

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



**EFFECTO INMUNOMODULADOR DE HEMOCIANINAS DE  
MOLUSCOS COMBINADAS CON ADYUVANTES DE  
VACUNA EN CÁNCER ORAL MURINO**

Tesis para optar por el grado académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Biotecnología por:

**JUAN JOSÉ MORA ROMÁN**

Director de tesis

María Inés Becker C., Ph. D.

Santiago de Chile, 2015

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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

**JUAN JOSÉ MORA ROMÁN**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Biotecnología, en el examen de defensa rendido el día 20 de Enero del 2016

Director de tesis:

Dra. María Inés Becker Ph. D.

\_\_\_\_\_

Comisión Informante de tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela Ph. D.

\_\_\_\_\_

Dr. Dante Miranda Ph. D.

\_\_\_\_\_

Dr. Álvaro Lladser Ph. D.

\_\_\_\_\_

“Feliz aquel que lleva consigo un ideal, un Dios interno, sea el ideal de la patria,  
el ideal de la ciencia o simplemente las virtudes del Evangelio.”

Epitafio en la tumba de Louis Pasteur.

A Vera Román, una mujer que me ha demostrado cómo de la mano de Dios  
cualquier tarea se puede llevar a feliz término, sin importar las dificultades y los  
sacrificios que esto implique. Eres una heroína y una gran madre.

A Mariana Ramírez, quien estuvo a mi lado durante estos dos años, por su  
cariño, paciencia y entrega. Te agradezco por creer en mí en todo momento.

Ha sido una enorme bendición que una mujer como tú llegara a mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

Es complicado realmente explicar en pocas palabras a las muchas personas a quien agradezco por los dos maravillosos años que ha durado esta experiencia de estudio fuera de mi patria. En primer lugar, me siento feliz por haber trabajado en el laboratorio de una gran científica y una excelente mujer como lo es la profesora María Inés. Siempre he creído que las cosas suceden porque Dios tiene un propósito y el llegar a FUCITED no ha sido la excepción. La fundación me permitió crecer como profesional, pero especialmente como ser humano, gracias a la dedicación, las llamadas de atención, el cariño y la entrega en cada paso que tuve en el desarrollo de mi proyecto de tesis por parte de su directora, la profe María Inés. Además, me llevo muchas de las historias que compartió conmigo y las atesoraré por siempre, porque como ella me dio a entender, somos el resultado de la interacción con las personas que vamos conociendo a lo largo de nuestros años.

Asimismo he de agradecer todos los consejos y la buena onda de mis compañeros de laboratorio Miguel del Campo, Claudia d' Alençon, Javiera Villar, José Jiménez, Javier Pizarro y Miriam Palacios. El trabajo en el laboratorio y durante las sesiones de seminario se convirtió en momentos de muchas risas e inmenso aprendizaje al lado de ellos. Ahora que culmina mi labor en la fundación, los considero grandes amigos en mi vida. A Augusto Manubens le agradezco su pensamiento crítico y constructivo para cuestionarme muchas cosas durante los seminarios que realicé. Sin sus opiniones, muchas de las cosas que aprendí ni siquiera las habría considerado. También debo expresar mi gratitud hacía Fabián Godoy, por sus atenciones para el cuidado de los animales de experimentación y la limpieza en el laboratorio, y a Rodolfo Soto, por el mantenimiento de los equipos del mismo y la preparaciones de las soluciones que necesité para llevar a cabo mis

experimentos. Mis agradecimientos también los hago extensivos hacia todo el personal de Biosonda.

Al concluir esta etapa de mi formación también agradezco toda la dedicación del personal docente de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, especialmente a la profesora Daniela Seelenfreund, pues a través de su tiempo para responderme los múltiples correos que le envié, pude tener claro el panorama y el proceso para optar por hacer mi Magíster en la mejor universidad de Chile. A los profesora integrantes de mi Comisión Informante de Tesis, Dra. María Antonieta Valenzuela, Dr. Dante Miranda y Dr. Álvaro Lladser, estoy feliz por haber contado con personas con tanta disponibilidad para ayudarme a desarrollar un trabajo digno de esta institución.

Para concluir, no puedo dejar de mencionar a tantas personas que me apoyaron desde Costa Rica para alcanzar esta meta, entre ellos, mi mamá, mi novia, mi hermana postiza Karla, mis amigos de la Universidad de Costa Rica, de la Iglesia y los ticos que conocí estando en Chile. No puedo dejar de lado a todas las amistades que cultivé durante mis dos años aquí, la felicidad y aceptación que me hicieron sentir lo reflejo en amor por esta tierra, tanto así que una parte de mi corazón es ahora chileno.

## **FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue financiada parcialmente por el Proyecto FONDECYT 1151337, titulada “Mollusk hemocyanins as immunomodulatory proteins with beneficial clinical outcomes: Elucidating the role of C-type lectin receptors in these effects.” Además, se recibió apoyo de BIOSONDA, S.A., y de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

## **PRESENTACIONES A CONGRESOS**

### **Congresos Nacionales**

**Mora, J.**, del Campo, M., Paolini, F., Curzio, G., Venuti, A., Jara, L., Ferreira, J., Manubens, A., Becker, M. Efecto inmunomodulador de hemocianinas de moluscos combinadas con adyuvantes de vacuna en cáncer oral murino. LVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile y XIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Inmunología. Puerto Varas, Chile. Noviembre, 2015.

## ÍNDICE

	Página
<b>DEDICATORIA</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>FINANCIAMIENTO</b>	<b>v</b>
<b>PRESENTACIONES A CONGRESOS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b> Características estructurales y bioquímicas de las hemocianinas de moluscos	<b>5</b>
<b>1.2</b> Similitudes y diferencias estructurales entre las hemocianinas de interés	<b>7</b>
<b>1.3</b> Mecanismos de inmunoestimulación de las hemocianinas	<b>12</b>
<b>1.4</b> Aplicación del efecto inmunomodulador no específico de las hemocianinas para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer	<b>16</b>
<b>1.5</b> Uso de adyuvantes en conjunto con hemocianinas para mejorar la respuesta inmune frente a los tumores	<b>21</b>

1.6	Cáncer oral como modelo para estudiar la respuesta inmunoestimulante de las hemocianinas combinadas con adyuvantes	26
1.7	Importancia de los estudios preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos	29
<b>2. HIPÓTESIS</b>		<b>32</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>		<b>33</b>
3.1	Objetivo general	33
3.2	Objetivos específicos	33
<b>4. MATERIALES</b>		<b>35</b>
4.1	Materiales biológicos	35
4.2	Reactivos	37
4.3	Soluciones	39
4.4	Equipos	40
4.5	Servicios	41
<b>5. MÉTODOS</b>		<b>42</b>
5.1	Evaluación de la respuesta inmune humoral de ratones inoculados con diferentes preparaciones de hemocianina-adyuvante	42
5.2	Determinación del título de anticuerpos séricos anti-hemocianina.	42
5.3	Determinación de isotipo	44
5.4	Detección de citoquinas	45
5.5	Reacción de hipersensibilidad retardada	46
5.5.1	Método 1	46
5.5.2	Método 2	46

<b>5.6</b>	Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo ortotópico de cáncer oral (bioensayo terapéutico)	<b>47</b>
<b>5.7</b>	Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo ortotópico de cáncer oral (bioensayo profiláctico)	<b>48</b>
<b>5.8</b>	Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo heterotópico de cáncer oral (bioensayo profiláctico)	<b>49</b>
<b>5.9</b>	Determinación de la reacción cruzada entre anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7	<b>51</b>
<b>5.10</b>	Ensayo de viabilidad celular mediante Alamar Blue	<b>52</b>
<b>5.11</b>	Análisis de resultados	<b>53</b>
<b>6. RESULTADOS</b>		<b>54</b>
<b>6.1</b>	Respuesta inmune humoral y celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en un modelo murino	<b>54</b>
<b>6.1.1</b>	Respuesta inmune humoral específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6	<b>54</b>
<b>6.2.1</b>	Respuesta inmune celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6	<b>58</b>
<b>6.2</b>	Efecto antitumoral <i>in vivo</i> en dos modelo murino de cáncer oral de FLH en conjunto con QS-21	<b>60</b>
<b>6.2.1</b>	Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo terapéutico usando el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>60</b>
<b>6.2.2</b>	Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo profiláctico usando el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>63</b>

<b>6.2.3</b>	Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo profiláctico usando el modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7	<b>65</b>
<b>6.3</b>	Efecto citotóxico y reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie de las células tumorales que contribuyen al mecanismo de acción de las distintas formulaciones hemocianina-adyuvante	<b>75</b>
<b>6.3.1</b>	Efecto <i>in vitro</i> de las hemocianinas solas o en conjunto con adyuvantes sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7	<b>75</b>
<b>6.3.2</b>	Reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7	<b>78</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>		<b>82</b>
<b>7.1</b>	Respuesta inmune humoral y celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en un modelo murino	<b>82</b>
<b>7.1.1</b>	Respuesta inmune humoral específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en en ratones de la cepa C57BL/6	<b>82</b>
<b>7.1.2</b>	Respuesta inmune celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en en ratones de la cepa C57BL/6	<b>90</b>
<b>7.2</b>	Efecto antitumoral no específico <i>in vivo</i> en un modelo murino de cáncer oral de FLH en conjunto con QS-21	<b>93</b>
<b>7.3</b>	Efecto citotóxico y reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie de las células tumorales que contribuyen al mecanismo de acción de las distintas formulaciones hemocianina-adyuvante	<b>105</b>
<b>7.3.1</b>	Efecto <i>in vitro</i> de las hemocianinas solas o en conjunto con adyuvantes sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7	<b>105</b>
<b>7.3.2</b>	Reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7	<b>109</b>

<b>8. PROYECCIONES FUTURAS</b>	<b>113</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>117</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>120</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Modelo de la estructura de una hemocianina de molusco y microscopia electrónica de transmisión de moléculas de hemocianinas de molusco purificadas y teñidas negativamente mostrando la forma cilíndrica hueca característica	<b>6</b>
<b>Figura 2</b>	Organización estructural de las subunidades en las hemocianinas de KLH, CCH y FLH	<b>11</b>
<b>Figura 3</b>	Efecto sobre la respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con hemocianinas de moluscos solas o en conjunto con adyuvantes de vacunas	<b>57</b>
<b>Figura 4</b>	Efecto sobre la respuesta inmune celular de ratones inmunizados con hemocianinas de moluscos solas o en conjunto con adyuvantes de vacunas	<b>59</b>
<b>Figura 5</b>	Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo terapéutico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>67</b>
<b>Figura 6</b>	Efecto de hemocianinas más QS-21 en un esquema de tratamiento terapéutico, en el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea celular AT-84 E7 Luc	<b>68</b>
<b>Figura 7</b>	Bioensayo terapéutico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>69</b>
<b>Figura 8</b>	Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo profiláctico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>70</b>

<b>Figura 9</b>	Efecto de hemocianinas más QS-21 en un esquema de tratamiento profiláctico, en el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea celular AT-84 E7 Luc	<b>71</b>
<b>Figura 10</b>	Bioensayo profiláctico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc	<b>72</b>
<b>Figura 11</b>	Bioensayo profiláctico del modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7	<b>73</b>
<b>Figura 12</b>	Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo profiláctico del modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7	<b>74</b>
<b>Figura 13</b>	Efecto de las hemocianinas solas o con adyuvantes de vacunas sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral AT-84	<b>79</b>
<b>Figura 14</b>	Efecto de las hemocianinas solas o con adyuvantes de vacunas sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral MOC7	<b>80</b>
<b>Figura 15</b>	Efecto de las hemocianinas solas o con QS-21 sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral AT-84 E7 Luc	<b>81</b>
<b>Figura 16</b>	Mecanismo de acción propuesto para la formulación FLH+QS-21	<b>112</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

		<b>Página</b>
<b>Tabla I</b>	Composición de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante administradas a los animales de experimentación, para determinar respuesta inmune humoral	<b>43</b>
<b>Tabla II</b>	Composición de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante a ser administradas a los animales de experimentación, para los bioensayos ortotópicos y heterotópicos de cáncer oral.	<b>50</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APCs</b>	:	<i>Antigen presenting cells</i> / células presentadoras de antígenos
<b>BCG</b>	:	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> / Bacilo Calmette-Guérin
<b>CCD</b>	:	<i>Charge-coupled device</i> / dispositivo de carga acoplada
<b>CCH</b>	:	<i>Concholepas concholepas hemocyanin</i> / hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CCH-A</b>	:	<i>Concholepas concholepas hemocyanin subunit A</i> / subunidad A de la hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CCH-B</b>	:	<i>Concholepas concholepas hemocyanin subunit B</i> / subunidad B de la hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CD3+</b>	:	<i>T lymphocyte</i> / linfocito T
<b>CD4+</b>	:	<i>T helper lymphocyte</i> / linfocito T cooperador
<b>CD8+</b>	:	<i>T cytotoxic lymphocyte</i> / linfocito T citotóxico
<b>DHEA</b>	:	<i>Dehydroepiandrosterone</i> / dehidroepiandrosterona
<b>DO</b>	:	<i>Optical density</i> / densidad óptica
<b>DNFB</b>	:	<i>2,4-dinitrofluorobencene</i> / 2,4-dinitrofluorobenceno
<b>DMBA</b>	:	<i>7,12-dimethylbenz(a)anthracene</i> / 7,12-dimetillbenz(a)antraceno
<b>DMEM</b>	:	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i> / Medio de Eagle modificado de Dulbecco
<b>ELISA</b>	:	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> / ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FasL</b>	:	<i>Fas ligand</i> / ligando Fas
<b>FDA</b>	:	<i>Food and Drug Administration</i> / Administración de Alimentos y Drogas

<b>FLH</b>	:	<i>Fissurella latimarginata hemocyanin</i> / hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>
<b>FUs</b>	:	<i>functional units</i> / unidades funcionales
<b>GD2</b>	:	<i>disialoganglioside 2</i> / disialogangliósido 2
<b>GD3</b>	:	<i>disialoganglioside 3</i> / disialogangliósido 3
<b>GM2</b>	:	<i>ganglioside M2</i> / gangliósido M2
<b>HRP</b>	:	<i>horseradish peroxidase</i> / peroxidasa de rábano
<b>IgG</b>	:	<i>immunoglobulin G</i> / inmunoglobulina G
<b>IgG1</b>	:	<i>immunoglobulin G1</i> / inmunoglobulina G1
<b>IgG2a</b>	:	<i>immunoglobulin G2a</i> / inmunoglobulina G2a
<b>IgG2b</b>	:	<i>immunoglobulin G2b</i> / inmunoglobulina G2b
<b>IgG3</b>	:	<i>immunoglobulin G3</i> / inmunoglobulina G3
<b>IgM</b>	:	<i>immunoglobulin M</i> / inmunoglobulina M
<b>IL-2</b>	:	<i>interleukin 2</i> / interleucina 2
<b>IL-4</b>	:	<i>interleukin 4</i> / interleucina 4
<b>IL-6</b>	:	<i>interleukin 6</i> / interleucina 6
<b>IL-10</b>	:	<i>interleukin 10</i> / interleucina 10
<b>IL-12</b>	:	<i>interleukin 12</i> / interleucina 12
<b>IL-12p40</b>	:	<i>interleukin 12p40</i> / interleucina 12p40
<b>IL-23</b>	:	<i>interleukin 23</i> / interleucina 23
<b>INF-<math>\alpha</math></b>	:	<i>alfa interferon</i> / interferón alfa
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	:	<i>gamma interferon</i> / interferón gamma
<b>KLH</b>	:	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> / hemocianina de lapa californiana

<b>KLH1</b>	:	<i>Keyhole limpet hemocyanin subunit 1</i> / subunidad 1 de hemocianina de lapa californiana
<b>KLH2</b>	:	<i>Keyhole limpet hemocyanin subunit 2</i> / subunidad 2 de hemocianina de lapa californiana
<b>M2</b>	:	<i>alternatively activated macrophage</i> / macrófago activado clásicamente
<b>MDa</b>	:	MegaDaltons
<b>MHC-I</b>	:	<i>major histocompatibility complex class I</i> / complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
<b>MHC-II</b>	:	<i>major histocompatibility complex class II</i> / complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
<b>MUC1</b>	:	<i>mucin 1</i> / mucina 1
<b>MUC2</b>	:	<i>mucin 2</i> / mucina 2
<b>NK</b>	:	natural killer
<b>PBS</b>	:	<i>phosphate buffered saline</i> / amortiguador salino de fosfato
<b>pNpp</b>	:	<i>para-nitrophenylphosphate</i> / para-nitrofenilfosfato
<b>RPMI</b>	:	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> / medio del Instituto Roswell Park Memorial
<b>SFB</b>	:	<i>fetal bovine serum</i> / suero fetal bovino
<b>Th1</b>	:	<i>T helper lymphocyte type 1 response</i> / respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 1
<b>Th2</b>	:	<i>T helper lymphocyte type 2 response</i> / respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	<i>tumor necrosis factor alfa</i> / factor de necrosis tumoral alfa
<b>Tween 20</b>	:	<i>polysorbate 20</i> / polisorbato 20

## RESUMEN

Las hemocianinas de algunos moluscos son ampliamente usadas en biomedicina, entre ellas, la de *Megathura crenulata* (KLH), de *Concholepas concholepas* (CCH) y de *Fissurella latimarginata* (FLH), éstas dos últimas producidas en Chile, debido a que son potentes inmunoestimulantes no específicos. El factor común en su mecanismo de inmunoestimulación es que polarizan la respuesta hacia una de tipo Th1, fundamental para combatir tumores. Sin embargo, para potenciar su efecto en cánceres más agresivos como el cáncer oral, se requieren adyuvantes adicionales.

Así, los objetivos de esta tesis fueron estudiar la respuesta inmune específica, el efecto antitumoral en modelos murinos de cáncer oral y el efecto *in vitro* de una formulación terapéutica, constituida por una hemocianina y un adyuvante tipo Th1 (QS-21, AddaVax), planteando las siguientes hipótesis: **1.** Las hemocianinas de moluscos gastrópodos inducen una respuesta inmune humoral y celular del tipo Th1 en la inmunoterapia del cáncer oral en un modelo murino, que será potenciada al ser empleadas en conjunto con adyuvantes Th1, mejorando así la respuesta terapéutica contra dicho cáncer. **2.** Las hemocianinas afectan la viabilidad de las células tumorales de cáncer oral.

Los principales resultados demostraron que: **1.** La formulación FLH más QS-21 presentó la mejor inmunogenicidad, reflejada en un mayor título de IgG total anti-hemocianina, con predominio de anticuerpos IgG2a, y una respuesta celular superior en un ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH). **2.** En los modelos ortotópicos y heterotópicos de cáncer oral, la formulación FLH más QS-21 brindó los resultados más prometedores, evaluados mediante una DTH positiva, menor desarrollo de tumor y mayor supervivencia de los animales de experimentación en comparación con el resto de los tratamientos y controles, siendo el denominador común el requerimiento de una inmunización previa con hemocianina antes del desafío con las células tumorales. **3.** Las preparaciones de hemocianina-adyuvante tuvieron efectos variables, pero no significativos sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7. **4.** No se encontró reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral murina MOC7.

Finalmente, es importante destacar que se trata del primer trabajo en que se investiga el efecto de hemocianinas solas y combinadas con adyuvantes en modelos de cáncer oral murino, por lo cual los resultados obtenidos sientan las bases para profundizar en el estudio y la aplicación de las hemocianinas y especialmente de FLH en la inmunoterapia del cáncer oral, tanto para la prevención como para el tratamiento de este tipo de carcinoma en seres humanos.

## ABSTRACT

The hemocyanins of some mollusks are used in biomedicine, including the one of *Megathura crenulata* (KLH), of *Concholepas concholepas* (CCH) and of *Fissurella latimarginata* (FLH), the last two produced in Chile, since they are potent non-specific immunostimulants. The common factor in their immunostimulatory mechanism is that induce a strong polarization toward Th1 immune response, fundamental for destroying tumors. Nevertheless, to potentiate its effect in more aggressive cancers like oral cancer, additional adjuvants are required.

The aims of this thesis were to study the specific immune response, the antitumor effect in murine models of oral cancer and the *in vitro* effect of a therapeutic formulation, consisting of a hemocyanin and a Th1 adjuvant (QS-21, AddaVax). The hypotheses were: **1.** The hemocyanins of mollusks gastropod induce a humoral and cellular type Th1 immune response in oral cancer immunotherapy in a murine model, and will be enhanced when they are used in conjunction with Th1 adjuvants, thereby improving the therapeutic response against such cancer. **2.** The hemocyanins affect the cellular viability of the tumor cells of oral cancer.

The principal results demonstrated that: **1.** The FLH plus QS-21 formulation showed the better immunogenicity, as reflected in a major anti-hemocyanin IgG total tittle, with predominance of IgG2a antibodies, and better cellular response in a delated-type hypersensitivity assay (DTH). **2.** In the orthotopic and heterotopic models of oral cancer, the FLH plus QS-21 formulation showed the most promising results, evaluated through a positive DTH, less tumor development and a major survival compared with other treatments and controls. The common factor was the priming with hemocyanins prior the tumor cells challenge. **3.** The hemocyanin-adjuvant preparations had variable, without significant effects on the viability of the oral cancer cell lines AT-84, AT-84 E7 Luc and MOC7. **4.** A cross reaction between the anti-hemocyanin antibodies and the surface antigens in the MOC7 murine tumor line was not found.

Finally, it is important to note that this is the first study in which are investigated the effect of the hemocyanins alone and combined with adjuvants in murine models of oral cancer. Therefore, the results lay the basis for further studies on application of hemocyanins and especially FLH in oral cancer immunotherapy, both for the prevention and/or the treatment of such carcinoma in humans.

## 1. INTRODUCCIÓN

La hemocianina fue descubierta en 1878 por el naturalista francés Leon Frederiq, a partir de una muestra de sangre de pulpo (*Octopus vulgaris*), la cual contenía una sustancia incolora que en contacto con el oxígeno formaba una combinación muy estable de color azul<sup>1</sup>. Se trataba de una glicoproteína presente en dos filos de invertebrados, *Arthropoda* y *Mollusca*. Su nombre proviene del griego (*haima* que significa sangre y *kyanos*, pigmento azul)<sup>2</sup>. Los animales pertenecientes a dichos filos las emplean como proteínas respiratorias, debido a su capacidad para unir oxígeno en sitios activos únicos, denominadas unidades funcionales (FUs), donde cada uno presenta dos átomos de cobre<sup>3</sup>. También se ha descrito su participación en procesos homeostáticos y fisiológicos, tales como la muda del exoesqueleto, el transporte hormonal, la osmoregulación, el transporte de proteínas, el actuar como precursores de péptidos antimicrobianos, el poseer propiedades antivirales y en la síntesis de especies reactivas del oxígeno<sup>4</sup>.

Las hemocianinas de estas dos clases de organismos se diferencian significativamente en aspectos tales como la secuencia primaria, el tamaño y la organización de las subunidades, lo cual sugiere una evolución divergente que ha mantenido algunas similitudes superficiales en cuanto al diseño y a la función de su estructura general<sup>5</sup>. Cabe destacar que las estructuras primaria,

terciaria y cuaternaria de las hemocianinas de artrópodos y moluscos son tan diferentes que se consideran dos superfamilias de proteínas distintas<sup>6</sup>. En consecuencia, para los fines de la presente tesis, el estudio se centró en las hemocianinas de moluscos gastrópodos.

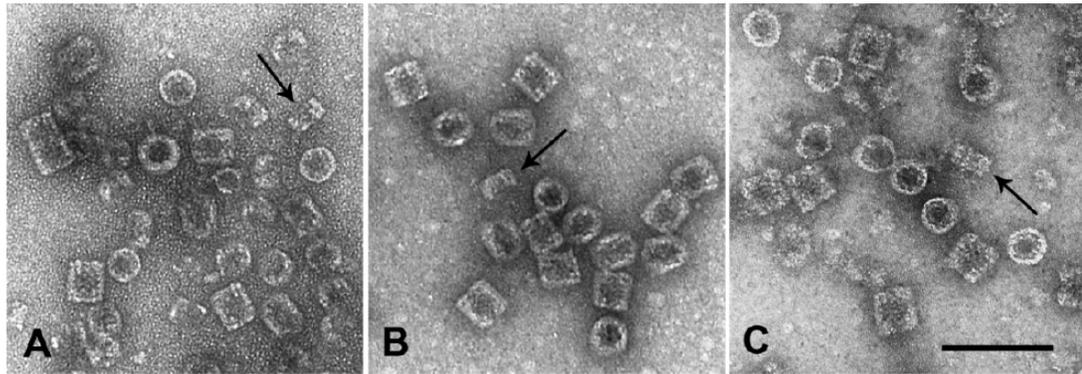
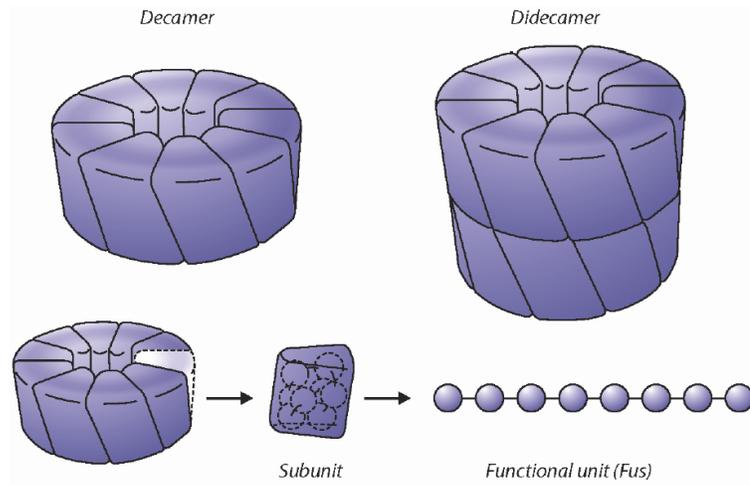
Algunas hemocianinas de moluscos, debido a características como su tamaño (4 a 8 MDa), carácter xenogénico y contenido de carbohidratos han sido utilizadas para inducir una fuerte respuesta inmune en mamíferos<sup>7</sup>. Por esta razón, se empezaron a usar como proteínas transportadoras de haptenos y péptidos, compuestos que por sí solos no eran inmunogénicos, como algunos químicos (2,4-dinitrofenol y 2,4,6-trinitrofenol), drogas, hormonas, polisacáridos, lípidos y oligonucleótidos, contra los cuales no era posible la obtención de anticuerpos policlonales<sup>8</sup>, un uso masivo que se les da hasta hoy en día.

En este ámbito, la primera hemocianina empleada fue la que se obtuvo de la lapa de las costas de California conocida como *keyhole limpet* (*Megathura crenulata*) y denominada KLH<sup>9, 10</sup>. Luego de más de 35 años de uso en biomedicina, los investigadores han provisto evidencia que sustenta este atributo, al tener la habilidad para incrementar la respuesta inmune del hospedero, a través de su interacción con diferentes células inmunes como los linfocitos T, monocitos, macrófagos y linfocitos polimorfonucleares<sup>11, 12</sup>. Posteriormente, se han estudiado hemocianinas provenientes de otros

moluscos, donde destacan las de los gastrópodos que habitan las costas chilenas, *Concholepas concholepas* (CCH), conocido comúnmente como Loco<sup>13</sup>, y *Fissurella latimarginata* conocido como Lapa negra (FLH)<sup>14</sup>.

### **1.1 Características estructurales y bioquímicas de las hemocianinas de moluscos**

Estructuralmente, las hemocianinas están formadas por un arreglo complejo de diez subunidades, cada una de aproximadamente 350 a 450 kDa, las cuales se autoensamblan en cilindros huecos de alrededor de 35 nm de diámetro denominados decámeros. A su vez, cada subunidad consiste de siete u ocho dominios globulares llamados unidades funcionales, que se hallan conectadas por cadenas peptídicas constituidas por diez a 15 residuos aminoacídicos. Estas FUs varían en tamaño de 45 a 55 kDa y cada una de ellas puede unir una molécula de oxígeno de modo reversible mediante un par de átomos de cobre. En algunos órdenes de moluscos como los gastrópodos y bivalvos, los decámeros pueden asociarse en parejas para generar didecámeros, de aproximadamente 9 MDa<sup>15</sup> e inclusive multidecámeros de hasta 13 MDa<sup>16</sup>. La **Figura 1A** muestra una representación de la compleja estructura de estas proteínas. Debido a su tamaño, las hemocianinas son fácilmente observables mediante microscopía electrónica de transmisión, usando tinción negativa<sup>17</sup>, como se muestra en la **Figura 1B**.



**Figura 1. Superior.** Modelo de la estructura de una hemocianina de molusco<sup>17</sup>. **Inferior.** Microscopía electrónica de transmisión de moléculas de hemocianinas de molusco purificadas y teñidas negativamente mostrando su forma cilíndrica hueca característica. **A:** KLH. **B:** CCH. **C:** FLH. Se puede apreciar tanto una vista desde arriba (círculos) como una vista de lado (rectángulos) de estas proteínas. Las vistas laterales muestran tanto la presencia de decámeros (se indican con flechas) como de didecámeros. La barra de la escala representa 100 nm<sup>15</sup>.

Por otra parte, las hemocianinas contienen una importante cantidad de carbohidratos, los cuales juegan un papel fundamental no solo a nivel de la estructura, sino también de eficacia inmunológica. En los gastrópodos, se ha encontrado una cantidad variable y heterogénea de sitios N- y O-glicosilados, con un porcentaje de hasta el 9%, siendo manosa el oligosacárido más abundante<sup>18</sup>. Algunas de estas proteínas, como KLH y FLH, poseen el antígeno disacárido de Thomsen-Friedenreich o antígeno T, que junto con la manosa han sido señalados como esenciales para explicar las propiedades relacionadas con el efecto inmunomodulador de las hemocianinas<sup>15</sup>.

## **1.2 Similitudes y diferencias estructurales entre las hemocianinas de interés**

KLH, por ser la primera hemocianina empleada para estudios sobre el mejoramiento de la respuesta inmune, ha sido utilizada ampliamente en diversos estudios como se explicará más adelante. Requiere la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para su estabilidad<sup>6</sup>. Estos iones cumplen dos funciones importantes en la hemocianina. En primer lugar, unen los residuos o dominios de la proteína, estabilizando sus estructuras terciaria y cuaternaria. Como segundo punto, median la interacción ligando-proteína, específicamente la cooperatividad oxígeno-hemocianina y la constante de equilibrio de asociación<sup>5</sup>.

KLH presenta dos isoformas estructural e inmunológicamente diferentes, como lo son KLH1 y KLH2. Pueden coexistir en la circulación de los animales, pues se sabe que la mayoría de ellos poseen una mezcla de los dos tipos de hemocianina en su hemolinfa. La caracterización de la KLH2 fue facilitada como consecuencia de la disponibilidad de lapas con hemolinfa con escasa KLH1. Por otro lado, moluscos de esta especie con predominancia de KLH1 son extremadamente raros. Los que se encuentran en cautiverio durante varios meses van cambiando la composición de su hemolinfa y la KLH1 se pierde gradualmente. Se han intentado desarrollar procedimientos justamente para separar estos dos tipos de moléculas<sup>19</sup>.

Además de la variabilidad en las proporciones de las dos isoformas de KLH, la preparación tiene problemas de estabilidad en solución y frecuentemente precipita. Estos factores se han convertido en una limitante enorme para las aplicaciones biomédicas de KLH, pues para que un producto farmacéutico sea aprobado, se debe demostrar la composición y la invariabilidad de los componentes del mismo<sup>15</sup>.

Por las desventajas de KLH y además, porque a la fecha aunque sus genes están secuenciados, no ha sido posible expresar KLH heterológamente, y porque la fuente depende del recurso natural, se comenzó a estudiar hemocianinas provenientes de otras fuentes. Una de ellas es la de *C.*

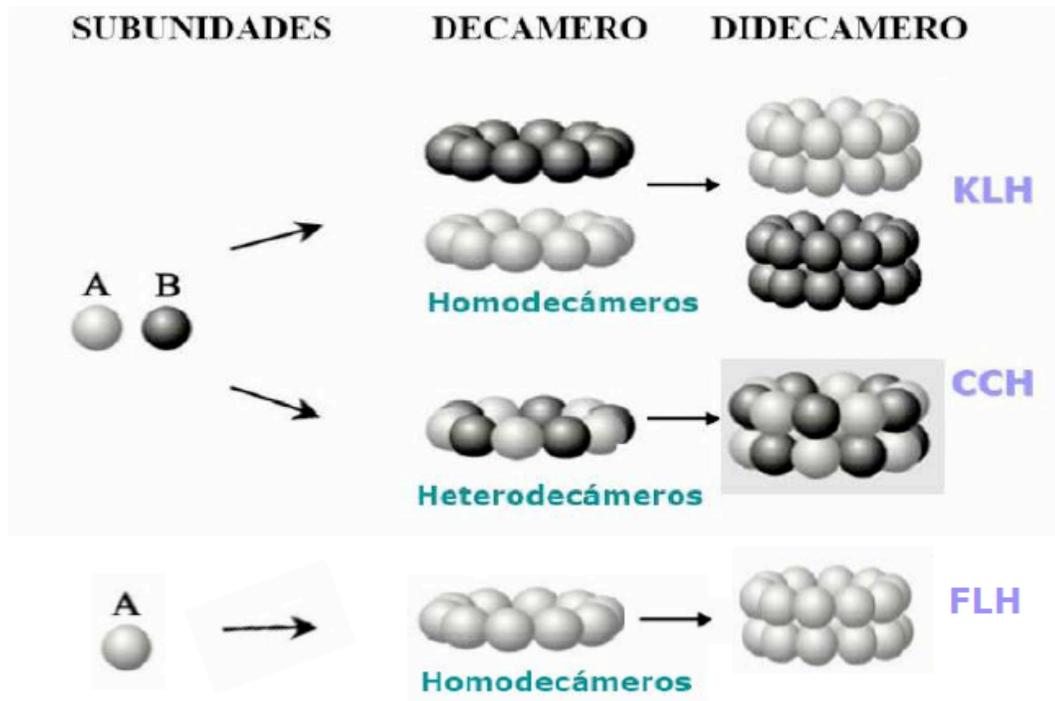
*concholepas* o CCH. El molusco de esta hemocianina se distribuye en la costa oeste de América del Sur, entre Callao en Perú y Cabo de Hornos en Chile<sup>20</sup>. Se ha empleado como proteína transportadora para el desarrollo tanto de anticuerpos monoclonales como policlonales para péptidos y haptenos<sup>13</sup>. Además, cuenta con diversas características para ser considerada como una sustituta o alternativa para la KLH<sup>21</sup>.

En cuanto a su estructura, ensayos electroforéticos de CCH purificada permitieron la identificación de dos subunidades denominadas CCH-A y CCH-B<sup>5</sup>. Paralelamente, se desarrollaron anticuerpos monoclonales murinos para toda la proteína, y se logró determinar la existencia de epítomos comunes para ambas subunidades, así como específicos de cada una de ellas. En contraposición con la CCH, la KLH no muestra epítomos compartidos entre sus subunidades<sup>22</sup>.

Una propiedad de CCH, encontrada durante su purificación, es que no necesita la adición de iones divalentes en el medio de mantención para estabilizar su estructura y mantenerse óptimamente en solución, a diferencia de otras hemocianinas, incluyendo KLH y FLH. Esto es importante, pues sugiere que dichos iones se hallan unidos a la proteína con una elevada constante de afinidad y permiten comprender la alta estabilidad de esta molécula en comparación con la KLH<sup>5</sup>.

Por otro lado, mediante estudios de reagregación de subunidades aisladas de CCH, específicamente ensayos de dispersión de luz, se determinó que se requiere la interacción de ambas subunidades antes de la formación del didecámero. La reasociación no sigue una cinética de primer orden. Esto llevó a sugerir que la molécula consta de una estructura heterodimérica (a diferencia de la KLH, la cual es homodimérica), pues ambas subunidades son requeridas en conjunto para formar la molécula completa<sup>5</sup>. Lo anterior muestra otra ventaja con respecto a la KLH, porque, como se mencionó anteriormente, ésta no ha podido ser preparada con una composición determinada. La CCH no presenta ese problema dado que una solución de esta hemocianina estaría constituida por un solo tipo de molécula.

Recientemente, se reportó la caracterización de una nueva hemocianina, proveniente de *Fissurella latimarginata*, denominada FLH. Esta proteína es invariable, al estar constituida por una sola subunidad, a diferencia de la KLH y la CCH, lo cual la hace sumamente ventajosa como sustancia para desarrollar nuevas vacunas experimentales donde se emplean hemocianinas como transportadoras de antígenos<sup>14</sup>. La desventaja actual de esta proteína consiste en que todavía no se ha logrado precisar las condiciones bajo las cuales esta proteína se mantenga en solución de una manera tan estable como la de CCH. Las diferencias y similitudes estructurales de las hemocianinas de interés para esta tesis se sintetizan en la **Figura 2**.



**Figura 2: Organización estructural de las subunidades en las hemocianinas de KLH, CCH y FLH<sup>14, 23</sup>.** KLH y CCH constan de dos subunidades. En el caso de KLH, cada subunidad se asocia de manera individual, constituyéndose en homodidecámeros, mientras que para CCH, las dos subunidades forman heterodidecámeros. FLH está conformada por una única subunidad, formando homodidecámeros.

### 1.3 Mecanismos de inmunoestimulación de las hemocianinas

Se sabe poco sobre los mecanismos involucrados en la inmunogenicidad de estas proteínas en mamíferos, por lo cual ha surgido la necesidad de determinar las características estructurales que le confieren esta propiedad<sup>23</sup>. Se les considera estimulantes no específicos capaces de generar una respuesta humoral y celular en vertebrados incluyendo los seres humanos<sup>11</sup>. Son capaces de inducir la producción de anticuerpos contra ellas sin adyuvantes adicionales, y estimular las respuestas de linfocitos T CD8+ a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) y de linfocitos T CD4+ mediante el de clase II (MHC-II)<sup>22</sup>.

Una hipótesis se relaciona con la composición de carbohidratos de las hemocianinas. A pesar de su diversidad, tienen un denominador común, como ya se mencionó, el monosacárido manosa, que es el más abundante en ellas<sup>15</sup>.

A nivel de la inmunidad innata, el sistema inmune de los mamíferos dispone de células presentadoras de antígeno (entre ellas, macrófagos y células dendríticas) con receptores de reconocimiento para patrones moleculares asociados a patógenos. Los miembros de la familia de lectinas tipo C, identifican diversos tipos de oligosacáridos presentes en patógenos y moléculas foráneas. Se ha visto que la KLH promueve la maduración *in vitro* de

las células dendríticas humanas, mediante la interacción con el receptor de manosa. Esto no se ha apreciado en células dendríticas murinas, tanto para la KLH como para la CCH. En cuanto a la FLH, promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-12p40, TNF- $\alpha$  e IL-23 en las células dendríticas murinas cultivadas *in vitro*. Esta secreción es dependiente de la presencia de los oligosacáridos en esta hemocianina, indicando nuevamente el papel desempeñado por los receptores tipo lectina<sup>15</sup>.

Luego de producirse la internalización de las hemocianinas por las células presentadoras de antígenos, éstas son degradadas con mayor lentitud en comparación con los antígenos clásicos, por parte de la maquinaria proteolítica de dichas células, permitiendo un mayor tiempo para la presencia de los péptidos antigénicos de las hemocianinas. Esto incrementa su inmunogenicidad, tal y como se demostró para la CCH<sup>15</sup>.

En cuanto a la respuesta adaptativa, las hemocianinas son antígenos timo-dependientes. Dado que la inducción de inmunidad, específicamente efectos antitumorales, son inducidos por las propias hemocianinas sin adyuvante, éstas tienen características estructurales comunes que promueven la inflamación y el mantenimiento de la inmunidad innata, desembocando en el inicio de la respuesta inmune adaptativa antitumoral. Se cree que estas características se deben a los carbohidratos que participarían como adyuvantes

naturales. Un mecanismo alternativo y no excluyente, sería la estimulación por parte de las secuencias peptídicas xenogénicas preservadas de hemocianinas y su interacción con los linfocitos T CD4+, lo cual a su vez promueve la secreción de citoquinas Th1, rompiendo la tolerancia a los antígenos tumorales e incrementando la respuesta contra el tumor<sup>15</sup>. Cabe destacar que se requiere una inmunización previa con cualquiera de estas proteínas para direccionar la respuesta inmune hacia la secreción de IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (citoquinas propias de una respuesta Th1)<sup>23</sup>, con excepción de la FLH, como se observó en un modelo de melanoma murino<sup>14</sup>.

También se ha propuesto que la inmunogenicidad de estas sustancias podría relacionarse con la existencia de linfocitos B de memoria, generados a partir de una estimulación anterior con xenoantígenos parecidos<sup>23</sup>. Finalmente, otra posibilidad consiste en que los efectos terapéuticos de estas moléculas no se deben a una actividad similar a un súper antígeno, sino más bien a un efecto indirecto, a través de la estimulación indirecta de respuestas específicas latentes, mediante la ruptura de la tolerancia o suprimiendo la reacción inmune contra el tumor, fenómeno denominado *bystander*<sup>22</sup>. No obstante, también se ha sugerido que el arreglo polivalente y repetitivo de los epítomos de las unidades funcionales, como en el caso de la CCH, puede facilitar la captura de las células B específicas por dichos péptidos, con la consecuente activación de los linfocitos CD4+ específicos<sup>21</sup>.

Un aspecto que aporta al esclarecimiento de estas diferentes hipótesis sobre los mecanismos de inmunoestimulación de las hemocianinas, es el entendimiento de las características estructurales de estas moléculas y su influencia en los efectos inmunomodulares. Aunque todavía falta mucho por estudiar, es posible señalar el avance en los estudios de la CCH. Con este propósito, se aisló en forma pura y soluble los monómeros CCH-A y CCH-B, con el propósito de identificar las propiedades inmunogénicas y antitumorales en un modelo de cáncer de vejiga *in vivo*<sup>21</sup>. En el estudio, ambas subunidades mostraron ser inmunogénicas, al igual que la molécula completa de CCH, sin la necesidad de utilizar adyuvantes. Sin embargo, el monómero CCH-A presentó un título mayor de anticuerpos en comparación con el monómero CCH-B, lo cual podría deberse a las diferencias tanto estructurales como bioquímicas (descritas anteriormente) entre ambas. La abundancia relativa similar de aminoácidos en las dos indicó que las diferencias observadas se relacionan con una divergencia conformacional de un precursor común que origina la estructura de la subunidad heterodimérica de la CCH. Otras diferencias observadas fueron en las propiedades hidrofílicas, siendo más hidrofílica la subunidad CCH-A, por la exposición de residuos de triptofano y un mayor contenido de azúcares (esto facilitaría su interacción con células presentadoras de antígeno como linfocitos B, dado que el receptor BCR reconoce epítopos en regiones con una flexibilidad relativamente alta en hidrofiliidad en la superficie de las proteínas)<sup>21</sup>.

Los resultados también mostraron que las subunidades de CCH difieren en la naturaleza y el contenido de carbohidratos. La actividad antitumoral de las subunidades de CCH en un modelo de cáncer de vejiga indicó que la incidencia y la supervivencia fueron mejores usando la subunidad CCH-A en relación con la subunidad CCH-B, posiblemente por la presencia en la primera de una mayor fracción de o-glucósidos, exclusivas de esta subunidad. En KLH, esta información no se encuentra disponible. Este ensayo abre la posibilidad de usar únicamente la subunidad CCH-A, al ser soluble y más homogénea en comparación con la heterogeneidad de las soluciones con las moléculas completas de KLH o CCH<sup>21</sup>, lo cual es un problema como se expuso anteriormente.

#### **1.4 Aplicación del efecto inmunomodulador no específico de las hemocianinas para desarrollar vacunas terapéuticas contra el cáncer**

Las hemocianinas también han sido empleadas para el estudio de posibles vacunas terapéuticas contra distintos tipos de cáncer<sup>24</sup>. Uno de los primeros estudios relacionados con el desarrollo de inmunoestimulantes no específicos para el tratamiento de tumores fue en cáncer superficial de vejiga, el cual a pesar de ser extirpado trans-uretralmente, presentaba el riesgo de la recurrencia del tumor entre un 60 y un 90% de los pacientes<sup>25</sup>. En 1976, los resultados preliminares del estudio realizado por Morales y colaboradores,

mostraron como el tratamiento con BCG (Bacillus Calmette-Guérin) era capaz de mejorar la prognosis en pacientes con recurrencias persistentes, sin presentar efectos adversos a largo plazo. Allí, se observó la presencia de necrosis, así como la generación de granulomas, lo que sugería la destrucción del tumor<sup>26</sup>. Con esto, se estaba ante la presencia de un agente terapéutico sumamente promisorio para el desarrollo de un tratamiento inmunoterapéutico contra dicho tipo de cáncer. En la actualidad, se ha sugerido que se debe mantener la instilación de BCG durante uno a tres años y este tratamiento, junto con la quimioterapia, permite reducir las recurrencias y la progresión de la enfermedad hacia el tejido muscular de la vejiga. Por tal razón, las guías de práctica clínica recomiendan su uso por dicho período de mantenimiento, siendo la terapia intravesical de elección para la enfermedad de alto riesgo. Sin embargo, estudios posteriores realizados mostraron que únicamente el 16% de los pacientes eran capaces de recibir todas las instilaciones por el período sugerido. Muchos debían abandonar el tratamiento como consecuencia de sus efectos adversos. Estos se pueden clasificar en locales (cistitis bacterial o química, prostatitis granulomatosa, epididimitis, obstrucción uretral y vejiga contraída), sistémicas (fiebre mayor a 39 °C, síntomas similares a la gripe, infección pulmonar inducida por la BCG, toxicidad renal y sepsis) y alérgicas (erupciones en la piel, artralgia y artritis)<sup>27</sup>.

En 1988, los estudios realizados con KLH mostraron ser sumamente esperanzadores, pues esta hemocianina ocasionaba una respuesta inmune más dirigida a combatir el tumor en comparación con BCG y sin los efectos adversos que impedían concluir el tratamiento terapéutico<sup>25</sup>. En la actualidad, se ha empleado para llevar a cabo diferentes estudios tanto *in vitro* como preclínicos, para determinar su efectividad frente a otros tumores, además del cáncer de vejiga, tales como: 1. Adenocarcinoma esofágico de Barrett (estudio de los efectos de KLH en el crecimiento y la apoptosis celular en un modelo *in vitro* de adenocarcinoma de Barrett<sup>28</sup>), 2. Cáncer pancreático, de mama y de próstata (respuesta de la KLH *in vitro* frente a líneas celulares de cáncer de mama estrógeno dependiente, cáncer de mama estrógeno independiente, cáncer de páncreas y cáncer de próstata,<sup>11</sup> y evaluación de los potenciales mecanismos de la KLH, específicamente la producción de citoquinas, la inducción de apoptosis y/o la necrosis<sup>12</sup>). 3. Melanoma (evaluación de los efectos potenciales y mecanismos de KLH en melanoma,<sup>29</sup> y evaluación de los efectos potenciales y los mecanismos de KLH en un tratamiento único y en un tratamiento en combinación con inmunoterapias convencionales, específicamente INF- $\alpha$  e IL-2, contra melanoma<sup>30</sup>).

Los resultados de estos estudios han sido promisorios. No obstante, los inconvenientes derivados de los mismos se deben a la materia prima, pues en primer lugar existe una fuente disponible limitada de KLH. Además, tiene el

problema de la variabilidad en las proporciones de las isoformas mencionado con anterioridad<sup>15</sup> y la baja inducción de títulos duraderos de anticuerpos IgM e IgG específicos contra antígenos tumorales<sup>14</sup>. Por esta razón, el interés de los investigadores se ha dirigido hacia la identificación de otras hemocianinas<sup>15</sup>. Así, la hemocianina de *Concholepas concholepas* es una alternativa para ser empleada en estos estudios. Se determinó si poseía algún valor inmunoterapéutico como un agente tumoral y cuales elementos de la respuesta humoral se encontraban envueltos en su efecto inmunoestimulante como adyuvante. Para el ensayo con el modelo de vejiga singénico heterotópico murino, se empleó además la KLH como sustancia de referencia. Se observó, al igual que con KLH, un incremento del IFN- $\gamma$  en el suero de los animales de experimentación, así como un cambio de isotipo de IgG1 a IgG2a en los anticuerpos específicos circulantes. Sin embargo, a dosis mayores de CCH, se encontraron niveles más altos de IgG2b e IgG3, a diferencia del tratamiento con KLH. Éste fue un primer antecedente para señalar como diferencias en la respuesta inmune podrían ser un reflejo de las diferencias estructurales entre ambas hemocianinas. Finalmente, se observó en ambos casos un incremento en la actividad de las células NK, junto con una actividad polarizada hacia una respuesta inmune de tipo Th1, sin necesidad de añadir adyuvantes<sup>22</sup>.

En lo que respecta a los estudios clínicos con CCH, se llevó a cabo una investigación en la cual se buscó mejorar la respuesta antitumoral de linfocitos

T específicos en pacientes con cáncer de próstata, mediante una inmunoterapia celular basada en la inyección de células dendríticas cargadas con extractos tumorales paralelamente con CCH como adyuvante/inmunoestimulante. Los resultados arrojaron que seis de los 14 pacientes evaluados con el tratamiento disminuyeron los niveles del antígeno prostático, correlacionándose con un incremento de los linfocitos T citotóxicos<sup>31</sup>.

Recientemente, se publicó que la FLH también mostró tener propiedades antitumorales para ser usada en vacunas terapéuticas contra el cáncer, empleando el modelo de melanoma de ratón B16F10<sup>17</sup>. Los resultados obtenidos mostraron que esta nueva hemocianina posee propiedades inmunoestimulantes mayores en comparación con KLH y CCH. A diferencia de ellas, FLH activa una rápida producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- $\alpha$ , y especialmente altos niveles de IL-12p40, la cual desempeña papeles esenciales en la coordinación de las inmunidades innata y adaptativa hacia una respuesta inmune de tipo Th1. Sin embargo, los resultados como transportador de 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB) fueron similares a los observados para KLH y no fueron superiores a los de CCH. Lo anterior ha llevado a la hipótesis de que esta nueva hemocianina puede inducir un ambiente inflamatorio más rápido con respecto a CCH y a KLH, resultando en una respuesta inmune innata potente y una respuesta inmune adaptativa

incrementada frente a las células de melanoma. Sin embargo, al ser el primer estudio realizado, se requieren bioensayos adicionales en otros modelos tumorales<sup>17</sup>.

A pesar de todos los estudios señalados, todavía existen muchos tipos de cáncer en los cuales no se ha evaluado el uso de las hemocianinas como inmunomoduladores para mejorar la supervivencia de los pacientes, incluyendo el cáncer oral.

### **1.5 Uso de adyuvantes en conjunto con hemocianinas para mejorar la respuesta inmune frente a los tumores**

Existen varios problemas con la inducción de inmunidad contra antígenos asociados a tumores en comparación con la que se genera contra antígenos bacterianos y virales, dado que la gran mayoría de los antígenos tumorales que se han descrito son autoantígenos normales o escasamente modificados<sup>24</sup>. Además, aunque se produzca la activación del sistema inmune, ésta no necesariamente llega a ser óptima. Al inicio, el tumor es lo suficientemente inmunogénico para generar una respuesta inmune y así controlar su crecimiento. Sin embargo, sobre un período más largo de tiempo, el tumor desarrolla múltiples estrategias para circunscribir la acción del sistema inmune y por ende, evadir su vigilancia y continuar con su crecimiento<sup>32</sup>.

La mayoría de los tumores inducen inmunosupresión sistémica o local a través de la disminución de las moléculas coestimuladoras y la producción ectópica de citoquinas Th2 como IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ . Como complemento, la expresión de FasL funcional en algunas células tumorales puede conferirles la habilidad para inducir apoptosis en células del sistema inmune que expresan Fas, contribuyendo al privilegio inmunitario del tumor<sup>33</sup>. Es así, que para mejorar la eficacia global de las vacunas terapéuticas antitumorales se ha recurrido al uso de adyuvantes.

Los adyuvantes son sustancias que aumentan u optimizan respuestas inmunes específicas frente a antígenos. Las formulaciones incluyen al adyuvante y su vehículo como una emulsión o un liposoma. Se combinan por lo general con inmunógenos para incrementar la respuesta inmune deseada, disminuir la frecuencia de administración y/o reducir la cantidad de antígeno necesaria para lograr o mantener la protección<sup>34</sup>. Una clasificación se basa en la fuente de estos adyuvantes. Dicha clasificación se divide en vegetales (saponina, extracto de glucano), bacterianos (monofosforil lípido A, trehalosa dimicolato, toxina colérica, lipopolisacáridos), químicos (hidróxido de aluminio, surfactantes, emulsiones, micro y nanopartículas), y citoquinas (INF- $\gamma$ , factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos) y hormonas (dehidroepiandrosterona o DHEA)<sup>35</sup>. Se han descrito varios mecanismos de la actividad adyuvante, entre ellos, la absorción del antígeno, efecto de depósito,

inducción de citoquinas, activación de complemento, reclutamiento de células inmunes, orientación del antígeno a células presentadoras de antígenos, regulación hacia un alza en la expresión de MHC-I y MHC-II, y estimulación de anticuerpos con subtipos de Ig específicos<sup>34</sup>.

### Adyuvante QS-21

El primer estudio acerca del uso de la KLH con un adyuvante fue en 1969. En dicho estudio, la hemocianina recubierta con partículas de bentonita inducía un elevado título de anticuerpos anti-KLH en ratones y en ratas, mucho mayor que los encontrados después de la inyección de la misma cantidad de KLH soluble<sup>36</sup>. Posteriormente, la KLH fue combinada con el adyuvante QS-21. Este compuesto es una saponina altamente purificada extraída de la corteza del árbol endémico de la zona central de Chile *Quillaja saponaria* Molina<sup>37</sup>. Su uso se ha extendido tanto para medicina veterinaria como humana<sup>38</sup>. A pesar de no ser apto para muchos usos humanos, es empleado para vacunas contra el cáncer, donde una toxicidad mayor es aceptada<sup>39</sup>. Se describe como un potente adyuvante para la inducción de linfocitos T citotóxicos, requeridos para el desarrollo de vacunas profilácticas contra distintos tipos de tumores y también, porque promueve la secreción de citoquinas de tipo Th1 (IL-2 e INF- $\gamma$ ) y anticuerpos del isotipo IgG2a<sup>37, 40</sup>. Cabe señalar que puede ser utilizada tanto para antígenos con respuesta timo dependiente como timo independiente<sup>41</sup>.

Este adyuvante se ha empleado en conjunto con la KLH como transportador de distintos antígenos asociados a tumores, entre ellos el péptido MUC1 y el gangliósido GD3, en ensayos preclínicos y clínicos<sup>23, 42</sup>. Estudios posteriores en esta misma línea se han orientado hacia el uso de la KLH y el QS-21 en conjunto con vacunas constituidas por uno o cuatro antígenos (gangliósido GD3, glicolípido neutral de Lewis, y las mucinas MUC1 y MUC2), sobre-expresados en la superficie de células tumorales en el ser humano<sup>43</sup>.

En cuanto a los estudios clínicos que involucran QS-21, se ha evaluado en una vacuna con las lactonas GD2 y GD3 acopladas a KLH. En todos los ensayos, se han obtenido respuestas humorales contra los antígenos carbohidratos y peptídicos en asociación con KLH. Inclusive, se han realizado dos estudios aleatorios de ensayos clínicos fase III con la vacuna conjugada gangliósido GM2-KLH junto con QS-21 y más de 1.000 pacientes han recibido dicha vacuna. Aunque los resultados no mostraron un aumento en la tasa de progresión o supervivencia con respecto a los pacientes de los grupos control, más del 90% de los pacientes produjeron una respuesta humoral elevada contra GM2. Además, existen cuatro estudios clínicos fase II aleatorios, de doble ciego, multicéntricos con vacunas conjugadas monovalentes o polivalentes antígeno-KLH más el QS-21 para pacientes con cáncer<sup>44</sup>.

### Adyuvante AddaVax

Otro adyuvante de interés es el AddaVax, una formulación aceite en agua basado en el escualeno<sup>45</sup>, que promueve un incremento significativo en los títulos de anticuerpos con respuestas inmunes tipo Th1/Th2 más balanceadas en comparación con las obtenidas para la Alúmina<sup>46</sup>. Se cree que actúa a través de un efecto de depósito, que incrementa la persistencia del antígeno en el sitio de inyección, el reclutamiento y la activación de células presentadoras de antígenos, y la estimulación directa de la producción de citoquinas y quimioquinas por parte de macrófagos y granulocitos<sup>47</sup>. Este adyuvante no se encuentra autorizado para uso en seres humanos, únicamente para investigación. A pesar de ello, es similar al adyuvante MF59, el cual ha sido el primero de este tipo autorizado en Europa en vacunas para la gripe desde 1997<sup>48</sup>. Actualmente, el MF59 se encuentra presente en tres vacunas comercializadas contra dicha enfermedad<sup>49</sup>, incrementando la inmunogenicidad contra la gripe en los ancianos<sup>47</sup>.

### Sales de Aluminio como adyuvantes

Las sales de aluminio son otro adyuvante muy utilizado. Consisten de geles no cristalinos basados en hidróxido de aluminio, hidroxifosfato de aluminio o sales patentadas, entre ellas, el hidroxisulfato de aluminio<sup>50</sup>. Los

mecanismos de acción incluyen la formación de un depósito, facilitando la liberación del antígeno, la formación de una estructura en forma de partícula, lo cual promueve la fagocitosis del antígeno por células presentadoras de antígenos como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B, y el incremento en la expresión del MHC-II y la presentación del antígeno, direccionando la respuesta hacia una de tipo Th2<sup>51</sup>, caracterizada por la presencia de anticuerpos de isotipo IgG1<sup>52</sup> y de la citoquina IL-4<sup>53</sup>. Aunque incrementa los anticuerpos Th2, no promueve respuestas de los linfocitos T significativas, con lo cual su utilidad para el desarrollo de vacunas anticancerígenas terapéuticas se considera limitada<sup>51</sup>. Su empleo en esta tesis se debió a que nunca ha sido evaluado en conjunto con las hemocianinas de interés, por lo cual se deseó determinar el tipo de respuesta en una formulación en conjunto con dichas hemocianinas y además, es uno de los dos adyuvantes aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) para su uso en productos comercializados actualmente en el mercado de Estados Unidos, junto con el AS04 (combinación de hidróxido de aluminio y monofosforil lípido A)<sup>54</sup>.

## **1.6 Cáncer oral como modelo para estudiar la respuesta inmunoestimulante de las hemocianinas combinadas con adyuvantes**

El carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello es el sexto cáncer de mayor incidencia a nivel mundial<sup>55</sup>. Incluye lesiones en varios sitios anatómicos como el labio, cavidad oral, nariz, senos paranasales, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe. Es uno de los tumores malignos biológicamente más agresivos<sup>56</sup>. La supervivencia a largo plazo para pacientes con esta enfermedad es menor al 50%<sup>57</sup>. Su mortalidad es considerablemente mayor en comparación con los cánceres de mama, cervical y colorrectal<sup>56</sup>.

Las estrategias terapéuticas actuales para su tratamiento incluyen la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Éstas son de eficacia limitada para prevenir tanto la recurrencia como la progresión del tumor, y una proporción significativa de pacientes desarrollan invasión local y metástasis<sup>58</sup>. La prognosis de pacientes con esta patología es relativamente pobre, a pesar de los recientes avances terapéuticos<sup>59</sup>. Por esta razón, la identificación de agentes terapéuticos novedosos y efectivos para inhibir el crecimiento celular en esta enfermedad es esencial<sup>58</sup>.

Este cáncer es considerado como una enfermedad inmunosupresora, debido a que los pacientes han mostrado un nivel de linfocitos menor a los

pacientes sanos, apoptosis espontánea de linfocitos T citotóxicos, actividad deteriorada de las células NK y función de presentación de antígenos pobre<sup>55</sup>. Inclusive después del tratamiento, las concentraciones de linfocitos T CD3+, CD4+ y CD8+ en la sangre periférica se encuentran reducidas<sup>60</sup>. Junto con esto, en tumores murinos y humanos se han aislado macrófagos con el fenotipo M2, los cuales suprimen la activación y la proliferación de la respuesta inmune celular a través de la IL-10 y el TGF- $\beta$ <sup>61</sup>. También, brindan baja actividad contra el tumor, así como la promoción del remodelamiento tisular y angiogénesis. La infiltración de macrófagos asociados a tumores en las etapas tardías de la progresión tumoral, tanto en ratones como en humanos, se ha asociado con un panorama poco alentador en enfermedad de Hodgkin, glioma, colangiocarcinoma y cáncer de mama<sup>62</sup>.

La inmunoterapia del cáncer ha sido evaluada como tratamiento adyuvante del carcinoma de cabeza y cuello, lo cual implica técnicas para utilizar la respuesta inmune antitumoral del paciente, para reconocer y reducir la metástasis, recurrencia e incipientes segundos tumores primarios<sup>57</sup>.

Las estrategias con vacunas para este tipo de tumor implican la generación de una respuesta inmune antitumoral que involucra muchos elementos del sistema inmune, con los linfocitos T considerados como efectores celulares críticos involucrados en la actividad antitumoral<sup>57</sup>. El

incrementar el número de linfocitos CD8+ específicos por el tumor y la producción de citoquinas Th1, como INF- $\gamma$  e IL-2, sería un modo óptimo para revertir la inmunodeficiencia asociada en pacientes con cáncer<sup>33</sup>.

Un reto importante con el uso de esta inmunoterapia basada en células T ha sido el encontrar un antígeno adecuado y un método óptimo para llevarlo hasta células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas, para iniciar la respuesta inmune más eficiente y persistente<sup>57</sup>. La vacunación apunta hacia dos tipos de antígenos: los antígenos específicos del tumor y los antígenos asociados al tumor<sup>55</sup>. Esto último fue el interés de este proyecto de tesis.

### **1.7 Importancia de los estudios preclínicos para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos**

El cáncer es una enfermedad heterogénea que presenta uno de los problemas mayores de salud pública a nivel mundial. El desarrollo de nuevas y mejores drogas es requerido con urgencia para poder combatir una enfermedad que con demasiada frecuencia se esparce más allá del alcance del cirujano o radioterapeuta en la presentación inicial<sup>63</sup>.

Históricamente, los modelos animales han sido utilizados para el proceso de descubrimiento y desarrollo de drogas, caracterizar la patología de la enfermedad, evaluar el mecanismo de acción de las drogas existentes, y el descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos y biomarcadores. Asimismo, han permitido establecer las relaciones farmacodinamia/farmacocinética, estimar los regímenes de dosis clínicos y determinar los parámetros de seguridad y toxicidad, con el propósito de salvaguardar la integridad de los voluntarios de las pruebas clínicas en sus distintas fases<sup>64</sup>.

La mayoría de los científicos que elaboran drogas contra el cáncer están de acuerdo que la demostración de la eficacia antitumoral en un modelo preclínico de cáncer, típicamente murino, a una dosis no tóxica, es decir con índice terapéutico, es una luz promisorio para seleccionar una molécula y continuar con su desarrollo<sup>63</sup>. Como corolario, la FDA establece claramente que los estudios farmacológicos en humanos sólo se pueden comenzar después de que la información sobre la aplicación de una nueva droga (ensayos preclínicos) ha sido revisada por esta institución y una junta institucional de revisión local<sup>65</sup>.

Uno de los modelos de cáncer oral de interés para esta tesis fue la línea celular AT-84, derivada del carcinoma celular escamoso oral de ratones C3H, los cuales son inmunocompetentes, pero al ser una línea innata, esta cepa

acepta injertos de estas células sin inmunosupresión. Su uso ha sido propuesto para estudiar la inmunidad tumoral, por lo cual es un elemento atractivo para el desarrollo de un modelo realista de cáncer oral<sup>66</sup>. Una línea derivada de la anterior es la AT-84 E7 Luc, que expresa el gen de la proteína E7 del virus papiloma, la cual es una proteína asociada con la inducción y el mantenimiento tumoral, y por ende, es considerada como blanco ideal para el ataque por parte de linfocitos T citotóxicos. Además, se le ha incorporado el gen de la luciferasa, cuyo sustrato es la luciferina. Al administrarse este sustrato, se genera la luminiscencia requerida para apreciar el tumor por imagenología<sup>56</sup>. Para concluir, existe otra línea celular de cáncer oral murino para trabajar con la cepa C57BL/6 que se denomina MOC<sup>67</sup>.

Todas las líneas anteriormente mencionadas fueron consideradas para llevar adelante el estudio propuesto en esta tesis.

## 2. HIPÓTESIS

Considerando los antecedentes expuestos en relación a la estructura y utilización de las hemocianinas como inmunoestimulantes no específicos por el tipo de respuesta inmune que inducen, a la potenciación de las vacunas terapéuticas con adyuvantes de vacunas, y a la agresividad del cáncer oral y la falta de terapias que mejoren su prognosis, proponemos las siguientes hipótesis.

### *Hipótesis 1*

**Las hemocianinas de moluscos gastrópodos inducen una respuesta inmune humoral y celular del tipo Th1 en la inmunoterapia del cáncer oral en un modelo murino, y ésta será potenciada al ser empleadas en conjunto con adyuvantes de vacunas Th1, mejorando así la respuesta terapéutica contra dicho cáncer.**

### *Hipótesis 2*

**Las hemocianinas afectan la viabilidad de las células tumorales de cáncer oral, lo cual es uno de los factores que participa en su mecanismo de acción antitumoral contra dichas células.**

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar la respuesta inmune humoral y celular de una formulación terapéutica constituida por una hemocianina, ya sea KLH, CCH o FLH, en conjunto con un adyuvante Th1 (QS-21 o AddaVax) frente a modelos murinos de carcinoma bucal de células escamosas, así como su efecto sobre la viabilidad celular *in vitro* en diversas líneas de dicho carcinoma.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Estudiar la respuesta inmune humoral y celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina (KLH, CCH, FLH)-adyuvante (alúmina, QS-21, AddaVax) en un modelo murino.

- Caracterizar la respuesta inmune humoral de cada hemocianina en conjunto con un adyuvante.
- Caracterizar la respuesta inmune celular de cada hemocianina en conjunto con un adyuvante.

- 3.2.2 Determinar el efecto antitumoral *in vivo* de las hemocianinas CCH o FLH en conjunto con el adyuvante que mostró los mejores resultados en el Objetivo 1 en dos modelos murinos de cáncer oral.
- 3.2.3 Estudiar el efecto citotóxico y la reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie de las células tumorales que contribuyen al mecanismo de acción de las distintas formulaciones hemocianina-adyuvante.
- Evaluar el efecto *in vitro* de las hemocianinas solas o en conjunto con los adyuvantes anteriormente señalados sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7.
  - Evaluar si hay reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea MOC7.

## 4. MATERIALES

### 4.1 Materiales biológicos

Hemocianinas: las hemocianinas CCH y FLH suspendidas en PBS (0,1 M de fosfato de sodio, 0,15 M de cloruro de sodio, pH 7,2) fueron obtenidas de Biosonda S.A., Chile, en condiciones libres de pirógenos. La KLH en solución se adquirió a través de Merck Millipore, Estados Unidos. El contenido de endotoxinas de cada una de las hemocianinas se determinó mediante un kit de detección de endotoxinas que usa el factor C recombinante (PyroGene, Estados Unidos).

Animales de experimentación: ratones hembra de dos a cuatro meses de la cepa C57BL/6 fueron adquiridos en BiosChile, S.A., Chile, y en el Bioterio de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Los ratones hembra de dos a cuatro meses de la cepa C3H/He fueron proporcionados por el Instituto Regina Elena, Italia. Ambas cepas fueron mantenidas en un área resguardada con control de acceso, entre 22 y 24 °C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, agua y alimento *ad libitum*, de acuerdo a las consideraciones de mantenimiento y manipulación exigidas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT, Chile) y/o el Instituto Regina Elena.

Líneas celulares de carcinoma bucal de células escamosas: la línea celular murina de carcinoma celular escamoso de lengua AT-84, originalmente aislada de un ratón C3H<sup>63</sup> fue proporcionada por la Dra. Synnøve Magnussen (Tumor Biology Research Group, Institute of Medical Biology, Faculty of Health Sciences, Universidad de Tromsø, Noruega). Estas células fueron cultivadas a 37 °C y 10% de CO<sub>2</sub> en un ambiente húmedo en medio Dulbecco suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), y antibióticos Penicilina y Estreptomina 1x. Se mantuvieron en cultivo con trasposos sucesivos, cosechando con Tripsina/EDTA, por tratarse de células epiteliales que se adhieren al plástico. Se hizo un banco de inóculos de la línea, congelando en nitrógeno líquido alrededor de 2 x 10<sup>6</sup> células en mezcla crioprotectora (10% DMSO más 90% SFB).

Por otro lado, la línea celular murina de cáncer oral MOC7, originalmente aislada de un ratón C57BL/6<sup>64</sup> fue proporcionada por el Dr. Ravindra Uppaluri (Department of Otolaryngology, Washington University School of Medicine, Washington, Estados Unidos). Estas células fueron cultivadas y cosechadas de la misma manera que las AT-84. También se realizó un banco de inóculos de la manera anteriormente señalada.

Finalmente, la línea celular murina de cáncer oral AT-84 E7 Luc fue proporcionada por el Dr. Aldo Venuti (HPV Unit Laboratory of Virology, Regina

Elena National Cancer Institute, Roma, Italia)<sup>53</sup>. Dichas células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% de SFB y antibióticos. Fueron cosechadas de la misma manera que las AT-84. También se preparó un banco de inóculos de la manera anteriormente señalada.

## **4.2 Reactivos**

Adyuvantes: la Alúmina fue provista por Sigma-Aldrich, Estados Unidos, el QS-21 por Desert King, Chile y el AddaVax, de grado preclínico, por InvivoGen, Estados Unidos.

Agua: las soluciones como el QS-21, el PBS y el PBS Dulbecco Modificado se prepararon utilizando agua estéril para inyectables obtenida de Bibraun, Perú.

Cultivo celular: se usaron los medios de cultivo DMEM/alta glucosa (4,00 mM de L-glutamina, 4.500 mg/L de glucosa y piruvato de sodio) y RPMI-1640 (25 mM de HEPES y L-glutamina), ambos de HyClone al 5 o 10% de suero fetal bovino (SFB). El SFB fue obtenido de Hyclone, Estados Unidos y posteriormente descomplementado. A los medios de cultivo también se les adicionó solución de antibióticos Penicilina/Estreptomina (Hyclone) y aminoácidos no esenciales (Hyclone). Para los trasposos sucesivos, se utilizó

Tripsina/EDTA (Hyclone), por tratarse de células tumorales epiteliales que se adhieren al plástico.

Reacción de ELISA: anticuerpo secundario suero de cabra anti-IgG de ratón (H+L) conjugado a fosfatasa alcalina (FAL; Thermo Scientific, Estados Unidos), anticuerpos secundarios suero de cabra anti-IgG1 de ratón, anti-IgG2a, anti-IgG2b y anti-IgG3 conjugados a peroxidasa de rábano (HRP; Abcam, Estados Unidos), para-nitrofenilfosfato (pNpp; Thermo Scientific), solución 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo Scientific).

Kits de ELISA para interleuquinas: INF- $\gamma$  e IL-4 (BD Biosciences, Estados Unidos).

Anestesia: ketamina 10% (Alfasan, Holanda) y Zoletil (tiletamina más zolazepam) (Virbac, Italia).

Sustrato para la generación de luminiscencia: XenoLight D-luciferina (Perkin Elmer, Estados Unidos).

Ensayo de viabilidad celular: Alamar Blue Cell Viability Assay (Thermo Scientific) y doxorubicina clorhidrato (Laboratorio Kampar, Argentina).

### 4.3 Soluciones

Dilución y aplicación de formulaciones hemocianina-adyuvante: PBS: 0,1 M de fosfato de sodio, 0,15 M de cloruro de sodio, pH 7,2.

Trapaso de células tumorales: PBS Dulbecco Modificado: 0,008 M de fosfato de sodio, 0,002 M de fosfato de potasio, 0,14 M de cloruro de sodio, 0,01 M de cloruro de potasio, pH 7,4.

Solución crioprotectora: 10% DMSO más 90% SFB.

#### Soluciones para ensayo ELISA:

- Solución de PBS-Caseína 1%-azida 0,05%.
- Solución de PBS-Tween 20 0,02%.
- Amortiguador FAL: 6,10 g de carbonato de sodio y 11,2 g de hidrógeno carbonato de sodio por litro de solución, pH 9,6.
- Solución de cloruro de magnesio 50 mM.
- Solución de hidróxido de sodio 3 N.
- Solución de ácido sulfúrico 3 N.
- Solución de paraformaldehído 0,5%.

## 4.4 Equipos

### Área de cultivo celular

- Cámara de Neubauer (Fischer Scientific, Estados Unidos).
- Campana de flujo laminar (Clean Room Products Inc., Estados Unidos).
- Centrífuga refrigerada Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Alemania).
- Microcentrífuga 5417C (Eppendorf).
- Propipeta eléctrica Powerpette Plus (Jencons, Reino Unido).
- Estufa de cultivo de células con regulación de temperatura y CO<sub>2</sub> (Nuair, Estados Unidos).

### Equipos laboratorio general

- Balanza granataria eléctrica (Sartorius, Alemania).
- pHmetro Hanna Edge HI2020 (Hanna Instruments, Estados Unidos).
- Agitador magnético termoregulado Nuova (Thermolyne, Estados Unidos).
- Vortex Type 37600 Mixer (Thermolyne).
- Baño de Agua Lab-Line® Imperial III (Lab-Line Instruments Inc., Estados Unidos).
- Lector de ELISA 7520 con filtros de absorción a 405, 450, 480, 570 y 600 nm (Cambridge Technology Inc., Estados Unidos).
- Lavador de placas de ELISA Bio-Tek ELx50.

- Vitrina refrigerada (Mimet, Chile), refrigeradores (Fensa, Chile y Mademsa, Chile) y congelador Glaciar (Nuaire).
- Micropipetas de 2, 20, 200 y 1000  $\mu\text{L}$  (Axygen, Estados Unidos), 10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf) y multicanal de 200  $\mu\text{L}$  (Axygen).
- Caliper de alta precisión (Mitutoyo, Estados Unidos).
- Vernier (Redline Mechanics).
- Equipo de imagenología IVIS Series Pre-clinical In Vivo Imaging Systems IVIS® Lumina.

#### **4.5 Servicios**

Unidad de Microscopia Electrónica, Pontificia Universidad Católica de Chile:  
equipada con un microscopio Electrónico Phillips TECNAI 12 Bio Twin  
(Phillips, Holanda).

Servicio de Citometría de Flujo: Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

## 5. MÉTODOS

### 5.1 Evaluación de la respuesta inmune humoral de ratones inoculados con diferentes preparaciones de hemocianina-adyuvante

Ratones hembra de dos a cuatro meses de edad de la cepa C57BL/6 fueron separados en grupos de tres animales cada uno e individualizados con marcas en las orejas. Posteriormente, fueron sometidos a una primera inmunización (día uno) vía subcutánea en la pared lateral del cuerpo con cada una de las hemocianinas de manera individual o en conjunto con uno de los adyuvantes (alúmina, QS-21 o AddaVax). Para ello, se administraron las dosis descritas en la **Tabla I**. Al día 16, se realizó una segunda inmunización por la misma vía con las mismas dosis. A los 37 días, se tomó una muestra de sangre para obtener el suero.

### 5.2 Determinación del título de anticuerpos séricos anti-hemocianina

Para medir el título de anticuerpos anti-hemocianinas en el suero de los animales de experimentación, se utilizó el procedimiento de Oliva *et al.* 2002<sup>13</sup>. Brevemente, placas de 96 pocillos fueron cubiertas con 100 µL/pozo de una solución conteniendo 10 µg/mL de KLH, CCH o FLH en PBS, durante toda la noche a 4 °C y luego, se bloquearon los sitios reactivos remanentes con 200 µL

**Tabla I:** Composición de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante administradas a los animales de experimentación, para determinar respuesta inmune humoral

<b>Grupo</b>	<b>Hemocianina (µg) en 100 µL de volumen total</b>	<b>Adyuvante (µg) en 100 µL de volumen total</b>	<b>Referencia</b>
<b>Control: Sham</b>	-	-	-
<b>Control: PBS</b>	-	-	-
<b>KLH</b>	50	-	68
<b>CCH</b>	50	-	68
<b>FLH</b>	50	-	68
<b>KLH más Alúmina</b>	50	100	68, 69
<b>CCH más Alúmina</b>	50	100	68, 69
<b>FLH más Alúmina</b>	50	100	68, 69
<b>KLH más QS-21</b>	50	10	69, modificado de 24
<b>CCH más QS-21</b>	50	10	69, modificado de 24
<b>FLH más QS-21</b>	50	10	69, modificado de 24
<b>KLH más AddaVax</b>	50	1:1 (vol/vol)	69
<b>CCH más AddaVax</b>	50	1:1 (vol/vol)	69
<b>FLH más AddaVax</b>	50	1:1 (vol/vol)	69

de una solución de PBS-Caseína al 1% durante una hora a 37 °C. A continuación, se agregó el suero y se realizaron diluciones seriadas en base dos en PBS-Caseína al 1% y se incubaron las placas por dos horas a 37 °C y luego, se lavaron los pocillos tres veces con 200 µL de PBS-Tween al 0,02%. Posteriormente, se agregaron 100 µL de una solución de PBS-Caseína al 1% con suero de cabra anti-IgG de ratón (H+L) conjugado a FAL (dilución 1:2.500) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavaron de la misma forma señalada anteriormente y se revelaron con 100 µL de una solución 1 mg/mL de pNpp en amortiguador FAL. Las placas se incubaron 20 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con 100 µL de NaOH 3 N y se leyó la densidad óptica (DO) a 405 nm. Como control de la especificidad de la reacción, se omitió el primer anticuerpo. Los resultados se expresaron como dilución del suero versus DO. El título de anticuerpos se definió como la dilución del suero a la cual se alcanzó la mitad de la DO máxima.

### **5.3 Determinación de isotipo**

Se utilizó el procedimiento de Moltedo *et al.* 2006<sup>22</sup>. Brevemente, placas de 96 pocillos fueron cubiertas con 100 µL/pozo de una solución conteniendo 10 µg/mL de KLH, CCH o FLH en PBS durante toda la noche a 4 °C y luego, se bloquearon los sitios reactivos remanentes con 200 µL de una solución de PBS-Caseína al 1% durante una hora a 37 °C. A continuación, se agregó el

suero y se realizaron diluciones seriadas en base dos en PBS-Caseína al 1% y se incubaron las placas por dos horas a 37 °C y luego, se lavaron los pocillos tres veces con 200 µL de PBS-Tween al 0,02%. Posteriormente, se agregaron 100 µL de una solución de PBS-Caseína al 1% conteniendo suero de cabra anti-subclases de IgG de ratón (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) conjugados con HRP (dilución 1:10.000) y se incubó por 30 minutos a 37° C. Se lavó de la misma forma señalada anteriormente y se agregaron 100 µL de la solución 1-Step™ Ultra TMB-ELISA. Las placas se incubaron 20 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 N y se leyó la DO a 450 nm. Como control de la especificidad de la reacción, se omitió el anticuerpo específico. Los resultados de anticuerpos anti-subclases se expresaron como la mitad de la DO máxima de las muestras de suero diluidas apropiadamente.

#### **5.4 Detección de citoquinas**

Se midieron los niveles de IFN-γ e IL-4 para determinar si la respuesta humoral era de tipo Th1 o Th2, respectivamente<sup>33, 35</sup>. Dichas citoquinas fueron medidas en el suero de los animales de experimentación, usando kits de ELISA específicos adquiridos comercialmente, según las instrucciones de los fabricantes.

## 5.5 Reacción de hipersensibilidad retardada

Método 1: se midió el grosor del cojinete del pie derecho y el pie izquierdo mediante un caliper de alta precisión, tanto en el instante previo a la inyección de las hemocianinas como a las 24, 48 y 72 horas. En cada oportunidad, se realizaron tres mediciones y se promediaron. Para realizar la inyección, los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con 60  $\mu$ L de ketamina diluida en suero fisiológico (1:5). Luego, se inyectaron en el cojinete del pie izquierdo del animal 50  $\mu$ g de cada hemocianina en estudio por vía subcutánea, disuelta en 20  $\mu$ L de PBS. Seguidamente, los ratones se dejaron bajo calor, para permitir su recuperación de la anestesia. La reacción de DTH se graficó en términos de la diferencia de grosor entre el pie izquierdo y el derecho a lo largo del tiempo.

Método 2: se midió el grosor del cojinete del pie derecho y el pie izquierdo mediante un caliper de alta precisión, tanto en el instante previo a la inyección de las hemocianinas como a las 24, 48 y 72 horas. En cada oportunidad, se realizaron tres mediciones y se promediaron. Para realizar la inyección, los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente con 60  $\mu$ L de ketamina diluida en suero fisiológico (1:5). Luego, se inyectó en el cojinete del pie izquierdo del animal  $1 \times 10^4$  de células tumorales MOC7, suspendidas en 20  $\mu$ L de PBS Dulbecco (modificado de Schillaci *et al*<sup>70</sup>). Seguidamente, los ratones

se dejaron bajo calor, para permitir su recuperación de la anestesia. La reacción de DTH se graficó en términos de la diferencia de grosor entre el pie izquierdo y el derecho, a lo largo del tiempo.

## **5.6 Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo ortotópico de cáncer oral (bioensayo terapéutico)**

Se empleó el procedimiento general descrito por Paolini *et al.* 2013 con modificaciones<sup>56</sup>. Grupos de 5 ratones hembra C3H/He previamente separados fueron anestesiados con 40-50 mg de Zoletil por kg de peso corporal y fueron inyectados con 100  $\mu$ L de una suspensión de  $6 \times 10^5$  células AT-84 E7 Luc en el piso de la boca, a través de una vía extraoral. En el día 8, los grupos recibieron intradérmicamente en el flanco uno de los tratamientos especificados en la **Tabla II**. Posteriormente, el tratamiento fue administrado en el flanco cada tres días (días 11, 14, 18 y 20). El crecimiento del tumor fue monitoreado con el sistema de imagenología IVIS® Lumina. El sistema incluyó una cámara CCD de alta sensibilidad, una cámara de imagenología hermética contra la luz con lo requerido para la adquisición y el análisis de imágenes. La emisión de luz fue detectada usando el sistema de cámara CCD IVIS® Lumina II y analizado con el paquete de software Image Pro®-Premier. Para la adquisición de imágenes, los ratones fueron anestesiados como se indicó anteriormente. Después,

fueron inyectados intraperitonealmente con 150 mg/Kg de D-luciferina. Diez minutos después, la cuantificación de la emisión de luz fue realizada en fotones/segundo y visualizada en una escala de pseudo-color. El tiempo de exposición del animal fue de 5 minutos. El área del tumor (unidades relativas) fue determinado dibujando las regiones de interés (ROI) sobre cada localización. Además, los ratones fueron sangrados en los días 11 y 21 (primer y segundo sangrado, respectivamente), para obtener muestras de suero y así, determinar el título de anticuerpos IgG séricos contra cada hemocianina y el isotipo de dichos anticuerpos, mediante ensayos de ELISA. La reacción de DTH contra el tumor se realizó en el día 21 del bioensayo. La supervivencia se evaluó hasta el día 25 posinoculación de las células.

### **5.7 Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo ortotópico de cáncer oral (bioensayo profiláctico)**

Se empleó el procedimiento general descrito por Paolini *et al.* 2013 con modificaciones<sup>56</sup>. En el día 14, grupos de 5 ratones hembra C3H/He previamente separados fueron inyectados en el flanco con uno de los tratamientos indicados en la **Tabla II**. En el día 0, fueron anestesiados con 40-50 mg de Zoletil por kg de peso corporal y fueron inyectados con 100 µL de una suspensión de  $6 \times 10^5$  células AT-84 E7 Luc en el piso de la boca, a través de

una vía extraoral. Después de ello, el tratamiento idéntico al que se le brindó en el día -14 fue administrado en el día 1 y luego, cada 3 días (días 4, 7, 10 y 14). La medición del tumor se llevó a cabo de la misma manera en que se detalla para el ensayo terapéutico del modelo ortotópico de cáncer oral. Además, los ratones fueron sangrados en los días 10 y 21 (primer y segundo sangrado, respectivamente), para obtener muestras de suero y así, determinar el título de anticuerpos IgG séricos contra cada hemocianina y el isotipo de dichos anticuerpos, mediante ensayos de ELISA. La reacción de DTH contra el tumor se realizó en el día 15 del bioensayo. La sobrevida se evaluó hasta el día 25 posinoculación de las células.

#### **5.8 Evaluación del efecto inmunoterapéutico de la formulación FLH más QS-21 en un modelo heterotópico de cáncer oral (bioensayo profiláctico)**

Se empleó el procedimiento general descrito por Moltedo *et al.* 2006 con modificaciones<sup>22</sup>. En el día -14, grupos de 5 ratones hembra C57BL/6 previamente separados fueron inyectados en el flanco con uno de los tratamientos indicados en la **Tabla II**. En el día 0, fueron inyectados con 100 µL de una suspensión de  $1 \times 10^5$  células MOC7 en el flanco opuesto al empleado para la aplicación del tratamiento. Después de ello, el tratamiento fue idéntico al que se le brindó en el día -14, siendo administrado en el día 7 y luego, cada

3 días (días 10, 13, 16 y 20). Los ratones fueron evaluados visualmente y mediante palpación en cuanto a la presencia de tumor. El volumen del tumor fue monitoreado dos veces a la semana usando un vernier. El mismo fue calculado de acuerdo a la fórmula del elipsoide ( $0,52 \times \text{largo} \times \text{ancho}^2$ ). Además, los ratones fueron sangrados en los días 15 y 34 (primer y segundo sangrado, respectivamente) para obtener muestras de suero y así, determinar el título de anticuerpos IgG séricos contra cada hemocianina y contra el tumor, el isotipo de los anticuerpos IgG séricos anti-hemocianina, y el nivel de citoquinas, mediante ensayos de ELISA. La reacción de DTH contra el tumor se realizó en el día 30 del bioensayo. La sobrevivencia se evaluó hasta el día 65 posinoculación de las células.

**Tabla II:** Composición de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante administradas a los animales de experimentación, para los bioensayos ortotópicos y heterotópicos de cáncer oral

Grupo	Hemocianina ( $\mu\text{g}$ ) en 100 $\mu\text{L}$ de volumen total	Adyuvante ( $\mu\text{g}$ ) en 100 $\mu\text{L}$ de volumen total
Control: PBS	-	-
Control: QS-21	-	10
KLH	100	-
FLH	100	-
KLH más QS-21	50	10
FLH más QS-21	50	10

## **5.9 Determinación de la reacción cruzada entre anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7**

Brevemente, placas de 96 pocillos fueron sembradas con 100  $\mu$ L/pozo de una suspensión conteniendo  $5 \times 10^4$  células tumorales de MOC7 en medio DMEM con SFB 5% durante toda la noche a 37 °C y luego, se fijaron las células con 100  $\mu$ L de paraformaldehído 0,5% durante 10 minutos. El medio se descartó, y se repitió la adición y el descarte de paraformaldehído. A continuación, se agregó el suero de los animales de experimentación y se realizaron diluciones seriadas en base dos en PBS-Caseína al 1% y se incubaron las placas por dos horas a 37 °C; luego, se lavaron los pocillos tres veces con 200  $\mu$ L de PBS-Tween al 0,02%. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ L de una solución de PBS-Caseína al 1% con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) de ratón conjugado a fosfatasa alcalina (dilución 1:2.500) y se incubó por 30 minutos a 37 °C. Los pocillos se lavaron de la misma forma señalada anteriormente y se revelaron con 100  $\mu$ L de una solución 1 mg/mL de pNpp en amortiguador FAL. Las placas se incubaron 20 minutos a 37 °C, la reacción se detuvo con 100  $\mu$ L de NaOH 3 N y se leyó la DO a 405 nm. Como control de la especificidad de la reacción, se omitió el primer anticuerpo. Los resultados se expresaron como dilución del suero versus DO. El título de

anticuerpos se definió como la dilución del suero a la cual se alcanzó la mitad de la DO máxima.

### **5.10 Ensayo de viabilidad celular mediante Alamar Blue**

Se utilizó el ensayo comercial Alamar Blue, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron en placas de 96 pocillos  $2 \times 10^4$  células por pocillo de las líneas tumorales AT-84, MOC7 o AT-84 E7 Luc. En el caso del ensayo a 72 horas, a las tres horas después de sembradas las células, fueron incubadas con diferentes concentraciones de KLH, CCH y FLH (0, 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}^{28}$ ), solas y también con los adyuvantes Alúmina, QS-21 o AddaVax (en las mismas proporciones de las formulaciones descritas en la **Tabla I**). A las 72 horas después de su aplicación, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Alamar Blue (preparado diluyendo 1:10 en medio DMEM con 5% de suero fetal bovino) y se incubó a 37 °C. Para el ensayo a 24 horas, 48 horas después de la siembra, se aplicaron las diversas formulaciones y, a las 24 horas después de su aplicación, se retiró el medio y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  del reactivo Alamar Blue, preparado como se mencionó anteriormente, y se incubó a 37 °C. Las lecturas para ambos ensayos se llevaron a cabo 4 horas después de aplicar el Alamar Blue. Como controles, se utilizaron las hemocianinas y los adyuvantes solos, y

como control positivo, se empleó doxorubicina (10  $\mu$ M), una conocida droga antitumoral que es frecuentemente usada en quimioterapia<sup>71, 72</sup>.

### **5.11 Análisis de resultados**

Para la comparación entre grupos, se usó ANOVA de una o dos vías y post-confirmación con el ensayo de Bonferroni. Para el análisis de sobrevivencia, se utilizó el método de Kaplan-Meier. En todos los casos, se dispuso del programa GraphPad Prism 6. En el caso de los bioensayos, se consideró significativo un valor de  $p \leq 0,05$ , y en los de viabilidad celular, uno de  $p \leq 0,0001$ .

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Respuesta inmune humoral y celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en un modelo murino**

#### **6.1.1 Respuesta inmune humoral específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6**

En primer lugar, se procedió a inmunizar los animales de experimentación con las diferentes hemocianinas solas o junto con los diferentes adyuvantes para medir su efecto en la potencia de la respuesta inmune humoral específica contra ellas. En la **Figura 3A** se muestra el protocolo experimental, que consistió en la aplicación de dos dosis similares (día 1 y día 16) de cada una de las hemocianinas solas o en conjunto con uno de los tres adyuvantes de interés. Un día después de la administración de la dosis, se revisó el sitio de inyección, y sólo en el caso de las formulaciones con AddaVax, se observó una ligera inflamación en el sitio de aplicación. No obstante, la misma desapareció a las 48 horas.

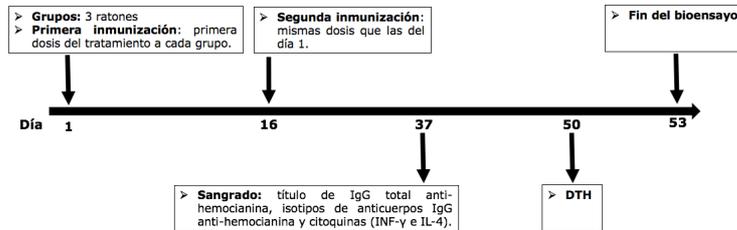
A los 37 días de la inmunización secundaria, se determinó el título de anticuerpos séricos anti-hemocianina (IgG total) mediante un ensayo de ELISA

indirecto. Como se observa en la **Figura 3B**, se produjo una diferencia significativa entre el título contra cada hemocianina sola (en torno a 33 diluciones para KLH, 90 para CCH y 180 para FLH) y cada hemocianina mezclada con el adyuvante QS-21 (en torno a 1.000 diluciones para KLH, 865 para CCH y 2.025 para FLH). En el caso del AddaVax, esta diferencia solo se observó usando KLH y FLH (en torno a 430 y 890 diluciones, respectivamente). Al comparar entre los tres tratamientos con QS-21, aquel donde se empleó FLH presentó una diferencia significativa en relación con los otros dos, concluyéndose que para este ensayo, el que brindó los mejores resultados en cuanto a potencia de la respuesta inmune humoral específica fue FLH más QS-21.

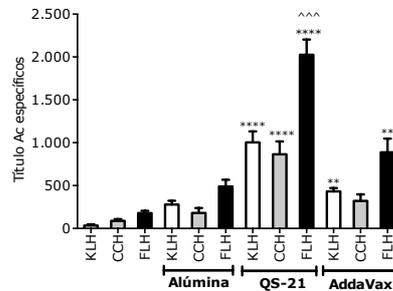
Otro de los aspectos evaluados fue el perfil de tipo Th1 o Th2 de la respuesta humoral observada con cada uno de los tratamientos. En la **Figura 3C** se muestra la determinación de los isotipos de IgG anti-hemocianina en dichas condiciones. En el caso de las formulaciones constituidas por las hemocianinas solas y en combinación con Alúmina, no se observó una diferencia significativa entre el isotipo IgG1 y los isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3. En contraposición con esta situación, todos los tratamientos con QS-21 y AddaVax fueron indicativos del desarrollo de una respuesta inmune de tipo Th1, con predominio de IgG2a. Sin embargo, cabe resaltar que las respuestas a las preparaciones con QS-21 presentaron una polarización mayor hacia una

respuesta inmune de este perfil. Se evaluó mediante ELISA si este resultado se correlacionaba con un aumento de la concentración sérica de INF- $\gamma$  y, a su vez, a un nivel basal de IL-4 en todos los tratamientos, excepto con Alúmina, encontrándose resultados negativos en ambos casos para todos los grupos estudiados (valores por debajo del valor menor de la curva de calibración de cada ensayo), incluidos los grupos Sham y PBS.

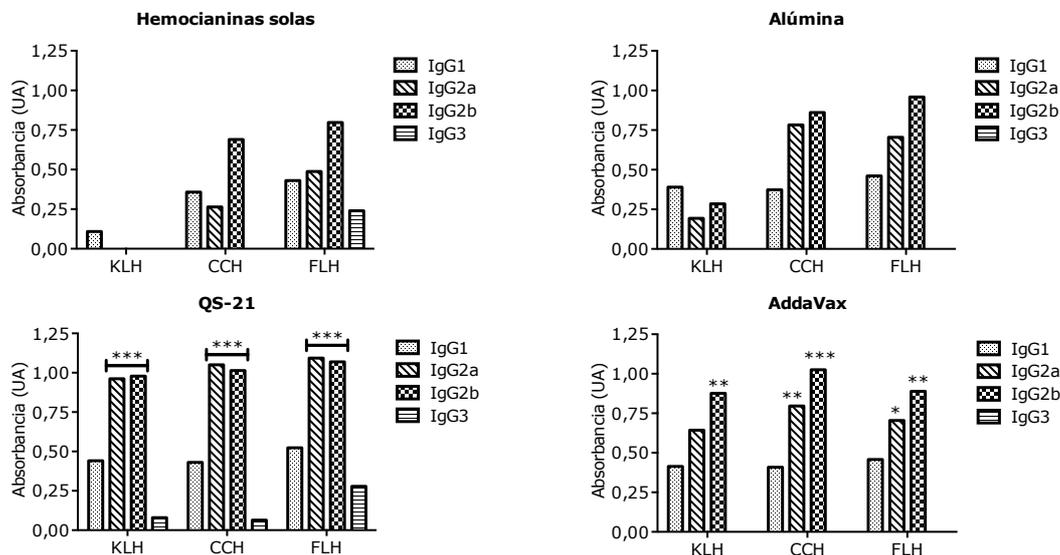
A



B



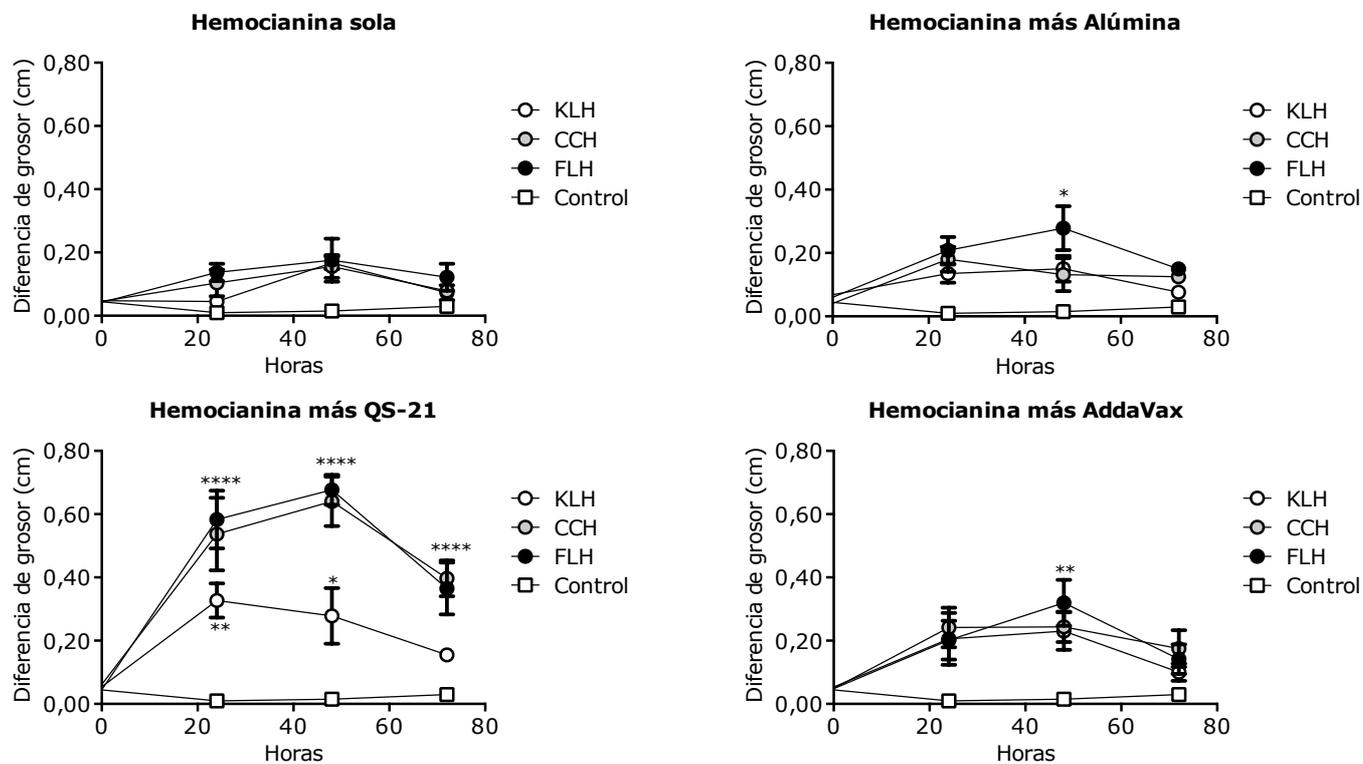
C



**Figura 3: Efecto sobre la respuesta inmune humoral de ratones C57BL/6 inmunizados con hemocianinas de moluscos solas o en conjunto con adyuvantes de vacunas. A. Esquema del protocolo de inmunización de los animales de experimentación.** Grupos de tres ratones C57BL/6 hembras de dos a cuatro meses de edad fueron inmunizados vía subcutánea en los días 1 y 16 con uno de los siguientes tratamientos: 50  $\mu$ g de KLH, CCH o FLH sola o en conjunto con 100  $\mu$ g de alúmina, 10  $\mu$ g de QS-21, en una relación 1:1 (vol/vol) de AddaVax en 100  $\mu$ L de volumen total o 100  $\mu$ L de PBS. Se tomó una muestra de suero a cada animal en el día 37, posterior a la inmunización secundaria para los análisis que se describen a continuación. **B. Determinación del título de IgG total anti-hemocianina en la respuesta secundaria mediante un ensayo de ELISA indirecto.** Se muestra la media de los valores obtenidos para cada tratamiento junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó mediante ANOVA de una vía el valor del título total de IgG anti-hemocianina del tratamiento con la hemocianina sola contra aquellos con la hemocianina homóloga y cada uno de los adyuvantes empleados. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ , ^^^  $p < 0,001$ .  $n = 2$ , tres ratones por grupo. **C. Determinación de los isotipos de IgG específicos anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto específico para cada isotipo.** Para la comparación, se tomó la mitad de la DO máxima obtenida para cada uno de los isotipos de los distintos tratamientos<sup>22</sup>. Las diluciones para las hemocianinas solas fueron las siguientes: KLH, IgG1 (80); CCH, IgG1 (320), IgG2a (160), IgG2b (80); FLH, IgG1 (640), IgG2a (80), IgG2b (320), IgG3 (160). Para las hemocianinas más Alúmina, las diluciones fueron: KLH, IgG1 (5.120), IgG2a e IgG2b (160); CCH, IgG1 (640), IgG2a (160), IgG2b (320); FLH, IgG1 (2.560), IgG2a e IgG2b (640). Para las hemocianinas más QS-21, las diluciones fueron: KLH, IgG1 (5.120), IgG2a e IgG2b (2.560), IgG3 (320); CCH, IgG1 e IgG2a (10.240), IgG2b (5.120), IgG3 (320); FLH, IgG1, IgG2a e IgG2b (10.240), IgG3 (5.120). Para las hemocianinas más AddaVax, las diluciones fueron: KLH, IgG1 (10.240), IgG2a (640), IgG2b (320); CCH, IgG1 (10.240), IgG2a e IgG2b (1.280); FLH, IgG1 (5.120), IgG2a (1.280), IgG2b (640). Se comparó la IgG1 contra la IgG2a, IgG2b e IgG3 de cada uno de los tratamientos mediante ANOVA de dos vías. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$  (ensayo representativo de dos experimentos independientes, pool de tres ratones).

### **6.1.2 Respuesta inmune celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6**

Con los mismos grupos de animales usados anteriormente para determinar la respuesta humoral anti-hemocianina, también se caracterizó la respuesta inmune celular midiendo la reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) anti-hemocianina. Con este propósito, se aplicaron 50  $\mu$ g de la hemocianina empleada en el tratamiento de un determinado grupo, en el cojinete izquierdo de cada animal y, usando el cojinete derecho como control. Las mediciones se llevaron a cabo al momento de iniciar el experimento (tiempo 0) y a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección de cada proteína. Como se muestra en la **Figura 4**, los tratamientos con cada hemocianina sola y KLH o CCH más Alúmina o AddaVax, no presentaron diferencias significativas en la respuesta con respecto al grupo control, tratado con PBS, vehículo en que se inyectaron las hemocianinas. En contraste, con los demás tratamientos sí se encontró diferencias significativas en las formulaciones de FLH más Alúmina o AddaVax, en que hubo una respuesta DTH considerable a las 48 horas posteriores a la aplicación de la hemocianina. En cuanto a la formulación KLH más QS-21, también hubo un aumento en la respuesta a las 24 y 48 horas. Finalmente, las formulaciones CCH y FLH más QS-21 mostraron las mayores respuestas, alcanzando un valor máximo a las 48 horas de 0,64 y 0,68, respectivamente.



**Figura 4: Efecto sobre la respuesta inmune celular de ratones inmunizados con hemocianinas de moluscos solas o en conjunto con adyuvantes de vacunas.** La prueba de hipersensibilidad retardada se llevó a cabo mediante la aplicación de la hemocianina homóloga del tratamiento en el cojinete de la pata izquierda del ratón, y la medición de la diferencia de grosor con respecto al de la pata derecha al iniciar el experimento (tiempo 0), y a las 24, 48 y 72 horas. Se muestra la media de los valores obtenidos junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó la diferencia de grosor del grupo control a los diferentes tiempos de medición con respecto al de los demás tratamientos a los mismos tiempos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=2$ , tres ratones por grupo.

## **6.2 Efecto antitumoral *in vivo* en dos modelos murinos de cáncer oral de FLH en conjunto con QS-21**

Debido a que la formulación FLH más QS-21 fue la que brindó mejores resultados en el Objetivo 1, se eligió para evaluar el efecto antitumoral en el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea de células de cáncer oral AT-84 E7 Luc, tanto en un protocolo profiláctico como uno terapéutico. Estos experimentos se realizaron durante una estadía de tres meses (Abril-Julio de 2015) en el Departamento de Virología, dirigido por el Dr. Aldo Venuti, del Instituto Regina Elena, Roma, Italia.

### **6.2.1 Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo terapéutico usando el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc**

En este bioensayo, al igual que en los demás realizados con modelos de cáncer oral, se empleó como control la FLH sola, y también KLH sola y junto con el QS-21. Además, se incluyó el QS-21, para conocer el efecto de este adyuvante solo en el desarrollo del carcinoma oral murino, y PBS como control, por ser el vehículo de las hemocianinas. En la **Figura 5A** se presenta el esquema del protocolo empleado en el bioensayo terapéutico.

En la **Figura 6** se muestran las imágenes obtenidas para el ensayo terapéutico, mediante el sistema de imagenología IVIS® Lumina. Las imágenes exhiben el avance en el crecimiento tumoral al transcurrir el tiempo del bioensayo. Además, al lado de cada grupo se adjunta la escala de color, donde el azul indica un menor flujo de luminiscencia (zona con menor tejido tumoral) y el rojo uno mayor (zona con mayor tejido tumoral). También, se aprecia cómo fueron muriendo los individuos de los distintos grupos a medida que avanzaba el ensayo. Las muertes se distinguieron entre aquellas ocasionadas a causa del tumor o como consecuencia de que el animal fue eutanasiado, al presentar un tumor con un volumen en torno a  $2.000 \text{ mm}^3$ , y aquellas que sucedieron al poco tiempo de la aplicación de la anestesia, requerida para la obtención de la imagen (cruz roja) o el desafío con las células tumorales (ocurrida a menos de 8 horas posteriores a la inyección, cruz verde). Los datos de sobrevivencia para cada uno de los grupos también se aprecian en la figura (**Figura 7A**). En este bioensayo, los grupos con mayor porcentaje de sobrevivencia fueron QS-21 y FLH, siendo éste un 80%. Junto con esto, en la **Figura 7B**, se muestra que no existe una diferencia significativa en el desarrollo de tumor entre los distintos tratamientos utilizados con respecto al control. Para dicho gráfico, no se consideraron los ratones que se encontraron muertos (inanición y/o anestesia) y a los cuales no se les evaluó la presencia de tumor.

También, se caracterizó la respuesta humoral y celular de las formulaciones. Es así que en cuanto al título de IgG anti-hemocianina, no se apreció una diferencia significativa entre el valor obtenido para la hemocianina sola en comparación a la misma hemocianina junto con QS-21 (**Figura 5B**).

En lo que respecta al tipo de respuesta inmune, evaluando el isotipo de los anticuerpos específicos anti-hemocianina, se encontró que ésta fue indicativa de una tipo Th1 para cada uno de los tratamientos (con excepción de KLH sola, pues no se contaba con suficiente suero para la realización del ensayo), porque se encontró una diferencia significativa entre el valor obtenido para la IgG1 versus la IgG2a y la IgG2b, como se muestra en la **Figura 5C**.

Para la respuesta celular, la formulación FLH más QS-21 mostró diferencias significativas en la DTH con respecto al grupo control a los distintos tiempos analizados (**Figura 5D**). Para los tratamientos FLH y KLH más QS-21 también se apreciaron diferencias significativas, pero no a todos los tiempos (24 y 48 horas, y 48 y 72 horas, respectivamente). Los tratamientos sólo con KLH o con QS-21 fueron similares al grupo control en todos los tiempos.

### **6.2.2 Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo profiláctico usando el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc**

En la **Figura 8A** se muestra el esquema del protocolo usado en el bioensayo profiláctico. En este bioensayo, los animales del grupo FLH más QS-21 desarrollaron pequeñas lesiones superficiales en la piel, específicamente en el sitio de aplicación de la formulación, después de cuatro dosis administradas. No obstante, no hubo cambio en la conducta de los animales. En la **Figura 9**, se exhiben las imágenes obtenidas para este bioensayo, las cuales siguen los mismos criterios y características descritos para el bioensayo terapéutico. Las mismas muestran el desarrollo del carcinoma de cabeza y cuello conforme avanzaba el bioensayo. También se presentaron los datos de supervivencia para cada uno de los grupos (**Figura 10A**). Todos los sujetos de experimentación de los grupos QS-21 y FLH más QS-21 llegaron hasta el final del bioensayo, siendo esto significativo en relación con el grupo control. Sin embargo, únicamente el grupo FLH más QS-21 mostró una disminución significativa en el desarrollo del tumor hasta el día 16, tal y como se exhibe en la **Figura 10B**. Al igual que para el tratamiento terapéutico, no se consideraron los ratones que se encontraron muertos (inanición y/o anestesia) y a los cuales no se les evaluó la presencia de tumor.

Bajo este esquema de tratamiento, al evaluar el título de IgG anti-hemocianina obtenido se encontró una diferencia significativa entre la formulación constituida por KLH únicamente y la que presentaba KLH más QS-21, para las dos muestras tomadas a distintos tiempos, tal y como se observa en la **Figura 8B**.

El análisis fue indicativo de una respuesta inmune balanceada durante el primer sangrado, esto es de tipo Th1/Th2, ya que no se observó una diferencia significativa entre los resultados de la IgG1 versus IgG2a, IgG2b e IgG3 (**Figura 8C**). Sin embargo, al analizar las muestras del segundo sangrado, se observó un aumento de las IgG2a e IgG2b con respecto a la IgG1, indicativo de una respuesta inmune de tipo Th1. También, esta respuesta fue mucho más polarizada en comparación con la observada en el bioensayo terapéutico.

Finalmente, en la prueba de hipersensibilidad retardada hubo una diferencia significativa en todos los tiempos analizados para KLH y FLH con QS-21, siendo los mayores valores obtenidos (**Figura 8D**). Además, no hubo una diferencia significativa entre ambos grupos. Para FLH, se encontró una diferencia significativa a 24 y 48 horas, y para KLH y QS-21 no hubo diferencias con respecto al control a ninguno de los tiempos de medición.

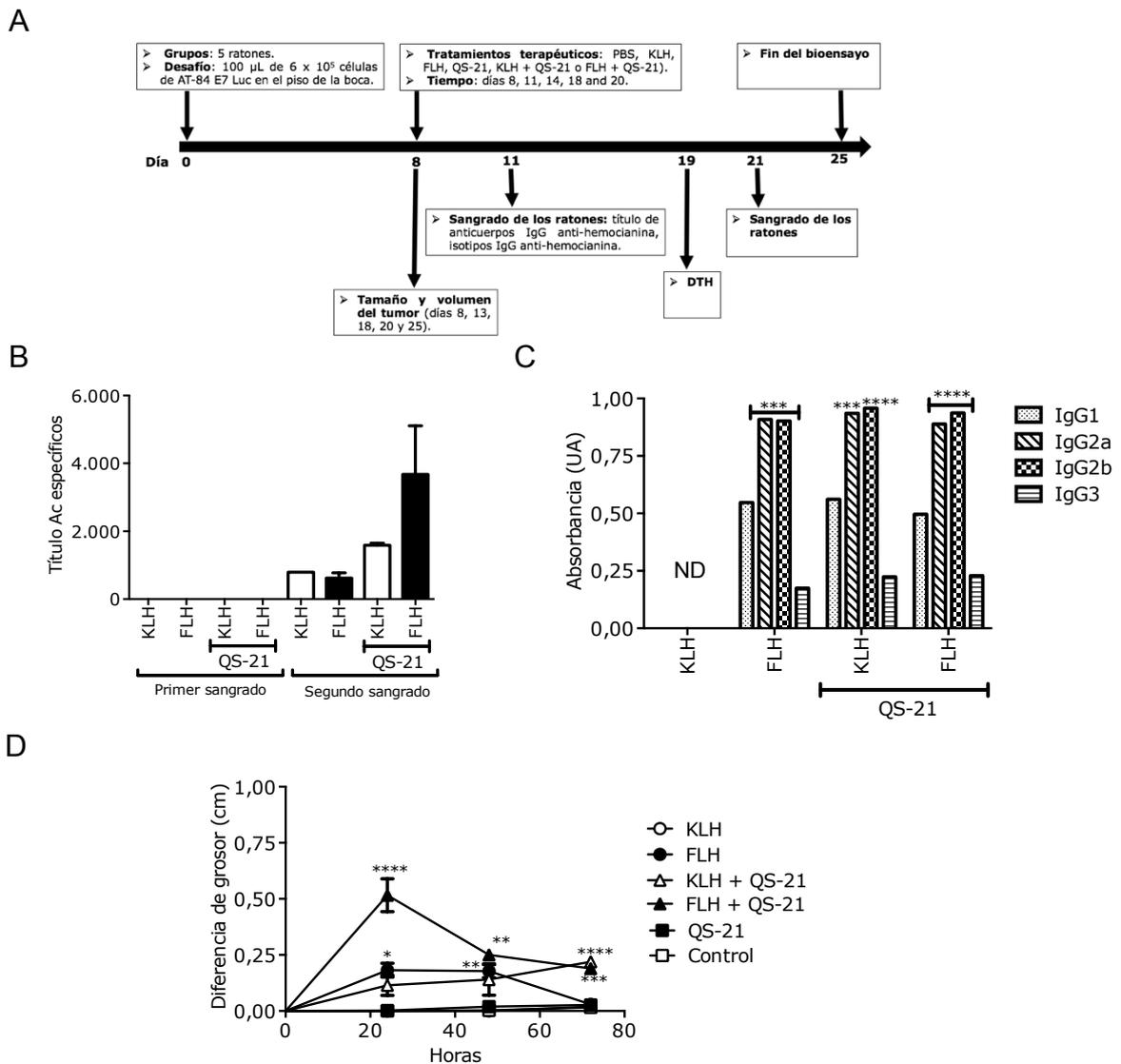
### **6.2.3 Efecto inmunoterapéutico de hemocianinas-adyuvantes, en un ensayo profiláctico usando el modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7**

Se realizó un bioensayo profiláctico en ratones C57BL/6 desafiados con la línea de células tumorales MOC7 en un modelo heterotópico, esto inyectando las células subcutáneamente en la pared costal del cuerpo. En este bioensayo, no se presentaron heridas en ninguna de las formulaciones con QS-21, pues las dosis se aplicaron en diferentes posiciones en torno a la zona de inyección del tumor en los animales de experimentación. En la **Figura 11A** se muestra el esquema del protocolo utilizado. En la **Figura 11B** se observa la medición del volumen del tumor para los distintos grupos hasta el día 23, pues a partir de ese momento se comenzó a dar la muerte de los animales de experimentación por razones bioéticas, debido al desarrollo de metástasis a nivel pulmonar. No se encontró una diferencia significativa en el tamaño promedio medido para cada grupo con respecto al grupo control. También se muestra el momento de aparición del tumor y la sobrevivencia de los animales para los diferentes tratamientos (**Figuras 11C y 11D**, respectivamente), encontrándose el desarrollo del carcinoma de cabeza y cuello en todos los sujetos de experimentación. Además, únicamente un sujeto de experimentación del grupo FLH y uno de FLH más QS-21 llegaron al final del bioensayo al día 65. No

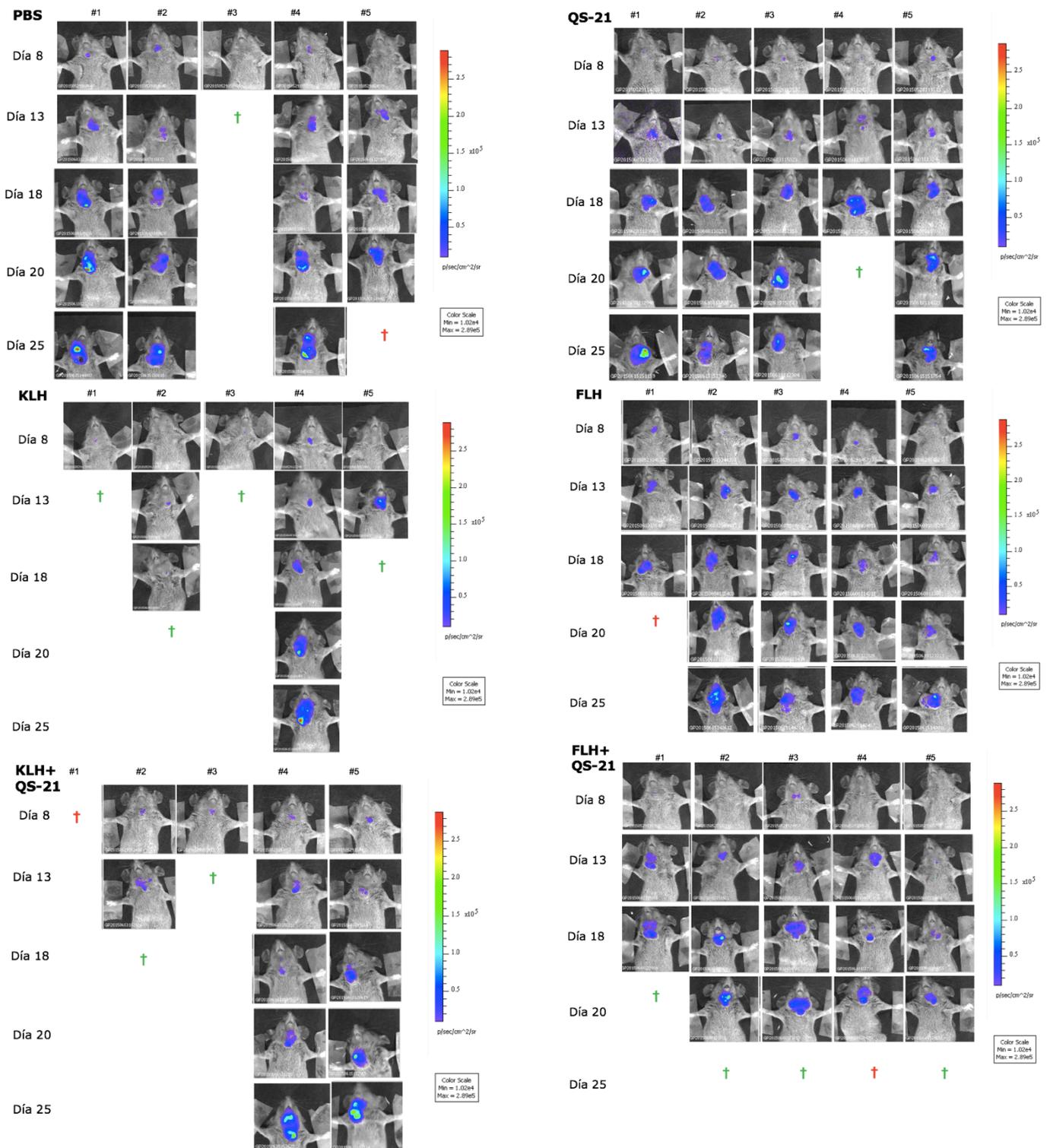
obstante, no se encontró una diferencia significativa en cuanto al período de sobrevivencia con respecto al grupo control.

Para la respuesta humoral, específicamente con respecto al título de IgG anti-hemocianina, no se encontró una diferencia significativa entre la formulación constituida por cada hemocianina sola o con QS-21 (**Figura 12A**). En cuanto al tipo de respuesta inmune, a partir de las muestras tomadas en el primer sangrado, el ensayo fue indicativo de una respuesta inmune balanceada de tipo Th1/Th2, ya que no se observó una diferencia significativa entre los niveles de la IgG1 versus IgG2a, IgG2b e IgG3, con excepción de la formulación KLH más QS-21, la cual fue Th1 (**Figura 12B**). Sin embargo, al analizar las muestras del segundo sangrado, sí se observó una respuesta inmune indicativa de una de tipo Th1 para ambas formulaciones de hemocianina más QS-21, con una diferencia significativa entre IgG1 e IgG2b. Además, se evaluó mediante ELISA si este resultado se correlacionaba con las concentraciones de citoquinas. Los resultados fueron negativos para IFN- $\gamma$  e IL-4 en todos los grupos estudiados (valores por debajo del valor menor de la curva de calibración de cada ensayo), incluidos QS-21 y PBS.

En la prueba de hipersensibilidad retardada de este bioensayo, no hubo una diferencia significativa a los distintos tiempos con respecto al grupo control (**Figura 12C**).

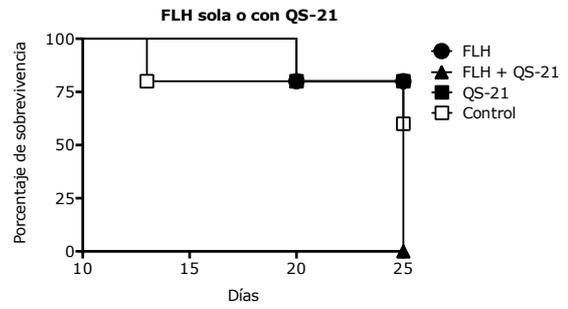
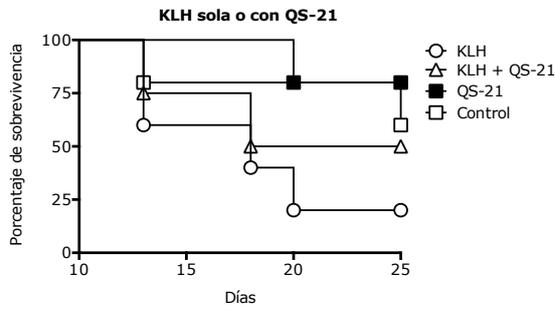


**Figura 5: Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo terapéutico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc.** **A.** Esquema del bioensayo terapéutico. Grupos de cinco ratones C3H/He hembras fueron inmunizados con uno de los siguientes tratamientos: 100 µg de KLH o FLH, 50 µg de KLH o FLH más 10 µg de QS-21, 10 µg de QS-21 o 100 µL de PBS. **B.** Determinación del título de IgG total anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto. Para ello, se tomaron muestras de suero en los días 11 y 21. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del título total de IgG anti-hemocianina del tratamiento con la hemocianina sola contra el de la misma hemocianina y QS-21, analizado mediante ANOVA de una vía. n=1, cinco ratones por grupo. **C.** Determinación de los isotipos de IgG específico anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto específico para cada isotipo. Se llevó a cabo con las mismas muestras de suero tomadas los días 11 y 21 del bioensayo. Las diluciones fueron: FLH, IgG1 (320), IgG2a e IgG2b (640), IgG3 (320); KLH + QS-21, IgG1 e IgG2a (10.240), IgG2b (1.280), IgG3 (640); FLH más QS-21, IgG1 (10.240), IgG2a (5.120), IgG2b (1.280), IgG3 (640). Se comparó la IgG1 contra la IgG2a, IgG2b e IgG3 de cada uno de los tratamientos. \*\*\*\* p<0,0001, \*\*\* p<0,001, analizado mediante ANOVA de dos vías. n=1, pool de cinco ratones. ND: no determinado. **D.** Prueba de hipersensibilidad retardada. Se realizó mediante la aplicación de la hemocianina propia del tratamiento para cada uno de los grupos en el cojinete de la pata izquierda del ratón y la medición de la diferencia de grosor con respecto al de la pata derecha a 24, 48 y 72 horas. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó la diferencia de grosor del grupo control a los diferentes tiempos de medición con respecto al de los demás tratamientos a los mismos tiempos. \*\*\*\* p<0,0001, \*\*\* p<0,001, \*\* p<0,01, \* p<0,05, analizado mediante ANOVA de una vía. n=1, cinco ratones por grupo.

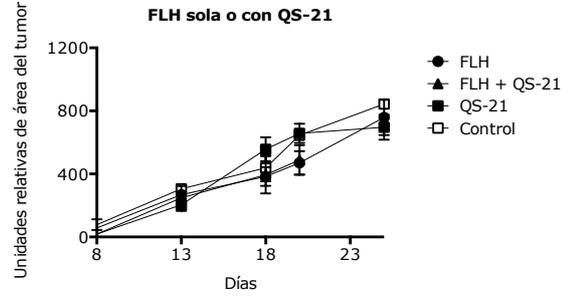
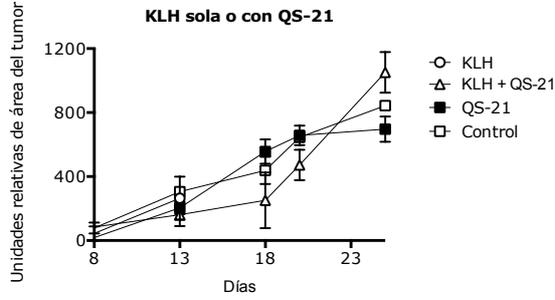


**Figura 6: Efecto de hemocianinas más QS-21 en un esquema de tratamiento terapéutico, en el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea celular AT-84 E7 Luc.** Se muestran las imágenes de emisión de luz de la zona del cuello de los animales de experimentación a los 8, 13, 18, 20, y 25 posdesafío, obtenidas con el sistema de imagenología IVIS® Lumina. Para su adquisición, los ratones fueron anestesiados e inyectados intraperitonealmente con 150 mg/Kg de D-luciferina y 10 minutos después, se expuso el animal a la cámara CCD durante 5 minutos. En la escala de color, el azul indica un menor flujo de luminiscencia y el rojo uno mayor. La cruz verde representa los animales encontrados muertos o eutanasiados y la cruz roja los que murieron después de la aplicación de la anestesia requerida para dormir al ratón, previo a la obtención de la imagen o al desafío con las células tumorales (menos de 8 horas posteriores a la anestesia).

A

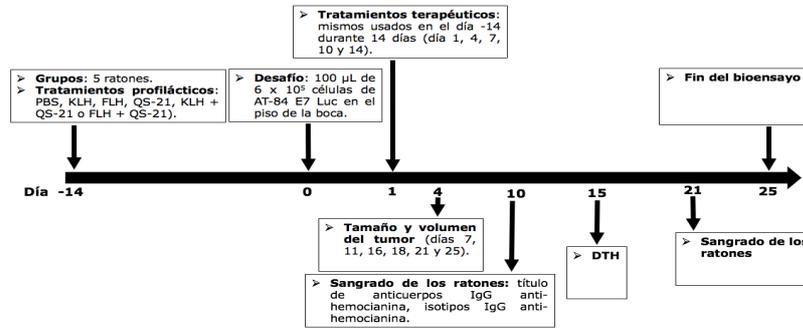


B

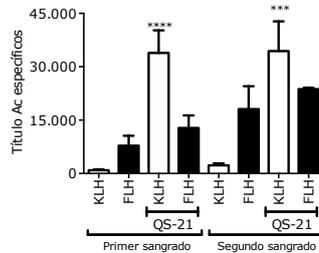


**Figura 7: Bioensayo terapéutico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc. A. Sobrevivencia de los animales del bioensayo.** El análisis de sobrevivencia de Kaplan-Meier fue realizado usando la prueba de long-rank. n=1, cinco ratones por grupo, con excepción del grupo FLH más QS-21 (cuatro ratones). **B. Efecto de los tratamientos en el crecimiento del carcinoma de cabeza y cuello.** El área del tumor fue medido empleando el paquete de software Image Pro®-Premier a partir de las imágenes obtenidas mediante el sistema de imagenología IVIS® Lumina. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del área del tumor para cada tratamiento con respecto al del grupo control y se analizó mediante ANOVA de una vía. n=1, cinco ratones por grupo.

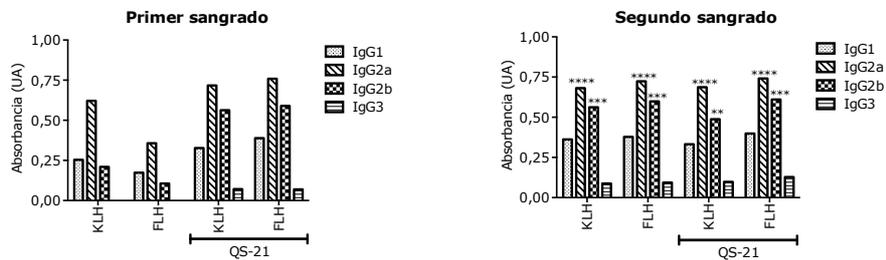
A



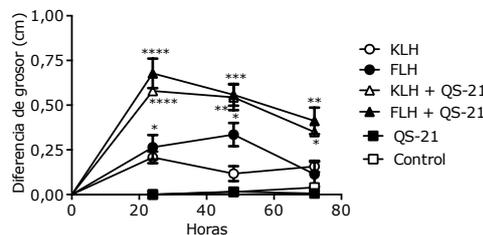
B



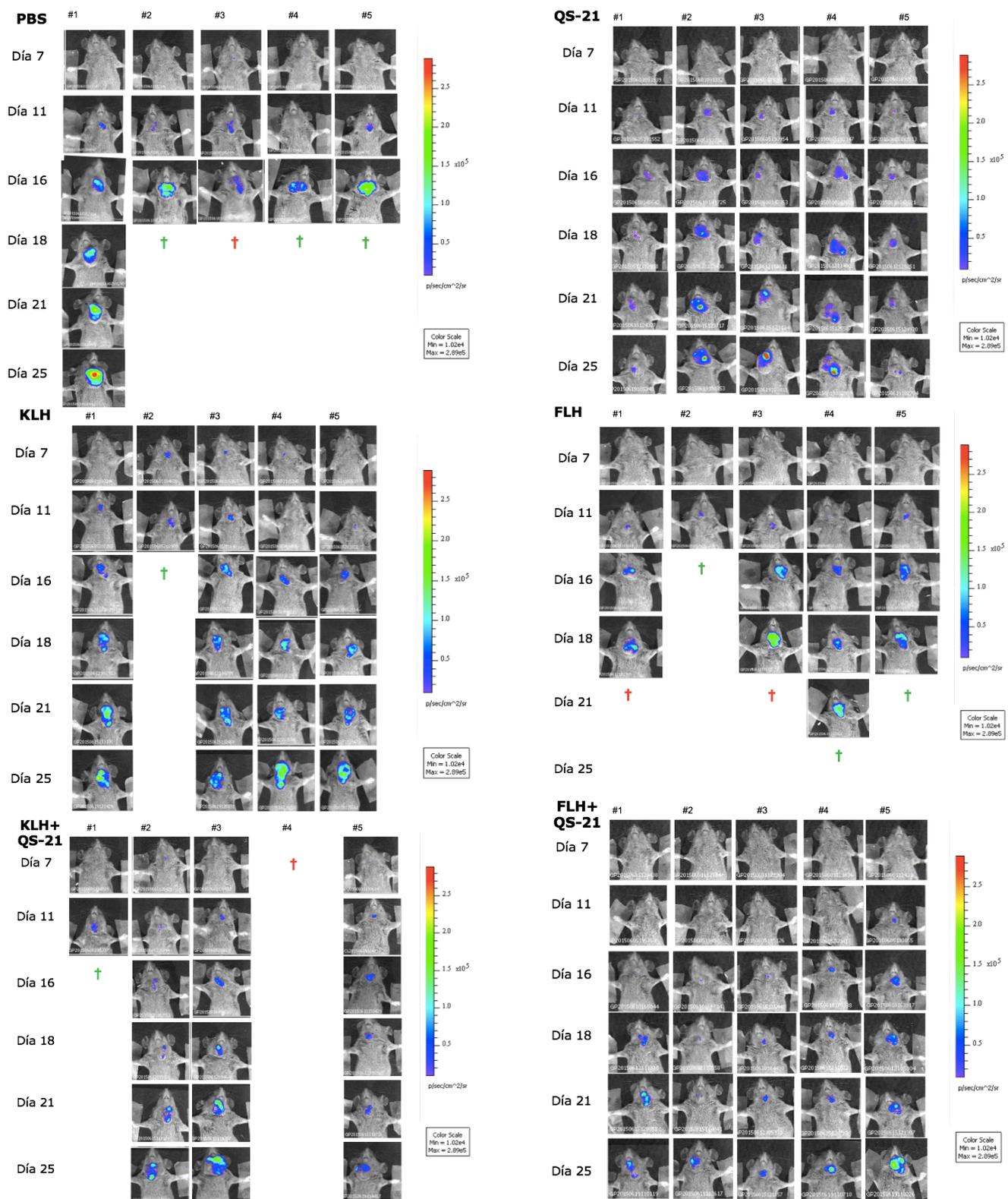
C



D

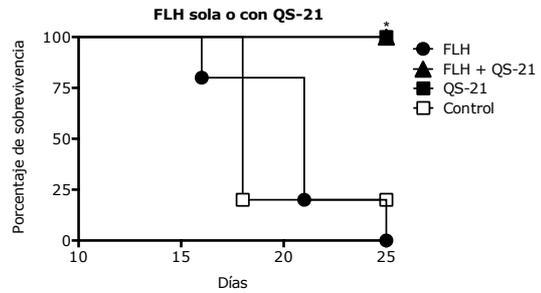
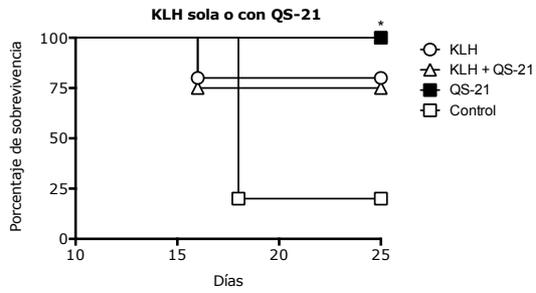


**Figura 8: Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo profiláctico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc.** **A.** Esquema de bioensayo profiláctico. Grupos de cinco ratones C3H/He hembras fueron inmunizados con uno de los siguientes tratamientos: 100 µg de KLH o FLH, 50 µg de KLH o FLH más 10 µg de QS-21, 10 µg de QS-21 o 100 µL de PBS. **B.** Determinación del título de IgG total anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto. Para ello, se tomaron muestras de suero en los días 10 y 21. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del título total de IgG anti-hemocianina del tratamiento con la hemocianina sola contra el de la misma hemocianina y QS-21 a los distintos tiempos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=1$ , cinco ratones por grupo. **C.** Determinación de los isotipos de IgG específico anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto específico para cada isotipo. Se llevó a cabo con las mismas muestras de suero tomadas los días 11 y 21 del bioensayo. En el caso del segundo sangrado, las diluciones fueron: KLH, IgG1 (10.240), IgG2a, IgG2b e IgG3 (1.280); FLH, IgG1 (20.480), IgG2a (81.920), IgG2b (5.120), IgG3 (320); KLH + QS-21, IgG1 (10.240), IgG2a (164.840), IgG2b (5.120), IgG3 (640); FLH más QS-21, IgG1 (20.480), IgG2a (81.920), IgG2b (10.240), IgG3 (640). Se comparó la IgG1 contra la IgG2a, IgG2b e IgG3 de cada uno de los tratamientos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , analizado mediante ANOVA de dos vías.  $n=1$ , pool de cinco ratones. **D.** Prueba de hipersensibilidad retardada. Se realizó mediante la aplicación de la hemocianina propia del tratamiento para cada uno de los grupos en el cojinete de la pata izquierda del ratón y la medición de la diferencia de grosor con respecto al de la pata derecha a 24, 48 y 72 horas. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó la diferencia de grosor del grupo control a los diferentes tiempos de medición con respecto al de los demás tratamientos a los mismos tiempos. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=1$ , cinco ratones por grupo.

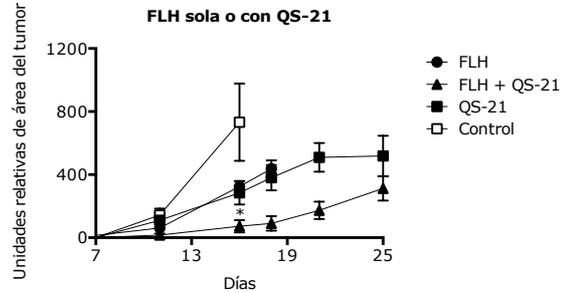
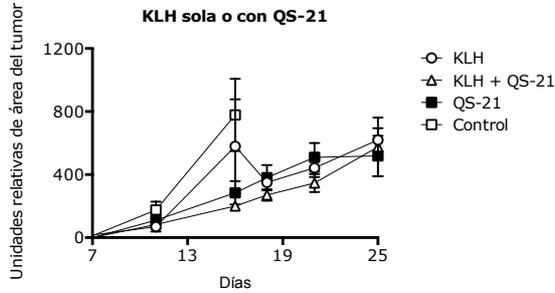


**Figura 9: Efecto de hemocianinas más QS-21 en un esquema de tratamiento profiláctico, en el modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea celular AT-84 E7 Luc.** Se muestran las imágenes de emisión de luz de la zona del cuello de los animales de experimentación, a los 7, 11, 16, 18, 21 y 25 posdesafío, obtenidas con el sistema de imagenología IVIS® Lumina. Para su adquisición, los ratones fueron anestesiados e inyectados intraperitonealmente con 150 mg/Kg de D-luciferina y 10 minutos después, se expuso el animal a la cámara CCD durante 5 minutos. En la escala de color, el azul indica un menor flujo de luminiscencia y el rojo uno mayor. La cruz verde representa los animales encontrados muertos o eutanasiados y la cruz roja los que murieron después de la aplicación de la anestesia requerida para dormir al ratón, previo a la obtención de la imagen o al desafío con las células tumorales (menos de 8 horas posteriores a la anestesia).

A

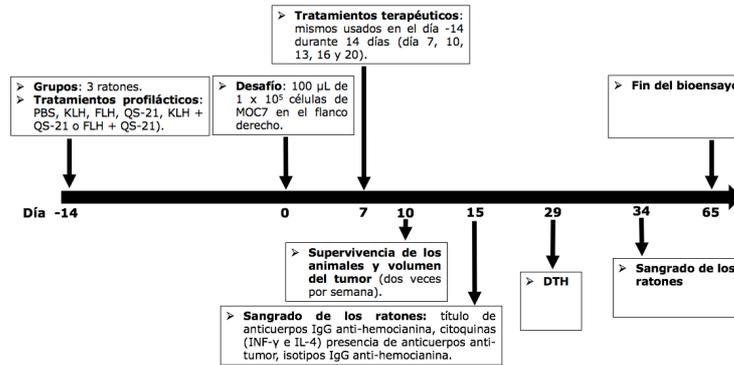


B

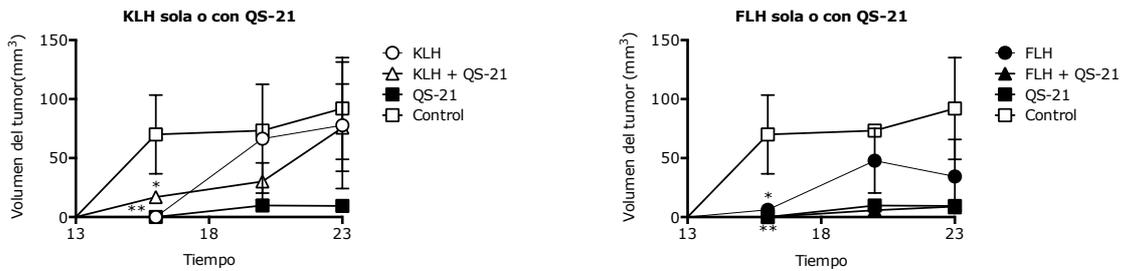


**Figura 10: Bioensayo profiláctico del modelo ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc.** **A.** Sobrevivencia de los animales del bioensayo. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier fue realizado usando la prueba de long-rank. \*  $p < 0,05$ .  $n=1$ , cinco ratones por grupo, con excepción del grupo FLH más QS-21 (cuatro ratones). **B.** Efecto de los tratamientos en el crecimiento del carcinoma de cabeza y cuello. El área del tumor fue medido empleando el paquete de software Image Pro®-Premier a partir de las imágenes obtenidas mediante el sistema de imagenología IVIS® Lumina. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del área del tumor para cada tratamiento con respecto al del grupo control y se analizó mediante ANOVA de una vía. \*  $p < 0,05$ .  $n=1$ , cinco ratones por grupo.

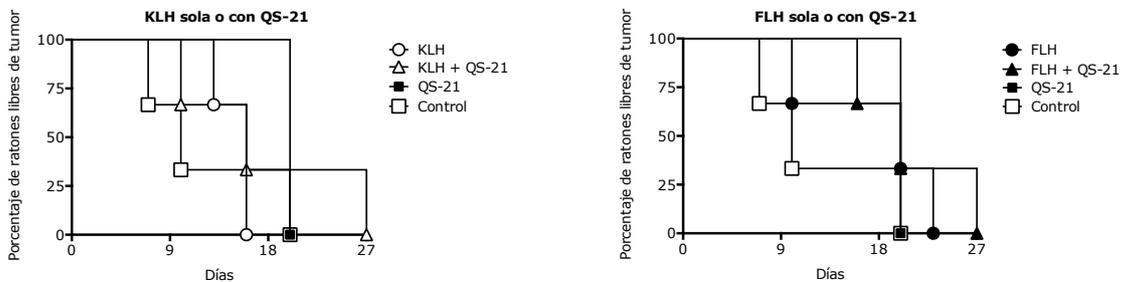
A



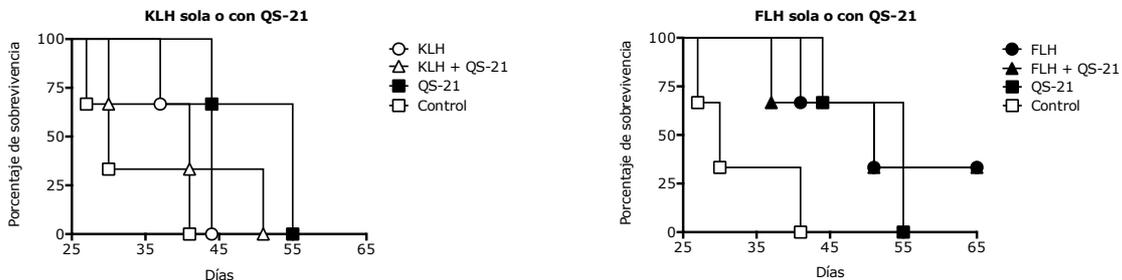
B



C



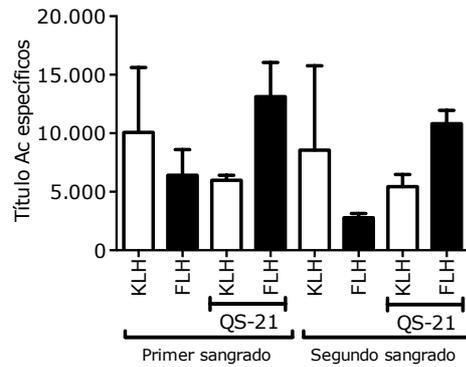
D



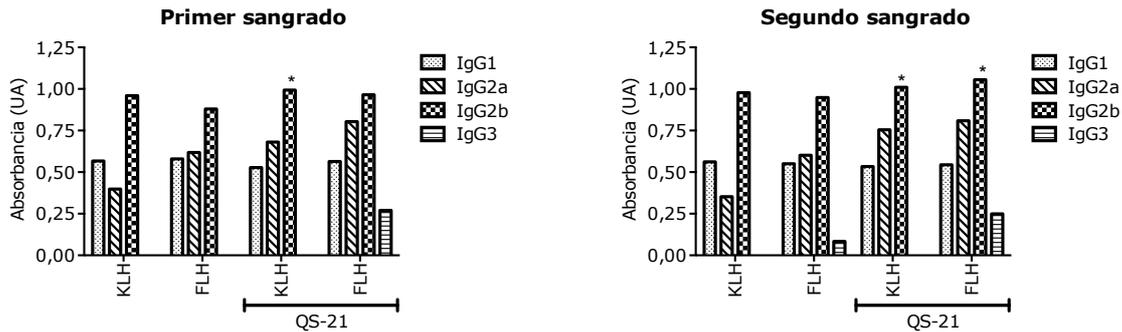
**Figura 11: Bioensayo profiláctico del modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7.**

**A. Esquema del bioensayo profiláctico.** Grupos de tres ratones C57BL/6 hembras fueron inmunizados con uno de los siguientes tratamientos: 100 µg de KLH o FLH, 50 µg de KLH o FLH más 10 µg de QS-21, 10 µg de QS-21 o 100 µL de PBS. **B. Efecto de los tratamientos en el crecimiento del carcinoma de cabeza y cuello.** El tumor fue medido dos veces a la semana a partir del día 13 del bioensayo. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del volumen del tumor para cada tratamiento con respecto al del grupo control y se analizó mediante ANOVA de una vía. n=1, tres ratones por grupo. **C. Efecto de los tratamientos en la aparición del carcinoma de cabeza y cuello.** La aparición de tumor fue determinado por 27 días después del desafío con las células MOC7. n=1, tres ratones por grupo. **D. Supervivencia de los animales.** El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier fue realizado usando la prueba de long-rank. n=1, tres ratones por grupo.

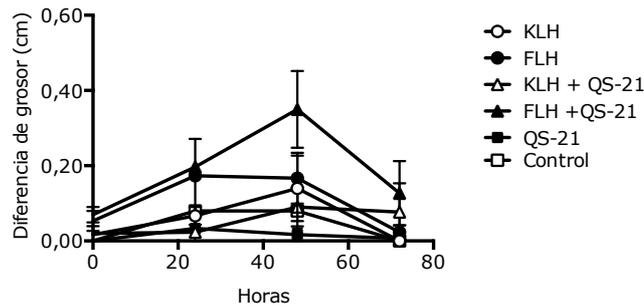
A



B



C



**Figura 12: Respuesta inmune humoral y celular de los animales de experimentación del bioensayo profiláctico del modelo heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7. A. Determinación del título de IgG total anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto.** Para ello, se tomaron muestras de suero en los días 15 y 34. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó el valor del título total de IgG anti-hemocianina del tratamiento con la hemocianina sola contra el de la misma hemocianina y QS-21 a los distintos tiempos, analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=1$ , tres ratones por grupo. **B. Determinación de los isotipos de IgG específico anti-hemocianina mediante un ensayo de ELISA indirecto específico para cada isotipo.** Se llevó a cabo con las mismas muestras de suero tomadas los días 15 y 34 del bioensayo. En el caso del segundo sangrado, las diluciones fueron: KLH, IgG1 (40.960), IgG2a (640), IgG2b (2.560); FLH, IgG1 (40.960), IgG2a (640), IgG2b (2.560), IgG3 (5.120); KLH + QS-21, IgG1 (20.480), IgG2a e IgG2b (10.240); FLH más QS-21, IgG1 (40.980), IgG2a (20.480), IgG2b (10.240), IgG3 (2.560). Se comparó la IgG1 contra la IgG2a, IgG2b e IgG3 de cada uno de los tratamientos. \*  $p < 0,05$ , analizado mediante ANOVA de dos vías.  $n=1$ , pool de tres ratones. **C. Prueba de hipersensibilidad retardada.** Se realizó mediante la aplicación de la hemocianina propia del tratamiento para cada uno de los grupos en el cojinete de la pata izquierda del ratón y la medición de la diferencia de grosor con respecto al de la pata derecha a 24, 48 y 72 horas. Se muestra la media de los valores obtenidos para cada grupo, junto con el respectivo error estándar de la media. Se comparó la diferencia de grosor del grupo control a los diferentes tiempos de medición con respecto al de los demás tratamientos a los mismos tiempos, analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=1$ , tres ratones por grupo.

### **6.3 Efecto citotóxico y reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie de las células tumorales que contribuyen al mecanismo de acción de las distintas formulaciones hemocianina-adyuvante**

#### **6.3.1 Efecto *in vitro* de las hemocianinas solas o en conjunto con adyuvantes sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7**

Para determinar el efecto de las preparaciones sobre la proliferación de las líneas celulares de cáncer oral, se evaluaron distintas concentraciones de hemocianina partiendo de una concentración cercana a la que se obtendría al momento de ser aplicada a los animales de experimentación. Junto con ello, en el caso de los tratamientos constituidos por una hemocianina y un adyuvante, las concentraciones de adyuvante usadas fueron proporcionales a las de la hemocianina, teniendo como referencia la concentración a la cual cada una de estas sustancias fue aplicada en los bioensayos del Objetivo 1.1. La comparación de la viabilidad celular se determinó con respecto al valor obtenido para un cultivo similar sin tratamiento.

En el caso de la línea celular AT-84, no se encontró una disminución significativa de la viabilidad celular a las 24 y 72 horas de cultivo con las distintas hemocianinas, como se observa en la **Figura 13A**.

Para los tratamientos en conjunto con los distintos adyuvantes, se observaron diferentes efectos, pero todos relacionados con el adyuvante presente en la preparación. En el caso de la Alúmina (**Figura 13B**), a 24 horas no hubo una disminución de la viabilidad celular cuando se aplicó sola o en conjunto con cada una de las hemocianinas. En cambio, a las 72 horas sí se presentó un decremento en la viabilidad celular para KLH, CCH y FLH más Alúmina a 125, 62,5, 31,25 y 15,63  $\mu\text{g/mL}$ . La menor viabilidad celular a valores intermedios y no a la mayor concentración se debió al efecto de la Alúmina, pues al incubar solo con este adyuvante se observó un patrón idéntico. En el caso de FLH más Alúmina hubo una inhibición significativa a 250  $\mu\text{g/mL}$ , pero la diferencia no es significativa con respecto al adyuvante solo.

En el caso del QS-21, a las tres dosis más altas, se apreció un decremento significativo de la viabilidad celular a las 24 y 72 horas con cada uno de los tratamientos analizados, alcanzando valores en torno al 10% en todos los casos a concentraciones de 250 y 125  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 13C**), producto de la toxicidad de esta saponina. En los distintos tratamientos con AddaVax no hubo una disminución significativa a 24 horas para las diferentes formulaciones

(**Figura 13D**). A 72 horas, la inhibición observada se relacionó con la toxicidad ocasionada por esta emulsión.

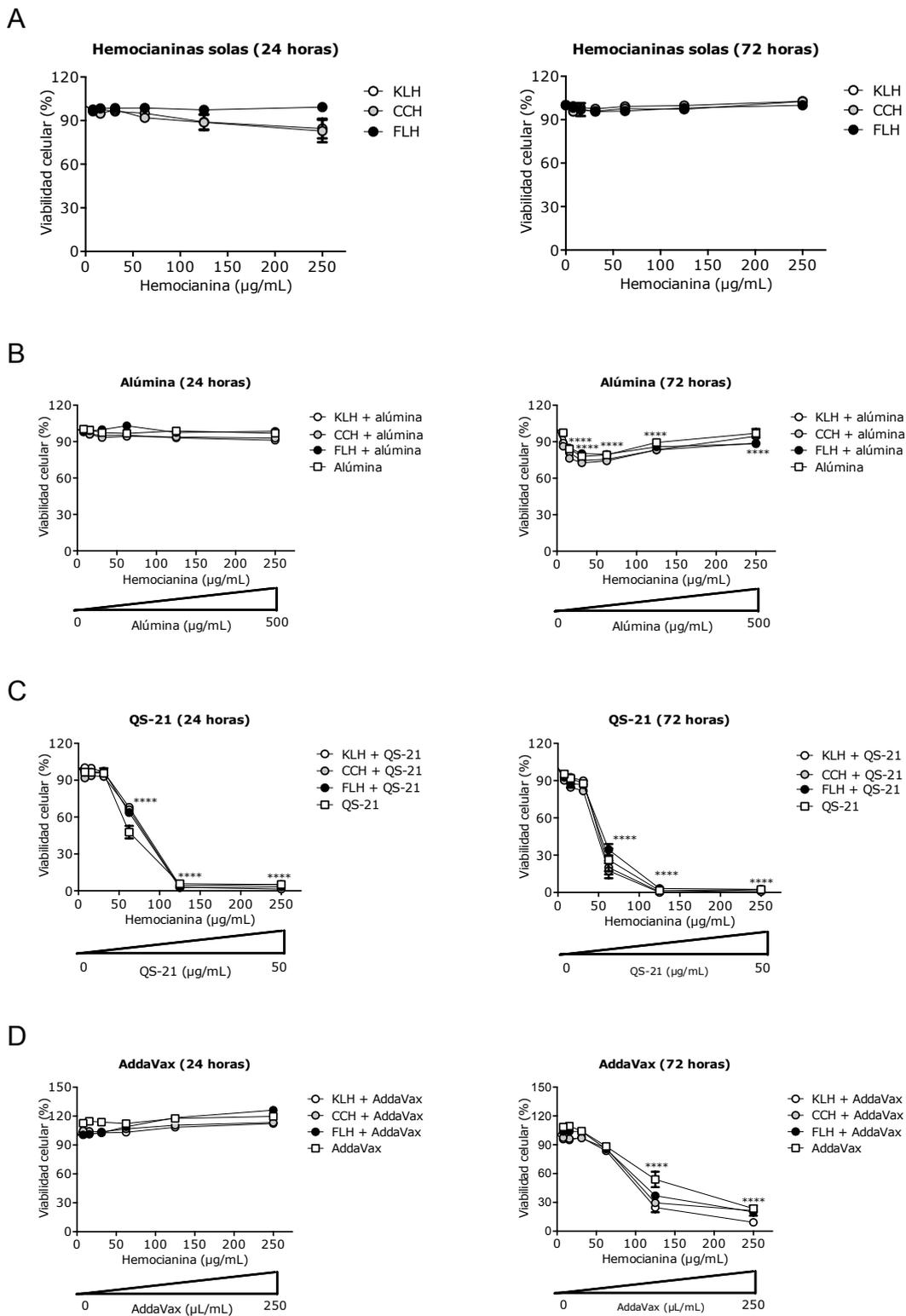
En lo que respecta a la línea MOC7, no se observó un efecto significativo en la disminución de la viabilidad celular con ninguna hemocianina en las concentraciones y tiempos de exposición empleados (**Figura 14A**). Este mismo resultado se obtuvo para las formulaciones constituidas por las hemocianinas y Alúmina, excepto con KLH más este adyuvante, pues a 250 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  los porcentajes promedio de viabilidad celular fueron 60,5 y 69,1% (**Figura 14B**). No obstante, la diferencia no fue significativa cuando se comparó con la toxicidad ocasionada por la Alúmina únicamente. Asimismo, en el caso del QS-21, se apreció una toxicidad dependiente del adyuvante. En la **Figura 14C**, se observó una inhibición significativa en la viabilidad celular a una concentración de hemocianina de 250 y 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 24 horas. A 72 horas, además de las dos concentraciones anteriores, también hubo una disminución significativa a 62,5  $\mu\text{g}$  de hemocianina/mL y a 32,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la KLH. Sin embargo, al igual que sucedió con la Alúmina, al comparar este último valor con respecto al del adyuvante solo, no existió una diferencia significativa. En la **Figura 14D**, se muestra como cada hemocianina en conjunto con el AddaVax presentó un incremento en la viabilidad celular a 24 horas, con un comportamiento similar al del adyuvante solo. A 72 horas, los distintos tratamientos mostraron una

inhibición significativa a 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de hemocianina, pero no hubo una diferencia significativa al compararlos con respecto al AddaVax.

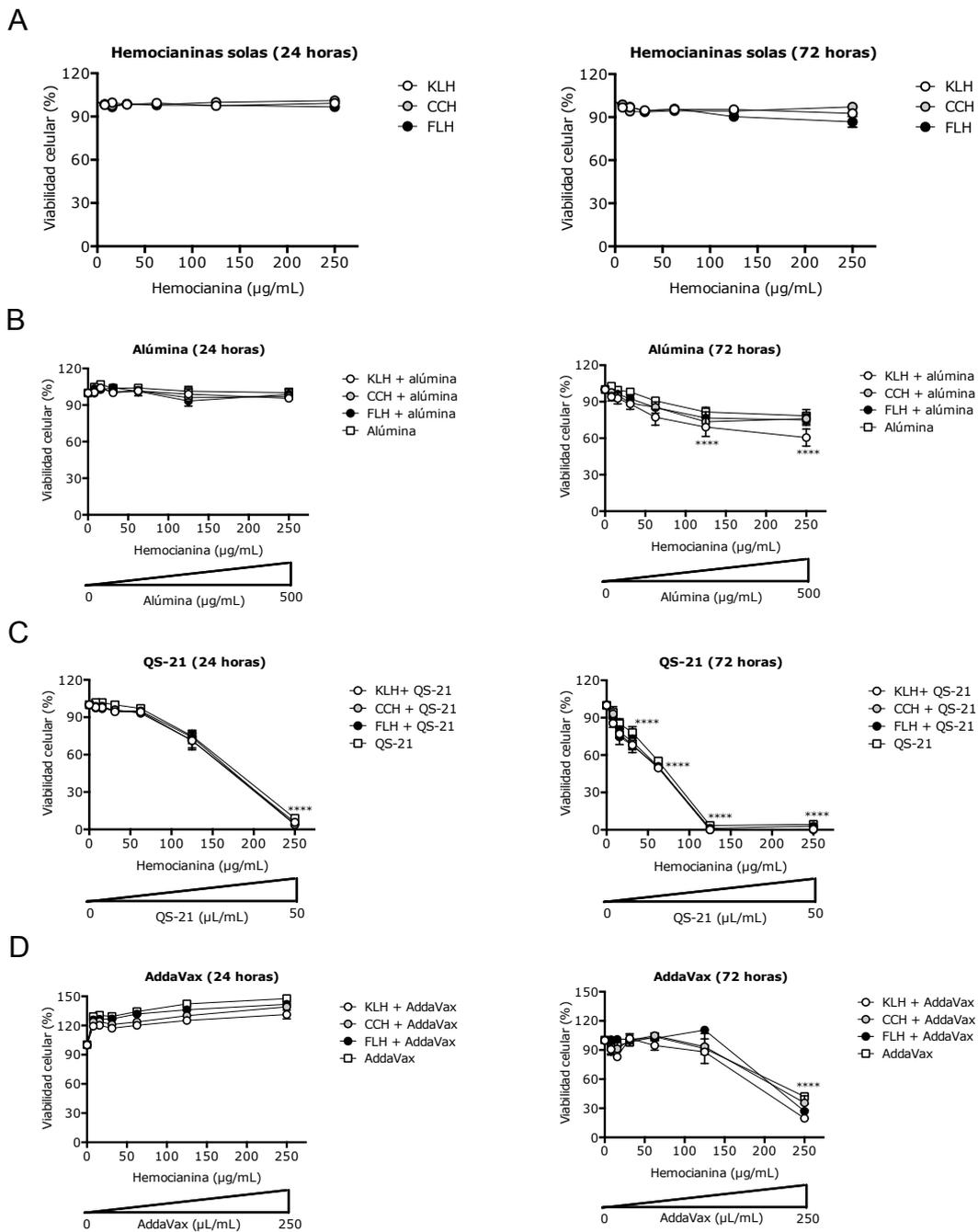
Finalmente, para la línea AT-84 E7 Luc, ninguna de las hemocianinas causó una disminución significativa de la viabilidad a las diferentes concentraciones y tiempos utilizados (**Figura 15A**). Sin embargo, el QS-21 mostró un efecto tóxico tanto solo como en conjunto con cada una de las hemocianinas, ya que las curvas fueron superponibles a ambos tiempos, mostrando que la toxicidad fue ocasionada por este adyuvante (**Figura 15B**).

### **6.3.2 Reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7**

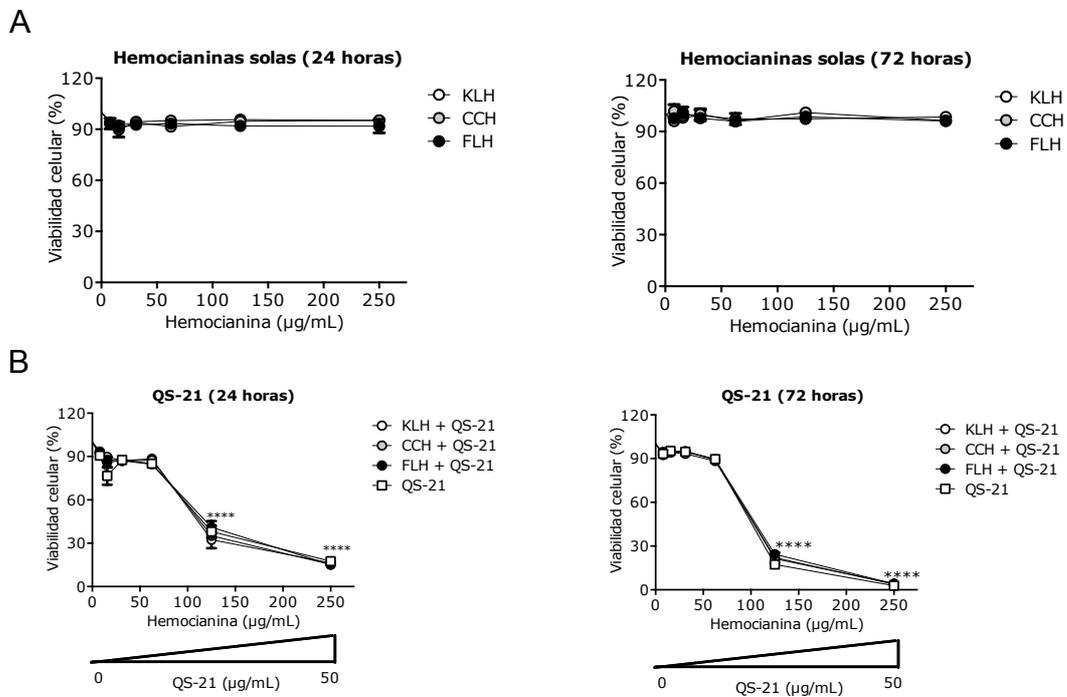
Se realizó un ensayo de ELISA indirecto con los sueros obtenidos de los ratones C57BL/6 sometidos a los diferentes tratamientos (tanto sanos, es decir sin desafío tumoral, como desafiados contra las células tumorales de carcinoma de cabeza y cuello murino MOC7), incluyendo Sham, PBS y/o QS-21. En todos los casos, los resultados fueron negativos, indicando la ausencia de una reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral murina.



**Figura 13: Efecto de las hemocianinas solas o con adyuvantes de vacunas sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral AT-84.** Las células ( $2 \times 10^4$  células/pozo) fueron incubadas con distintas concentraciones de hemocianina (KLH, CCH o FLH) y adyuvante (alúmina, QS-21 o AddaVax) por 24 y 72 horas, y la viabilidad se determinó usando el método del Alamar Blue. Se graficó la media de los valores obtenidos, junto con el respectivo error estándar de la media. **A. Hemocianinas solas. B. Hemocianinas más alúmina. C. Hemocianinas más QS-21. D. Hemocianinas más AddaVax.** Para cada caso, se comparó el valor de viabilidad celular obtenido a las diferentes concentraciones de las formulaciones con respecto al obtenido para la misma condición sin tratamiento. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=2$ , cada ensayo por triplicado.



**Figura 14: Efecto de las hemocianinas solas o con adyuvantes de vacunas sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral MOC7.** Las células ( $2 \times 10^4$  células/pozo) fueron incubadas con distintas concentraciones de hemocianina (KLH, CCH o FLH) y adyuvante (alúmina, QS-21 o AddaVax) por 24 y 72 horas, y la viabilidad se determinó usando el método del Alamar Blue. Se graficó la media de los valores obtenidos, junto con el respectivo error estándar de la media. **A. Hemocianinas solas.** **B. Hemocianinas más alúmina.** **C. Hemocianinas más QS-21.** **D. Hemocianinas más AddaVax.** Para cada caso, se comparó el valor de viabilidad celular obtenido a las diferentes concentraciones de las formulaciones con respecto al obtenido para la misma condición sin tratamiento. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=2$ , cada ensayo por triplicado.



**Figura 15: Efecto de las hemocianinas solas o con QS-21 sobre la viabilidad de la línea celular de cáncer oral AT-84 E7 Luc.** Las células ( $2 \times 10^4$  células/pozo) fueron incubadas con distintas concentraciones de hemocianina (KLH, CCH o FLH) y QS-21 por 24 y 72 horas, y la viabilidad se determinó usando el método del Alamar Blue. Se graficó la media de los valores obtenidos, junto con el respectivo error estándar de la media. **A. Hemocianinas solas.** **B. Hemocianinas más QS-21.** Para cada caso, se comparó el valor de viabilidad celular obtenido a las diferentes concentraciones de las formulaciones con respecto al obtenido para la misma condición sin tratamiento. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , analizado mediante ANOVA de una vía.  $n=2$ , cada ensayo por triplicado.

## **7. DISCUSIÓN**

El uso de hemocianinas de moluscos en biomedicina tiene una larga historia y muchos ejemplos de aplicación, destacándose su efecto inmunomodulador no específico en cáncer superficial de vejiga. No obstante, su uso en otros tipos de cáncer ha sido escasamente documentado, probablemente, porque su efecto inmunomodulador no es suficiente frente a cánceres más agresivos, como es el caso del cáncer de cabeza y cuello o cáncer oral, usado en esta tesis, razón que llevó a evaluar el efecto de tres de las hemocianinas más promisorias como inmunomoduladores, como son KLH, CCH y FLH, con el propósito de potenciar el mecanismo de respuesta inmune tipo Th1 que ellas desencadenan, al ser inoculadas en mamíferos.

### **7.1 Respuesta inmune humoral y celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en un modelo murino**

#### **7.1.1 Respuesta inmune humoral específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6**

Los mecanismos de inmunoestimulación no específicos de las hemocianinas como agentes inmunoterapéuticos en algunos tipos de cáncer,

implican su interacción con los linfocitos T CD4+, por tratarse de antígenos timo-dependientes, para promover la secreción de citoquinas Th1<sup>15</sup>. Además, conllevarían a la estimulación de linfocitos T CD8+ contra algunos antígenos tumorales, ya sea por una respuesta cruzada de los anticuerpos anti-hemocianina con epítomos carbohidratos presentes en las hemocianinas y dichos antígenos<sup>15</sup> o por la estimulación indirecta de respuestas inmunes específicas latentes (efecto *bystander*), rompiendo la tolerancia inmune contra el tumor<sup>22</sup>. Con estos considerandos, es posible orientar la búsqueda de un tratamiento adecuado para ciertos tumores, a partir de las respuestas inmunes humoral y celular contra la hemocianina. Estas respuestas pueden extrapolarse a las que se ejercerían contra un determinado tumor, en este caso, carcinoma de cabeza y cuello.

En lo que respecta a la determinación del título de anticuerpos séricos anti-hemocianina, se centró en los de tipo IgG, porque cumplen funciones efectoras pivotaes en la inmunoterapia contra el cáncer, entre ellas, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y la activación del complemento por la vía clásica<sup>73</sup>, hecho que se respalda en la batería de anticuerpos quiméricos y humanizados de isotipo IgG contra diversos antígenos tumorales que se utilizan hoy en el tratamiento de diversos cánceres<sup>74, 75</sup>.

De nuestros resultados, lo primero que llama la atención es que se observó un bajo título de anticuerpos séricos en la respuesta secundaria de los animales de experimentación, contra cada una de las hemocianinas solas (**Figura 3B**), hecho que se debería a que, a diferencia de las otras investigaciones realizadas, particularmente las efectuadas en nuestro laboratorio<sup>14, 21, 22, 68</sup>, ésta es la primera vez en la cual se emplean dosis tan menores de cada proteína (50 µg), para determinar el efecto inmunoestimulante no específico y antitumoral de la hemocianina, sin incluir un antígeno tumoral en la formulación<sup>68</sup>. La idea desde un punto de vista industrial respecto a la elaboración de una formulación farmacéutica que incluye una biomolécula, fue reducir la cantidad de un determinado componente, en este caso la proteína y así, bajar los costos de producción<sup>76</sup>, sin afectar el efecto terapéutico sobre el paciente. Entonces, para obtener el efecto óptimo, se usaron distintos adyuvantes, que promueven respuestas tipo Th1 (QS-21), balanceadas Th1/Th2 (AddaVax) y francamente Th2 (Alúmina), capaces de generar una respuesta inmune más potente<sup>77</sup>.

Ahora bien, el uso de la Alúmina representó un aspecto importante en el desarrollo de esta investigación. A pesar de no ser un adyuvante Th1 (los cuales polarizan hacia una respuesta inmune de este tipo, considerada favorable para el control inmunológico del cáncer<sup>78</sup>), a la fecha es el adyuvante más utilizado para el desarrollo de vacunas humanas y veterinarias<sup>79, 80</sup>. Los

resultados obtenidos mostraron que no se produce una diferencia significativa al comparar el título anti-hemocianina de la hemocianina sola con respecto a la misma hemocianina en conjunto con la Alúmina. Este resultado es un reflejo de una preocupación y un interés actual en el desarrollo de vacunas, como lo es la investigación de nuevos adyuvantes, para incrementar la respuesta inmune con respecto a la que se genera mediante el uso de las sales de aluminio<sup>81</sup>. Por tal razón, se decidió emplear otros dos más recientes, el AddaVax y el QS-21.

Usando el AddaVax, un adyuvante para uso preclínico, los resultados fueron más promisorios, ya que se obtuvo una diferencia significativa en el título de anticuerpos séricos tanto para KLH como FLH, no así con CCH. El aspecto negativo para esta sustancia redundaba en el hecho de ser una emulsión y de usarse en una dosis tan alta (1:1 vol/vol) con respecto al resto de los componentes de la formulación, lo cual la hace un sistema metaestable, característica intrínseca de las emulsiones<sup>82, 83</sup>. Por esta razón, es necesario realizar una buena agitación luego de combinarla con la hemocianina y previo a la aplicación del tratamiento a los animales de experimentación.

En relación con el adyuvante QS-21, fue el que exhibió los mejores resultados para las tres hemocianinas, inclusive con el uso de la mitad de la dosis recomendada en ratones (la Alúmina y el AddaVax se emplearon a la dosis máxima recomendada). Junto con ello, el desarrollo de la formulación es

mucho más sencillo, pues se logró obtener un sistema homogéneo con una pequeña agitación posterior a la combinación de sus componentes, lo cual se reflejó en nuestros resultados, en la obtención de títulos con baja desviación del error estándar de la media. Además, de las tres formulaciones evaluadas, en aquella constituida por FLH y QS-21 se obtuvo el título más alto anti-hemocianina con respecto a las otras dos proteínas. Por ende, bajo las mismas condiciones de dosis, la FLH generó una mejor inmunogenicidad.

Posteriormente, en las mismas muestras de suero se determinaron los títulos para cada una de las subclases de IgG anti-hemocianina, con el propósito de conocer el tipo de respuesta inmune obtenido para los distintos tratamientos evaluados (IgG1 se considera un indicador de una respuesta inmune de tipo Th2, mientras que IgG2a, IgG2b e IgG3 una de tipo Th1<sup>84</sup>); siendo lo ideal obtener una respuesta inmune que promueva respuestas celulares, es decir de tipo Th1. Para las hemocianinas solas, los resultados fueron indicativos de una respuesta balanceada, de tipo Th1/Th2. Sin embargo, la respuesta observada (**Figura 3C**) se contradice con lo indicado en la literatura, donde se señala que las hemocianinas generan una respuesta Th1 al ser aplicada en mamíferos<sup>23, 85</sup>, efecto que podría explicarse por el uso de una menor dosis de dichas proteínas, lo cual ocasionó que la respuesta inmune generada no fuera suficiente para polarizar el sistema inmune hacia una de tipo Th1.

En lo que respecta a las formulaciones hemocianina-Alúmina, el análisis también fue indicativo de respuestas balanceadas Th1/Th2, probablemente en virtud de que las hemocianinas tienden hacia una respuesta inmune Th1, mientras que la Alúmina lo hace hacia una de tipo Th2<sup>39, 86, 87</sup>, cada componente de la formulación conduce hacia su respectiva respuesta natural y al combinarse, no es posible que la misma se polarice hacia una sola. No obstante, pensamos que la utilización de dosis mayores de hemocianina podrían polarizar de la forma esperada la respuesta inmune.

Para las formulaciones con AddaVax en cambio, los resultados fueron indicativos de respuestas de tipo Th1, pues los títulos de los isotipos IgG2a e IgG2b exhibieron una diferencia significativa con respecto a la IgG1. El isotipo IgG2a se considera esencial para emplear en las formulaciones en que la hemocianina se usa como carrier de antígenos asociados a tumores de naturaleza gangliósida<sup>24</sup> y en consecuencia, podría considerarse en el diseño de tratamientos experimentales para la inmunoterapia contra el cáncer oral. Como se menciona en la literatura, el AddaVax tiende a generar respuestas inmunes más equilibrada en comparación con la Alúmina<sup>46, 88</sup>; fenómeno que se apreció en los resultados obtenidos, dado que el efecto conjunto de cada hemocianina y la emulsión desembocó en la obtención de una respuesta de tipo Th1, deseable para el tipo de formulación requerida.

Finalmente, para los tratamientos hemocianina más QS-21, también se consiguieron resultados indicativos de una respuesta inmune de tipo Th1, gracias a títulos de IgG2a e IgG2b mucho mayores con respecto a los de IgG1. Estos valores también están acordes con la literatura, pues presentan a esta saponina como un adyuvante de tipo Th1 bastante fuerte <sup>37, 40</sup>.

Adicionalmente, se determinó la concentración INF- $\gamma$  en el suero de los animales inmunizados con las distintas formulaciones, pues es la citoquina característica de una respuesta inmune de tipo Th1<sup>89</sup>. También se midió el nivel basal de IL-4 en todos los tratamientos, excepto aquellos con Alúmina, ya que es una citoquina característica de una respuesta inmune tipo Th2<sup>53</sup>. Sin embargo, todos los resultados fueron negativos. Una interpretación posible es que los tiempos en que se tomó la muestra de suero estaban alejados del momento de la inoculación de las preparaciones y, en consecuencia, el alza esperada en cada circunstancia ya había pasado. De obtenerse este resultado, habría sido una confirmación de lo observado con los isotipos IgG anti-hemocianina. Una manera posible para tener resultados positivos con INF- $\gamma$  podría ser cultivar esplenocitos de ratón C57BL/6 previamente sensibilizados con hemocianina, y ponerlos en contacto con las distintas formulaciones hemocianina-adyuvante durante un tiempo apropiado, y posteriormente, determinar la concentración de citoquinas en el sobrenadante del cultivo<sup>90, 91</sup>.

Los buenos resultados obtenidos con QS-21 se respaldan también con antecedentes de la literatura, en estudios empleando QS-21 y KLH conjugada con antígenos asociados a tumores. Por ejemplo, se comparó el efecto de 19 adyuvantes inmunológicos, combinados con MUC1-KLH y GD3-KLH<sup>24</sup>, encontrándose que los títulos de IgG anti-MUC1 y anti-GD3 fueron considerables cuando se emplearon asociados a KLH y en conjunto con QS-21. Por otra parte, una formulación constituida por un péptido humano de CD20 (auto-antígeno propio de células B, que es una diana farmacológica contra el linfoma de estas células, al no encontrarse presente en sus células progenitoras) en conjunto con KLH y QS-21 produjo títulos mayores de anticuerpos séricos anti-CD20 con respecto a una formulación del péptido-KLH más alúmina<sup>92</sup>. En otro estudio, se mostró la utilidad de la combinación KLH y QS-21 con respecto a otros adyuvantes en el desarrollo de vacunas contra el linfoma de células T<sup>93</sup>, encontrándose que el mayor título de IgG2a e IgG2b se presentó en la formulación donde se incluía el QS-21 junto con el antígeno de la vacuna asociado con KLH. No obstante, en ninguno de los casos se estudió una formulación constituida por KLH y QS-21 únicamente, para conocer el efecto inmunomodulador no específico en algún modelo de tumor de dicho tratamiento.

En cuanto al AddaVax, en nuestro laboratorio se evaluó la respuesta inmune protectora frente al desafío de ratones C57BL/6 con células de

melanoma murino de la línea B16F10, de formulaciones de este adyuvante junto con KLH, CCH o FLH acopladas a P10, un péptido mimético del gangliosido GD2<sup>68</sup>. No se encontraron diferencias entre las hemocianinas al actuar como *carrier* de P10, pero sí hubo diferencias importantes en la respuesta inmune anti-tumoral inducida por efecto del AddaVax.

En base a los resultados descritos para este objetivo entonces, se concluyó que la formulación que brindó la mejor inmunogenicidad, reflejada en un mayor título de IgG total anti-hemocianina, con predominio de anticuerpos IgG2a e IgG2b fue FLH más QS-21.

#### **7.1.2 Respuesta inmune celular específica de las distintas formulaciones de hemocianina-adyuvante en ratones de la cepa C57BL/6**

Otro aspecto necesario de evaluar fue la respuesta inmune celular de los tratamientos de interés. Con este propósito se utilizó la reacción de hipersensibilidad retardada, porque mide el reclutamiento de linfocitos CD4+ y CD8+ hacia el cojinete del ratón<sup>94, 95</sup>. Así, la respuesta DTH en los grupos donde se utilizaron únicamente hemocianinas, no se encontró diferencia alguna con respecto al grupo control (**Figura 4**); resultado que se relacionó con los bajos títulos obtenidos y una respuesta inmune balanceada Th1/Th2, debido probablemente a que la dosis de hemocianina empleada no fue suficiente para generar una buena respuesta inmune en el tiempo, tanto humoral como celular.

Además, otro factor a considerar en la obtención de este resultado negativo fue el realizar la prueba más de 30 días posterior a la aplicación de la última dosis de los tratamientos, lo cual pudo ocasionar una disminución en la población de linfocitos, pues aunque en esta prueba no se apreció la migración de linfocitos CD4+, estos si debieron estar presentes, ya que de lo contrario no se habrían encontrado IgG2a e IgG2b, generados producto de la secreción de las citoquinas características de los linfocitos Th1, tales como INF- $\gamma$ , IL-2, IL-12 y TNF- $\beta$ <sup>96, 97</sup>.

En el caso de la alúmina y el AddaVax, tampoco se encontraron diferencias de grosor significativas entre los cojinetes, inmunizando con las formulaciones donde se encontraba presente KLH o CCH. En contraposición, a las 48 horas sí se presentó una diferencia significativa para dichos adyuvantes en conjunto con FLH. Así, esta hemocianina fue capaz de ejercer una mejor respuesta celular con respecto a las otras dos, reafirmando el hecho de que es necesario la evaluación de las distintas hemocianinas. Efectivamente, aunque las tres provienen de moluscos, sus diferencias bioquímicas y estructurales señaladas en la introducción ocasionan diferencias en los efectos obtenidos sobre la respuesta inmune.

Para las formulaciones constituidas por KLH, CCH o FLH más QS-21, se encontraron las DTH de mayor valor para cada una de las hemocianinas,

siendo KLH la que mostró un menor efecto con respecto a las otras dos. Entre CCH y FLH no se apreciaron diferencias significativas. Es así que aunque transcurrieron 34 días posterior a la última dosis, los valores de DTH fueron el doble para estas dos formulaciones con respecto al resto. Lo anterior indica que el QS-21 no solamente genera una respuesta humoral superior con respecto a los demás, sino que también es capaz de mantener una población de linfocitos T citotóxicos y cooperadores de memoria superior, como se observó en la investigación realizada por Sasaki *et al*<sup>98</sup>, aunque por rutas de administración diferentes. Otra característica es su capacidad para generar una migración rápida hacia el sitio de aplicación del antígeno, inclusive 24 horas posterior a su administración y mantener dicha migración por 72 horas, como quedó demostrado en los resultados de DTH.

Nuestros datos son similares a los obtenidos por Kim *et al*<sup>42</sup>, en que el QS-21 solo o en combinación con otros adyuvantes (MoGM-CSF, PG-026, CRL-1005, CpG, MPL-SE y TiterMax) indujo una respuesta de hipersensibilidad retardada para KLH en ratones inmunizados con un antígeno tumoral acoplado a KLH más QS-21. Para las otras hemocianinas y los restantes adyuvantes, no existe información, porque han sido evaluados por primera vez en esta tesis.

La obtención de una respuesta celular superior junto con los resultados de la caracterización de la respuesta humoral, nos llevó a seleccionar a FLH más

QS-21 como la formulación con mejores resultados para su evaluación posterior en modelos de cáncer murino, tanto de tipo profiláctico como terapéutico.

## **7.2 Efecto antitumoral *in vivo* en dos modelos murinos de cáncer oral de FLH en conjunto con QS-21**

Para estudiar el efecto antitumoral de la formulación FLH más QS-21, se empleó un modelo ortotópico y otro heterotópico de cáncer oral, cada uno con una línea celular y una cepa de ratón distintas. En todos los bioensayos se usó la KLH sola o en conjunto con el QS-21, por tratarse de la hemocianina más estudiada en la inmunoterapia del cáncer<sup>99</sup> y por considerarse el patrón de referencia al evaluar nuevos tratamientos de este tipo.

En el caso del modelo ortotópico, se empleó la línea de carcinoma de cabeza y cuello AT-84 E7 Luc, compatible con la cepa de ratón C3H/He. La misma se deriva de la línea de cáncer oral AT-84, con la transfección e incorporación de los genes de la proteína E7 y la enzima luciferasa<sup>56</sup>. La proteína E7 se encuentra en los serotipos 16 y 18 del virus del papiloma humano y se ha relacionado directamente con el mantenimiento del fenotipo maligno del virus<sup>100, 101</sup>. Este virus muestra una prevalencia en el cáncer oral entre un 25 y un 35% de los casos estudiados en distintas investigaciones<sup>101</sup>.

En lo referente a la luciferasa, su presencia es de utilidad para la obtención de imágenes del tumor. El procedimiento usado en esta tesis es una modalidad de imagenología de alto rendimiento y sumamente sensitiva, convirtiéndola en una herramienta excelente para el monitoreo del tamaño de crecimiento tumoral y el progreso de las terapias antitumorales en modelos animales<sup>102</sup>.

Se realizaron dos experimentos con el modelo ortotópico de cáncer oral, uno terapéutico y otro profiláctico. Entre las razones estuvo determinar la necesidad de una inmunización previa con el respectivo tratamiento para obtener el efecto antitumoral, pues trabajos previos con FLH mostraron que dicha inmunización no era requerida para generar un efecto contra el tumor en un modelo de melanoma murino<sup>14</sup>, no así en el modelo de cáncer de vejiga con CCH<sup>22</sup>. También, se deseaba saber si el tratamiento del tumor debía hacerse inmediatamente después del desafío con las células tumorales o era posible obtener una prognosis buena días después de dicho desafío.

Esta fue la primera ocasión en donde la aplicación de los tratamientos se llevó a cabo por vía sistémica y no intralesional como se había hecho hasta el momento en bioensayos previos<sup>14, 21, 22, 68</sup>. Así, se abrió la posibilidad de estudiar si estas formulaciones eran capaces de brindar resultados positivos al ser aplicadas por vía subcutánea y por aplicación directa en el sitio donde se halla el tumor. Los resultados mostraron que los títulos de IgG total anti-

hemocianina obtenidos a partir de la segunda muestra de los sueros de los animales de experimentación para los diferentes tratamientos fueron menores a 2.000 en todos los casos, excepto para la formulación FLH más QS-21 (**Figura 5B**). A pesar de ello, no hubo una diferencia significativa al compararlo con la hemocianina sola. Lo mismo sucedió con KLH. Aún así, se apreció el efecto del QS-21, pues los títulos obtenidos fueron similares para una dosis de 100  $\mu$ g de hemocianina en comparación con una de 50  $\mu$ g, pero en presencia de la saponina. Lo anterior reafirma lo obtenido en el Objetivo 3.1.1, específicamente, en cómo la presencia de un adyuvante mejora la respuesta inmune de estas proteínas. En cuanto al tipo de respuesta inmune, en todos los casos el análisis fue indicativo de una respuesta de tipo Th1 para los tratamientos analizados (**Figura 5C**). Este resultado refleja la obtención de un principio clave de la inmunoterapia contra el cáncer, como es contrarrestar la inmunosupresión ocasionada por el tumor<sup>103</sup> y favorecer un ambiente Th1 para poder combatirlo<sup>104</sup>. Además, acompañado de una respuesta proinflamatoria, se obtuvo una DTH positiva para los tratamientos, con excepción de KLH (**Figura 5D**), donde no hubo una diferencia en la migración de linfocitos CD4+ y CD8+ con relación al grupo control. Además, la mayor respuesta en el ensayo de DTH para el tratamiento FLH más QS-21 también se relacionó con lo apreciado en los bioensayos del primer objetivo.

No obstante, a pesar de los buenos resultados desde el punto de vista de la respuesta humoral y celular, al evaluar el crecimiento tumoral a lo largo de los cinco días donde se tomaron las imágenes mediante el sistema IVIS® Lumina fue similar para los diversos tratamientos (**Figura 6**). Esta observación cualitativa se reafirma con la determinación de las áreas promedio de los tumores de los distintos grupos (**Figura 7B**), donde para ninguno de los tratamientos existió una diferencia significativa en el área promedio del carcinoma a los tiempos dados con respecto al grupo control. En este caso, es probable que debido al número elevado de células empleadas y la poca ventana de tiempo para la acción de la inmunoterapia, no fue posible obtener un resultado positivo para el tratamiento hemocianina-adyuvante.

En cuanto a la sobrevivencia, FLH más la saponina no mostró buenos resultados, dado que ninguno de los animales del grupo logró llegar al final del tratamiento (**Figura 7A**). Para el grupo QS-21, su sobrevivencia fue buena, pero esto no se vio reflejado en el crecimiento del tumor. Es posible que el mecanismo de inmunoestimulación del adyuvante rompa la tolerancia frente al tumor<sup>105</sup> y logre que la respuesta inmune latente en el animal lo combata. La desventaja es que dado que esta respuesta requiere de varios días, la ventana de tiempo ofrecida por el modelo no fue óptima, porque las células generan un crecimiento muy acelerado del carcinoma. Por esta razón, es posible concluir que para este bioensayo, la respuesta inmune fue indicativa de una de tipo Th1

en todos los tratamientos en todos los tratamientos. Además, se observó una DTH anti-hemocianina mayor con FLH más QS-21, pero su sobrevida no resultó ser mejor.

Ahora bien, para el bioensayo profiláctico con este mismo modelo se observó un daño a la piel de los animales del grupo FLH más QS-21. Esto es una evidencia de la toxicidad generada por el QS-21<sup>106</sup>, al acumularse en el organismo del animal. En seres humanos, los efectos adversos de esta saponina han generado que las dosis se encuentren limitadas a 50 µg, con excepción de pacientes con cáncer<sup>107</sup>. Por eso, es necesario el empleo de dosis menores del adyuvante, para disminuir sus efectos sobre el sujeto de experimentación y generar una terapia menos dañina.

En cuanto a la caracterización de la respuesta humoral, los títulos de IgG anti-hemocianina fueron mayores a 15.000 para todos los casos, mostrando así la importancia de la inmunización con hemocianina previa al desafío con las células tumorales (**Figura 8B**). La excepción fue el tratamiento con KLH, donde se obtuvo un título muy bajo. Esto explica el porqué la única diferencia significativa observada fue al comparar esta hemocianina con respecto a la hemocianina sola más el adyuvante. También, es de destacar la inmunogenicidad de la FLH al aplicar la inmunización previa al desafío con las células tumorales y las dosis posteriores, pues el título obtenido fue claramente

superior a la KLH. Además, fue similar al que se obtuvo al combinarla con el QS-21 aunque, al igual que como se mencionó para el bioensayo terapéutico, para la formulación FLH más QS-21 la dosis de hemocianina fue la mitad, reafirmando nuevamente el efecto del adyuvante en la respuesta inmune anti-hemocianina.

El tipo de respuesta inmune asociada a los distintos tratamientos mostró ser indicativa de una de tipo Th1 en la segunda muestra de sueros de los animales de experimentación, al igual que en el bioensayo terapéutico (**Figura 8C**). Pero, en este caso, la polarización fue mucho mayor. Esto indica la necesidad de una inmunización inicial para obtener resultados más prometedores en la inmunoterapia contra el carcinoma de cabeza y cuello. La mayor polarización de la respuesta inmune se relacionó con una DTH positiva superior para los tratamientos de ambas hemocianinas con el QS-21 (**Figura 8D**), respuesta que fue sostenida en el tiempo, pues aún a 72 horas se seguía presentando una diferencia significativa con respecto al grupo control. Esto no sucedió con la FLH, donde la diferencia de grosor resultó ser significativa a 24 y 48 horas, pero no a 72 horas, por lo que la migración de linfocitos T no fue tan elevada como en las formulaciones donde el QS-21 se encontraba presente. Y aun menos fue lo encontrado para KLH, donde no hubo una diferencia significativa con respecto al control a ninguno de los tiempos.

Con respecto al tamaño del tumor, evidenciado en las imágenes de la **Figura 9**, se puede decir que se apreció una diferencia en el crecimiento del tumor para la formulación FLH más QS-21, con respecto al grupo control hasta el día 16, momento en que comenzó la muerte de la mayoría de los animales de este último grupo. Esto se confirmó cuantitativamente (**Figura 10B**), donde se apreció la disminución significativa en su crecimiento hasta ese día. Para mejorar la efectividad del tratamiento, podría aplicarse una dosis adicional, para beneficiar el resultado final del bioensayo. Como se observa en el protocolo profiláctico (**Figura 8A**), hasta el día 14 (aplicación de la última dosis), el área promedio del tumor era pequeña y después de ese día, se dio un incremento de la misma.

Sumado al decremento en el desarrollo tumoral, el grupo FLH más QS-21 también presentó un porcentaje de sobrevivencia hasta el día 25 del 100%, lo cual fue significativo (**Figura 10A**). No obstante, para el grupo QS-21 también se presentó el mismo porcentaje de sobrevivencia. En contraposición a la formulación junto con hemocianina, este grupo no promovió la disminución en el crecimiento tumoral, lo cual es esencial para una prognosis óptima de la inmunoterapia<sup>108</sup>.

En resumen, para este bioensayo los títulos de IgG total anti-hemocianina fueron superiores para los distintos tratamientos en comparación

con los títulos obtenidos en el bioensayo terapéutico. También, el análisis fue indicativo de una mayor polarización hacia un perfil de tipo Th1 para todos los tratamientos analizados, en comparación con los mismos tratamientos en el bioensayo terapéutico y además, se observó una DTH anti-hemocianina mayor para los tratamientos KLH y FLH más QS-21. En cuanto al crecimiento del tumor, los animales tratados con FLH más QS-21 presentaron un menor tamaño en comparación con el grupo control. Además, la supervivencia fue mayor con respecto a dicho grupo e igual en relación con el QS-21.

El modelo ortotópico empleado en esta tesis presenta una gran desventaja en cuanto a la alimentación e hidratación de los animales. Aunque la técnica para la aplicación de las células tumorales sea correcta, esto genera molestia a los animales, y muchos abandonan la ingesta de agua y comida. Por eso, mueren a pesar de presentar tamaños de tumores pequeños o la ausencia de los mismos, motivo que nos llevó a utilizar un modelo heterotópico que obviara este problema. En dicho modelo, se empleó la línea MOC7, compatible con la cepa de ratón C57BL/6<sup>67</sup>, obtenida a partir de un protocolo de inducción de tumores con 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA)<sup>109</sup>. En este bioensayo, los tratamientos se aplicaron por vía subcutánea, al igual que en el modelo ortotópico. Aquí, no se apreciaron heridas en la piel de los animales de los grupos, dado que las dosis se aplicaban en diferentes zonas de sus flancos.

El tamaño del tumor se midió hasta el día de la muerte de los primeros ratones, específicamente del grupo control (**Figura 11B**) y se encontró el desarrollo de metástasis pulmonares, al realizar la autopsia. En los otros tratamientos no hubo el desarrollo de la misma, cumpliéndose otro objetivo de la inmunoterapia del cáncer, como es el impedir el desarrollo de metástasis<sup>110</sup>,<sup>111</sup>. En cuanto al tamaño, no se apreció una diferencia significativa entre el grupo control con respecto a los tratamientos utilizados. Una vez que los tratamientos se dejaron de administrar, el grupo FLH más QS-21 mantuvo un desarrollo tumoral lento, mientras que la del grupo con adyuvante solamente aumentó de manera rápida. Por ello, se determinó que el efecto de la saponina no logró sostenerse en el tiempo, como si se observa en conjunto con la hemocianina proveniente de *F. latimarginata*. Esto demuestra como la inmunogenicidad de la proteína es esencial para asegurar una efectividad en la vacuna inmunoterapéutica contra el cáncer de cabeza y cuello.

El efecto de disminución del desarrollo del tumor también se vio en el tiempo en que los animales de los grupos lo desarrollaron, dado que este decremento ocasionó que el grupo FLH en conjunto con la saponina exhibiera el mayor tiempo para que todos los sujetos del grupo experimental desarrollaran el tumor (**Figura 11C**). Con el QS-21 no sucedió lo mismo, pues el tiempo de desarrollo en los animales fue menor en comparación con los de las formulaciones FLH, FLH más QS-21 e igual que con la del grupo control.

Cabe la posibilidad de que la aplicación de una dosis adicional en el día 23 disminuyera más el crecimiento tumoral para la formulación FLH más QS-21 e inclusive, la obtención de un porcentaje de ratones libres de tumor.

En lo que respecta al porcentaje de sobrevivencia en el tiempo, no hubo una diferencia significativa con alguno de los tratamientos y el grupo control (**Figura 11D**). El uso de únicamente tres animales ocasionó que la muerte de un animal afectara este valor y por ende, el obtener un dato estadístico significativo del verdadero efecto de los tratamientos. Lo que sí es de destacar es la FLH como elemento común en la sobrevivencia de los animales. Esto confirma lo observado para el modelo ortotópico, donde dicha hemocianina mostró ser mejor con respecto a la KLH.

En cuanto a la respuesta humoral de los tratamientos, no hubo diferencia significativa entre la hemocianina sola con respecto a la misma junto con el adyuvante (**Figura 12A**). No obstante, en todos los casos hubo títulos superiores a 2.750 diluciones, lo cual consideramos son buenas respuestas inmunes, teniendo en cuenta la menor dosis de hemocianina aplicada. El efecto del adyuvante se mantuvo de manera idéntica a lo observado en los bioensayos del modelo ortotópico. Por otra parte, el tipo de respuesta inmune secundaria resultó ser buena para las hemocianinas solas (**Figura 12B**), pues a pesar de ser indicativa de una respuesta balanceada Th1/Th2, logró superar

la inmunosupresión que genera un tumor tan agresivo, como el formado por las células MOC7. Para los tratamientos con QS-21, sí fueron indicativas de una respuesta polarizada de tipo Th1 óptima para combatir el tumor, al generar un ambiente proinflamatorio<sup>112</sup>.

Aquí, se intentó confirmar nuevamente el resultado mediante la medición de las citoquinas INF- $\gamma$  e IL-4. Sin embargo, los resultados fueron negativos, probablemente por la misma razón esgrimida anteriormente, esto es que los tiempos en que se tomaron las muestras de suero estaban alejados del momento de la inoculación de las preparaciones.

Finalmente, para la prueba de DTH no se presentó una diferencia significativa para las distintas formulaciones con respecto al grupo control (**Figura 12C**). Una explicación posible es que en esta oportunidad se usaron células tumorales en vez de las hemocianinas, para explorar una posible reacción cruzada de la respuesta inmune contra hemocianina y antígenos de superficie de las células MOC7, producto de los linfocitos T cooperadores y citotóxicos específicos por los antígenos presentes en las células tumorales. Por otra parte, el número de células utilizadas ( $1 \times 10^4$ ) puede haber no sido adecuado. Sin embargo, fue el que brindó los menores efectos sobre el pie de los ratones con respecto a otros valores estudiados ( $5 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$ ) en ratones C57BL/6 sanos.

Para mejorar este ensayo, se podría utilizar un extracto de las células tumorales<sup>113</sup>, pues su uso facilitaría la presentación de antígenos tumorales intracelulares, además de los hallados en la superficie de las células MOC7. Esto incrementaría el reclutamiento de células CD4+ y CD8+ en caso de haberse generado una respuesta anti-tumoral, como consecuencia de la inmunoterapia.

Por todo lo anterior, se concluye entonces que en el bioensayo profiláctico heterotópico de cáncer oral se encontraron títulos anti-hemocianina elevados para los distintos tratamientos, pero únicamente en el caso de las formulaciones con QS-21 se observó una respuesta indicativa de una tipo Th1. Paralelo a ello, se observó una DTH positiva contra las células MOC7 en los ratones del grupo FLH más QS-21.

### **7.3 Efecto citotóxico y reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie de las células tumorales que contribuyen al mecanismo de acción de las distintas formulaciones**

#### **7.3.1 Efecto *in vitro* de las hemocianinas solas o en conjunto con adyuvantes sobre la viabilidad celular de las líneas tumorales de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7**

Para la mayoría de los agentes anticancerígenos, el paso inicial de su evaluación como agente terapéutico es determinar su efecto sobre cultivos celulares *in vitro*. En comparación con los modelos tumorales de animales, los métodos *in vitro* son menos costosos y consumen menos tiempo. Además, permiten probar y cuantificar el potencial de posibles fármacos para afectar la diana molecular, como por ejemplo, la disminución de una quinasa específica, facilitando la función de candidatos promisorios<sup>114</sup>. En el caso de los ensayos de viabilidad celular, su uso analiza la eficiencia y el mecanismo de acción de los tratamientos, así como el escenario clínico para identificar la quimiorresistencia de un paciente contra un tumor dado<sup>115</sup>. Para esta investigación, el estudio del efecto *in vitro* de los distintos tratamientos de hemocianina-adyuvante conlleva al conocimiento de algunos factores sobre el mecanismo de acción inmunoterapéutico de los componentes que los constituyen, tanto para una administración intralesional como sistémica.

El Instituto Nacional del Cáncer 60 (NCI60) es un programa desarrollado a finales de los 80 y consiste de un panel de 60 líneas de varios tipos de cáncer humano<sup>116</sup> (leucemia, melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, colon, sistema nervioso central, ovárico, renal, prostático y mamario)<sup>117</sup>, para revisar el efecto de drogas anticancerígenas y predecir su mecanismo de acción<sup>116</sup>. Sin embargo, la aproximación actual no es suficiente, porque las líneas celulares disponibles no dan cuenta completamente de la diversidad genética<sup>118</sup> y no se puede comprender nuevos mecanismos de acción interesantes de sustancias que no son considerados agentes citotóxicos o citostáticos y por lo tanto, son descartados en las fases iniciales de investigación<sup>119</sup>. La revisión del efecto *in vitro* de las líneas tumorales murinas de cáncer de cabeza y cuello dará información entonces, para la posterior evaluación de líneas humanas de este tipo de carcinoma.

En el ensayo de viabilidad celular, los tratamientos con las hemocianinas solas no generaron efecto alguno sobre este parámetro en las líneas AT-84, MOC7 y AT-84 E7 Luc (**Figuras 13A, 14A y 15A**) a las distintas concentraciones estudiadas, siendo la mayor la que se obtiene al diluir a la mitad la concentración inicial de las formulaciones aplicadas en los diferentes bioensayos.

Ahora bien, los tratamientos en conjunto con Alúmina o AddaVax no exhibieron toxicidad alguna a las 24 horas en las líneas AT-84 (**Figuras 13B y 13D**) y MOC7 (**Figuras 14B y 14D**). En contraposición, a las 72 horas sí se presentaron efectos sobre la viabilidad celular. Sin embargo, para efectos prácticos sería muy difícil que estas formulaciones generen un efecto citotóxico a nivel *in vivo*, pues mantener las concentraciones a las cuales se observó el decremento en la viabilidad celular por más de 24 horas, es poco probable. Ahora bien, no es posible tampoco indicar que estas sustancias no generen toxicidad a largo plazo. Como se ha mostrado con la alúmina a través de diversos estudios, su seguridad está bastante cuestionada<sup>120</sup>.

A diferencia de todo lo expuesto en los párrafos anteriores, las formulaciones hemocianina más QS-21 sí generaron efectos citotóxicos a 24 horas (**Figuras 13C, 14C y 15B**). Además, dicho efecto fue tiempo-dependiente, dado que a 72 horas, el mismo fue más pronunciado. Se ha propuesto que por tratarse de una saponina, este adyuvante ocasiona una desestabilización de la bicapa lipídica de la membrana celular, desembocando en su muerte<sup>121</sup>. Por tal razón, su empleo implicaría que el efecto sobre las células tumorales no solo dependería de la respuesta inmune innata y adaptativa del animal hacia los antígenos tumorales, a partir de la utilización de las hemocianinas. También, se estaría en presencia de un efecto apoptótico y/o

de necrosis, este último con la consecuente activación del sistema inmune por la liberación de señales de peligro y/o por la inflamación generada<sup>122</sup>.

En relación con trabajos anteriores, la única hemocianina mayoritariamente evaluada ha sido KLH. Es así que se han empleado líneas tumorales humanas de mama dependiente de estrógeno (MCF-7) e independiente de estrógeno (ZR75-1), páncreas (PANC-1 y MIAPaCa), próstata (DU145)<sup>11</sup>, adenocarcinoma esofágico de Barrett (SEG-1 y BIC-1)<sup>28</sup> y melanoma (HTB68 and HTB72)<sup>29</sup>. Sin embargo, los datos brindados no pueden ser comparados con los encontrados en esta tesis, porque en algunos casos se indica la cantidad de hemocianina evaluada, pero no su concentración, y en otros, como es el caso de las líneas de melanoma, se menciona la cantidad de KLH por pocillo y no el volumen donde se encontraba la hemocianina, con lo cual tampoco se puede tener una idea de la concentración real de proteína utilizada.

El único trabajo donde sí se indica la concentración de KLH adecuadamente, corresponde al de Riggs *et al*, donde también se emplearon las líneas de cáncer de mama MCF-7 y ZR75-1, y cáncer de páncreas PANC-1<sup>12</sup>. Se encontró un decremento significativo de la viabilidad celular de las tres líneas a 500 y 250 µg/mL después de 72 horas de aplicada la hemocianina. El resultado a 250 µg/mL difiere del obtenido con líneas celulares AT-84, AT-84

E7 Luc y MOC7 empleadas en este trabajo. La concentración a 500 µg/mL no se utilizó, dado que ésta nunca se alcanzaría con los tratamientos usados en los bioensayos realizados. Para la CCH y la FLH, así como para los tratamientos de cada una de las hemocianinas con los distintos adyuvantes, no existe información alguna al respecto.

En conclusión, los resultados obtenidos muestran que las preparaciones de KLH, CCH y FLH más adyuvante tienen efectos variables, pero no significativos sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7. Para los adyuvantes, los efectos citotóxicos ejercidos fueron variables sobre estas mismas líneas de cáncer oral, siendo el QS-21 el de mayor citotoxicidad para cada una de ellas.

### **7.3.2 Reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7**

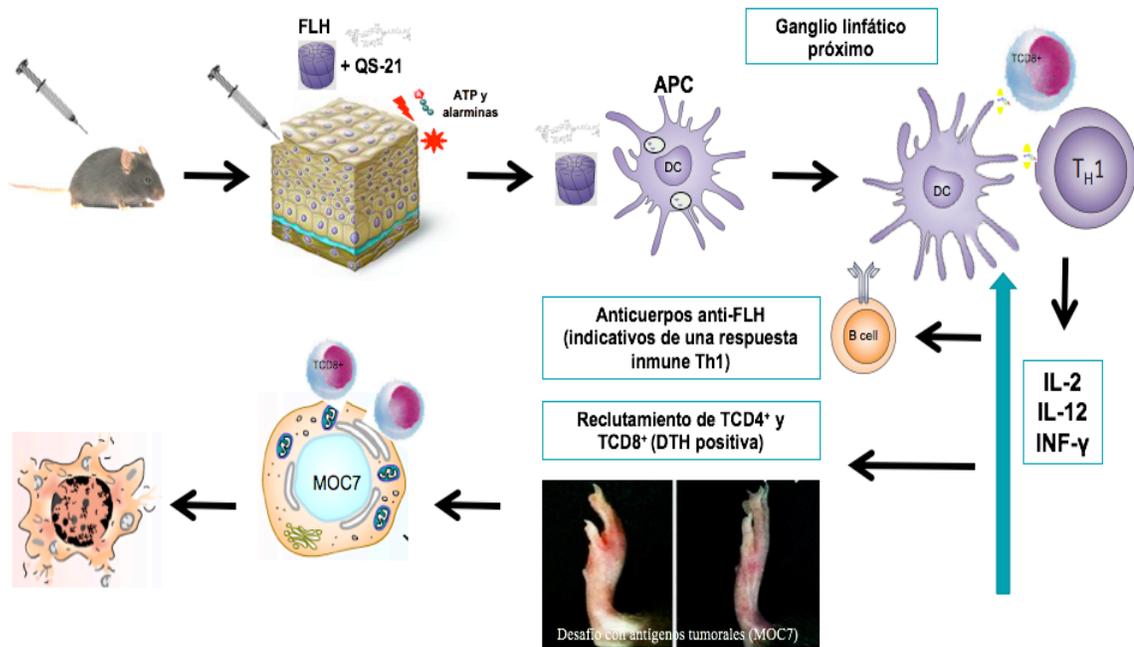
La evaluación de la reacción cruzada entre anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral MOC7 arrojó resultados negativos.

En otros casos, como en líneas de melanoma humano<sup>68</sup> y líneas de cáncer superficial de vejiga<sup>15</sup>, sí se ha observado una reacción cruzada entre

los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos tumorales. En el caso del carcinoma escamoso de cabeza y cuello, la disminución en la expresión del antígeno T, presente en la KLH, y de los sitios de unión a dicho antígeno se correlacionan significativamente con un incremento en el nivel clínicamente detectable de la agresividad de este tipo de cáncer<sup>123</sup>, fenómeno que podría explicar el porqué los resultados obtenidos fueron negativos. Así, la conclusión obtenida de este análisis es la ausencia de una reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral murina MOC7.

A partir de toda la información obtenida en el curso de esta investigación, sumado a los estudios que se llevarían a cabo más adelante, es posible describir un posible mecanismo de acción para FLH más QS-21. Esta formulación demostró que la respuesta inmune Th1 generada por la hemocianina podía ser mayor al administrarse en conjunto con un adyuvante Th1 y a la vez, mejorar su efecto inmunoterapéutico no específico en el tratamiento del cáncer escamoso de cabeza y cuello. Como se muestra en el esquema de la **Figura 16**, una vez que se efectúa la aplicación del tratamiento, el QS-21 es capaz de generar la liberación de ATP y alarminas, producto de su citotoxicidad. Esta liberación favorece la respuesta del sistema inmune, en especial la activación y migración de células presentadoras de antígenos (APCs) a la zona de inyección. Estas células endocitarían la hemocianina y la

procesarían, para posteriormente viajar al ganglio linfático regional más próximo. Allí, presentarían péptidos de la proteína tanto en MHC-II a los linfocitos CD4+ (con la posterior diferenciación a linfocitos Th1 producto de la secreción de citoquinas, especialmente IL-12 por parte de las APCs<sup>124</sup>) como a los linfocitos CD8+ en MHC-I (asumiendo una presentación cruzada). Ambas acciones ocasionarían la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-2, IL-12 e INF- $\gamma$ . Este incremento conllevaría a un cambio de clase de los anticuerpos anti-FLH hacia IgG2a e IgG2b, lo cual es indicativo de la activación de una respuesta Th1. Finalmente, producto de la activación de linfocitos T cooperadores y citotóxicos, se produciría el reclutamiento celular apreciado con una DTH positiva (evaluada mediante la inoculación de un extracto de células tumorales MOC7 en el cojinete plantar del ratón). Como corolario, los linfocitos CD8+ serían los responsables de entrar en contacto con las células MOC7 y ocasionar su muerte.



**Figura 16: Mecanismo de acción propuesto para la formulación FLH+QS-21.** Una vez aplicado el tratamiento, el QS-21 generaría la liberación de ATP y alarminas por su efecto citotóxico, lo cual favorecería la respuesta del sistema inmune (activación y migración de APCs a la zona de inyección). Estas células endocitarían la hemocianina y la procesarían, para viajar al ganglio linfático regional más próximo. Allí, presentarían péptidos de hemocianina tanto en MHC-II a los linfocitos CD4+ como a los linfocitos CD8+ en MHC-I (asumiendo una presentación cruzada). Ambas acciones ocasionarían la secreción de citoquinas proinflamatorias y su incremento conllevaría al cambio de clase de los anticuerpos anti-FLH hacia IgG2a e IgG2b, indicativos de una respuesta tipo Th1. Además, producto de la activación de linfocitos T cooperadores y citotóxicos específicos antitumorales, se produciría el reclutamiento celular, apreciado en el cojinete plantar inoculado con extracto de células tumorales MOC7. Finalmente, los linfocitos CD8+ entrarían en contacto con las células MOC7 y ocasionarían su muerte.

## 8. PROYECCIONES FUTURAS

El estudio realizado en esta tesis ha demostrado cómo la hemocianina FLH, en conjunto con el QS-21 resultó ser la preparación más efectiva con respecto a KLH más QS-21 en la inmunoterapia contra el cáncer oral, tanto en un modelo ortotópico como heterotópico. Además, se determinó la necesidad de realizar una inmunización previa al desafío con las células tumorales y por ende, al desarrollo del tumor, reforzando la idea que la respuesta inmune adaptativa es fundamental en el efecto inmunomodulador de las hemocianinas. Sin embargo, es necesario evaluar otros elementos de la respuesta inmune involucrados en el mecanismo de acción de la formulación FLH más QS-21 para comprender con mayor profundidad, ampliar y/o modificar el modelo propuesto en esta tesis. Paralelamente, en cuanto al protocolo terapéutico, la vía de aplicación de la terapia, el (los) momento(s) y el número de dosis deben ser evaluados más sistemáticamente, previo a determinar si los componentes del tratamiento requerirían emplearse a dosis diferentes.

En primer lugar, entre los próximos estudios está definir con parámetros bioquímicos (Anexina V y PI<sup>125</sup>) el tipo de muerte celular en las líneas celulares de cáncer oral AT-84 y MOC7, producto del empleo de QS-21, como se apreció en el ensayo de viabilidad celular, ya que brindará información sobre el mecanismo de acción. La apoptosis reduce el número de células tumorales

como consecuencia de la muerte celular programada. La necrosis, aparte de generar la muerte de las células, provoca la liberación al medio extracelular de ATP y alarminas, sustancias útiles para mejorar la respuesta inmune ante el tumor. Este fenómeno también se observa en un tipo de muerte celular denominada inmunogénica (ICD). El mismo favorece la infiltración del tumor por linfocitos CD8+ específicos y que hoy se sabe que es un tipo de apoptosis que genera inflamación<sup>126, 127</sup>. Este ensayo se complementará con análisis mediante microscopía electrónica de transmisión, y así, visualizar lo que está sucediendo con dichas células a un tiempo temprano, una vez aplicado el adyuvante.

Además, se desarrollarán ensayos de citotoxicidad para evaluar si las células tumorales de cáncer oral incorporan, procesan y presentan hemocianinas. Los resultados, de ser positivos, validarían lo descrito en el modelo propuesto, referente a que los linfocitos CD8+ son los principales responsables del efecto antitumoral observado vía una presentación antigénica cruzada en MHC-I. Por esta razón, en primer lugar se debe evaluar si las líneas de cáncer oral expresan MHC-I, y también, si incorporan hemocianinas y si esto lleva a un aumento en la expresión de los MHC-I si los hay. Posteriormente, se realizarían estudios con linfocitos T CD8+ específicos anti-hemocianina (obtenidos del bazo de ratones inmunizados previamente con hemocianina).

Por otra parte, *in vivo*, se espera realizar bioensayos donde se evaluará otra vía de administración de la terapia antitumoral (de subcutánea a intralesional). La administración subcutánea genera una mayor dilución de la formulación previo a entrar en contacto con las células tumorales, disminuyendo o evitando el efecto citotóxico de la saponina, observado sólo a altas concentraciones en el ensayo con Alamar Blue. Sumado a eso, investigaciones previas (cáncer de vejiga y melanoma) han mostrado una mayor eficiencia en la inmunoterapia del cáncer con el empleo de la ruta intralesional para la administración de la hemocianina<sup>23</sup>.

Para los ensayos de DTH, se utilizará un extracto tumoral en vez de células vivas, considerando que fisiológicamente, una vez que una célula tumoral muere, las APCs muestran tanto antígenos superficiales como aquellos encontrados a nivel intracelular.

También pensando en el mecanismo de acción de las formulaciones con FLH más QS-21, se evaluarán las poblaciones de células inmunes que infiltran el tumor comparadas con las que se encuentran en los ganglios aledaños al tumor, así como en el bazo de los animales portadores del mismo. Junto con esto, se estudiará el estado fisiológico de algunas poblaciones celulares con marcadores específicos (activas o inactivas), pues este conjunto de información

daría cuenta del efecto a nivel celular de la formulación hemocianina-adyuvante sobre el sistema inmune del animal.

Finalmente, se estudiará también el uso de un mayor número de dosis, pues a partir del bioensayo profiláctico del modelo ortotópico de cáncer oral, surgió la interrogante si dosis adicionales disminuirían aún más el desarrollo tumoral con respecto al grupo control y al resto de tratamientos utilizados, sin ocasionar efectos tóxicos, especialmente por la acumulación del QS-21 en el organismo.

## 9. CONCLUSIONES

1. La formulación FLH más QS-21 presentó la mejor inmunogenicidad, reflejada en un mayor título de IgG total anti-hemocianina, con predominio de anticuerpos IgG2a e IgG2b, y una respuesta celular superior en un ensayo de DTH.
2. Para el bioensayo terapéutico ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc: la respuesta inmune fue indicativa de una de tipo Th1 en todos los tratamientos. No obstante, se observó una DTH anti-hemocianina mayor con FLH más QS-21, aunque su sobrevida no resultó ser mejor.
3. Para el bioensayo profiláctico ortotópico de cáncer oral de ratones C3H/He desafiados con la línea AT-84 E7 Luc: los títulos de IgG total anti-hemocianina fueron superiores para los distintos tratamientos en comparación con los títulos obtenidos en el bioensayo terapéutico, observándose un análisis indicativo de una mayor polarización Th1. No obstante, la DTH anti-hemocianina fue mayor para los tratamientos KLH y FLH más QS-21, siendo esta última la que mostró un menor desarrollo de tumor y mayor sobrevida en comparación con el resto de los tratamientos y los controles, e igual en relación con el QS-21.

4. Para el bioensayo terapéutico heterotópico de cáncer oral de ratones C57BL/6 desafiados con la línea MOC7: se encontraron títulos anti-hemocianina elevados para los distintos tratamientos, pero únicamente en el caso de las formulaciones con QS-21 se observó una respuesta inmune indicativa de una Th1, obteniéndose una DTH positiva contra las células MOC7 con FLH más QS-21.
5. Las preparaciones de KLH, CCH y FLH más adyuvantes tienen efectos variables, pero no significativos sobre la viabilidad de las líneas celulares de cáncer oral AT-84, AT-84 E7 Luc y MOC7.
6. Los adyuvantes Alúmina, QS-21 y AddaVax producen efectos citotóxicos variables sobre estas mismas líneas de cáncer oral, siendo QS-21 el de mayor citotoxicidad.
7. No se encontró reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de superficie presentes en la línea tumoral murina MOC7.
8. Finalmente, se destaca que este es el primer trabajo en que se investiga el efecto de hemocianinas solas y combinadas con adyuvantes en modelos de cáncer oral murino, por lo cual los resultados sientan las bases para

profundizar en el estudio de esta inmunoterapia para la prevención y/o el tratamiento de este carcinoma en seres humanos.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fredericq, M. L. 1878. Sur l' hémocyanine, substance nouvelle du sang de Poulpe (*Octopus vulgaris*). C. r hebod séanc. 87: 996-998.
2. Swedlow, R. D., Ebert, R. F., Lee, P., Bonaventura, C. & Miller, K. I. 1996. Keyhole Limpet Hemocyanin: Structural and Functional Characterization of Two Different Subunits and Multimers. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 113B(3): 537-548.
3. Stedman, E. & Stedman E. 1928. The Oxygen Dissociation Curve of Haemocyanin from the Snail (*Helix pomatia*) in Dialysed Solution. *Biochemical Journal*. 22(4): 889-901.
4. Coates, C. J. & Nairn, J. 2014. Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental and Comparative Immunology*. 45: 43-55.
5. De Ioannes, P., Moltedo, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A. E. & Becker, M. I. 2004. Hemocyanin of the Molluscan *Concholepas concholepas* Exhibits an Unusual Heterodecameric Array of Subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(25): 26134-26142.
6. Markl, J. 2013. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1834: 1840-1852.
7. Gesheva, V., Idakieva, K., Kerekov, N., Nikolova, K., Mihaylova, N., Doumanova, L & Tchorbanov, A. 2011. Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. *Fish & Shellfish Immunology*. 30: 135-142.
8. Harris, J. R. & Markl, J. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 30: 597-623.
9. Weigle, W. O. 1964. Immunochemical Properties of Hemocyanin. *Immunochemistry*. 1: 295-302.
10. Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M. L. & Della Bella, S. 2008. Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Molecular Immunology*. 45: 1136-1145.
11. Riggs, D. R., Jackson, B., Vona-Davis, L. & McFadden, D. 2002. *In Vitro* Anticancer Effects of a Novel Immunostimulant: Keyhole Limpet Hemocyanin. *Journal of Surgical Research*. 108: 279-284.
12. Riggs, D. R., Jackson, B. J., Vona-Davis, L. Nigam, A. & McFadden, D. W. 2005. *In vitro* effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regard to cell growth, cytokine production and apoptosis. *The American Journal of Surgery*. 189: 680-684.
13. Oliva, H., Moltedo, B., De Ioannes, P., Faunes, F., De Ioannes, A. E. & Becker, M. I. 2002. Monoclonal Antibodies to Molluscan Hemocyanin from *Concholepas concholepas* Demonstrate Common and Specific Epitopes among Subunits. *Hybridoma and Hybridomics*. 21(5): 365-374.

14. Arancibia, S., Espinoza, C., Salazar, F., Del Campo, M., Tampe, R., Zhong, T., De Ioannes, P., Moltedo, B., Ferreira, J., Lavelle, E. C., Manubens, A., De Ioannes, A. E. & Becker, M. I. 2014. A Novel Immunomodulatory Hemocyanin from the Limpet *Fissurella latimarginata* Promotes Potent Anti-Tumor Activity in Melanoma. PLOS ONE. 9(1): 1-12.
15. Becker, M. I., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M. & De Ioannes, A. 2014. Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications. En Thien Duc, G. H. (Ed.), Immune Response Activation. [Versión de Intech]. Recuperado de <http://www.intechopen.com/books/immune-response-activation/mollusk-hemocyanins-as-natural-immunostimulants-in-biomedical-applications>. pp. 45-72
16. Gatsogiannis, C., Hofnagel, O., Markl, J. & Raunser S. 2015. Structure of Mega-Hemocyanin Reveals Protein Origami in Snails. Structure. 23(1):93-103.
17. Arancibia, S., Salazar, S. & Becker, M. I. 2012. Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer. En Canda, A. (Ed.). Bladder Cancer – From Basic Science to Robotic Surgery. [Versión de Intech]. Recuperado de <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/27324.pdf>. pp. 221-242).
18. Hall, R. L. & Wood, E. J. 1976. The carbohydrate content of gastropod hemocyanins. Biochemical Society Transactions. 4: 307-309.
19. Harris, J. R., Gebauer, W., Söhngen, S. M. & Markl, J. 1995. Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH): Purification of Intact KLH1 Through Selective Dissociation of KLH2. Micron. 26(3): 201-212.
20. Manubens, A., Salazar, F., Haussmann, D., Figueroa, J., Del Campo, M., Martínez Pinto, J., Huaquín, L., Venegas, A. & Becker, M. I. 2010. *Concholepas* hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. Cell and Tissue Research. 342: 423-435.
21. Becker, M. I., Fuentes, A., Del Campo, M., Manubens, A., Nova, E., Oliva, H., Faunes, F., Valenzuela, M. A., Campos-Vallette, M., Aliaga, A., Ferreira, J., De Ioannes, A. E., De Ioannes, P. & Moltedo, B. 2009. Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. International Immunopharmacology. 9: 330-339.
22. Moltedo, B., Faunes, F., Haussmann, D., de Ioannes, P., de Ioannes, A. E., Puente J. & Becker, M. I. 2006. Immunotherapeutic Effect of *Concholepas* Hemocyanin in the Murine Bladder Cancer Model: Evidence for Conserved Antitumor Properties Among Hemocyanins. The Journal of Urology. 176: 2690-2695.
23. del Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., González, A., Moltedo, B., De Ioannes, P., Ferreira, J., Manubens, A. & Becker, M. I.

2011. Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Revista Médica de Chile*. 139: 236-246.
24. Kim, S. K., Ragupathi, G., Musselli, C., Choi, S., Park, Y. S. & Livingston, P. O. 2000. Comparison of the effect of different immunological adjuvants on the antibody and T-cell response to immunization with MUC1-KLH y GD3-KLH conjugate cancer vaccines. *Vaccine*. 18: 597-603.
  25. Jurincic-Winkler, C., Engelmann, U., Beuth J. & Klippel, K. F. 1995. Efficacy of Local Bacillus Calmette-Guérin Treatment in Superficial Bladder Cancer Relapsing under Keyhole-Limpet Hemocyanin Immunotherapy. *Zbl. Bakt.* 282: 409-415.
  26. Morales, A., Eiding, D. & Bruce, A. W. 1976. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the Treatment of Superficial Bladder Tumors. *The Journal of Urology*. 116: 180-183.
  27. Brausi, M., Oddens, J., Sylvester, R., Bono, A., van de Beek, C., van Andel, G., Gontero, P., Turkeri, L., Marreud, S., Collette, S. & Oosterlinck, W. 2014. Side Effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the Treatment of Intermediate- and High-risk Ta, T1 Papillary Carcinoma of the Bladder: Results of the EORTC Genito-Urinary Cancers Group Randomised Phase 3 Study Comparing One-third Dose with Full Dose and 1 Year with 3 Years of Maintenance BCG. *European Urology*. 65: 69-76.
  28. McFadden, D. W., Riggs, D. R., Jackson, B. J. & Vona-Davis, L. 2003. Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgery*. 186: 552-555.
  29. Somasundar, P., Riggs, D. R., Jackson, B. J. & McFadden, D. W. 2005. Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. *The American Journal of Surgery*. 190: 713-716.
  30. McFadden, D. W., Riggs, D. R., Jackson, B. J., Ng, A. & Cunningham, C. 2007. Keyhole limpet hemocyanin potentiates standard immunotherapy for melanoma. *The American Journal of Surgery*. 193: 284-287.
  31. Reyes, D., Salazar, L., Espinoza, E., Pereda, C., Castellón, E., Valdevenito, R., Huidobro, C., Becker, M. I., Lladser, A., López, M. N. & Salazar-Onfray, F. 2013. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *British Journal of Cancer*. 109(6): 1488-1497
  32. d'Onofrio, A. 2007. Tumor evasion from immune control: Strategies of a MISS to become a MASS. *Chaos, Solitons and Fractals*. 31: 261-268.
  33. Devarapu, S. K., Sharma, S. C. & Das, S. N. 2006. Triggering of T Cell-Mediated Immune Responses by Allogenic Tumor Cell Vaccine in Patients with Oral Cancer. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 28: 387-395.
  34. McElrath, M. J. 1995. Selection of potent immunological adjuvants for vaccine construction. *Cancer Biology*. 6: 375-385.

35. Aucouturier, J., Dupuis, L. & Ganne, V. 2001. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 19: 2666-2672.
36. Gallily, R. & Garvey, J. S. 1969. Prolonged antibody production in rats after single injection of KLH coated on bentonite. *Immunochemistry*. 6: 766-767.
37. Vandepapelière, P., Horsmans, Y., Moris, P., Van Mechelen, M., Janssens, M., Koutsoukos, M., Van Belle, P., Clement, F., Hanon, E., Wettendorff, M., Garçon, N. & Leroux-Roels, G. 2008. Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine*. 26: 1375-1386.
38. Guy, B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 505-517.
39. Aguilar, J. C. & Rodríguez, E. G. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 25: 3752-3762.
40. Mbawuike, I., Zang, Y. & Couch, R. B. 2007. Humoral and cell-mediated immune responses of humans to inactivated influenza vaccine with or without QS21 adjuvant. *Vaccine*. 25: 3263-3269.
41. Petrovsky, N. & Aguilar, J. C. 2004. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 82: 488-496.
42. Kim, S. K., Ragupathi, G., Cappello, S., Kagan, E. & Livingston, P. O. 2001. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*. 19: 530-537.
43. Ragupathi, G., Cappello, S., Yi, S. S., Canter, D., Spassova, M., Bornmann, W. G., Danishefsky, S. J & Livingston P. O. 2002. Comparison of antibody titers after immunization with monovalent or tetravalent KLH conjugate vaccines. *Vaccine*. 20: 1030-1038.
44. Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O. & Gin, D. Y. 2011. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Review of Vaccines*. 10(4): 463-470.
45. Mastelic, B., Ahmed, S., Egan, W. M., Del Giudice, G., Golding, H., Gust, I., Neels, P., Reed, S. G., Sheets, R. L., Siegrist, C. & Lambert, P. 2010. Mode of action of adjuvants: Implications for vaccine safety and design. *Biologicals*. 38: 594-601.
46. Coffman, R. L., Sher, A. & Seder, R. A. 2010. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 33(4): 492-503.
47. Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M. & Rappuoli, R. 2010. New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*. 22: 411-416.
48. Correia-Pinto, J. F., Csaba, N. & Alonso, M. J. 2013. Vaccine delivery carriers: Insights and future perspectives. *International Journal of Pharmaceutics*. 440: 27-38.

49. Brito, L. A., Malyala, P. & O'Hagan, D. T. 2013. Vaccine adjuvant formulations: A pharmaceutical perspective. *Seminars in Immunology*. 25: 130-145.
50. Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N. & Friede, M. 2008. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*. 30(1): 23-32.
51. Dubensky Jr., T. W. & Reed, S. G. 2010. Adjuvants for cancer vaccines. *Seminars in Immunology*. 22: 155-161.
52. Jin, B., Kim, S., Lee, J., Kang, S., Han, H., Jang, Y, Seo, G. & Kim, P. 2013. Alum Directly Modulates Murine B Lymphocytes to Produce IgG1 Isotype. *Immune Network*. 13(1): 10-15.
53. Brewer, J. M., Conacher, M., Hunter, C. A., Mohrs, M., Brombacher, F. & Alexander, J. 1999. Aluminium Hydroxide Adjuvant Initiates Strong Antigen-Specific Th2 Responses in the Absence of IL-4 or IL-13-Mediated Signaling. *The Journal of Immunology*. 163: 6448-6454.
54. Food and Drug Administration. 2014. Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines. Food and Drug Administration Recuperado de <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm187810.htm>
55. Gildener-Leapman, N., Ferris, R. L. & Bauman, J. E. 2013. Promising systemic immunotherapies in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 49: 1089-1096.
56. Paolini, F., Massa, S., Manni, I., Franconi, R. & Venuti, A. 2013. Immunotherapy in new pre-clinical models of HPV-associated oral cancers. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 9(3): 534-543.
57. Davidson, H. C., Leibowitz, M. S., Lopez-Albaitero, A. & Ferris, R. L. 2009. Immunotherapy for head and neck cancer. *Oral Oncology*. 45: 747-751.
58. Luo, Q., Hu, D., Hu, S., Yan, M., Sun, Z. & Chen, F. 2012. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 12: 1-10.
59. Chen, S., Nieh, S., Jao, S., Liu, C., Wu, C., Chang, Y., Yang, C. & Lin, Y. 2012. Querceptin Suppresses Drug-Resistant Spheres via the p38 MAPK-Hsp27 Apoptotic Pathway in Oral Cancer Cells. *PLOS ONE*. 7(11): 1-9.
60. Prince, A., Aguirre-Ghizo, J., Genden, E., Posner, M. & Sikora, A. 2010. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: New Translational Therapies. *Mount Sinai Journal of Medicine*. 77: 684-699.
61. Guiducci, C., Vicari, A. P., Sangaletti, S., Trinchieri, G. & Colombo, M. P. 2005. Redirecting *In vivo* Elicited Tumor Infiltrating Macrophages and Dendritic Cells towards Tumor Rejection. *Cancer Research*. 65(8): 3437-3446.
62. Sica, A. & Mantovani, A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*. 122(3): 787-795.
63. Kelland, L. 2008. Preclinical pharmacology and *in vivo* models. En Neidle, S. (Ed.), *Cancer Drug Design and Discovery*. Nueva York: Elsevier. pp. 39-52.

64. McGonigle, P. & Ruggeri, B. 2014. Animal models of human disease: Challenges in enabling translation. *Biochemical Pharmacology*. 87: 162-171.
65. Food and Drug Administration. 2014. The FDA's Drug Review Process: Ensuring Drugs Are Safe and Effective. Food and Drug Administration. Recuperado de <http://www.fda.gov/drugs/resourcesforyou/consumers/ucm143534.htm>
66. Lou, E., Kellman, R. M., Hutchinson, R. & Shillitoe, E. J. 2003. Clinical and pathological features of the murine AT-84 orthotopic model of oral cancer. *Oral Diseases*. 9: 305-312.
67. Judd, N. P., Winkler, A. E., Murillo-Sauca, O., Brotman, J. J., Law, J. H., Lewis Jr., J. S., Dunn, G. P., Bui, J. D., Sunwoo, J. B. & Uppaluri, R. 2012. ERK1/2 Regulation of CD44 Modulates Oral Cancer Aggressiveness. *Cancer Research*. 72: 365-374.
68. Palacios, M. B. 2014. 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. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 117p.
69. Gupta, R. K. & Siber, G. R. 1995. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 13(14): 1263-1276.
70. Schillaci, R., Salatino, M., Cassataro, J., Proietti, C. J., Giambartolomei, G. H., Rivas, M. A., Carnevale, R. P., Charreau, E. H. & Elizalde, P. V. 2006. Immunization with Murine Breast Cancer Cells Treated with Antisense Oligodeoxynucleotides to Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Induced an Antitumoral Effect Mediated by a CD8+ Response Involving Fas/Fas Ligand Cytotoxic Pathway. *The Journal of Immunology*. 176(6): 3426-3437.
71. Gewirtz, D. A. 1999. A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*. 57: 727-741.
72. Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. & Gianni, L. 2004. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*. 56(2): 185-229.
73. Vidarsson, G., Dekkers, G. & Rispens, T. 2014. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*. 5: 1-17.
74. Carter, P. J. 2006. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Reviews*. 6: 343-357.
75. Zhou, H. & Mascelli, M. A. 2011. Mechanisms of Monoclonal Antibody-Drug Interactions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 51: 359-372.

76. Gupta, R. K., Relyveld, E. H., Lindblad, E. B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S. & Gupta, C. K. 1993. Adjuvants – a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine*. 11(3): 293-306.
77. Lycke, N. 2007. Mechanisms of Adjuvant Action. En Singh, M. (Ed.), *Vaccine Adjuvants and Delivery Systems*. Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc. pp. 53-79
78. Werner Haabeth, O. A., Berg Lorvik, K., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B. & Corthay, A. 2011. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature communications*. 2: 1-12.
79. Lindblad, E. B. 2004. Aluminium compounds for use in vaccines. *Immunology and Cell Biology*. 82: 497-505.
80. Wang, W. & Singh, M. 2011. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. *World Journal of Vaccines*. 1: 33-78.
81. Leslie, M. 2013. Solution to Vaccine Mystery Starts to Crystallize. *Science*. 341(6141): 26-27.
82. Wege, H. A., Kim, S., Paunov, V. N., Zhong, Q. & Velev, O. D. 2008. Long-Term Stabilization of Foams and Emulsions with In-Situ Formed Microparticles from Hydrophobic Cellulose. *Langmuir*. 24 (17): 9245-9253.
83. Lam, S., Velikov, K. P. & Velev, O. D. 2014. Pickering stabilization of foams and emulsions with particles of biological origin. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 19(5): 490-500
84. Lefeber, D. J., Benaissa-Trouw, B., Vliegenthart, J. F. G., Kamerling, J. P., Jansen, W. T. M., Kraaijeveld, K. & Snippe H. 2003. Th1-Directing Adjuvants Increase the Immunogenicity of Oligosaccharide-Protein Conjugate Vaccines Related to *Streptococcus pneumoniae* Type 3. *Infection and Immunity*. 71(12): 6915-6920.
85. Slovin S. F., Keding S. J. & Ragupathi G. 2005. Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunology and Cell Biology*. 83: 418–428.
86. Marrack, P., McKee, A. S. & Muncks, M. W. 2009. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nature Reviews Immunology*. 9(4): 287-293.
87. HogenEsch, H. 2013. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Frontiers in Immunology*. 3: 1-13.
88. Wu, C., Chang, C., Ma, H., Wang, C., Chen, Y., Hsiao, P., Chang, C., Chan, C., Liu, C. & Chen, J. 2014. Squalene-adjuvanted H7N9 virus vaccine induces robust humoral immune response against H7N9 and H7N7 viruses. *Vaccine*. 32(35): 4485-4494.
89. Smeltz, R. B., Chen, J., Ehrhardt, R. & Shevach, E. M. 2002. Role of INF- $\gamma$  in Th1 Differentiation: INF- $\gamma$  Regulates IL-18R $\alpha$  Expression by Preventing the Negative Effects of IL-4 and by Inducing/Maintaining IL-12 Receptor  $\beta$ 2 Expression. *The Journal of Immunology*. 168(12): 6165-6172.

90. Murray, P. J., Aldadovini, A. & Young, R. A. 1996. Manipulation and potentiation of antimycobacterial immunity using recombinant bacille Calmette-Guérin strains that secrete cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 934-939.
91. Mu, H. Sawitzke, A. D. & Cole, B. C. 2000. Modulation of Cytokine Profiles by the Mycoplasma Superantigen *Mycoplasma arthritidis* Mitogen Parallels Susceptibility to Arthritis Induced by *M. arthritidis*. *Infection and Immunity*. 68(3): 1142-1149.
92. Roberts, W. K., Livingston, P. O., Agus, D. B, Pinilla-Ibarz, J., Zelenetz, A. & Scheinberg, D. A. 2002. Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood*. 99(10): 3748-3755.
93. Wong, C. P., Okada, C. Y. & Levy, R. 1999. TCR Vaccines Against T Cell Lymphoma: QS-21 and IL-12 Adjuvants Induce a Protective CD8+ T Cell Response. *The Journal of Immunology*. 162: 2251-2258.
94. Staite, N. D., Justen, J. M., Sly, L. M., Beaudet, A. L. & Bullard, D. C. 1996. Inhibition of Delayed-Type Contact Hypersensitivity in Mice Deficient in Both E-Selectin and P-Selectin. *Blood*. 88(8): 2973-2979.
95. Hacini-Rachinel, F., Gheit, H., Le Luduec, J., Dif, F., Nancey, S. & Kaiserlian, D. 2009. Oral Probiotic Control Skin Inflammation by Acting on Both Effector and Regulatory T Cells. *PLOS one*. 4(3): 1-9.
96. Romagnani, S. 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 85(1) 9-18.
97. Torre, D., Speranza, F., Giola, M., Matteeli, A., Tambini, R. & Biondi, G. 2002. Role of Th1 and Th2 Cytokines in Immune Response to Uncomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(2): 348-351.
98. Sasaki, S., Sumino, K., Hamajima, K., Fukushima, N, Ishii, N., Kawamoto, S., Mohri, H., Read Kensil, C. & Okuda, K. 1998. Induction of Systemic and Mucosal Immune Responses to Human Immunodeficiency Virus Type 1 by a DNA Vaccine Formulated with QS-21 Saponin Adjuvant via Intramuscular and Intranasal Routes. *Journal of Virology*. 72(6): 4931-4939.
99. Gesheva, V., Chausheva, S., Mihaylova, N., Manoylov, I., Doumanova, L., Idakieva, K. & Tchorbanov, A. 2014. Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. *BMC Immunology*. 15(34): 1-11.
100. Georgopoulos, N. T., Proffitt, J. L. & Blair, G. E. 2000. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. *Oncogene*. 19: 4930-4935.
101. Kraus, I., Molden, T., Holm, R., Lie, A. K., Karlsen, F., Kristensen, G. B. & Skomedal, H. 2006. Presence of E6 and E7 mRNA from Human

- Papillomavirus Types 16, 18, 31, 33 and 45 in the Majority of Cervical Carcinomas. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(4): 1310-1317.
102. Sun, A., Hou, L., Prugpichailers, T., Dunkel, J., Kalani M. A., Chen, X., Kalani, M. Y. S. & Tse, V. 2010. Firefly Luciferase-Based Dynamic Bioluminescence Imaging: A Noninvasive Technique to Assess Tumor Angiogenesis. *Neurosurgery*. 66(4): 751-757.
  103. Ghirelli, C. & Hagemann, T. 2013. Targeting immunosuppression for cancer therapy. *The Journal of Clinical Investigation*. 123(6): 2355-2356.
  104. Xu, H. 2014. Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 13(5): 482-494.
  105. Whiteside, T. L. 2010. Inhibiting the Inhibitors: Evaluating Agents Targeting Cancer Immunosuppression. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 10(7): 1019-1035.
  106. Fernández-Tejada, A., Chea, E. K., George, C., Pillarsetty, N., Gardner, J. R., Livingston, P. O., Ragupathi, G., Lewis, J. S., Tan, D. S. & Gin, D. Y. 2014. Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21. *Nature Chemistry*. 6(7): 635-643.
  107. Zhu, D. & Tuo, W. 2015. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Natural Products Chemistry & Research*. 3(4).
  108. Lu, Y., Zhang, Z., Liu, Q., Liu, B., Song, X., Wang, M., Zhao, X. & Zhao, Q. 2007. Immunological Protection against HPV16 E7-Expressing Human Esophageal Cancer Cell Challenge by a Novel HPV-E6/E7 Fusion Protein Based-Vaccine in a Hu-PBL-SCID Mouse Model. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(1): 150-156.
  109. Ku, T. K. S., Nguyen, D. C., Karaman, M., Gill, P., Hacia, J. G. & Crowe, D. L. 2007. Loss of p53 Expression Correlates with Metastatic Phenotype and Transcriptional Profile in a New Mouse Model of Head and Neck Cancer. *Molecular Cancer Research*. 5(4): 351-362.
  110. Pulaski, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. 1998. Reduction of Established Spontaneous Mammary Carcinoma Metastases following Immunotherapy with Major Histocompatibility Complex Class II and B7.1 Cell-based Tumor Vaccines. *Cancer Research*. 58: 1486-1493.
  111. Kwon, E. D., Foster, B. A., Hurwitz, A. A., Madias, C., Allison, J. P., Greenberg, N. M. & Burg, M. B. 1999. Elimination of residual metastatic prostate cancer after surgery and adjunctive cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) blockade immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 96(26): 15074-15079.
  112. Stanton, S. E. & Disis, M. L. 2015. Designing vaccines to prevent breast cancer recurrence or invasive disease. *Immunotherapy*. 7(2): 69-72.
  113. Lee, T. H., Cho, H. K., Cho, Y. H. & Lee, M. G. 2009. Development of an Effective Method for Dendritic Cell Immunotherapy of Mouse Melanoma. *Scandinavian Journal of Immunology*. 70(2): 85-92.
  114. Zips, D., Thames, H. D. & Baumann, M. 2005. New Anticancer Agents: *In Vitro* and *In Vivo* Evaluation. *In Vivo*. 19: 1-8.

115. Unger, F. T., Witte, I. & David, K. A. 2015. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72: 729-757.
116. Kong, D. & Yamori, T. 2012. JFCR39, a panel of 39 human cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20: 1947-1951.
117. Garnett, M. J. & McDermott, U. 2014. The evolving role of cancer cell line-based screens to define the impact of cancer genomes on drug response. *Current Opinion in Genetics & Development*. 24: 114-119.
118. Burger, A. M. & Fiebig H. 2014. Preclinical Screening for New Anticancer Agents. En Rudek, M. A. *et al.* (eds.). *Cancer Drug Discovery and Development*. Nueva York: Springer. pp. 23-38.
119. Mignolet, A., Derenne, A., Smolina, M., Wood, B. R. & Goormaghtigh, E. 2015. FTIR spectral signature of anticancer drugs. Can drug mode of action be identified. *Biochimica et Biophysica Acta*.
120. Tomljenovic, L. & Shaw, C. A. 2011. Aluminum Vaccine Adjuvants: Are they Safe? *Current Medicinal Chemistry*. 18: 2630-2637.
121. Korchowiec, B., Gorczyca, M, Wojszko, K., Janikowska, M. Henry, M. & Rogalska, E. 2015. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1848: 1963-1973.
122. Iyer, S. S., Pulskens, W. P., Sadler, J. J., Butter, L. M., Teske, G. J., Ulland, T. K., Eisenbarth, S. C., Florquin, S., Flavell, R. A., Leemans, J. C. & Sutterwala, F. S. 2009. Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(48): 20388-20393.
123. Choufani, G., Nagy, N., Saussez, S., Marchant, H., Bisschop, P., Burchert, M., Danguy, A., Louryan, S., Salmon, I., Gabius, H. J., Kiss, R. & Hassid, S. 1999. The levels of expression of galectin-1, galectin-3, and the Thomsen-Friedenreich antigen and their binding sites decrease as clinical aggressiveness increases in head and neck cancers. *Cancer*. 86(11): 2353-2563.
124. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai S. 2012. *Inmunología celular y molecular*. 7<sup>a</sup> ed. Barcelona, El Sevier. 560p.
125. Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuck, J. D. & Barreda, D. R. 2011. Modified Annexin V/Propidium Iodide Apoptosis Assay for Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*. 50: 1-4.
126. Galluzzi, L., Maluri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*. 14(7): 1237-1243.
127. Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V. & Agostinis P. 2010. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1805(1): 53-71.