

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO DEL ROL DE CALRETICULINA DE  
*Trypanosoma cruzi* EN LA RESPUESTA INMUNE CELULAR  
INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO TUMORAL MAMARIO**

**HAYDEÉ GABRIELA PAULETTE GALLARDO AGUILERA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
MENCIÓN INMUNOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dr. Arturo Ferreira Vigouroux**

**2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

**HAYDEÉ GABRIELA PAULETTE GALLARDO AGUILERA**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biomédicas con mención en Inmunología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de Julio del 2016

**Prof. Dr. Arturo Ferreira Vigouroux**

**Director de Tesis**

**Facultad de Medicina - Universidad de Chile**

Comisión Informante de Tesis:

**Prof. Dra. Gittith Sánchez**

\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Juan Carlos Aguillón**

\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Héctor Contreras**

\_\_\_\_\_

**Prof. Dra. María Carmen Molina**

\_\_\_\_\_

*(Presidente Comisión)*

*"Para mi Madre Gabriela, mi Padre Allain, mis amores Ramón y Pedro por ayudarme a alcanzar mi anhelada meta".*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera especial a mi tutor de Tesis, el Doctor Arturo Ferreira, quien fue un pilar fundamental para finalizar este proyecto. Me dio su confianza, la opción de elegir el proyecto de investigación a desarrollar y la oportunidad de pertenecer a su importante grupo de laboratorio.

En este Laboratorio encontré la ayuda de quienes se convirtieron en mis compañeros y amigos, en los cuales me apoyé para resolver dudas y desarrollar mi tesis. Gracias a: *Ismael Maldonado, Paula Abello, Lorena Aguilera, Andrea González, Carlos Rosas, Katherine Weinberger, Carolina Valck, Leonora Duaso, Eduardo Sosoniuk, Gerardo Vallejos, Jaime Peña, Javier Pizarro, Ruth Mora, Nancy Fabre y Álvaro Rojas.*

Agradezco además a mis correctores de Tesis, en especial a Dra. María Carmen Molina y Carolina Ribeiro por demostrar preocupación por mis avances y conocimientos.

## 1. ÍNDICE

1. Índice	5
2. Abreviaturas	7
3. Resumen	9
4. Abstract	10
5. Introducción	11
5.1. Importancia del Estudio	11
5.2. Generalidades de Biología del Cáncer	11
5.3. Angiogénesis	12
5.4. Calreticulina: Aspectos Generales	12
5.5. Regulación de la Proliferación de Células Cancerígenas por CRT	13
5.6. CRT en Membrana, Señal de Fagocitosis	13
5.7. Relación entre cáncer y el sistema inmune	13
5.8. Terapias Contra el Cáncer	17
5.9. <i>Trypanosoma cruzi</i> y su Efecto Antitumoral	18
5.10. Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
5.10.1. Efecto anticomplemento	19
5.10.2. Efecto antitumoral	19
5.10.3. Efecto antiangiogénico	22
5.11. Elementos Racionales Principales que Conducen a la Hipótesis	23
6. Hipótesis	24
7. Objetivo General	24
8. Objetivos Específicos	24
9. Materiales y Métodos	25
9.1. Animales	25
9.2. Células tumorales	25
9.3. rTcCRT	25
9.4. Diseño Experimental	25

9.4.1. Inoculación Inicial (día 0)	25
9.4.2. Inoculación de rTcCRT	26
9.4.3. Extracción de Tejidos Tumoraes	26
9.5. Extracción mRNA de Tejidos Tumoraes	26
9.6. Transcripción Reversa (RT) y qPCR	26
9.7. Citometría de Flujo	28
9.8. Análisis Estadístico	29
<b>10. Resultados</b>	<b>30</b>
10.1. rTcCRT Inhibe el Crecimiento de un Adenocarcinoma Mamario	30
10.2. La Inoculación de rTcCRT no Induce Variaciones Detectables a Nivel de mRNA de MmCRT del Adenocarcinoma Mamario	31
10.3. Se detecta mayor cantidad de CRT en las Células del Tejido Tumoral de aquellos Ratones Tratados con rTcCRT	33
10.4. La Terapia Experimental con rTcCRT Aumentó la Población de Linfocitos que Infiltran el Adenocarcinoma Mamario	35
<b>11. Discusión</b>	<b>37</b>
<b>12. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>13. Anexos</b>	<b>43</b>
13.1. Aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Chile	43
<b>14. Bibliografía</b>	<b>45</b>

## 2. ABREVIATURAS

Ab	=	Antibodies (Anticuerpo)
Ac	=	Anticuerpo
ADCC	=	Citotoxicidad Celular Mediada por Anticuerpos
ADN	=	Acido Desoxiribonucleico
AJ	=	Cepa de Ratones homocigoto Cdh23 <sup>ahl</sup> Jackson Lab.
APC	=	Alofocianina
Ca <sup>+2</sup>	=	Calcio
CRT	=	Calreticulina
Ct	=	Ciclo umbral
DC	=	Célula Dendrítica
dNTP	=	Deoxinucleósido Trifosfato
EE	=	Extracto de Epimastigotes
ELISA	=	Ensayo Inmuno Absorbente Ligado a Enzimas
FITC	=	Isotiocianato de Fluoresceína
HuCRT	=	Calreticulina Humana
ICAM	=	Molécula de Adhesión Intercelular
Ig	=	Inmunoglobulina
LT	=	Linfocitos T
µg	=	Microgramo(s)
MgCl	=	Cloruro de Magnesio
MHC	=	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
µl	=	Microlitro(s)
µM	=	micromolar
mm <sup>3</sup>	=	milímetros cúbicos
MmCRT	=	Calreticulina Murina
mRNA	=	mensajero de Acido Ribonucleico
NK	=	Natural Killer
NKG2D	=	Receptor Natural Killer Grupo 2, miembro D
NKT	=	Natural Killer T
OMS	=	Organización Mundial de la Salud
PECy7	=	Ficoeritrina Cianina 7

qPCR	=	Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa
RE	=	Retículo Endoplásmico
rTcCRT	=	Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i> recombinante
RT-PCR	=	Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
s.c.	=	sub cutáneo
SFB	=	Suero Fetal Bovino
SPI	=	Suero Preinmune
TA3-MTXR	=	Adenocarcinoma mamario Resistente a Metotrexato
TAP	=	Transportador asociado al Procesamiento de Antígeno
TcCRT	=	Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i>	=	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Th1	=	Linfocitos T ayudadores 1
Th2	=	Linfocitos T ayudadores 2
TIL	=	Linfocitos Infiltrantes de Tumor
VCAM	=	Molécula de Adhesión de la Célula Vasular
VEGF	=	Factor de Crecimiento del Endotelio Vasular

### 3. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, y año a año aumentan las cifras de nuevos casos. Es un proceso complejo de proliferación celular no regulada, favorecido por la angiogénesis, que le brinda al tumor oxígeno, nutrientes y la posibilidad de eliminar productos catabólicos, lo que le permite crecer y eventualmente metastizar. Hace aproximadamente ocho décadas, se describió la inhibición de tumores malignos implantados en ratones, concomitantemente infectados con *Trypanosoma cruzi* y, en humanos, se observó el efecto antitumoral de la inoculación de extractos de este parásito. Sin embargo, no se identificó moléculas parasitarias responsables. Estudios más recientes mostraron el efecto antitumoral de Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT). Esta proteína es translocada desde el retículo endoplásmico a la zona de emergencia flagelar del parásito, donde inhibe al sistema del complemento, sirve de señal profagocítica, y media efectos antiangiogénicos que protegen al hospedero de agresiones neoplásicas. Calreticulina (CRT) de mamíferos tiene varias funciones intracelulares; como reguladora de la homeostasis del calcio, de la expresión de genes y del plegamiento de proteínas. Aunque, dependiendo del tipo tumoral, su sobreexpresión se ha asociado a mayor capacidad metastásica, su localización superficial, en general, es señal de daño, conduciendo a la fagocitosis de la célula y, en el caso de las células tumorales conduciría, además, a la activación de una respuesta inmune. Este proyecto propone que, al inhibir la angiogénesis, TcCRT recombinante (rTcCRT) genera un microambiente estresante para células tumorales. En respuesta, éstas translocan CRT murina (MmCRT) a la superficie celular. Por otra parte, rTcCRT inoculada podría unirse a la superficie de la células del tumor, generando señales profagocíticas, lo que mediaría una respuesta inmune, resultante en una mayor infiltración linfocitaria en el tejido tumoral, contribuyendo a un menor desarrollo de la neoplasia. Para abordar esta posibilidad se utilizó un modelo *in vivo* de adenocarcinoma mamario murino resistente a metotrexato (TA3-MTXR). Se obtuvo tejido tumoral de ratones, tratados o no con rTcCRT, se analizó la expresión del mRNA de MmCRT mediante qPCR y, por citometría de flujo, se analizó la cantidad de CRT en superficie y la infiltración linfocitaria. Se detectó una mayor cantidad de CRT en la superficie de las células del tejido tumoral de animales que recibieron rTcCRT, y una mayor infiltración de LTCD4<sup>+</sup> y LTCD8<sup>+</sup> en los mismos. Por otra parte, el tratamiento con rTcCRT no afectó los niveles de expresión del mRNA de MmCRT en el tejido tumoral. En síntesis, rTcCRT, modula la respuesta inmune, aumentando señales profagocíticas, la infiltración linfocitaria, conduciendo a la inhibición del crecimiento tumoral.

#### 4. ABSTRACT

Cancer is a major cause of morbidity and mortality worldwide, and the number of new cases increases yearly. Cancer is a complex process of unregulated cell proliferation, favored by angiogenesis, which provides tumors with oxygen, nutrients and eliminates accumulation of catabolic products, allowing the tumor to grow and eventually metastasize. Eight decades ago, inhibition of malignant tumors implanted in mice concomitantly infected with *Trypanosoma cruzi*, was described and, on the other hand, antitumor effects of inoculated parasite extracts was observed in humans. However, it was not possible to identify the responsible parasite molecules. Recent studies showed the antitumor effect of *T. cruzi* calreticulin (TcCRT). This protein is translocated from the endoplasmic reticulum to the area of flagellum emergence in this parasite. There, it inhibits the complement system, serves as pro phagocytosis signal, and has antiangiogenic properties that protect the host from neoplastic aggressions. Calreticulin (CRT) from mammals has several intracellular functions; as a regulator of calcium homeostasis, gene expression and protein folding. Although, depending on tumor type, its overexpression has been associated with increased metastatic ability, in general, CRT surface location, is a sign of damage, leading to the phagocytosis of the cell by macrophages. In tumor cells, surface CRT would lead also, to activation of an immune response. In this project it is proposed that, by inhibiting angiogenesis, recombinant TcCRT (rTcCRT) generates a stressful microenvironment for tumor cells. In response, they translocate murine CRT (MmCRT) to the cell surface, as a sign of damage, or rTcCRT upon binding surface tumor cells, generates "eat me signals", thus mediating an immune response, resulting in increased infiltration of lymphocytes in the tumor tissue, contributing to impaired development. To address this possibility, an *in vivo* murine methotrexate resistant (TA3-MTXR) mammary adenocarcinoma model was used. Tumor tissue was obtained from mice treated or untreated with rTcCRT, to analyze the mRNA expression of MmCRT by qPCR and, by flow cytometry, the expression of CRT surface and infiltrating lymphocytes was analyzed. The results show increased expression of CRT on the surface of tumor cells of animals receiving rTcCRT, and increased CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte infiltration in these treated tumors. Moreover, rTcCRT did not affect the levels of expression of messenger RNA of murine CRT in tumor tissues. In short, rTcCRT modulates the immune response, inducing "eat-me signals", increased infiltrating lymphocytes, resulting inhibition of tumor growth.

## **5. INTRODUCCION**

### **5.1 Importancia del Estudio**

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo; en el 2012 hubo unos 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas. Se prevé que el número de nuevos casos aumente en aproximadamente un 70% en los próximos 20 años. Más del 60% de estos casos se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo<sup>1</sup>.

El porcentaje de muertes por cáncer en Chile es el doble de hace 40 años (en 1960 era 9% y en el 2009 de 25%), siendo la segunda causa de fallecimiento, precedida por las enfermedades cardiovasculares. Durante el 2012, los cánceres diagnosticados en Chile con más frecuencia en el hombre fueron los de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. En cambio, en la mujer fueron los de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago<sup>2</sup>.

Por otra parte, la descripción de cómo la inflamación, el crecimiento de los vasos sanguíneos y la modificación de la respuesta inmune median el crecimiento tumoral, proporciona opciones, experimentales preclínicas, de tratamiento del cáncer. Sin embargo, en un escenario metastásico, las opciones terapéuticas actuales, aunque drásticas, son claramente insuficientes. Por ende, profundizar en investigaciones al respecto es fundamental, y la OMS junto al Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer colaboran con otras organizaciones con el fin de aumentar el compromiso político en la prevención y control del cáncer<sup>1</sup>.

### **5.2 Generalidades Sobre Biología del Cáncer**

En general, el cáncer se caracteriza por la acumulación de un número variable de alteraciones genéticas y por la pérdida de procesos regulatorios de la célula normal, que adquiere la capacidad de invadir de forma progresiva, y por distintas vías, a órganos próximos, o incluso diseminándose a distancia (metástasis)<sup>3-4</sup>. Un evento clave del crecimiento tumoral y la metástasis lo constituye la angiogénesis<sup>5</sup>.

### **5.3 Angiogénesis**

Es la generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que proveen a las células tumorales oxígeno, nutrientes y posibilidad de eliminar productos catabólicos, lo que les permite crecer en forma exponencial. La angiogénesis es un elemento esencial para la formación de metástasis al proporcionar a la célula cancerígena sitios de entrada a la circulación sistémica<sup>5</sup>.

Los tumores con capacidad de expandirse a un tamaño microscópico menor a 0.5 mm, pueden permanecer latentes por meses, hasta que ocurre un desbalance entre los reguladores proangiogénicos y los antiangiogénicos<sup>5</sup>.

### **5.4 Calreticulina: Aspectos Generales**

Nuestro organismo, cuenta con inhibidores de la angiogénesis, como angiotensina, trombospondina, endostatina y calreticulina<sup>6</sup>. CRT es una molécula multifuncional, predominantemente localizada en el retículo endoplásmico (RE) y altamente conservada en diversas especies. La regulación de la expresión de CRT puede estar asociada a procesos biológicos o patológicos, ya que la depleción de  $\text{Ca}^{2+}$  o el estrés de RE son importantes activadores de la expresión del gen de CRT.

CRT, compuesta por 3 dominios, N, P y C, es sintetizada con una señal de escisión en la región N-terminal y una señal KDEL de retención en el RE, en la región C-terminal. La región N-terminal es un dominio globular que puede interactuar con  $\alpha$ -integrinas, mediando así la adhesión celular, y es un sitio de unión al ADN. Además, puede interactuar con el dominio P para generar su función de chaperona, involucrada en el control de calidad durante la síntesis de proteínas. El dominio P controla el plegamiento de proteínas y une  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad y baja capacidad. El dominio C une  $\text{Ca}^{2+}$  con alta capacidad y baja afinidad. Estos 2 últimos dominios hacen de CRT un regulador intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual participa en muchos procesos celulares. Más del 50% del  $\text{Ca}^{2+}$  almacenado en el RE se asocia a CRT<sup>7</sup>.

## **5.5 Regulación de la Proliferación de Células Cancerígenas por CRT**

Investigaciones en tumores humanos demuestran que CRT se encontraría sobreexpresada a niveles de RNA mensajero (mRNA) y niveles proteicos en células cancerígenas, lo que les confiere a éstas una mayor posibilidad de migración y proliferación, facilitando la metástasis. Por el contrario, inhibir la expresión del mRNA de CRT impide el crecimiento tumoral y las metástasis<sup>8</sup>. Dichas investigaciones no han enfocado sus análisis a la localización celular exacta de la proteína sobreexpresada, y sólo discuten que el efecto de CRT sobre la proliferación celular es dependiente del tipo de tumor<sup>8</sup>.

## **5.6 CRT en Membrana, Señal de Fagocitosis**

Si bien CRT tiene una señal de retención en el RE (KDEL), la chaperona puede ser expuesta sobre la superficie de la membrana de células en apoptosis o cancerígenas facilitando así la fagocitosis por macrófagos<sup>9-10</sup>. El daño celular promueve la localización de la proteína en superficie, y se puede inducir experimentalmente su expresión en membrana<sup>11</sup>, ya sea por shock térmico o tratando a las células con antraciclinas (antibióticos que dañan el ADN y se utilizan como quimioterapia en pacientes con cáncer), así se logra la fagocitosis de estas células, por tener CRT expresada en la superficie, y con ello montar una respuesta inmune<sup>12</sup>.

Este tipo de fagocitosis nos da la clave para analizar la expresión de CRT en la superficie de las células del tejido tumoral y poder analizar los mecanismos inmunes involucrados y dirigir una estrategia para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

## **5.7 Relación entre cáncer y el sistema inmune**

El sistema inmunitario controla el cáncer al identificar y eliminar de manera temprana las células cancerosas, este mecanismo se denomina inmunovigilancia. Estudios contemporáneos de inmunidad ahora han generado una propuesta más matizada de la participación de la inmunidad en la regulación neoplásica. Este modelo se llama inmunoedición; incorpora observaciones de procesos tanto inhibidores de tumor como potenciadores del tumor, mediados por el sistema inmunitario.

Las tres fases actualmente propuestas son: eliminación, equilibrio y escape. La

primera fase, eliminación, es la perspectiva tradicional del sistema inmunitario como un participante importante en la identificación de células cancerosas recién formadas y la destrucción de las mismas. El equilibrio es la segunda fase propuesta, caracterizada por un estado de equilibrio entre destrucción y supervivencia de un número pequeño de células neoplásicas. Evidencia clínica sugiere que la fase 2 puede continuar hasta décadas después del surgimiento de un tumor. La identificación de células transformadas residuales y el establecimiento de ellas como objetivo durante esta ventana es un desafío para el sistema inmune. El escape es la fase final de la progresión del cáncer, cuando las más agresivas y menos inmunogénicas de las células tumorales residuales empiezan a crecer, desarrollarse y propagarse. Casi todos los estudios de investigación básicos se han enfocado en el papel del sistema inmunitario en la fase de eliminación, donde procesos tanto innatos como adaptativos identifican células transformadas y las establecen como objetivo para destrucción, lo cual a veces prepara el terreno para lo que ocurrirá durante las fases de equilibrio y escape<sup>13</sup>.

Se han identificado vías inmunitarias claves que median la erradicación del tumor. En cuanto a respuestas antitumorales se encuentran las respuestas inmunes innatas, dominadas por macrófagos activadores de la inmunidad, células dendríticas que efectúan presentación cruzada, y células NK. Estas células, y las citoquinas que producen, ayudan a desencadenar fuertes respuestas de Th1 y Linfocitos T Citotóxicos, que se asocian con un buen pronóstico y regresión tumoral. Dentro de las vías inmunitarias que median la erradicación del tumor tenemos:

a) Inhibidores innatos del cáncer: las células asesinas naturales (NK), figuraron entre el primer tipo de célula que se reconoció por su capacidad inherente para destruir células tumorales. En los mecanismos de reconocimiento de células NK se utiliza una serie de receptores de superficie que muestran respuesta a un equilibrio de señales activadoras e inhibitoras derivadas de células propias. Sus acciones se desencadenan, por lo tanto, según la unión de ligandos a sus respectivos receptores. La detección de lo "propio faltante" es al menos una de las maneras por las cuales las NK participan en la identificación de células tumorales y la erradicación de las mismas, éstas reconocen y matan células tumorales por carecer de MHC clase I, inactivación de receptores inhibidores o sobreexpresión de receptores activadores como NKG2D<sup>13</sup>.

NKG2D ha surgido como uno de los receptores expresados por NK más importantes, que reconoce ligandos frecuentemente sobreexpresados en células tumorales.

Además, este grupo de células se distinguen por la expresión de CD56<sup>Bright</sup>/CD16<sup>Dim</sup>, este grupo tiende a producir IFN- $\gamma$ , que aumenta las actividades fagocíticas de los macrófagos, influyendo también sobre la diferenciación de subgrupos de linfocitos CD4<sup>+</sup> ayudadores, al inhibir la proliferación Th2 y estimular el desarrollo Th1 por medio de la inducción de IL-2 por macrófagos y células dendrítica. Si expresan CD56<sup>Dim</sup>/CD16<sup>Bright</sup> ejercerán funciones principalmente citotóxicas<sup>14</sup>.

Los macrófagos, al igual que las células NK, no están restringidos a MHC y expresan receptores Fc, lo que les permite unirse a anticuerpos sobre células tumorales, y mediar citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. La actividad antitumoral de macrófagos activados probablemente está mediada por enzimas líticas, así como por intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivos. Además, los macrófagos activados secretan TNF- $\alpha$ , que tiene una potente actividad antitumoral.

b) Células adaptativas involucrados en la erradicación de cáncer: Los 2 grandes grupos de linfocitos comprenden a T y B, el complejo de reconocimiento del antígeno más característico de la superficie de las células T es TCR. TCR se une al complejo CD3, está compuesto por cadenas  $\alpha\beta$  quienes interactúan con el MHC y  $\gamma\delta$  que no requieren de la interacción con el MHC para reconocer antígenos. Se describe que los linfocitos T reconocen antígenos tumorales o extraños a través del contexto MHC clase I o clase II. Esto desencadena la activación de células T con la expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de quimioquinas y citoquinas. El efecto es para conducir la expansión clonal de la célula T, así como para reclutar otras células efectoras inmunes (incluyendo componentes del sistema inmune innato). Los Linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>), también conocidas como células T auxiliares, secretan citoquinas que regulan diferentes aspectos de la respuesta inmune: LTCD4<sup>+</sup> Th1 activan los LTCD8<sup>+</sup>, lo que favorece la inmunidad celular y LTCD4<sup>+</sup> Th2 actúan sobre las células B, favoreciendo la inmunidad humoral. Los LTCD8<sup>+</sup>, que son directamente citotóxicos, se activan tanto por la presentación directa de antígenos, a través de MHC de clase I y por medio de LTCD4<sup>+</sup> activadores.

Existe, un tipo de linfocito citolítico con características compartidas tanto por los linfocitos T citotóxicos como por la célula NK. Este tipo de célula, designado como célula NKT para reflejar su cualidad híbrida, se desarrolla en el timo y, estrictamente hablando, es un miembro del sistema inmunitario adaptativo. Pasa por reordenamientos de gen que codifica para receptor de antígeno, y expresa un complejo de TCR sobre su superficie.

También muestra características de células en el sistema inmunitario innato: El TCR sobre células NKT no reconoce péptidos unidos a MHC, sino más bien un glicolípido presentado por la molécula CD1d no polimorfa. Las células NKT pueden actuar como células auxiliares (al secretar citoquinas que conforman respuestas) y como células citotóxicas (al matar células blanco). Las células NKT comprenden subpoblaciones tanto CD4<sup>+</sup> como CD4<sup>-</sup>, que también pueden diferir por la producción de citoquinas. La muerte por células NKT parece depender de modo predominante de interacciones FasL-Fas. Éstas no forman células de memoria y no expresan varios de los marcadores característicos de los linfocitos T, sino que expresan múltiples proteínas características de células NK<sup>15</sup>.

Las células B por su parte, muestran una respuesta a antígenos específicos para tumor al generar anticuerpos antitumor que pueden fomentar el reconocimiento de células tumorales y la lisis de las mismas. Pero algunos anticuerpos antitumorales desempeñan un papel más perjudicial, al bloquear el acceso de linfocitos T citotóxicos a antígenos específicos para tumor y aumentar la supervivencia de las células cancerosas.

En general la frecuencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se correlaciona con un pronóstico de regresión de cáncer, como ejemplo una proporción alta entre LTCD8<sup>+</sup> y células T reguladoras se asocia a mejor pronóstico de la enfermedad.

c) Función de las citoquinas en la inmunidad del cáncer: el IFN- $\gamma$ , IL-12 aumentan la inmunidad antitumoral o la hacen más eficiente.

Si bien está claro que el sistema inmunitario puede responder a células tumorales, reconociendo antígenos tumorales, el hecho de que anualmente tantos individuos mueran por cáncer sugiere que la respuesta inmunitaria a tumores a menudo no es totalmente efectiva, produciéndose un escape de la vigilancia del sistema inmune. Los infiltrados de células inmunitarias que se encuentran en tumores que tienen más probabilidades de progresar y de metastizar, comprenden macrófagos antiinflamatorios y células supresoras derivadas de la línea mieloide. De manera concomitante, las respuestas adaptativas al cáncer dominadas por la vía Th2 (y en algunos casos, también células Th17 o T reguladores), se asocian con peores resultados clínicos y tiempos de supervivencia reducidos. Algunas de las estrategias de escape a la vigilancia del sistema inmune comprenden:

a) Expresión reducida de MHC en las células tumorales: los defectos en el procesamiento y la presentación de antígeno son comunes entre los mutantes de escape que surgen en muchos tumores, los cuales podrían incluir mutaciones que llevan a

expresión reducida de MHC, ya sea un transportador asociado con procesamiento de antígeno (TAP) o  $\beta$ 2-microglobulina defectuoso, e insensibilidad al IFN- $\gamma$ . Las células NK deben reconocer estas células que carecen de MHC clase I. Pero, la expresión disminuida de ligandos que se unen a receptores activadores sobre células NK, también común entre tumores, permite que estas células eviten la muerte mediada por células NK.

b) Subversión de señales de apoptosis por células tumorales: la regulación ascendente de mediadores antiapoptóticos y la expresión de receptores de muerte mutados, o la falta de dichos receptores, puede llevar a tumores que sean resistentes a señales de muerte celular programada.

c) Señales coestimuladoras inadecuadas proporcionadas por células tumorales: Sin números suficientes de células presentadoras de antígeno en la vecindad inmediata de un tumor, y con pocos estimuladores para impulsar la activación de estas células, las células T que muestran respuesta pueden sólo recibir una señal activadora parcial. Esto puede llevar a anergia clonal y tolerancia inmunitaria<sup>16-17-18</sup>.

## **5.8 Terapias Contra el Cáncer**

Los tratamientos contra el cáncer apuntan a la resección quirúrgica, a la quimioterapia y radioterapia, frecuentemente aplicados concomitantemente a un mismo paciente, con efectos secundarios importantes. Otros tipos de terapias son la inmunoterapia, que se perfila como un mecanismo de defensa antitumoral obtenido del sistema inmunológico del organismo, y tratamientos antiangiogénicos, donde uno de los blancos moleculares es el VEGF (Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular), el cual puede impactar en múltiples vías, actuando sobre el tumor y las células endoteliales.

Datos recientes sugieren que la terapia antiangiogénica (anti-VEGF) podría revertir algunos mecanismos inmunosupresores involucrados en la evasión y crecimiento del tumor, llevando a mejorar la inmunovigilancia, facilitando la infiltración de linfocitos lo que estaría asociado con la capacidad de las moléculas antiangiogénicas de normalizar la vasculatura tumoral, y probablemente evitar la pérdida de ICAM-1 y VCAM-1 de las células endoteliales<sup>5</sup>.

Por su parte, la inmunoterapia está diseñada para ayudar a eliminar un tumor al revivir, iniciar o complementar la respuesta inmunitaria antitumoral *in vivo*, o al neutralizar vías inhibitoras. Los desafíos en la determinación de la eficacia de inmunoterapias específicas en situaciones clínicas comprenden el rango de tipo de células cancerosas, el tamaño del tumor, las ubicaciones y los estadios de enfermedad, así como programas de tratamiento óptimos.

### **5.9 *Trypanosoma cruzi* y su Efecto Antitumoral**

En los últimos años, diferentes grupos de investigadores han reportado una relación adversa entre algunas infecciones parasitarias y cáncer. Datos estadísticos respecto a la prevalencia de las infecciones parasitarias y enfermedades tumorales indican una relación negativa entre ambas. En modelos animales se ha demostrado que ciertos parásitos o productos de ellos son capaces de inhibir el crecimiento tumoral<sup>19</sup>. El artículo de Grigorii Roskin titulado "Protozoan infection and experimental cancer" describe la inhibición de tumores malignos implantados conjuntamente con la infección de un parásito intracelular *T.cruzi* en ratones, sugiriendo que la infección podría ser usada como terapia o cura del cáncer<sup>20-21</sup>. En el Cuadro A, detallamos algunos aspectos de este parásito intracelular.

### **5.10 Calreticulina de *Trypanosoma cruzi***

Muchas son las moléculas que tiene el parásito, las cuales modulan la respuesta inmune, siendo Calreticulina (TcCRT) una de ellas. En nuestro laboratorio, TcCRT fue descrita, secuenciada y expresado su gen. Es una proteína de 45 kDa<sup>23</sup>, inmunogénica, encontrando anticuerpos que la reconocen en ratones<sup>24</sup> y humanos infectados<sup>25</sup>.

A pesar de contener una señal de retención (KDEL) en el RE, esta proteína es translocada a la zona de emergencia flagelar del parásito, y extracelularmente, modula el sistema del complemento, sirve de señal profagocítica, y media efectos antiangiogénicos que protegen al hospedero de agresiones neoplásicas<sup>26-31</sup>.

#### **Cuadro A. *Trypanosoma cruzi***

*T. cruzi* es un parásito flagelado intracelular, que causa la enfermedad de Chagas. La transmisión se produce por vectores insectos de la subfamilia *Triatominae*, portadores del parásito causante de la enfermedad, los cuales pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, y defecan cerca de la picadura. Los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea reciente. *T. cruzi* también se puede transmitir: Por alimentos contaminados con el parásito, por ejemplo, por el contacto con heces de triatomíneo; por la transfusión de sangre infectada; por la transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto; por el trasplante de órganos provenientes de una persona infectada y por accidentes de laboratorio. Inicialmente esta infección estaba confinada a América, pero en la actualidad se ha propagado a otros continentes. Se calcula que en todo el mundo, representa un problema de salud para unos 28 millones de personas. La infección se puede eliminar si el tratamiento se administra al poco tiempo de producida. Hasta un 30% de los infectados crónicos presenta sintomatología cardíaca y hasta un 10% padece de alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas, de aparición años post infección. Aproximadamente un 70% de los infectados no presenta sintomatología. El control vectorial es el método más útil para prevenir la enfermedad, al igual que el tamizaje de la sangre, para prevenir la infección mediante las transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos<sup>22</sup>.

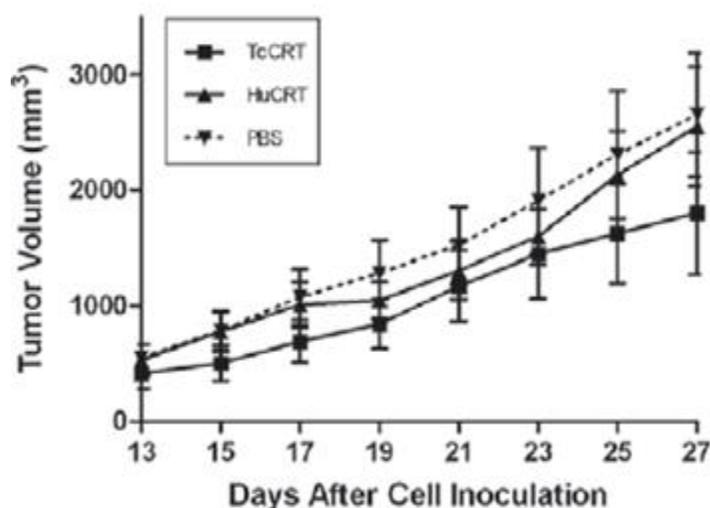
A continuación detallamos los efectos de rTcCRT:

**5.10.1 Efecto anticomplemento:** El parásito transloca desde RE su CRT a la zona de emergencia flagelar, permitiendo la interacción con el primer componente del complemento C1<sup>26-27</sup>, interfiriendo con la función de C1r y C1s y de estas serino proteasas sobre C4, inactivando así la vía clásica. El conservar unido C1q (potente "señal profagocítica")<sup>28</sup>, le sirve como estrategia para ser fagocitado, por simular un proceso de apoptosis y aumentar así la infectividad<sup>29</sup>.

**5.10.2 Efecto antitumoral:** El efecto antitumoral de CRT se describió primero para su versión humana (HuCRT)<sup>6</sup>. En nuestro laboratorio describimos un efecto antitumoral de rTcCRT (Figura 1) que, en términos molares, es superior al de la contraparte humana<sup>30</sup>. En ambos casos, el efecto antiangiogénico de estas chaperonas explica, al menos en parte importante, el efecto antitumoral. Las diferencias entre las capacidades antiangiogénicas/antitumorales de HuCRT y rTcCRT podría radicar en sus distintas afinidades por laminina<sup>32-33</sup> y en el hecho de ser 50% diferentes en sus secuencias aminoacídicas<sup>23</sup>.

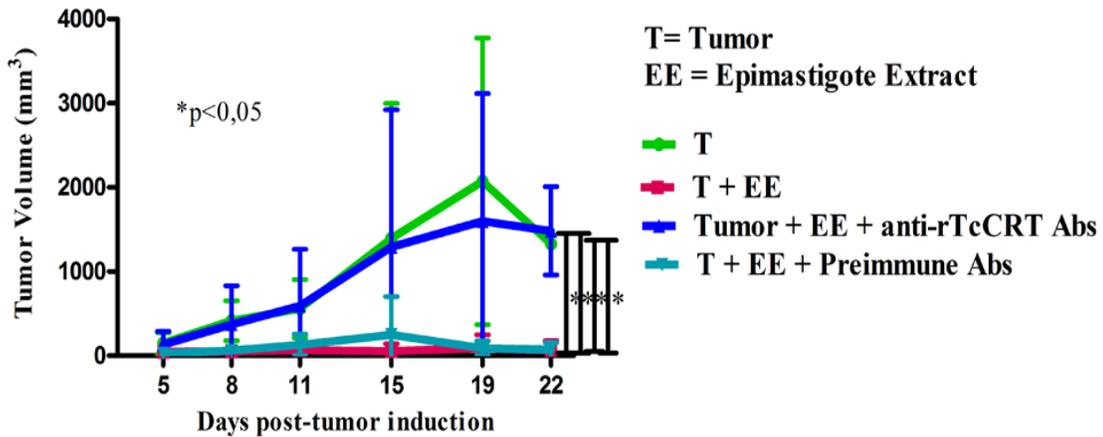
La inhibición del crecimiento tumoral en ratones infectados con *T. cruzi* es mediada, al menos en parte importante, por rTcCRT (Figura 2-3), ya que este efecto puede ser revertido por anticuerpos anti-rTcCRT y no por las contrapartes inmunoglobulínicas preinmunes (Abello, 2016, Enviado a publicación).

Por otra parte, se ha podido detectar que existe unión de rTcCRT a la superficie de una línea tumoral primaria de melanoma murino (B16-F10), lo que facilitaría de esta forma la fagocitosis por macrófagos<sup>34</sup>. Además, la unión de ésta molécula a la superficie de las células tumorales, en conjunto con C1q, aumentaría la fagocitosis.

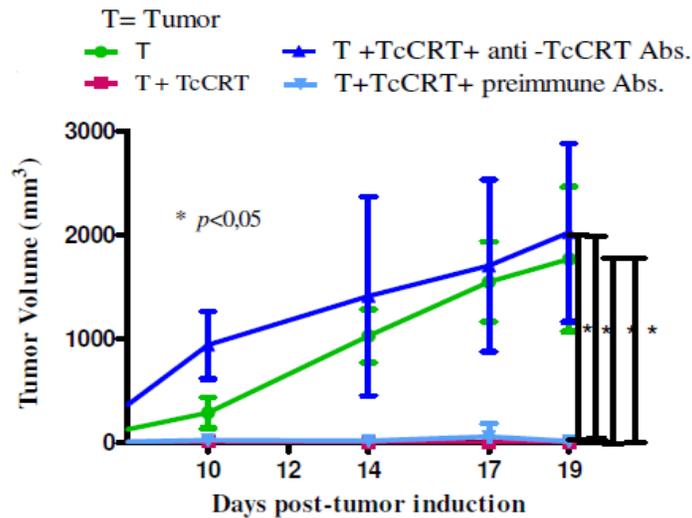


**Figura 1. rTcCRT Inhibe el Desarrollo de un Tumor Mamario Murino AJ (TA3-MTXR)<sup>33</sup>.** Experimento *in vivo*, en el cual  $5 \times 10^5$  células tumorales fueron inoculadas s.c en 10 ratones AJ hembras. A diferencia de HuCRT, rTcCRT muestra un efecto anti-tumoral más potente ( $p = 0.0078$ ).

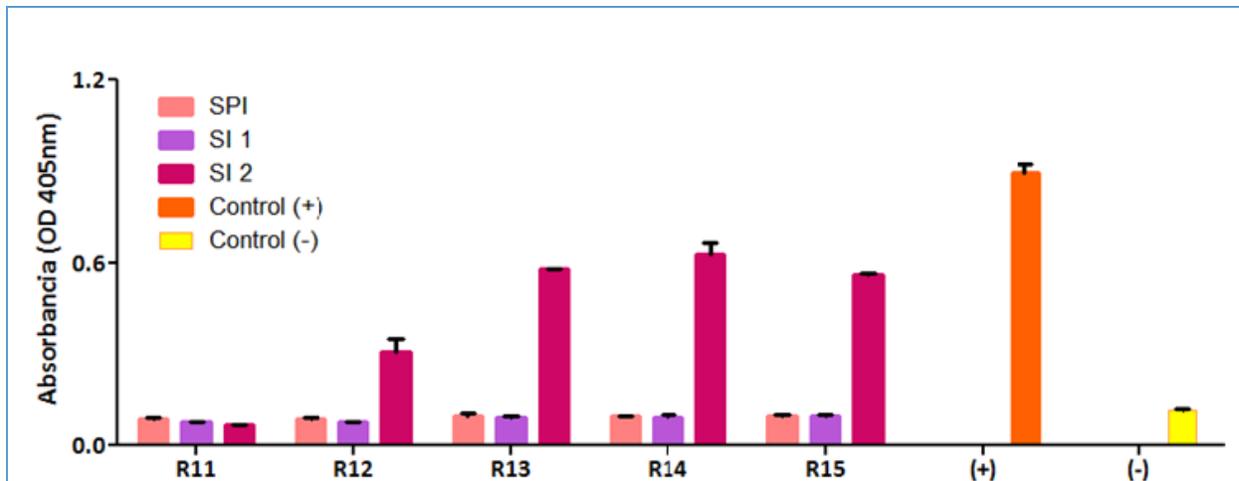
Por otra parte, el hecho que la inoculación de rTcCRT genera una respuesta inmune humoral anamnésica, pese a la ausencia de un adyuvante (Figura 4), implica la generación de una respuesta inmune celular Th específica. En cuanto a una respuesta inmune celular TcCRT-específica, verificable en el tejido tumoral, no ha sido posible establecerla aún<sup>34</sup>, siendo este uno de los objetivos principales que subyace en esta tesis.



**Figura 2. El Efecto Antitumoral de Extractos Epimastigotes Es Revertido por Anticuerpos Anti-rTcCRT:** Ratones AJ fueron inoculados s.c. en el área supra escapular con células de un adenocarcinoma mamario (TA3-MTXR, grupo control) y expuestas como se indica en la figura a extractos de epimastigotes de *T.cruzi* (EE), anticuerpos (Abs) anti-rTcCRT o anticuerpos Preinmunes. (Abello, 2016, Enviado a publicación)



**Figura 3. El Efecto Antitumoral de rTcCRT Es Revertido por Anticuerpos Anti-TcCRT:** Ratones AJ (n=8) fueron inoculados con el Adenocarcinoma mamario s.c (TA3-MTXR) y diferencialmente tratados como sigue: Grupo 1, sin tratamiento, Grupo 2, rTcCRT s.c. Grupo 3, rTcCRT y Ac anti-TcCRT, Grupo 4, rTcCRT y Ac pre-inmunes (\*:  $p < 0,05$ ). Los Ac fueron entregados vía s.c (Abello et al, 2016, Enviado a publicación).



**Figura 4. La Inoculación de rTcCRT Subcutáneamente Genera Anticuerpos<sup>34</sup>.** Mediante ELISA se determinó la presencia de anticuerpos anti-rTcCRT en los sueros de animales inoculados s.c. con dicha proteína (R11-R15), siendo posteriormente detectados con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados a peroxidasa. En la gráfica se muestra la comparación de los Sueros preinmunes (SPI), Sueros Inmunes a la 1era semana (SI 1) y a la segunda semana (SI2) de ambos grupos. El control positivo corresponde a Ac monoclonal anti rTCRT, E2G7. (\*\*:  $p= 0,004$ )

**5.10.3 Efecto antiangiogénico:** El que rTcCRT sea altamente homóloga a un fragmento funcional antiangiogénico de HuCRT, llevó a investigar su efecto sobre células endoteliales, en un ensayo en membrana corioalantoidea de embriones de pollo. En este ensayo, la proteína parasitaria inhibe la formación de nuevos vasos con un efecto más potente que el de su contraparte humana. Además, este efecto se manifiesta preferentemente sobre tejidos neoplásicos en desarrollo y no sobre tumores establecidos<sup>33</sup>. Otro ensayo, en anillos aórticos de rata, incubados con la proteína parasitaria, muestran una inhibición dosis-dependiente de la angiogénesis. Así, rTcCRT 0.1 y 1.0  $\mu\text{M}$  inhiben 50 y 100%, respectivamente<sup>31</sup>.

Por otra parte, rTcCRT inhibe, de manera dosis dependiente, la migración y proliferación de HUVECs (las cuales generan una red típica de células en cultivo)<sup>33</sup>.

## **5.11 Elementos Racionales Principales que Conducen a la Hipótesis**

Dado que:

1. CRT murina, expresada en la superficie de células tumorales, al reclutar C1q, es señal pro-fagocítica<sup>9,10,11,12</sup>
2. Las terapias antiangiogénicas modulan la respuesta del sistema inmunológico, permitiendo la participación de poblaciones de linfocitos que atacan el tumor<sup>3,4,5</sup>
3. rTcCRT inhibe el crecimiento de un tumor sólido<sup>33</sup>
4. rTcCRT es antiangiogénico, descrito para varios tipos de endotelios (humanos, murinos, de rata y de ave)<sup>33</sup>
5. rTcCRT expresado sobre la superficie es señal pro-fagocítica<sup>26,27,28,29</sup>
6. rTcCRT se une a la superficie de células tumorales<sup>34</sup>

Proponemos la siguiente Hipótesis:

## **6. HIPOTESIS**

Existe una mayor infiltración de linfocitos T en el tejido tumoral TA3-MTXR de ratones tratados con rTcCRT y una mayor expresión de CRT en superficie de las células tumorales.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Contribuir al conocimiento del rol de rTcCRT en la inhibición del crecimiento de un tumor mamario murino.

## **8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar rTcCRT en su capacidad para inhibir el crecimiento de un adenocarcinoma mamario murino resistente a metotrexato (TA3-MTXR).
2. Determinar el efecto de rTcCRT en los niveles de expresión del mRNA de MmCRT y de CRT en el tejido tumoral.
3. Determinar el efecto de rTcCRT en la infiltración de poblaciones linfocitarias CD3, CD4 y CD8 en el tejido tumoral.

## **9. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **9.1 Animales**

Se utilizaron ratones hembras AJ de 6-8 semanas de edad, n=6 ratones por grupo, mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ver Anexo 1).

### **9.2 Células Tumorales**

Se utilizaron células tumorales de un adenocarcinoma mamario resistente a metotrexato, TA3-MTXR, las que fueron mantenidas como tumor singénico ascítico, por pasaje semanal en ratones AJ. Entre el cuarto y quinto día post inoculación los ratones desarrollaron el tumor ascítico, momento en que se realizó la extracción.

Este tipo de células tumorales fue seleccionado, ya que previamente el modelo experimental se ha probado en el laboratorio<sup>33</sup>.

### **9.3 rTcCRT**

La proteína recombinante rTcCRT es obtenida a partir de ADN amplificado, el cual es ligado al plasmidio, luego la bacteria *E. coli* TOP10F' es transformada, se selecciona la población que corresponde de acuerdo a la resistencia con el antibiótico y se procede a sonicación. Posteriormente, se purifica la proteína por cromatografía de afinidad a través de la captura sus colas de histidina al Niquel unido a una fase sólida<sup>25</sup> y mantenida a menos 21°C hasta su uso.

### **9.4 Diseño Experimental** (ver esquema Figura 5).

#### **9.4.1 Inoculación Inicial (día 0)**

1. Se preparó una dilución de células en suero fisiológico de 1/20.000 y se contó las viables en cámara de Neubauer, diluyendo con azul tripán.
2. Según el recuento de células obtenido de la dilución anterior, se tomó el volumen necesario que contenga 500.000 células por ratón.
3. Se calculó el volumen necesario para administrar 200 µg de proteína a cada ratón, de acuerdo a la concentración de rTcCRT.
4. Se dispensó en tubo estéril, rTcCRT (200 µg por ratón), células tumorales TA3-MTXR

( $5 \times 10^5$  células de tumor ascítico por ratón), hasta completar un volumen de 200  $\mu$ l de inoculó por ratón, utilizando suero fisiológico estéril. El grupo control recibió sólo las células tumorales.

5. Los tubos fueron incubados por 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

6. Se inocularon los ratones en la región dorsal supraescapular subcutánea.

#### **9.4.2 Inoculación de rTcCRT**

Se prepararon los inóculos de 50  $\mu$ g de proteína por ratón, inoculados día por medio. El grupo control recibió suero fisiológico estéril.

Día por medio se midió el eje mayor del tumor y el eje transversal a él. El volumen tumoral se calculó mediante la siguiente fórmula<sup>33,34</sup>:

$$(\text{Volumen tumoral}) \text{ cm}^3 = (\text{Diámetro longitudinal})^2 \text{ mm} \times (\text{Diámetro transversal}) \text{ mm} \times 0.52$$

En el marcaje, en las inoculaciones e identificación y manipulación de los animales para que recibieran la dosis que les corresponde, colaboró personal técnico entrenado.

#### **9.4.3 Extracción de Tejidos Tumorales**

El experimento se detuvo en el momento que el compromiso bioético lo estipula, considerando el estado de salud general de los ratones y observando que el volumen tumoral no excediese los 3000 mm<sup>3</sup>.

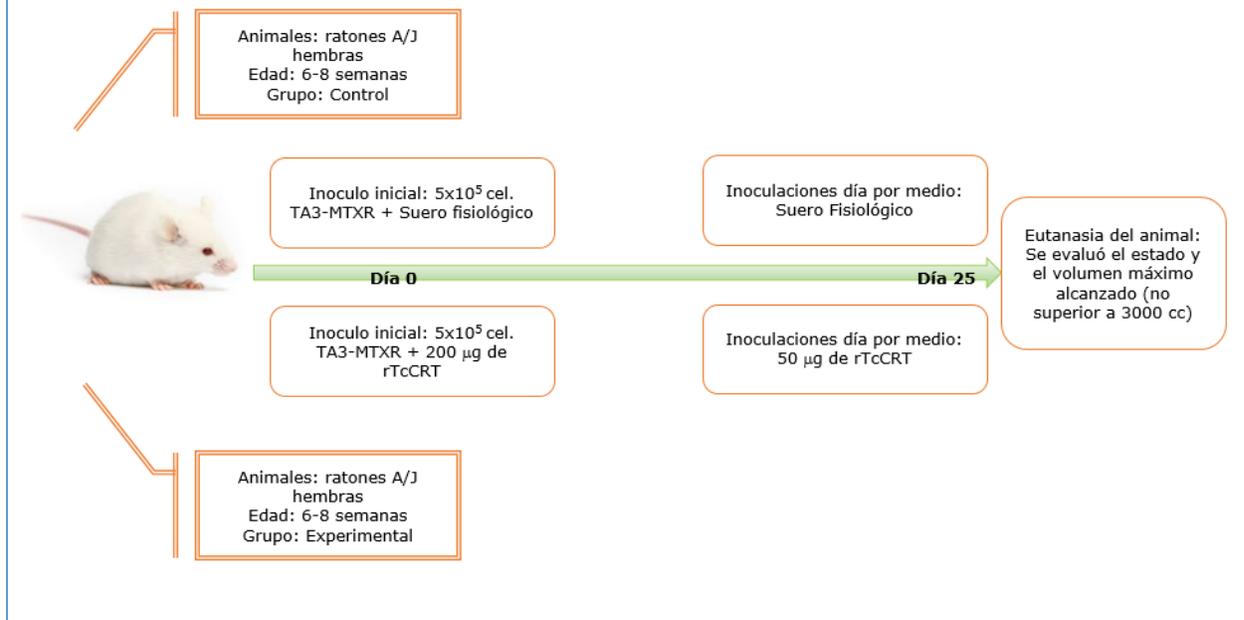
#### **9.5 Extracción de mRNA de Tejidos Tumorales**

Se procedió a extraer el tejido tumoral para purificar mRNA. 30 mg de tejido fueron tratados con el kit comercial RNeasy Mini Kit (Qiagen, Texas, USA). Luego las muestras obtenidas fueron analizadas en el Lector de microplaca multimodal Synergy HT (BioTek, Vermont, USA), utilizando el software Gen5™ (BioTek, Vermont, USA), dónde se midió la pureza de las muestras siendo todas >1.8.

#### **9.6 Transcripción Reversa (RT) y qPCR**

Para RT, 10  $\mu$ g por cada mRNA extraído fueron tratados con el kit comercial Improm II™ Reverse transcriptase (Promega, Wisconsin, USA), utilizando las cantidades que se detallan en la Tabla I.

**Figura 5: Diseño Experimental para Estudiar el rol de rTcCRT en la Inhibición del Crecimiento de un Tumor mamario murino**



**Tabla I. Protocolo de la Mezcla de Reacción para RT-PCR**

Reacción	
ImProm-II 5X Reaction Buffer	4 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (0.5mM cada dNTP)	1 $\mu\text{l}$
RNA (> 1 $\mu\text{g}$ )	5 $\mu\text{l}$
ImProm II Reverse Transcriptase	1 $\mu\text{l}$

Para qPCR se utilizó el kit comercial Brilliant II SYBR Green QPCR master mix (Agilent Technologies, California, USA). Los partidores utilizados fueron los que se describen en la Tabla II y amplifican una región de 132 pb del exón I de MmCRT<sup>35</sup> y una región de 110 pb para  $\beta$ -actina. El protocolo utilizado fue 12,5  $\mu\text{l}$  2X Brilliant II SYBR Green qPCR master mix, 1  $\mu\text{l}$  con 100 nM de cada partidor, en 25  $\mu\text{l}$  con 2  $\mu\text{l}$  de cada reacción de RT-PCR. El programa utilizado fue de 95°C por 15 minutos, 35 ciclos a 95°C por 10 segundos y 56°C de amplificación por 30 segundos, en el equipo Termociclador Mx3000P (Stratagene, Agilent Technologies, California, USA).

**Tabla II. Partidores Utilizados para qPCR**

CRT murina	forward	5` -TACGCACTGTCCGCCAAAT-3`
	reverse	5` -GTCCAAACCACTCGGAAACAG-3`
$\beta$ -actina	forward	5` -CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC-3`
	reverse	5` -TAGAGGTCTTTACGGATGTCAACGT-3`

### 9.7 Citometría de Flujo

Para el análisis de CRT en superficie celular se obtuvo los tejidos y se disgregaron con suero fetal bovino (SFB) 2% v/v+ PBS 1X. Para eliminar los eritrocitos se utilizó un buffer de lisis (ACK). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1500 g por 5 minutos. Luego fueron resuspendidas en PBS 1X/SFB 2% v/v, cuantificadas en cámara de Neubauer, marcadas con azul tripán y diluidas a  $3 \times 10^5$  células por cada anticuerpo, utilizado una placa de cultivo celular con fondo V. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: Policlonal de conejo anti-Calreticulina murina (Thermo-Sc, California, USA), policlonal de conejo anti-Isotipo de Ig (Thermo-Sc, California, USA), previamente probado en el laboratorio por Western Blot, demostrando que reconoce débilmente a rTcCRT. Ambos anticuerpos se marcaron con anticuerpo de cabra anti IgG de ratón asociado a FITC (Invitrogen, California, USA) como marcador a una concentración de 1:100. En la Tabla III se describe el protocolo utilizado. Luego se incubaron las muestras por 30 minutos a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Luego fueron resuspendidas en PBS 1X, lavadas 3 veces, por centrifugación a 1500 g, por 5 minutos con PBS1X. Luego se agregó anti-IgG de ratón asociado a FITC, donde las muestras nuevamente fueron lavadas y centrifugadas. Finalmente fueron resuspendidas en PBS 1X, fijadas en paraformaldehído 2% v/v y conservadas 4°C hasta el día siguiente para su análisis.

**Tabla III. Protocolo Experimental para Detección en Membrana de CRT por Citometría de Flujo**

<b>Pocillo</b> <b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<i>Tumor</i> <i>n=4</i>	<i>Sin marca</i>	<i>Anti-CRT</i>	<i>Anti-Isotipo</i>	<i>Anti-IgG asociado a FITC</i>	<i>Anti-CRT + Anti-IgG asociado a FITC</i>	<i>Anti-ISO + Anti-IgG asociado a FITC</i>
<i>Tumor + rTcCRT</i> <i>n=4</i>	<i>Sin marca</i>	<i>Anti-CRT</i>	<i>Anti-Isotipo</i>	<i>Anti-IgG asociado a FITC</i>	<i>Anti-CRT + Anti-IgG asociado a FITC</i>	<i>Anti-ISO + Anti-IgG asociado a FITC</i>

Para cuantificar el infiltrado de linfocitos en el tejido tumoral, se utilizaron los siguientes anticuerpos de rata (Biolegend, California, USA): Anti-CD3 con PE/Cy7, anti-CD4 con APC y anti-CD8 con FITC, a concentración de 0.25 µg/10<sup>6</sup> células. Se incubó 30 min en oscuridad. Las muestras fueron lavadas 3 veces, al igual que el protocolo anterior, utilizando PBS 1X, luego fueron fijadas con paraformaldehído 2% v/v (100µl por pocillo) y almacenadas a 4°C hasta su análisis.

Las células marcadas fueron procesadas en el Citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience, California, USA) y los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo 8.7 (Flowjo, Oregon, USA).

### **9.10 Análisis estadístico**

Los análisis de cuantificación del mRNA de MmCRT, se llevaron a cabo de acuerdo a la cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , según la fórmula<sup>36</sup>:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ de MmCRT} - Ct \text{ de } \beta\text{-ACTINA}) \text{ Grupo T+rTcCRT} - (Ct \text{ de MmCRT} - Ct \text{ de } \beta\text{-ACTINA}) \text{ Grupo T}}$$

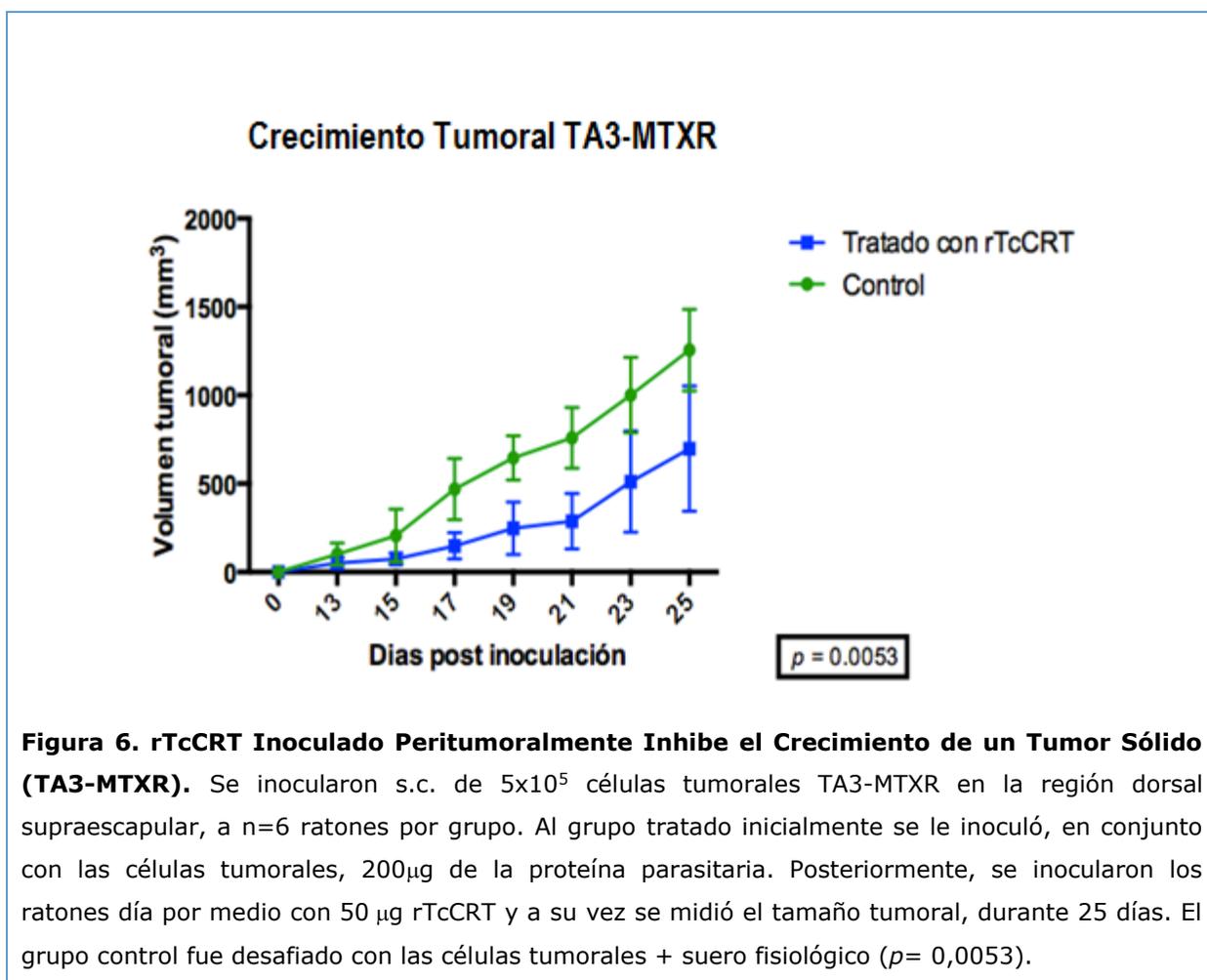
Ct = valor indicado por la intersección entre la curva de amplificación y la línea umbral para CRT murina y β-actina

Para la evaluación del crecimiento tumoral, se utilizó test ANOVA de una cola Wilcoxon con el programa Graph Prism 6.0<sup>33</sup>, para evaluar cuantificación de CRT y linfocitos infiltrantes del tejido tumoral se utilizó el *t Student* no paramétrico.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 rTcCRT Inhibe el Crecimiento de un Adenocarcinoma Mamario:

Para analizar la expresión de CRT murina en el tejido tumoral de ratones tratados con rTcCRT y la infiltración linfocitaria en el tumor fue necesario, primeramente, evaluar la inhibición del crecimiento tumoral por rTcCRT. Al igual que lo observado en experimentos previamente publicados por nuestro laboratorio, en la Figura 6 podemos observar que rTcCRT inhibe el crecimiento de este tumor sólido, correspondiente a un adenocarcinoma mamario murino, inoculado en la región dorsal de ratones AJ.



## **10.2 La Inoculación de rTcCRT no Induce Variaciones Detectables a Nivel de mRNA de MmCRT del Adenocarcinoma Mamario:**

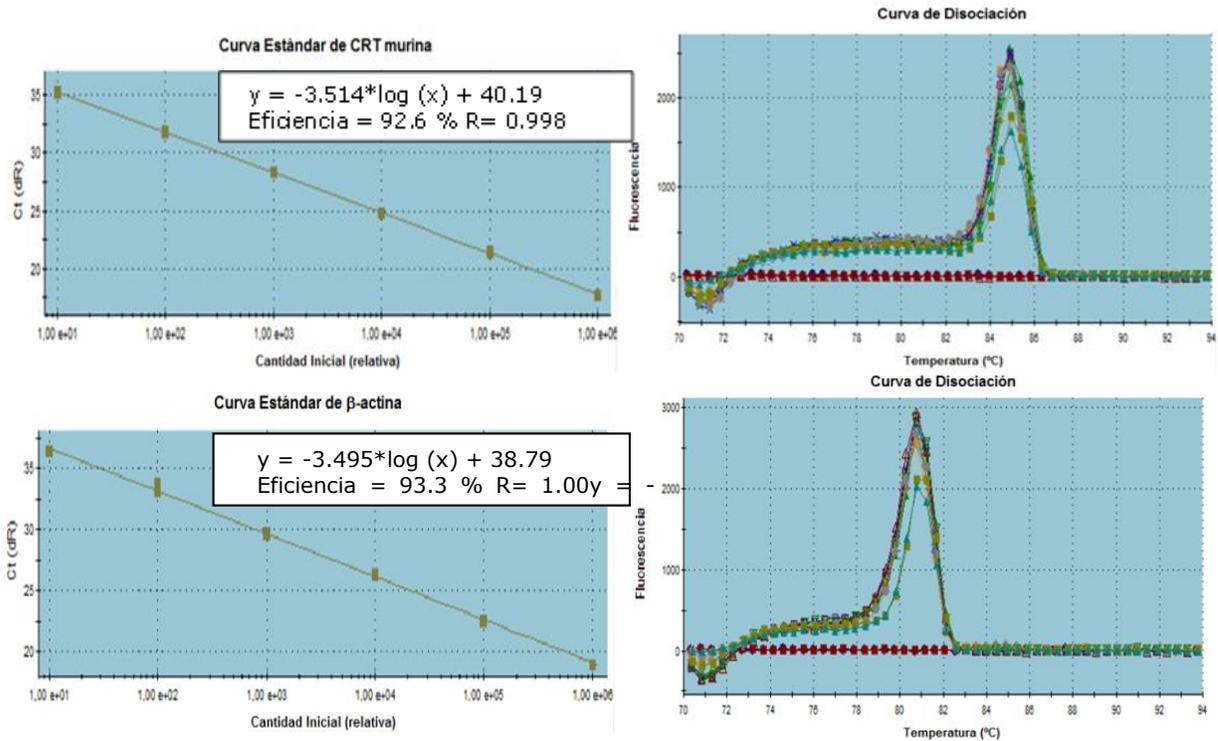
Dado que se ha reportado, en algunos tumores, el aumento de mRNA de MmCRT se correlaciona con mayores tamaños y capacidad migratoria de las células cancerígenas, cuantificamos los niveles del mRNA de MmCRT en los tejidos de los animales tratados con rTcCRT.

Se realizó una qPCR, utilizando el método de la cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , donde la expresión del gen es comparado en relación a un gen control, considerando significativo aquellos datos  $>1$ .

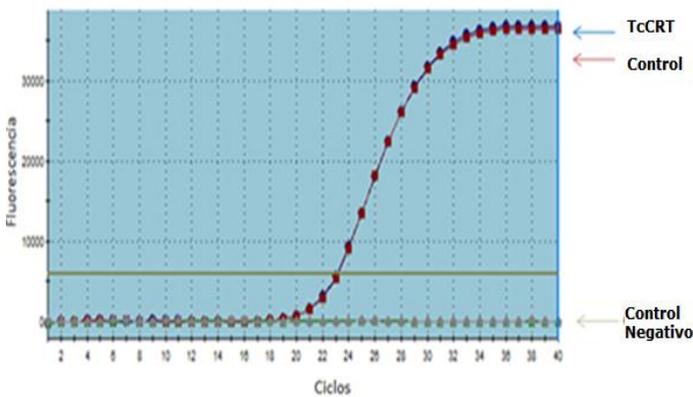
Tanto para evaluar la eficiencia de las amplificaciones como para optimizar la amplificación de los partidores, se realizó una curva estándar del mRNA de MmCRT y  $\beta$ -actina como *housekeeping*, obteniendo resultados satisfactorios para comenzar los análisis.

Los resultados obtenidos no mostraron una sobreexpresión del mRNA MmCRT en el grupo de ratones inoculados con el tumor y tratados con rTcCRT, en comparación con el grupo de ratones portadores de tumor sin tratamiento (Figura 7).

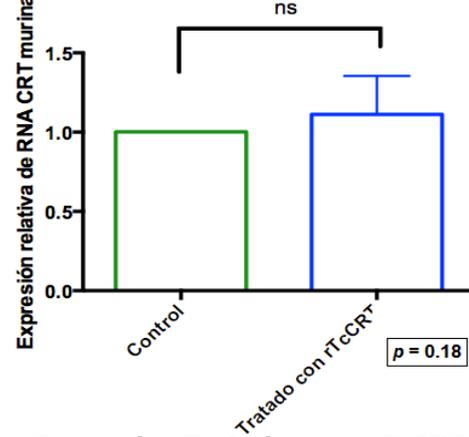
**a) Curvas estándar y de disociación**



**b) Curva de Amplificación de mRNA de MmCRT en Tejido Tumoral Tratado y Control**



**c) Cuantificación de mRNA de MmCRT**



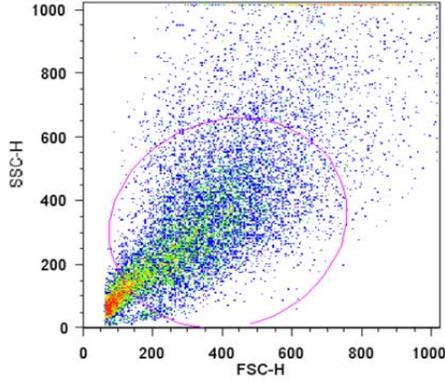
**Figura 7. Los Niveles de mRNA de MmCRT en Tejidos TumORAles Tratados con rTcCRT no**

**Varían.** Se realizó una RT-PCR utilizando partidores que amplifican una región del exón I del gen de MmCRT. **a)** Curvas estándar de CRT murina y β-actina, con una eficiencia >90 y un coeficiente de correlación >0.98, parámetros que validan el ensayo. Las curvas de disociación no arrojaron amplificaciones inespecíficas. **b)** Curvas representativa de las amplificaciones controles y experimentales del qPCR, y control negativo (blanco de H<sub>2</sub>O). **c)** Amplificaciones, utilizando como método estadístico 2<sup>-ΔΔCT</sup>. No se obtuvieron diferencias en cuanto a la expresión de MmCRT.

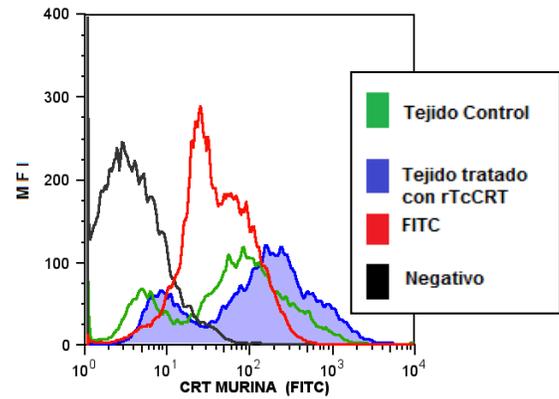
### **10.3 Se detecta mayor cantidad de CRT en las Células del Tejido Tumoral de aquellos Ratones Tratados con rTcCRT:**

Cuantificamos, por citometría de flujo la expresión de CRT en el tejido tumoral de ratones tratados con rTcCRT, para evaluar si el efecto antiangiogénico de la proteína parasitaria sería un mecanismo de estrés para las células tumorales, generado por la falta de nutrientes, oxígeno e impedimento para eliminar desechos catabólicos, conduciendo ya sea una sobreexpresión de CRT en superficie, como señal profagocítica o una unión de rTcCRT inoculada a la superficie de las células del tejido. Los resultados encontrados fueron una mayor cantidad de la proteína en la superficie de aquellos tejidos tumorales tratados con rTcCRT respecto al grupo sin tratamiento (Figura 8).

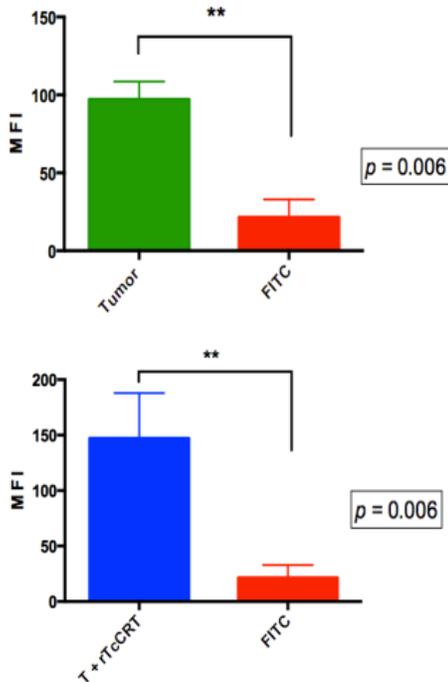
**a) Gate de la población inicial**



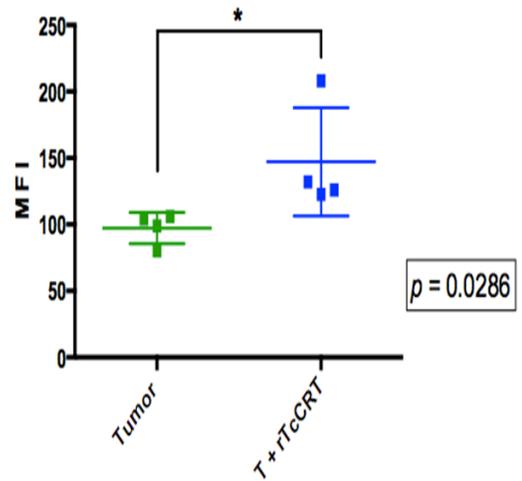
**b) Histograma de la MFI representativa**



**c) Expresión de CRT en Superficie versus FITC**



**d) Cuantificación de CRT en Superficie**



**Figura 8. Se detecta mayor cantidad de CRT en la Superficie Celular del Tejido Tumoral.**

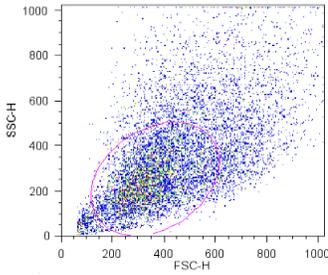
Se evaluó por Citometría de Flujo la cantidad de CRT en células obtenidas de los tejidos tratados o no con rTcCRT **(a)** Dot Plot representativo, el cual indica las poblaciones de células seleccionadas para el análisis. **(b)** Intensidad de fluorescencia mediana (MFI) obtenida a partir de la tinción de las células seleccionadas en **(a)** con un anticuerpo anti-MmCRT, seguido de la incubación con FITC. **(c)** Comparación de MFI de tumores de ratones tratados con rTcCRT *versus* la marca basal de FITC ( $p=0,006$ ) para poder ser analizados los grupos control y experimental. **(d)** Expresión de CRT en superficie de los grupos control y tratados, previamente marcados con CRT y posterior marcaje con FITC ( $p=0,0286$ ). Para los análisis estadísticos se utilizó *t Student* no paramétrico, Mann Whitney.

#### **10.4 La Terapia Experimental con rTcCRT Aumentó la Población de Linfocitos que Infiltran el Adenocarcinoma Mamario:**

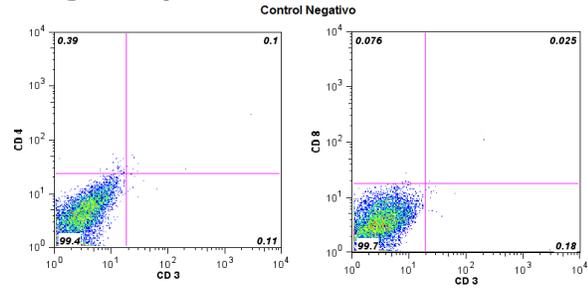
Por Citometría de Flujo, se cuantificaron las poblaciones CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> presentes en los tumores de aquellos ratones tratados o no con rTcCRT, ya que hasta ahora solo se ha detectado una respuesta inmune humoral.

Ambas poblaciones de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) aumentaron en aquellos tejidos tumorales tratados con rTcCRT, lo que sugiere fuertemente que existe una participación de la respuesta inmune celular adaptativa estimulada por el tratamiento con la proteína parasitaria (Figura 9).

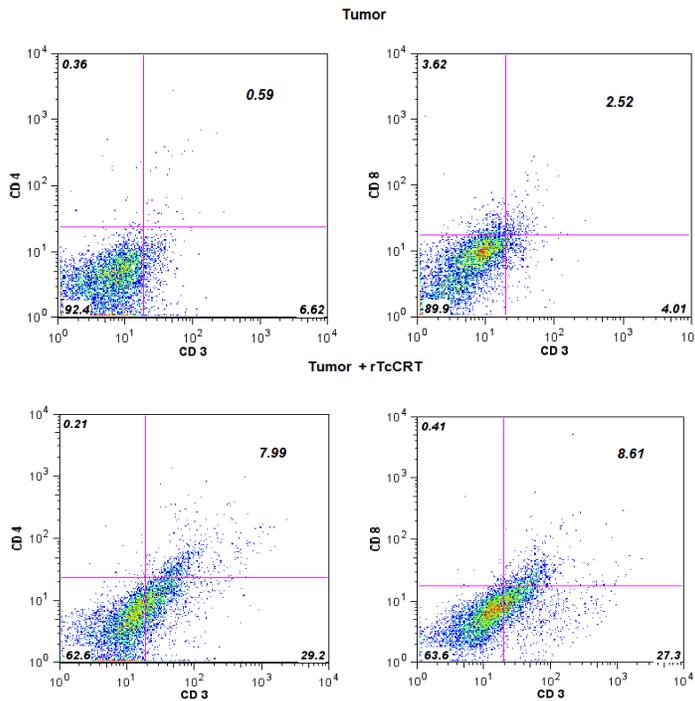
**a) Gate de la Población Inicial**



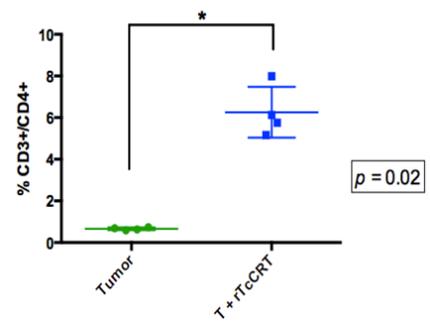
**b) Selección de los Cuadrantes (poblaciones negativas)**



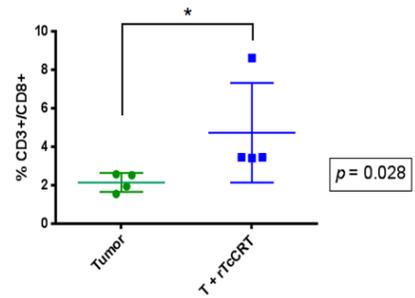
**c) Poblaciones Linfocitarias CD4+ y CD8+ del Tumor**



**Población de Linfocitos CD3+/CD4+**



**Población de Linfocitos CD3+/CD8+**



**Figura 9. En un adenocarcinoma Mamario Inoculado con rTcCRT aumentan los LT CD4+ y LT CD8+ Infiltrantes.** Se analizaron los tejidos tumorales desafiados con TA3-MTXR y tratados o no con rTcCRT por citometría de flujo (n=4), realizando un "gate" inicial de la población completa **(a)**. **(b)** Se representa la selección de los cuadrantes CD3CD4/CD3CD8 **(c)** Representa las poblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD8+ para el grupo control (Tumor) como el grupo tratado (Tumor + rTcCRT). En **(d)** se grafican las estadísticas para ambos grupos, siendo mayor las poblaciones del grupo tratado que en el control ( $p=0,02$  para CD3+CD4+ y  $p=0,028$  para CD3+CD8+). Para los análisis estadísticos se utilizó un *t Student* no paramétrico, Mann Whitney.

## 11. DISCUSIÓN

Las células tienen múltiples mecanismos integrados para prevenir cáncer, pero cuando las células tumorales pierden éstos mecanismos, escapan de la vigilancia del sistema inmunológico. En este trabajo analizamos el rol que tiene rTcCRT en la respuesta inmune celular inhibitoria del crecimiento tumoral mamario murino.

Para conocer de mejor manera el mecanismo que subyace a tal efecto, evaluamos la inhibición del crecimiento del adenocarcinoma mamario murino TA3-MTXR en animales tratados con rTcCRT (Figura 6), en los cuales se observa la existencia de un efecto antitumoral. Los tejidos obtenidos en esta etapa fueron fundamentales para cuantificar: mRNA de MmCRT, CRT en superficie y el grado de infiltración linfocitaria T.

Aunque CRT participa en varios procesos celulares, y la evidencia acumulada indica que tiene un gran impacto en el desarrollo de diferentes tipos de tumores, no encontramos diferencias entre los niveles de mRNA de MmCRT de los tejidos tratados *versus* control (Figura 7c). Por lo tanto, si rTcCRT no afectó los niveles de mRNA de MmCRT del tejido tumoral como mecanismo de inhibición del crecimiento, no podemos descartar que existan variaciones del mensajero a lo largo del ensayo.

Por otra parte, evaluamos el efecto que tiene la inoculación de rTcCRT en la expresión de CRT sobre la superficie de la célula tumoral, lo cual promueve la fagocitosis C1q dependiente, y con ello la modulación de la respuesta inmune. Los resultados señalan una mayor cantidad de CRT en superficie de las células del tejido tumoral de los ratones tratados (Figura 8d). Este hallazgo nos permite proponer que: i) el efecto antiangiogénico de rTcCRT afectaría la disponibilidad de oxígeno y nutrientes en el tejido tumoral, y esto causaría en las células un estrés, entrando en apoptosis y translocando mayor cantidad MmCRT a la superficie celular; ii) rTcCRT inoculada peritumoralmente se une a la membrana de la célula tumoral, ejerciendo un efecto similar al de MmCRT.

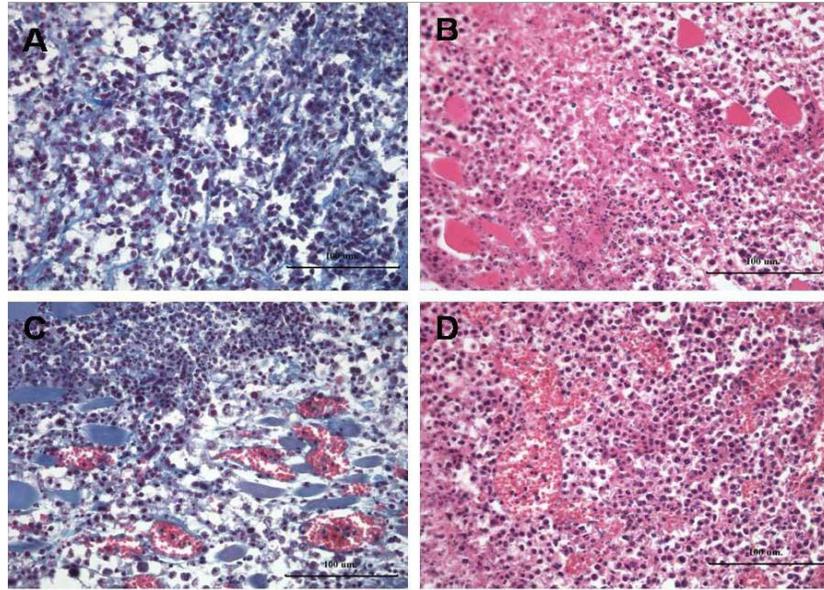
Se ha propuesto que la expresión de CRT en la superficie de la célula tumoral si bien es un mecanismo importante para eliminar células tumorales o dañadas, también es necesaria una baja expresión de señales no fagocíticas (CD47) y la expresión en membrana de receptores de CRT sobre las células macrofágicas<sup>37</sup>.

Dado que el anticuerpo policlonal anti-MmCRT, tiene un grado de reactividad cruzada con rTcCRT, no podemos discriminar entre MmCRT endógeno y rTcCRT exógenamente incorporado a la superficie celular. Sin embargo, podemos plantear que al existir mayor cantidad de la molécula profagocítica en la superficie del tejido tratado con rTcCRT, aumenta el reconocimiento por macrófagos y con ello se sustenta la mayor infiltración de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> encontrados (Figura 9c).

Las dificultades experimentales de este ensayo fueron: i) No se logró diferenciar las células tumorales de las que no lo son, ii) No se obtuvo tejido tumoral en todos los ratones ensayados, iii) Existió un ruido basal en los controles negativos utilizados (Figura 8b). De igual forma, a pesar de estas dificultades, los resultados fueron validados estadísticamente (Figura 8c).

Con respecto a las células que conforman este adenocarcinoma, se ha descrito morfológicamente que muestran heterogeneidad (Figura 10). Existiendo células pequeñas, redondeadas u ovoides, mononucleares que asemejan al aspecto de linfocitos. Por otra parte, se observan células de mediano a gran tamaño, de forma irregular, con núcleo prominente, en algunas ocasiones con nucléolo evidente. Además de presentar abundantes vasos sanguíneos distribuidos por todo el tumor, principalmente en la zona central<sup>38</sup>.

Si bien, las células neoplásicas son células propias y, así, casi todos los antígenos asociados con ellas están sujetos a procesos inductores de tolerancia que mantienen la homeostasis e inhiben el desarrollo de autoinmunidad, en muchos tumores pueden encontrarse antígenos únicos o expresados de manera inapropiada, y suelen ser detectados por el sistema inmunitario. Algunos de estos antígenos pueden ser los productos de oncogenes. Hay dos tipos principales de antígenos tumorales, que se clasifican por su singularidad, antígenos específicos para tumor y antígenos asociados con tumor, ambos tipos de antígenos pueden ser presentados al sistema inmune una vez que el tratamiento con rTcCRT permite la fagocitosis de las células tumorales.



**Figura 10.** Aspecto histológico de tumores TA3-MTXR representativos. a) área central del tumor, arteta (400x). b) área central del tumor, Hematoxilina Eosina. c) área periférica del tumor, Arteta (400x). d) área periférica del tumor, Hematoxilina Eosina (400x). Barra 100 $\mu\text{m}$ <sup>38</sup>.

Por otra parte, vía C1q, la presencia de TcCRT sobre las células tumorales, sí podría ser un potente estímulo inmunogénico para las células dendríticas (DCs) murinas *in vivo*, posibilidad propuesta en esta disertación. En otras palabras, un producto exógeno estimularía al sistema inmune para combatir el desarrollo del tumor. A su vez, encontrar no sólo una mayor cantidad de linfocitos CD4<sup>+</sup> en el tejido tumoral sino, además, un mayor número de linfocitos CD8<sup>+</sup>, da cuenta de una posible presentación cruzada de rTcCRT, por parte de las DCs y de las células tumorales.

Por otra parte, un aumento en la población de linfocitos CD3<sup>+</sup> en el tejido tumoral tratado con rTcCRT da cuenta de la participación de otras poblaciones como CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, en la inhibición del crecimiento tumoral, como NKT.

El alcance de este trabajo, se enfocó en la respuesta inmune linfocitaria CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, no describiendo lo que ocurre con otras poblaciones celulares como NK, macrófagos, linfocitos T reguladores y linfocitos B. De esta última se describe que, rTcCRT al ser un antígeno exógeno inoculado en la región periférica del tumor, es capaz de generar una respuesta inmune humoral. A su vez, estos anticuerpos podrían unir, vía Fc, C1, el que al estar distante de TcCRT, podría focalizar el ataque de la ruta

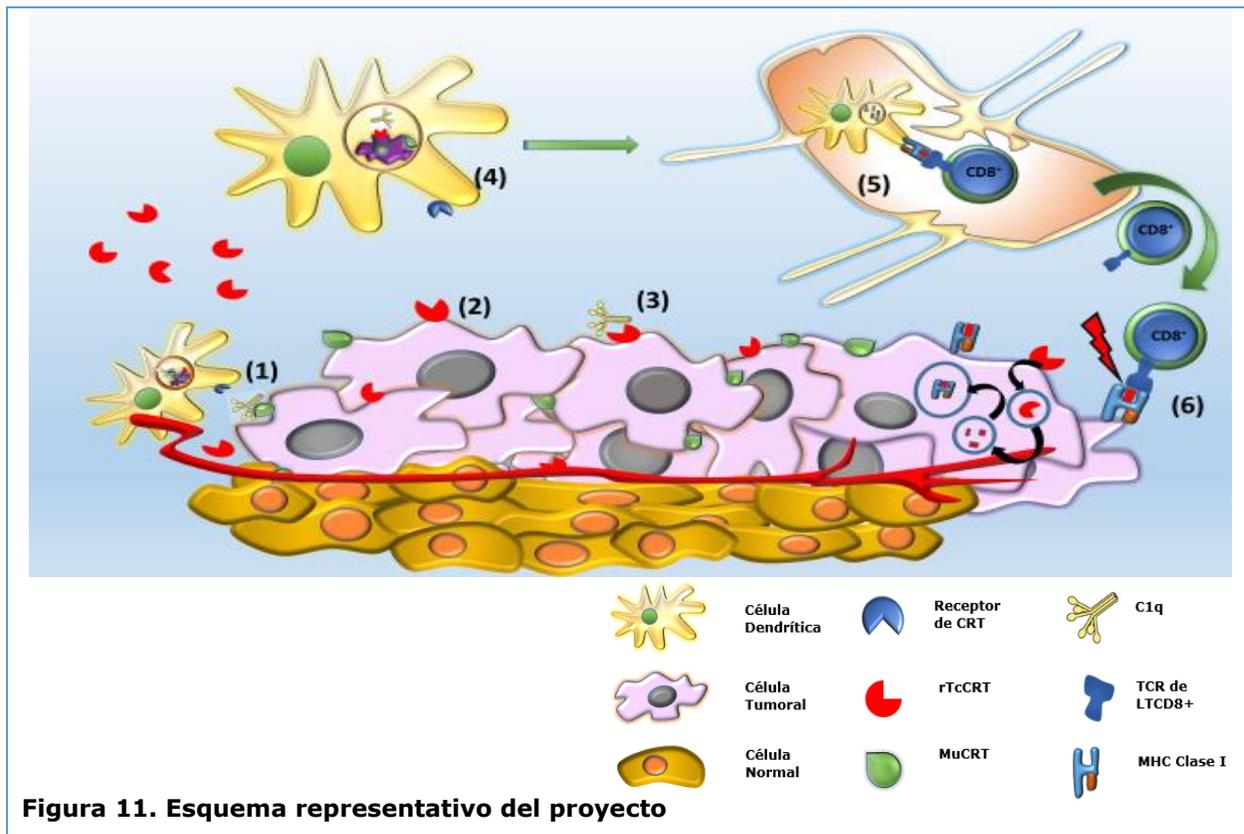
clásica sobre las células tumorales.

Aunque podríamos haber detectado la dinámica de la respuesta inmune con la inoculación de rTcCRT, por razones principalmente bioéticas, en nuestros ensayos, no obtuvimos tejido tumoral a diferentes tiempos. Esto no permitió detectar esta dinámica, como lo demostrado en investigaciones con *Toxoplasma gondii*, con otro tipo de tumor, donde se induce un aumento inicial de linfocitos CD4<sup>+</sup> y muy bajo de CD8<sup>+</sup> y, al finalizar el experimento, mientras los CD4<sup>+</sup> tienden a su nivel basal, los CD8<sup>+</sup> aumentan en el seno de aquellos tumores que reducen su crecimiento<sup>39</sup>.

Recientemente, se describió un modelo en ratas que reproducen carcinogénesis humana, donde la inmunización con extractos de epimastigotes *T. cruzi* suprimió significativamente el desarrollo del tumor<sup>40</sup>. Además, se indujo una activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La respuesta inmune también involucró el incremento de macrófagos, células dendríticas y anticuerpos, éstos anticuerpos son capaces de mediar ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) *in vitro*. Además, los anticuerpos anti-*T. cruzi* reaccionan cruzadamente con las líneas celulares de cáncer. Los datos anteriores sugieren la existencia de antígenos del parásito que evocan una respuesta antitumoral integrada por el sistema inmune innato y adaptativo<sup>40</sup>. En nuestro laboratorio, se demostró que utilizando un anticuerpo anti-TcCRT en ratones que recibieron extracto de *T. cruzi* se logra revertir la inhibición del crecimiento tumoral y que la inoculación con rTcCRT aumenta la infiltración linfocitaria. Estos hallazgos permiten decir que a diferencia de los más de 5000 productos génicos inoculados con el extracto de *T. cruzi*, en nuestro laboratorio logramos reproducir hallazgos similares con una sola molécula del parásito, TcCRT, la cual, entonces, es parte importante del efecto antitumoral.

La Figura 11 sintetiza lo principal de nuestra propuesta. Es probable que la inoculación s.c. simultánea de rTcCRT y del tumor TA3-MTXR, conlleve: i) Un efecto antiangiogénico (no mostrado); ii) Como consecuencia, un estrés de las células tumorales, las que translocan su CRT a la superficie<sup>41</sup> **(1)**, donde actúa como un receptor de C1q del complemento murino (cC1qR)<sup>42</sup>, generando así la señal profagocítica; iii) rTcCRT también puede incorporarse a la superficie de la célula tumoral **(2)**, y mediar la generación de “señales profagocíticas” C1q-dependientes **(3)**; iv) DCs murinas reconocen C1q, a través de sus propios receptores cC1qR, fagocitan y procesan antígenos del conjunto célula TA3-

MTXR / C1q murino / rTcCRT parasitario o murino **(4)**; v) De este conjunto, lo más inmunogénico debiera ser rTcCRT, dado que difiere en un 50% en su secuencia aminoacídica con MmCRT, mientras que ésta y HuCRT, difieren solo en un 5% aproximadamente.; vi) Las células dendríticas murinas, durante su viaje a los linfonodos regionales relevantes, procesan rTcCRT y presentan allí los péptidos respectivos a Linfocitos T (LTs) vírgenes **(5)**; vii) Los LTs activados viajan al tumor y allí debieran ejercer acciones ayudadoras y/o citotóxicas sobre las células tumorales que expresen péptidos relevantes **(6)**. La presentación de péptidos derivados de rTcCRT, por parte de las DCs y por las células tumorales, que permitan la interacción con moléculas MHC-I, implica presentación antigénica cruzada, lo cual no ha sido demostrado, ni negado, para las células neoplásicas. De hecho, aparte de las DCs, otras estirpes celulares también puede hacer presentación cruzada<sup>43-45</sup>.



Si bien no descartamos la inducción de una respuesta contra antígenos tumorales específicos, no definidos en el tumor TA3-MTXR, este trabajo aporta evidencia sobre el rol que tiene rTcCRT para inhibir el crecimiento tumoral, al proponer la existencia de una respuesta inmune celular, probablemente mediada principalmente por rTcCRT exógeno.

## 12. CONCLUSIONES

Se logró reproducir el efecto de inhibición del crecimiento tumoral mamario por rTcCRT, necesario para la obtención del material de análisis.

No se observan cambios en la cantidad de mRNA de MmCRT del tejido tumoral inoculado con rTcCRT. Pero sí en las cantidades detectadas en superficie de las células del tejido, donde podría tener un efecto en la generación de señales profagocíticas: i) al incorporarse a la superficie de la célula del tejido tumoral rTcCRT; ii) MmCRT sea exteriorizada a la superficie de la célula del tejido tumoral por el efecto antiangiogénico de rTcCRT. Una o ambas posibilidades estarían involucradas en el efecto antitumoral observado.

Se observó un aumento de LTCD4<sup>+</sup> y LTCD8<sup>+</sup> infiltrando el tejido tumoral, al inocular con la proteína parasitaria.

Por lo tanto, se concluye que el efecto antitumoral de rTcCRT es mediado por una respuesta inmune que involucra la participación de LTCD4<sup>+</sup> como LTCD8<sup>+</sup>, y que señales profagocíticas podrían ser responsables de la infiltración de dichas poblaciones linfocitarias.

Si bien a la fecha rTcCRT no es parte de ensayos como terapias antitumorales en humanos, dadas las capacidades demostradas de Calreticulina, ésta se perfila como una molécula interesante y con potencial en este contexto. Los hallazgos de esta investigación si bien contribuyen al conocimiento de los mecanismos de CRT para inhibir el crecimiento tumoral, deberán ser complementados con estudios enfocados en: probar el efecto de rTcCRT sobre líneas celulares tumorales humanas, detectar CRT tumoral expresada en membrana con un anticuerpo específico (monoclonal), evaluar la activación de las poblaciones linfocitarias CD8<sup>+</sup> obtenidas del tejido tumoral (efecto citotóxico) y medir subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup>, Th1 y Th2, evaluar otros marcadores de estrés celular (causado por el efecto antiangiogénico de rTcCRT).

## 13. ANEXO I

### 13.1 Comité de Ética

**CERTIFICADO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES  
AJUSTADO A LAS NORMAS ETICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE  
LA UNIVERSIDAD DE CHILE Y DE CONICYT**



El Comité de Bioética sobre la Investigación en Animales certifica que el Protocolo de Manejo y Cuidados de Animales de Laboratorio 2009 del Proyecto "*Trypanosoma cruzi* *Calreticulin Interplay with the Complement System and Angiogenesis*". Cuyo autor responsable es el **Dr. Arturo Ferreira Vigouroux**, del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y que aplica al concurso FONDECYT.

Se atiene a las normativas bioéticas de la investigación científica en animales ya que:

- 1) Fue revisado por el comité constituido por nueve personas, tres de ellas veterinarios, seis son académicos con más de 10 años de experiencia en investigación con animales quienes, asimismo, han estado evaluando éticamente estos estudios durante los últimos cuatro años. El comité consta, además, con una periodista diplomada en Bioética Clínica (que actúa como miembro externo no del área de investigación) e investigadores de variados campos incluidos los que no utilizan animales. Dos de los veterinarios son los Jefes del Bioterio de la Facultad y tienen una amplia experiencia en la mantención, cuidado y manejo de animales además de ser Diplomados en Bioética de la investigación y clínica.
- 2) El comité sólo acepta protocolos acordes con las leyes y permisos vigentes en Chile que están vinculados a la regulación del trato de los animales y que se atienen a las normativas internacionales aceptadas por las leyes chilenas. También vela porque las sustancias que son utilizadas en estos seres vivos y que están prohibidas, reguladas o sujetas a prescripción retenida en seres humanos, no sean empleadas por los investigadores o facilitadas a otros individuos.
- 3) En la revisión se exige que el protocolo sea firmado por un investigador o académico que se haga responsable de todas aquellas acciones que están relacionadas con el animal y que se lleven a cabo en el recinto que se encuentra bajo su autoridad. De igual manera, se le solicita que el protocolo tenga un título claro, que en términos simples se explicita lo que se pretende lograr con el estudio y que se detalle la duración de la investigación. Asimismo, que en el documento se señale que el director de la institución también se responsabiliza por la actividad científica en que están implicados los animales de experimentación usados en las dependencias bajo su autoridad.
- 4) El comité sólo aprueba protocolos cuyas propuestas son convincentes y garantizan la obtención de conocimientos o tecnologías científicamente válidas que justificarían el posible sufrimiento, malestar o aflicción de los animales, dado que estos logros redundarían en un beneficio tanto para el ser humano como para los propios sujetos de experimentación.
- 5) El comité vela porque todas las personas que manejan a los animales tengan la preparación necesaria para hacerlo en forma acreditada o equivalente.

- 6) El comité cuida con esmero que el uso de estos seres vivos se concrete sólo cuando es estrictamente necesario, por lo tanto, siempre y cuando se constate que no hay posibilidad de reemplazarlos por otro diseño de experimentación. También vela porque las especies seleccionadas sean las apropiadas y porque el número de los animales empleados sea el mínimo necesario para obtener resultados válidos. De igual manera, se preocupa de que las técnicas o intervenciones impliquen el menor sufrimiento posible, esto es particularmente relevante al momento de evaluar las prácticas de manipulación e intervenciones invasivas de los animales, así como su traslado, manejo del dolor, anestesia, eutanasia y los recintos donde se realizarán estos procedimientos, siempre de acuerdo a la especie y el número empleado. Se ha examinado con cuidado especial las condiciones éticas de la mantención de animales en experimentación antes, durante y después de las intervenciones. Un acápite especial se refiere a la evaluación del término de los experimentos debido a que el sufrimiento animal puede ser excesivo aún cuando no se haya completado la experiencia científica.
- 7) El comité también se preocupa de que haya una institución que sustente física y económicamente la investigación y que se haga responsable de la confidencialidad de los experimentos con animales.
- 8) El Comité vela porque los restos de estos seres vivos, así como de los reactivos químicos, físicos o bióticos que se utilizan en su experimentación sean manejados bajo las normas más estrictas de seguridad y bioseguridad, con el objetivo de proteger no sólo a quienes están involucrados en los experimentos, sino también a la comunidad general. Se exige que todos los investigadores se atengan a las normativas de Bioseguridad exigidas por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que se están actualizando permanentemente de acuerdo a las universalmente aceptadas.
- 9) Se adjunta el Protocolo correspondiente que especifica los requerimientos indicados.



DR. CARLOS VALENZUELA Y.  
Presidente

Comité de Bioética Sobre la Investigación en Animales

CVY/mva.  
Protocolo Nº 0283 Dr. Arturo Ferreira Vigouroux  
Santiago, 29 de Enero de 2009.

## 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart B y Wild C. "World Cancer Report". International Agency for Research on Cancer 1:15-16, 2014.
2. Departamento de Estadísticas e Información de Salud. "Series y gráficos de mortalidad". Ministerio de Salud <http://www.deis.cl/?p=2543>, 2012.
3. Chen D y Mellman I. "Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle". Cell Press 39: 1-10, 2013.
4. Hanahan D y Weinberg R. "Hallmarks of Cancer: The Next Generation". Cell 144: 646-674, 2011.
5. Martínez J y Herrera L. "Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer". Cancerología 1: 83-96, 2006.
6. Pike S, Yao L, Jones K, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K y cols. "Vasostatin, a Calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses Tumor Growth". J Exp Med 188 (12): 2349-2356, 1998.
7. Michalak M, Corbett E, Mesaali N, Nakamura K y Opas M. "Calreticulin: one protein, one gene, many functions". Biochem J (344): 281-292, 1999.
8. Lu Y, Chen C, Wang B, Hsu W, Chen S, Chang K y cols. "Changes in tumor growth and metastatic capacities of J82 Human Bladder cancer cells suppressed by down-regulation of calreticulin expression". Am J Pathol 179: 1425-1433, 2011.
9. Jiang Y, Dey S and Matsunami H. "Calreticulin: roles in cell-surface protein expression". Membranes 4: 630-641, 2014.
10. Lu Y, Weng W and Lee H. "Functional roles of calreticulin in cancer biology". BioMed Res Int 2015: 1-9, 2015.
11. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, Gonzalez F, Ramírez M, Reyes D y cols. "Heat-Shock Induction of Tumor-Derived Danger Signals Mediates Rapid Monocyte Differentiation into Clinically Effective Dendritic Cells". Clin Cancer Res 17 (8): 2474-2483, 2011.
12. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL y cols. "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death". Nat Med 13: 54-61, 2006.
13. Dunn G, Bruce A, Ikeda H, Old L y Schreiber R. "Cancer immunoediting: from

- immunosurveillance to tumor escape*". Nat Immunol 3 (11): 991-998, 2002.
14. Morvan M y Lanier L "NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks". Nat Rev Cancer 16: 7-16, 2015.
  15. Marquez D, Salla J, Salud A "Role of gamma-delta T-cells in cáncer. Another opening door to immunotherapy". Clin Transl Oncol 14: 891-895, 2012.
  16. Spurrell E y Lockley M. "Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics". ECancer 8: 441 1-10, 2014.
  17. James A M, Cohen A y Campbell K. "Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells". Frontiers In 4 (481): 1-12, 2013.
  18. Batista A. "Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos". Medisan 7(2): 75-88, 2003.
  19. Yousofi H y Yousefi Morteza. "Parasites and cancers: parasite antigens as possible targets for cancer immunotherapy". Future Oncol 8(12): 1529-1535, 2012.
  20. Kremmentsov N. "Trypanosoma cruzi, cáncer and the Cold War". His Cienc, Sa Man Scielo 16(1): 75-94, 2009.
  21. Kallinikova V, Matekin P, Oglobina T, Leikina M, Kononenko A, Sokolova N y cols. "Anticancer Properties of Flagellate Protozoan Trypanosoma cruzi Chagas, 1909". Biol Bulletin (28, 3): 244-255, 2001.
  22. Guhl F y Lazdins-Hels J. "Reporte sobre la enfermedad de Chagas". WHO. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf,2007](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf,2007).
  23. Aguillón JC, Ferreira L, Pérez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A y cols. "Tc45, a dimorphic Trypanosoma cruzi immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin". Am J Trop Med Hyg 63: 306-312, 2000.
  24. Ribeiro C, López N, Ramírez G, Valck C, Molina MC, Aguilar L y cols. "Trypanosoma cruzi calreticulin: A posible role in Chagas's disease autoimmunity". Mol Immunol 46: 1092-1099, 2009.
  25. Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguillón y cols. "Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against Trypanosoma cruzi calreticulin, an immunodominant antigen". Acta Tropica 75: 291-300, 2000.

26. Ferreira V, Molina MC, Schwaeble W, Lemus D y Ferreira A. "*Does Trypanosoma cruzi calreticulin modulate the complement system and angiogenesis?*". *Trens in Paras* 21: 169-174, 2005.
27. Ferreira V, Valck C, Sánchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC y cols. "*The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically inhibited by Calreticulin from Trypanosoma cruzi*". *J. Immunol* (172): 3042-3050, 2004.
28. Valck C, Ramírez G, López N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sánchez G y cols. "*Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by Trypanosome cruzi calreticulin*". *Mol Immunol* (7,8): 1516-1521, 2010.
29. Ramírez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, López N, Sánchez G y cols. "*Trypanosoma cruzi calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity*". *Immunobiology* 216: 265-273, 2011.
30. Toledo V, Ramírez G, Valck C, López N, Ribeiro C, Maldonado I y cols. "*Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from Trypanosoma cruzi and Homo sapiens sapiens*". *Biol Res* 43: 287-289, 2010.
31. Molina MC, Ferreira V, Valck C, Aguilar L, Orellana J, Rojas A y cols. "*An in vivo role for Trypanosoma cruzi calreticulin in antiangiogenesis*". *Mol Biochem Parasitol* 140 (4): 133-140, 2005.
32. Yao L, Pike SE y Tosato G. "*Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function*". *J Leukoc Biol* 71: 47-53, 2002.
33. López NC, Valck C, Ramírez G, Rodríguez M, Ribeiro C, Orellana J, y cols. "*Antiangiogenic and antitumor effects of Trypanosoma cruzi Calreticulin*". *Plos Negl Trop Dis* 4: e730, 2010.
34. Aguilar L, Lobos L, Rosas C, Vallejos G, Falcón C, Sosoniuk E y cols. "*Human Survivin and Trypanosoma cruzi Calreticulin Act in Synergy against a Murine Melanoma In Vivo*". *Plos One* 9 (4): 1-10, 2014.
35. Cheng S, He J, Dong Y, Liu X, Ding Y, Gao R y cols. "*Characterization of Calreticulin Expression in Mouse Endometrium during Embryo Implantation*". *Biol*

Res 42: 505-516, 2009.

36. Schmittgen T y Livak K. "Analyzing real-time PCR data by the comparative *C<sub>t</sub>* method". Nat Protoc (3, 6): 1101-1108, 2008.
37. Feng M, Chen J, Weissman R, Volkmer J, Yi P, McKenna K y cols. "Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk". PNAS 112 (7): 2145-2150, 2015.
38. Rosas C, Roa I, Sinning M, Fuenzalida M y Lemus D. "Efecto de Celecoxib en una Variante Multirresistente del Tumor TA3. Una Descripción Histológica". Int. J. Morhol 31(2): 392-298, 2013.
39. Kim J, Jung S, Kim S, Kim T, Shin D, Lee J y cols. "Inhibition of Lewis Lung Carcinoma Growth by *Toxoplasma gondii* through Induction of Th1 Immune Responses and Inhibition of Angiogenesis". J Korean Med 22: 38-46, 2007.
40. Ubillos L, Freire T, Berriel E, Chiribao M T, Chiale C, Festari M F y cols. "Trypanosoma cruzi extracts elicit protective immune response against chemically induced colon and mammary cancers". Int. J. Cancer 138: 1719-1731, 2016.
41. Fucikova J, Becht E, Iribarren K, Goc J, Remark R, Damotte D y cols. "Calreticulin Expression in Human Non-Small Cell Lung Cancers Correlates with Increased Accumulation of Antitumor Immune Cells and Favorable Prognosis". Canc Res. 76 (7): 1746-1756, 2016.
42. Eggleton P, Tenner AJ y Reid KB. "Review C1q receptors". Clin Exp Immunol. 3:406-412, 2000.
43. Bagai R, Valujskikh A, Canaday DH, Bailey E, Lalli PN, Harding CV y cols. "Mouse endothelial cells cross-present lymphocyte-derived antigen on class I MHC via a TAP1- and proteasome-dependent pathway". J. Immunol. 174 (12): 7711-7715, 2005.
44. Razakandrainibe R, Pelleau S, Grau GE y Jambou R "Antigen presentation by endothelial cells: what role in the pathophysiology of malaria?". Trends Parasitol. 28 (4): 151-160, 2012.
45. Gutiérrez-Martínez E, Planes R, Anselmi G, Reynolds M, Menezes S, Adiko AC, y cols "Cross-Presentation of Cell-Associated Antigens by MHC Class I in Dendritic Cell Subsets". Front Immunol. 6 (363): 1-15, 2015.

