3. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

En la Figura A.7 se muestra la población de células definida por tamaño y granulosidad de las células B16F10, en el ACF realizado con sueros de ratones desafiados con el tumor. En la Figura A.8A se puede ver una población de células homogénea, en términos de tamaño y granulosidad (FSC y SSC, *Forward Scatter* y *Side Scatter*, respectivamente). Una vez definida la población a trabajar, se definió el umbral de fluorescencia como la intensidad a la cual a lo más un 3% de las células control negativo presentan fluorescencia para FITC (cuadrante inferior derecho, Figura A.8B). Por otra parte, se consideró que las células tuvieron reacción positiva con los sueros si al menos un 60% de estas presentaron fluorescencia para FITC, según el umbral y la población ya definidos. En la Figura A.8 se muestran los resultados para sueros diluidos a razón 1:50.

Además, en las Tablas A.10 y A.11 se muestra el análisis estadístico de la citometría de flujo realizada en células de la línea de melanoma murino B16F10, que fueron tratadas con un pool de sueros de ratones inmunizados con los conjugados hemocianina-péptido (A.10), y que fueron tratadas con un pool de sueros de ratones inmunizados con hemocianinas o conjugados y desafiados con melanoma B16F10 (A.11). Aquí se puede observar que en sueros con reactividad positiva hay un corrimiento de los datos a una mayor intensidad de fluorescencia.

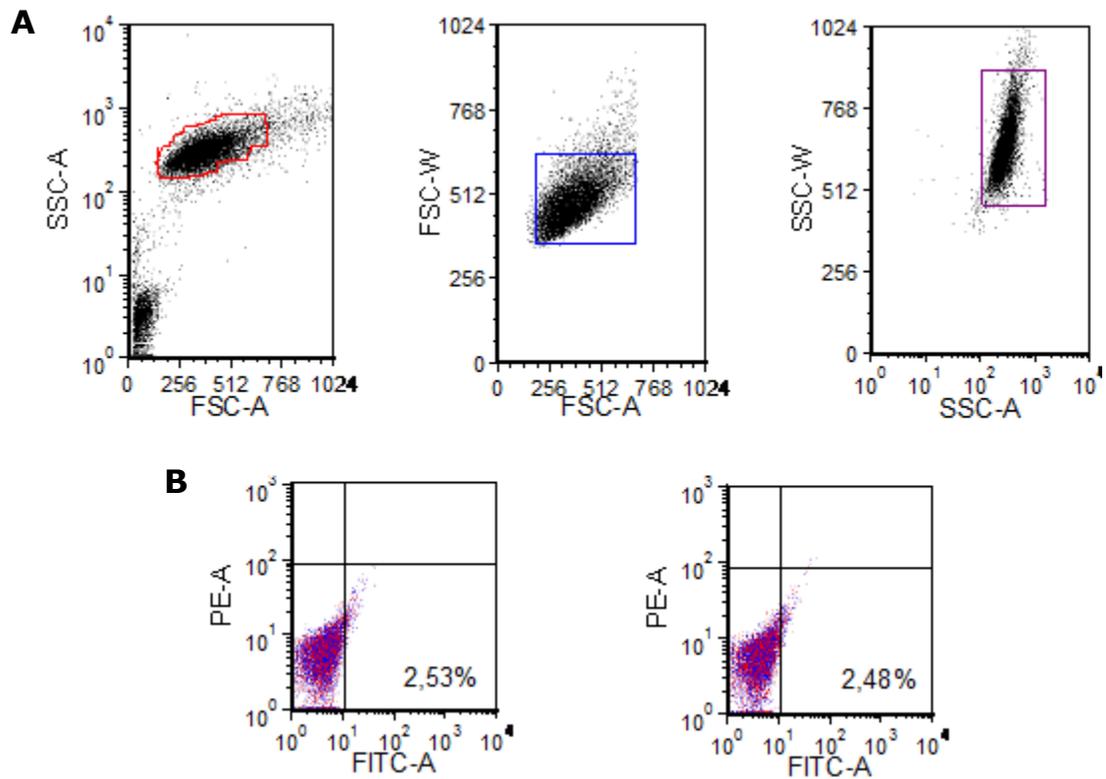


Figura A.7: Definición de la población de células de melanoma B16F10 para ACF de los sueros de ratones C57BL/6 desafiados con el tumor y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH o con los conjugados a P10 y S266. Las células fueron fijadas con paraformaldehído. **A)** Definición de la población según SSC y FCS de las células de melanoma murino de la línea B16F10. **B)** Gráficos de *dots* para células sin tratar con anticuerpos e incubadas únicamente con suero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unidos a fluoresceína (fluorocromo FITC; verde). Los gráficos están definidos por intensidad de fluorescencia para el fluorocromo PE (R-ficocitrina; rojo) versus FITC.

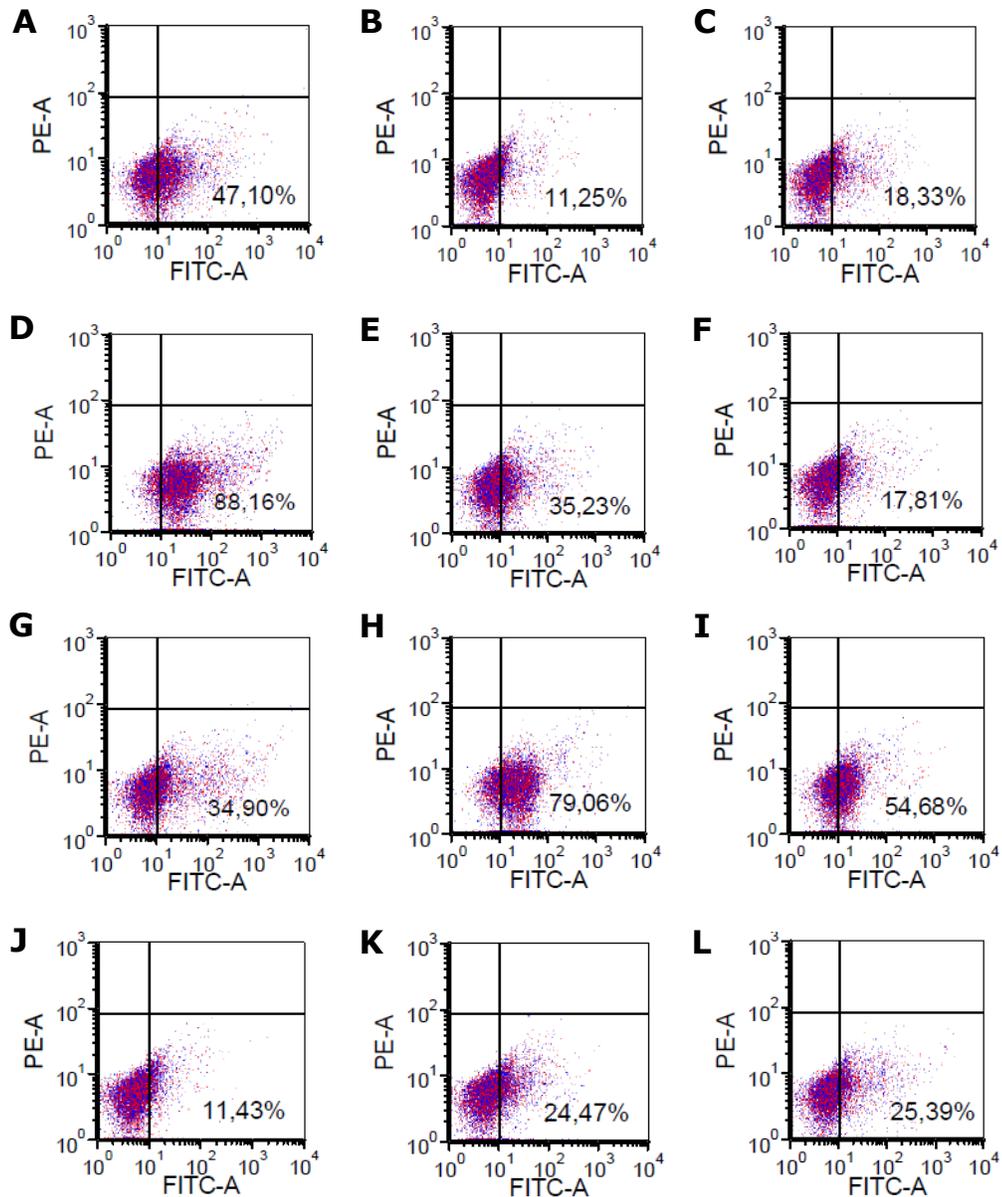


Figura A.8: Detección de anticuerpos por ACF que unen a células de melanoma B16F10, en sueros diluidos a razón 1:50 de ratones C57BL/6 desafiados con el tumor y tratados terapéuticamente con CCH, FLH y KLH, conjugadas o no a P10 y S266. Las células fueron incubadas con un pool de sueros de 5 animales por grupo, luego fueron incubadas con el suero de cabra anti-IgG (H+L) de ratón unido a fluoresceína (fluorocromo FITC; verde) y fijadas en paraformaldehído. **A)** CCH; **B)** CCH-P10; **C)** CCH-S266; **D)** FLH; **E)** FLH-P10; **F)** FLH-S266; **G)** KLH; **H)** KLH-P10; **I)** KLH-S266; y los controles **J)** *sham*; **K)** AddaVax y **L)** PBS. Las imágenes corresponden a gráficos de *dots* de la intensidad del fluorocromo PE (R-ficoeritrina; rojo) versus FITC, para la población celular con características de tamaño y granulosidad definidas en la Figura A.7. EL porcentaje mostrado corresponde al porcentaje de células que presentaron intensidad de fluorescencia para FITC, respecto a los controles negativos (Figura A.7B).

Tabla A.10: Datos estadísticos determinados por ACF en células de melanoma murino B16F10 con sueros de ratones inmunizados con los conjugados hemocianina-péptido. Los datos se presentan para cada suero a una dilución 1:50 y 1:100. El N° de eventos se refiere a la cantidad de células analizadas. La media corresponde a la media geométrica de los datos en el gráfico de puntos, donde el eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia para FITC y el eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia para PE. C1: cuadrante inferior izquierdo, C2: cuadrante inferior derecho. El control negativo son células no tratadas.

Suero	Dilución	N° de Eventos C1; C2	Media C1 EjeX; EjeY	Media C2 EjeX; EjeY	%Células C1 [%]; C2 [%]
Control Negativo	-	9.099; 186	0,00; 0,00	212,04; 241,98	97,97; 3,00
Control FITC	-	11.197; 342	0,00; 0,00	221,54; 258,50	97,02; 2,96
11H3	1:50	11.690; 345	0,00; 0,00	217,93; 245,42	96,96; 2,86
	1:100	11.325; 287	0,00; 0,00	210,43; 233,24	97,52; 2,47
2Q59	1:50	11.122; 271	0,00; 0,00	271,00; 249,44	97,61; 2,38
	1:100	11.457; 318	0,00; 0,00	222,41; 247,60	97,24; 2,70
CCH-P10	1:50	9.806; 1.657	0,00; 0,00	237,99; 179,77	85,44; 14,44
	1:100	10.752; 866	0,00; 0,00	221;00; 188,53	92,38; 7,44
CCH-S266	1:50	11.008; 448	0,00; 0,00	228,41; 215,89	96,01; 3,91
	1:100	11.026; 392	0,00; 0,00	228,03; 234,64	96,46; 3,43
FLH-P10	1:50	10.629; 853	0,00; 0,00	246,10; 191,28	92,39; 7,41
	1:100	10.846; 754	0,00; 0,00	237,18; 218,41	93,16; 6,48
FLH-S266	1:50	939; 10.320	0,00; 0,00	471,64; 252,19	8,32; 91,42
	1:100	2.355; 9.069	0,00; 0,00	330,77; 0,00	20,57; 79,23
KLH-P10	1:50	2.661; 8.973	0,00; 0,00	384,77; 0,00	22,80; 76,90
	1:100	5.923; 5.697	0,00; 0,00	285,69; 0,00	50,70; 48,76
KLH-S266	1:50	10.724; 769	0,00; 0,00	236,36; 218,39	93,05; 6,67
	1:100	11.129; 497	0,00; 0,00	234,24; 0,00	95,60; 4,27

Tabla A.11: Datos estadísticos determinados por ACF en células de melanoma murino B16F10 con sueros de ratones desafiados con el tumor de melanoma y tratados con las hemocianinas o los conjugados. Los datos se presentan para cada suero a una dilución 1:25 y 1:50. El N° de eventos se refiere a la cantidad de células. La media corresponde a la media geométrica de los datos en el gráfico de puntos, donde el eje X corresponde a la intensidad de fluorescencia para FITC y el eje Y corresponde a la intensidad de fluorescencia para PE. C1: cuadrante inferior izquierdo, C2: cuadrante inferior derecho. El control negativo es el

Suero	Dilución	N° de Eventos C1; C2	Media C1 EjeX; EjeY	Media C2 EjeX; EjeY	%Células C1 [%]; C2 [%]
Control Negativo	-	9.704; 252	4,01; 4,98	13,79; 16,07	97,47; 2,53
Control FITC	-	9.912; 252	4,04; 4,95	13,48; 15,54	97,49; 2,48
CCH	1:25	2.878; 7.227	6,98; 4,17	27,84; 5,02	28,25; 71,44
	1:50	5.364; 4.781	6,41; 4,44	21,73; 5,60	52,85; 47,10
CCH-P10	1:25	8.426; 1.739	5,23; 4,73	21,83; 7,93	82,89; 17,11
	1:50	9.036; 1.145	4,79; 4,71	19,74; 8,68	88,74; 11,25
CCH-S266	1:25	7.275; 2.968	5,51; 4,61	27,09; 6,66	71,01; 28,97
	1:50	8.404; 1.887	5,03; 4,70	23,42; 7,18	81,65; 18,33
FLH	1:25	3.160; 6.996	7,24; 4,40	23,73; 5,25	31,11; 68,88
	1:50	1.198; 8.935	7,61; 4,37	31,90; 5,00	11,82; 88,16
FLH-P10	1:25	3.766; 6.346	7,03; 4,51	22,76; 5,15	37,24; 62,76
	1:50	6.538; 3.557	6,11; 4,30	20,34; 5,33	64,76; 35,23
FLH-S266	1:25	7.156; 2.997	6,05; 4,36	20,31; 6,59	70,47; 29,51
	1:50	8.341; 1.807	5,28; 4,58	20,28; 7,44	82,19; 17,81
KLH	1:25	3.830; 6.463	7,18; 4,14	33,18; 5,62	37,20; 62,77
	1:50	6.715; 3.602	6,14; 4,27	29,14; 6,02	65,06; 34,90
KLH-P10	1:25	901; 9.505	7,54; 4,32	37,42; 4,60	8,66; 91,31
	1:50	2.167; 8.180	7,14; 4,42	25,84; 4,81	20,94; 79,06
KLH-S266	1:25	1.960; 8.334	7,52; 4,06	22,68; 4,89	19,04; 80,96
	1:50	4.581; 5.527	7,08; 4,12	17,49; 5,29	45,32; 54,68
Sham	1:25	7.986; 2.089	5,53; 4,54	18,12; 6,80	79,26; 20,73
	1:50	8.989; 1.160	4,93; 4,63	17,61; 8,49	88,57; 11,43
AddaVax	1:25	6.860; 3.275	5,65; 4,34	21,91; 6,36	67,68; 32,31
	1:50	7.626; 2470	5,25; 4,46	20,98; 7,04	75,53; 24,47
PBS	1:25	6.400; 3.834	5,99; 3,96	24,78; 5,74	62,52; 37,46
	1:50	7.530; 2.563	5,47; 4,42	23,37; 6,77	74,61; 25,39

A.4. REACCIÓN DE DTH

Las Tablas A.12 y A.13 contienen los resultados de la reacción de DTH estimulada por la inyección del péptido P10, en el primer caso, y por el péptido S266, en el segundo caso, en ratones tratados terapéuticamente con hemocianin y el péptido respectivo. Las tablas incluyen tres mediciones, hechas con un microcaliper, del cojinete del pie derecho y del pie izquierdo de cada animal al tiempo inicial (0) y luego a las 24, 48 y 72 horas post-inyección. La Tabla A.14 incluye los resultados para el control usando PBS, vehículo de los compuestos en todas las inoculaciones.

Tabla A.12: Datos crudos de la reacción de DTH luego de una inyección con P10, en ratones tratados terapéuticamente con conjugados hemocianina-P10. Se muestran los resultados de medición del cojinete del pie derecho (der) e izquierdo (izq) de cada ratón, por grupo, a las 0, 24, 48 y 72 horas post-inyección. T.: tiempo.

T. [h]	Pie	CCH-P10 Ratón					FLH-P10 Ratón					KLH-P10 Ratón				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
0	Der	2,39	2,10	1,99	2,14	1,98	2,01	1,92	2,15	1,92	2,05	1,95	1,95	1,92	1,85	2,07
		2,37	2,10	1,93	2,04	2,05	2,04	1,95	2,00	2,00	2,00	1,93	1,93	1,94	1,86	2,10
		2,10	2,12	2,00	2,02	2,02	1,95	2,00	2,00	2,02	2,20	1,94	1,93	1,90	2,05	2,25
	Izq	2,30	2,10	2,11	2,27	1,94	2,15	2,06	2,33	1,95	2,20	2,04	2,02	1,98	1,95	1,92
		2,60	2,02	2,12	2,00	2,05	2,05	2,11	2,15	1,94	2,05	2,04	2,00	1,95	1,93	1,90
		2,50	1,88	2,05	2,05	2,03	1,97	2,11	2,18	1,92	2,07	2,04	1,98	2,00	1,85	2,06
24	Der	1,92	1,96	2,09	1,90	1,90	2,17	1,97	2,00	1,97	1,95	2,05	1,93	1,91	1,86	1,90
		1,93	2,33	2,07	1,92	1,95	2,04	1,95	2,00	1,92	1,95	1,99	1,85	1,90	1,85	1,95
		1,85	2,20	2,10	1,85	2,15	2,04	1,90	2,05	1,91	2,01	1,91	1,94	2,03	1,80	2,15
	Izq	2,20	2,45	2,36	2,30	2,47	2,48	2,48	2,85	2,45	2,30	2,66	2,40	2,50	2,13	2,20
		2,15	2,50	2,21	2,37	2,40	2,47	2,42	2,85	2,40	2,35	2,75	2,43	2,53	2,10	2,25
		2,05	2,60	2,40	2,37	2,30	2,35	2,49	2,80	2,60	2,35	2,80	2,30	2,65	2,03	2,23
48	Der	2,03	1,98	2,11	1,96	1,97	2,05	1,96	2,02	2,01	1,91	1,94	2,00	1,88	1,88	2,13
		2,08	2,04	2,04	1,94	2,01	2,02	1,95	1,99	1,99	1,89	1,95	2,00	1,84	1,91	2,09
		2,00	2,04	2,07	2,05	2,09	2,02	2,00	1,95	1,96	1,90	1,93	2,00	1,90	1,93	2,07
	Izq	2,31	2,40	2,52	2,24	2,50	2,30	2,43	2,34	2,42	2,05	2,18	2,34	2,10	2,31	2,19
		2,24	2,45	2,41	2,17	2,48	2,25	2,38	2,31	2,45	2,01	2,16	2,31	2,10	2,30	2,15
		2,19	2,48	2,33	2,15	2,54	2,15	2,41	2,21	2,40	2,00	2,15	2,36	2,21	2,24	2,20
72	Der	1,95	1,93	2,04	1,95	2,04	2,09	2,02	2,07	1,90	2,07	2,00	2,02	1,94	2,05	2,10
		1,92	1,96	2,10	1,86	1,98	1,99	1,96	2,00	1,89	1,98	1,95	2,01	1,89	2,07	2,06
		1,89	2,04	2,15	1,91	2,12	2,08	1,96	1,98	1,88	1,99	1,93	1,99	2,03	1,98	2,20
	Izq	2,26	2,25	2,36	2,05	2,28	2,26	2,44	2,20	2,25	2,14	2,25	2,14	2,11	2,29	2,24
		2,28	2,27	2,30	2,23	2,22	2,23	2,39	2,34	2,25	2,12	2,23	2,12	2,17	2,22	2,27
		2,25	2,36	2,18	2,12	2,22	2,22	2,47	2,30	2,23	2,05	2,20	2,22	2,15	2,14	2,33

Tabla A.13: Datos crudos de la reacción de DTH luego de una inyección con S266, en ratones tratados terapéuticamente con conjugados hemocianina-S266. Se muestran los resultados de la medición del cojinete del pie derecho (der) e izquierdo (izq) de cada ratón, por grupo, a las 0, 24, 48 y 72 horas post-inyección. Además, se incluyen los datos de ratones inyectados con PBS y tratados terapéuticamente con PBS. T.: tiempo.

T. [h]	Pie	CCH-S266 Ratón					FLH-S266 Ratón		KLH-S266 Ratón					PBS Ratón
		1	2	3	4	5	1	5	1	2	3	4	5	2
0	Der	1,98	2,04	2,05	1,96	1,92	1,83	2,02	1,87	1,95	1,99	2,29	1,85	2,01
		1,95	2,05	2,03	1,90	1,90	1,92	2,08	1,94	1,93	2,03	2,20	1,85	1,99
		1,92	1,98	2,02	1,92	1,90	1,81	2,03	1,93	1,94	1,93	2,11	1,85	2,00
	Izq	1,92	1,96	1,96	1,95	1,85	1,89	1,90	1,92	1,85	1,93	2,05	1,95	2,01
		1,98	1,99	1,98	1,96	2,00	1,99	1,95	1,93	1,84	1,95	1,96	2,00	2,03
		2,02	2,05	2,05	1,84	1,82	2,00	1,86	1,91	1,84	2,00	1,97	2,11	1,93
24	Der	2,15	2,27	2,24	2,35	1,90	2,12	2,10	2,27	2,34	2,35	2,45	2,26	2,15
		2,20	2,30	2,25	2,39	2,02	2,15	2,10	2,30	2,32	2,40	2,32	2,22	2,12
		2,16	2,27	2,16	2,15	1,95	2,20	2,05	2,32	2,35	2,42	2,28	2,21	2,11
	Izq	1,96	2,05	1,95	2,05	1,87	2,02	1,87	1,90	1,90	2,02	1,92	1,93	2,08
		1,95	2,04	1,94	2,02	1,85	2,00	1,90	1,87	1,91	2,00	1,85	1,94	1,99
		2,02	2,08	1,90	1,97	1,88	1,98	1,95	1,95	1,95	1,95	1,88	2,04	1,98
48	Der	2,28	2,31	2,29	2,20	1,92	2,40	2,20	2,39	2,14	2,34	2,44	2,35	2,15
		2,22	2,35	2,25	2,25	2,12	2,40	2,23	2,30	2,20	2,29	2,31	2,28	2,18
		2,24	2,40	2,29	2,12	2,15	2,30	2,12	2,45	2,22	2,28	2,32	2,30	2,16
	Izq	1,84	2,05	1,98	2,02	1,96	2,14	1,97	1,88	2,01	1,99	2,02	2,04	2,04
		1,82	1,95	1,93	2,10	1,95	2,09	1,93	1,90	1,98	2,03	1,99	2,00	1,95
		1,81	1,95	1,93	2,00	2,05	2,03	1,97	1,91	2,01	1,97	1,95	1,97	1,93
72	Der	2,11	2,26	2,26	2,05	2,21	2,35	2,15	2,12	2,35	2,34	2,25	2,25	2,07
		2,06	2,10	2,28	2,15	2,26	2,30	2,10	2,22	2,27	2,23	2,25	2,22	2,06
		2,10	2,10	2,19	2,09	2,34	2,38	2,11	2,10	2,26	2,24	2,15	2,10	1,98
	Izq	1,98	2,04	2,05	1,96	1,92	1,83	2,02	1,87	1,95	1,99	2,29	1,85	2,01
		1,95	2,05	2,03	1,90	1,90	1,92	2,08	1,94	1,93	2,03	2,20	1,85	1,99
		1,92	1,98	2,02	1,92	1,90	1,81	2,03	1,93	1,94	1,93	2,11	1,85	2,00

A.5. SOBREVIVENCIA Y AUTOPSIA

La Tabla A.14 recopila los resultados del destino de los animales de experimentación, en cuanto a su muerte (natural o inducida), necrosis del tumor y también si se realizó o no autopsia para ver la presencia de metástasis en el bioensayo en que los animales fueron desafiados con melanoma B16F10 y tratados con hemocianinas o conjugados hemocianina-peptido, teniendo como controles el grupo *sham*, AddaVax y PBS.

Tabla A.14: Razón de muerte, necrosis y resultado de autopsia en ratones C57BL/6 desafiados con melanoma murino B16F10 y fueron tratados con hemocianinas o conjugados. La hiperplasia observada fue en el bazo.

Grupo	Ratón	Tipo de Muerte	Necrosis	Autopsia	Órganos Metastásicos	Observaciones
<i>Sham</i>	1	Inducida	No	Sí	Bazo	
	2	Inducida	Sí	Sí		
	3	Inducida	No	Sí		
	5	Inducida	No	Sí		
AddaVax	1	Inducida	No	No		
	2	Tumor	Sí	No		
	3	Inducida	Sí	Sí		
	5	Inducida	No	No		
PBS	1	Inducida	Sí	Sí	Pulmón y riñón	
	2	Inducida	No	Sí		
	4	Inducida	No	Sí		
	5	Inducida	No	Sí		
CCH	3	Inducida	No	Sí	Pulmón y bazo	Hiperplasia
	4	Inducida	Sí	Sí		
FLH	1	Inducida	No	Sí		
KLH	5	Inducida	No	Sí		
CCH-P10	1	Inducida	No	Sí	Bazo	Hiperplasia
	2	Inducida	No	Sí		
	4	Inducida	Sí	Sí		
	5	Inducida	No	Sí		
FLH-P10	3	Inducida	No	Sí		Hiperplasia
	5	Inducida	No	Sí		
KLH-P10	5	Inducida	No	Sí	Pulmón	
CCH-S266	4	Inducida	No	Sí	Bazo	
	5	Inducida	No	Sí		
FLH-S266	2	Anestesia DTH	No tumor	No		
	3	Anestesia DTH	No tumor	No		
	4	Anestesia DTH	No tumor	No		
	5	Inducida	No	Sí		

B. MEMORIA DE CÁLCULO

B.1. TEST DE ELLMAN: HEMOCIANINAS ACTIVADAS CON SULFO-SMCC

La curva de calibración de la cisteína, al hacer reaccionar muestras de cisteína de concentración conocida con el reactivo de Ellman, permitió determinar la pendiente de la recta mediante regresión lineal de los datos. La pendiente de la curva correlaciona la absorbancia de las muestras (y), medida a 405 nm, con la concentración de cisteína nM que hay en solución (x) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$x = \frac{y}{m}; \quad m = \text{pendiente de la recta}$$

Así, para una pendiente igual a 0,227 y una muestra con absorbancia igual a 0,011, la concentración de cisteína es 0,05 [mM]. Luego, la concentración resultante se multiplicó por el factor de dilución para determinar la concentración de cisteína en las muestras originales.

La diferencia entre la concentración de cisteína en solución de muestras de hemocianinas no activadas y de hemocianinas activadas con sulfo-SMCC corresponde a la cisteína que se unió a la maleimida de hemocianinas activadas. Conociendo la concentración inicial de las muestras, que fue equivalente al exceso molar de sulfo-SMCC que se agregó a la reacción con las hemocianinas, y conociendo la concentración de cisteína unida, se pudo obtener el porcentaje de cisteína que se unió a las proteínas activadas. Esto dio como resultado el porcentaje de sulfo-SMCC que se unió a las hemocianinas.

B.2. TITULACIÓN DE SUEROS MEDIANTE TEST DE ELISA

Teniendo las curvas dosis-respuesta de las reacciones de ELISA de los sueros contra un antígeno dado, se pudo obtener el valor del logaritmo de la EC50, que en este caso corresponde al punto de inflexión de la curva. El valor de Log(EC50) fue calculado por el software GraphPad Prism, como una regresión no lineal de los datos. Luego, el valor de la EC50, que corresponde al título de anticuerpos que reaccionó con el antígeno, se calculó usando la siguiente ecuación:

$$EC50 = x \cdot 2^{\text{Log}EC50}$$

donde x es el factor de dilución inicial del suero.

Así, con un $\text{Log}(\text{EC}_{50})$ igual a 5,885, para un suero con una dilución inicial igual a 1:40 (suero CCH-P10 anti-hemocianina, Tabla A.5), el valor del título fue equivalente a:

$$40 \cdot 2^{5,885}$$

B.3. REACCIÓN DE DTH

Se registraron 3 mediciones del cojinete del pie derecho e izquierdo de los ratones estimulados con una inyección de P10, en ratones tratados con conjugados a P10, y una inyección de S266, en ratones tratados con conjugados a S266, en los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas post-inyección. En cada tiempo se calculó la diferencia de espesor entre el cojinete del pie izquierdo y el del pie derecho, y se calculó un promedio de los 3 datos obtenidos para cada ratón. Luego se graficaron los promedios y el error de la media asociado a cada grupo de terapia, en el software computacional Graph Pad Prism, donde se realizó un ANOVA de dos vías, seguido de un post-test con Bonferroni, para determinar la significancia en cada tiempo.

C. PROPIEDADES DE LOS PÉPTIDOS P10 Y S266⁹⁹

i) Secuencias¹¹:

P10: GVVWRYTAPVHLGDG
S266: IRIQRGPGRAFVTIGKI

ii) Peso Molecular:

P10: 1626,8 [Da]
S266: 1882,2 [Da]

iii) pI teórico:

P10: 6,74
S266: 12,30

iv) Coeficiente de extinción:

P10: 6990 [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
S266: No sería visible espectrofotométricamente, por la ausencia de aminoácidos Trp, Tyr o Cys.

v) Vida media estimada:

P10: 30 horas en reticulocitos de mamífero in vitro.
S266: 20 horas en reticulocitos de mamífero in vitro.

vi) Valor GRAVY (Grand average of hydropathicity):

P10: 0,087

S266: 0,141