

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ABREVIATURAS	4
I. RESUMEN	6
II. ABSTRACT	8
III. INTRODUCCIÓN	10
III. 1. EL CÁNCER EN CHILE Y EL MUNDO	10
III. 2. TRATAMIENTO CONTRA CADs	12
III. 3. INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL	14
III. 4. ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO	17
III. 5. BACTERIÓFAGO M13 Y <i>PHAGE DISPLAY</i>	20
III. 6. RESUMEN DE LA ESTRATEGIA PROPUESTA	25
IV. HIPÓTESIS	27
V. OBJETIVO GENERAL	27
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
VII. MATERIALES	29
VII. 1. Material biológico	29
VII. 2. Plásmidos	30
VII. 3. Medios de cultivo	34
VII. 4. Soluciones y reactivos comerciales	35
VII. 5. Reactivos de biología molecular	36
VII. 6. Tampones y otras soluciones	37
VII. 7. Anticuerpos	37
VIII. MÉTODOS	38
VIII.1. Transformación de bacterias quimiocompetentes	38
VIII.2. Transformación de bacterias mediante electroporación	39
VIII.3. Amplificación de plásmidos	40
VIII.4. Digestión enzimática de plásmidos	41

VIII.5.	Purificación de ADN desde gel de agarosa.....	42
VIII.6.	Desfosforilación del vector M13KE.....	42
VIII.7.	Ligación de ácidos nucleicos.....	43
VIII.8.	PCR convencional.....	43
VIII.9.	Producción de bacteriófago M13 silvestre.....	44
VIII.10.	Titulación de bacteriófagos M13 silvestres mediante infección de bacterias <i>E. coli</i> ER2738.....	45
VIII.11.	Detección de bacteriófagos mediante ELISA indirecto.....	45
VIII.12.	Titulación de bacteriófagos mediante ELISA indirecto.....	46
VIII.13.	Ensayo de especificidad contra CEA purificado.....	46
VIII.14.	Cultivo celular.....	48
VIII.15.	Detección de bacteriófagos unidos a la superficie células tumorales mediante citometría de flujo.....	48
VIII.16.	Detección de la proteína pIII mediante western blot.....	49
VIII.17.	Análisis estadístico.....	50
IX.	RESULTADOS.....	51
	OBJETIVO 1.....	51
	OBJETIVO 2.....	60
	OBJETIVO 3.....	67
X.	DISCUSIÓN.....	74
XI.	CONCLUSIONES.....	84
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del genoma del fago M13 y su respectivo proteoma.....	22
Figura 2. Ciclo infectivo del bacteriófago M13.....	22
Figura 3. Etapas de selección en método <i>phage display</i>	23
Figura 4. Representación gráfica de la respuesta inmune esperada al inyectar bacteriófago anti-CEA en un modelo tumoral murino.....	26
Figura 5. Mapa del vector genómico M13KE.....	31
Figura 6. Mapa del vector de clonamiento pUC57.....	32
Figura 7. Mapa del fagomidio pSEX81.....	33
Figura 8. Análisis por PCR del producto de ligación entre el vector M13KE y el fragmento scFv anti-CEA.....	57
Figura 9. Análisis por PCR de posibles clones positivos para ligación M13KE-scFv anti-CEA.....	58
Figura 10. Detección de bacteriófago M13 mediante ensayo de ELISA indirecto....	59
Figura 11. Resumen esquemático de la producción de bacteriófagos anti-CEA.....	64
Figura 12. Curva estándar de M13 silvestre.....	65
Figura 13. Detección de la proteína de fusión scFv - pIII mediante técnica de <i>western blot</i>	66
Figura 14. Evaluación de la especificidad del bacteriófago M13 anti-CEA.....	71
Figura 15. El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a la proteína CEA purificada.....	72
Figura 16. El bacteriófago M13 anti-CEA se une específicamente a células que expresan CEA en su superficie.....	73