

**Expresión de proteínas de fusión viral en  
células tumorales como mecanismo para  
inducir una respuesta antitumoral**

**Tesis**

**Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De**

**Doctorado en Ciencias, mención Microbiología**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Claudia Julieta Robles Planells**

**Septiembre, 2018**

**Director de Tesis Dr: Claudio Acuña Castillo**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Claudia Julieta Robles Planells

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Ciencias, mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 13 de agosto de 2018.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Acuña

---

Co-Director de Tesis

Dr.

---

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Oscar León

---

Dra. Mónica Imarai

---

Dra. María Rosa Bono

---

Dr. Francisco Aguayo

---

*Dedicado a mis padres, hermanas y a mi compañero.*

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací el 17 de noviembre del 1987 en Santiago, Chile. Debido a la profesión de mi padre, Administrador de Aeropuertos, mis hermanas y yo nos criamos y realizamos nuestros estudios de enseñanza básica y media en distintas ciudades del País, desde Iquique a la Antártica. Entre los años 2006 y 2011 realicé mis estudios de Bioquímica en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. En el año 2012 entré al programa de Doctorado en Microbiología en la Universidad de Chile y el 2014 comencé mi tesis en el laboratorio del Dr. Claudio Acuña en la Universidad de Santiago de Chile (USACH).

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Director de Tesis el Dr. Claudio Acuña Castillo por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis bajo su tutela. A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Bioterapias de la Universidad de Santiago de Chile, en especial a Giselle Sánchez, Carlos Barrera y Valentina Galarce, por todos los buenos momentos vividos.

Al Doctor Elías Leiva Salcedo por sus invaluable consejos.

Al Doctor Felipe Rodríguez Tirado por estar siempre, gracias.

Finalmente, a la beca de Doctorado Nacional año 2012 y la beca de Apoyo de Tesis año 2015 otorgada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), cuyo financiamiento me permitió cursar el programa de Doctorado en ciencias, mención Microbiología y financió la realización de esta tesis.

## INDICE DE MATERIAS

	<b>Página</b>
<b>Portada</b>	i
<b>Dedicatoria</b>	ii
<b>Resumen biográfico</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice de materias</b>	v-viii
<b>Índice de tablas</b>	ix
<b>Índice de figuras</b>	x-xii
<b>Abreviaturas</b>	xiii-xvi
<b>Resumen</b>	xvii
<b>Abstract</b>	xviii
<b>Introducción</b>	1-9
1. Melanoma	1
2. Uso de proteínas de fusión viral como tratamiento antitumoral	2
3. Sistema inmune y cáncer	6
<b>Hipótesis</b>	10
<b>Objetivo general</b>	10
<b>Objetivos específicos</b>	10
<b>Materiales y Métodos</b>	11-21
1. Generación de nanopartículas	11
2. Caracterización de nanopartículas	11
2.1 Encapsulación del pDNA	12
a. Migración electroforética	12
b. Eficiencia de carga	12
2.2 Parámetros físicos	12

a. Tamaño	12
b. Carga superficial	12
c. Morfología	12
2.3 Citotoxicidad celular	12
a. Viabilidad celular	12
2.4 Funcionalidad	13
a. Eficiencia de transfección	13
3. Construcción de vectores con la secuencia codificante de las proteínas de fusión viral	13
4. Verificación de la expresión del mRNA por RT-PCR	14
5. Evaluación de fusión celular por microscopía confocal	15
5.1 Marcaje intracelular	15
5.2 Marcaje de microfilamentos de actina	15
5.3 Marcaje de membrana celular	16
6. Inmunocitoquímica para proteína ARV-p10	16
7. Citotoxicidad por expresión de proteínas virales	17
8. Animales	17
9. Inducción de tumor de melanoma y tratamiento	18
10. Evaluación de poblaciones linfocitarias	18
10.1 Extracción de esplenocitos y linfocitos infiltrantes de tumor	18
a. Ratones C57BL/6 Foxp3 <sup>GFP+</sup>	18
b. Ratones C57BL/6J tipo silvestre	19
10.2 Activación de linfocitos T	19
10.3 Citometría de flujo	20
a. Ratones C57BL/6 Foxp3 <sup>GFP+</sup>	20
b. Ratones C57BL/6J tipo silvestre	20
11. Análisis estadístico	21
<b>Resultados</b>	<b>22-61</b>

1. Nanopartículas de quitosano	22
2. Vectores de expresión para proteínas de fusión viral	27
3. Expresión de las proteínas hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F en células MDCK	28
4. Nanopartículas de quitosano y vectores de expresión	33
5. Expresión de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células tumorales por transfección con nanopartículas de quitosano	35
5.1 Expresión de transcritos de ARV-p10 e ISAV-F en células B16	35
5.2 Expresión de proteína ARV-p10 en células B16	36
5.3 Actividad fusogénica de ARV-p10 e ISAV-F en células B16	37
6. Citotoxicidad mediada por ARV-p10 e ISAV-F en células B16	40
7. Evaluación de la expresión intratumoral de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F con nanopartículas de quitosano sobre el crecimiento tumoral y el porcentaje de poblaciones linfocitarias en bazo y tumor de melanoma murino en ratones en ratones reporteros	42
7.1 Tratamiento intratumoral con NP-ARV	44
7.2 Tratamiento intratumoral con NP-ISAV	50
8. Efecto de la expresión intratumoral de las proteínas ARV-p10 con nanopartículas de quitosano sobre el crecimiento tumoral y el porcentaje de poblaciones linfocitarias en bazo y tumor de melanoma murino en ratones tipo silvestre	54
8.1 Tratamiento intratumoral con NP-ARV	55
<b>Discusión</b>	<b>62-70</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>71</b>
<b>Referencias</b>	<b>72-82</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Cantidad de pDNA y quitosano utilizada para la generación de los complejos	<b>11</b>
<b>Tabla 2</b> Secuencia de partidores específicos diseñados para la detección de transcritos de GAPDH, ARV-p10 e ISAV-F.	<b>15</b>
<b>Tabla 3</b> Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratone reporteros.	<b>45</b>
<b>Tabla 4</b> Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratones reporteros.	<b>50</b>
<b>Tabla 5</b> Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratones tipo silvestre.	<b>56</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> Caracterización de complejos quitosano/pcDNA3.1-GFP	<b>24</b>
<b>Figura 2</b> Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de quitosano/pcDNA3.1-GFP	<b>25</b>
<b>Figura 3</b> Eficiencia de transfección de nanopartículas de quitosano/pcDNA3.1-GFP	<b>26</b>
<b>Figura 4</b> Verificación de la presencia de la secuencia codificante de hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F en el vector pIRES	<b>28</b>
<b>Figura 5</b> Evaluación de actividad fusogénica de las proteínas de fusión viral en células MDCK: colocalización de fluoróforos	<b>30</b>
<b>Figura 6</b> Evaluación de actividad fusogénica de las proteínas de fusión viral en células MDCK: marcaje de microfilamentos de actina	<b>32</b>
<b>Figura 7</b> Caracterización de complejos quitosano/pIRES-hRSV, -ARV e -ISAV	<b>34</b>
<b>Figura 8</b> Detección de transcritos de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16	<b>36</b>
<b>Figura 9</b> Detección de la expresión de la proteína ARV-p10 en células B16 por inmunocitoquímica	<b>37</b>
<b>Figura 10</b> Evaluación de actividad fusogénica de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16	<b>39</b>
<b>Figura 11</b> Citotoxicidad producida por la expresión de ARV-p10 e ISAV-F en células B16	<b>41</b>
<b>Figura 12</b> Diseño experimental de ensayos <i>in vivo</i>	<b>43</b>

<b>Figura 13</b>	Inducción tumoral por desafío con células B16 vivas en ratones reporteros	<b>44</b>
<b>Figura 14</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones reporteros	<b>45</b>
<b>Figura 15</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones reporteros	<b>46</b>
<b>Figura 16</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones reporteros	<b>48</b>
<b>Figura 17</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones reporteros	<b>49</b>
<b>Figura 18</b>	Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones reporteros	<b>50</b>
<b>Figura 19</b>	Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones reporteros	<b>51</b>
<b>Figura 20</b>	Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones reporteros	<b>52</b>
<b>Figura 21</b>	Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones reporteros	<b>53</b>
<b>Figura 22</b>	Inducción tumoral por desafío con células B16 vivas en ratones tipo silvestre	<b>55</b>
<b>Figura 23</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones tipo silvestre	<b>56</b>
<b>Figura 24</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones tipo silvestre	<b>57</b>
<b>Figura 25</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ infiltrantes de tumor en ratones tipo silvestre	<b>58</b>

<b>Figura 26</b>	Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones tipo silvestre	<b>59</b>
<b>Figura 27</b>	Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones tipo silvestre	<b>60</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

<b>%DDA</b>	: <i>degree of deacetylation</i> , porcentaje de de-acetilación
<b>AAT</b>	: Antígeno Asociado a Tumor
<b>AcGlcN</b>	: N-acetil-D-glucosamina
<b>ACK</b>	: <i>Ammonium-chloride-potassium</i> , amonio-cloruro-potasio
<b>AFM</b>	: <i>Atomic force microscopy</i> , microscopía de fuerza atómica
<b>APC</b>	: <i>Antigen presenting cells</i> , célula presentadora de antígenos
<b>ARV</b>	: <i>Avian reovirus</i> , reovirus aviar
<b>B16</b>	: células de melanoma murino
<b>CBs-B16-ISAV</b>	: cellular bodies of B16 ISAV expressing cells, cuerpos celulares de células B16 que expresan ISAV
<b>CD28</b>	: <i>Cluster of Differentiation 28</i> , grupo de diferenciación 28
<b>CD4</b>	: <i>Cluster of Differentiation 4</i> , grupo de diferenciación 4
<b>CD45</b>	: <i>Cluster of Differentiation 45</i> , grupo de diferenciación 45
<b>CD8</b>	: <i>Cluster of Differentiation 8</i> , grupo de diferenciación 8
<b>CD80</b>	: <i>Cluster of Differentiation 80</i> , grupo de diferenciación 80
<b>CD86</b>	: <i>Cluster of Differentiation 86</i> , grupo de diferenciación 86
<b>CH</b>	: <i>Chitosan</i> , quitosano
<b>CH/DNA</b>	: <i>Chitosan-nucleic acid complex</i> , complejo quitosano-ácido nucleico
<b>CTL</b>	: <i>Cytotoxic T lymphocytes</i> , linfocitos T citotóxicos
<b>CTLA-4</b>	: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> , antígeno 4 del linfocito T citotóxico
<b>DABCO</b>	: 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octano
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamino-2-fenilindol
<b>DC</b>	: <i>Dendritic Cells</i> , célula dendrítica
<b>DMSO</b>	: Dimetilsulfóxido

<b>DNA</b>	: Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAsa</b>	: Desoxirribonucleasa
<b>ERK</b>	: <i>extracellular signal–regulated kinases</i> , quinasas reguladas por señales extracelulares
<b>FAST</b>	: <i>Fusion-Associated Small Transmembrane</i> , transmembrana pequeña asociada a fusión
<b>FITC</b>	: <i>fluorescein isothiocyanate fluorophore</i> , isotiocianato de fluoresceína
<b>FMG</b>	: <i>fusogenic membrane glycoprotein</i> , glicoproteína fusogénica de membrana
<b>Foxp3</b>	: <i>forkhead box P3 transcription factor</i> , factor de transcripción de células Treg
<b>FP</b>	: <i>fusion peptide</i> , péptido fusión
<b>GALV-F</b>	: <i>endogenous gibbon ape leukemia virus</i> , virus de la leucemia del mono Gibón
<b>GAPDH</b>	: <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase</i> , gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa
<b>GFP</b>	: <i>green fluorescent protein</i> , proteína fluorescente verde
<b>GlcN</b>	: D-glucosamina
<b>HBSS</b>	: <i>Hank's balanced salt solution</i> , solución salina balanceada de Hank
<b>HERV-W</b>	: <i>human endogenous retrovirus-W</i> , retrovirus W endógeno humano
<b>HP</b>	: <i>Hydrophobic peptide</i> , péptido hidrofóbico
<b>hRSV-F</b>	: <i>human respiratory syncytial virus fusion protein</i> , proteína de fusión del virus respiratorio sincicial humano
<b>i.t.</b>	: intratumoral
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	: Interferón alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	: Interferón gamma
<b>IL-17A</b>	: Interleuquina 17A
<b>IL-2</b>	: Interleuquina 2
<b>ISAV-F</b>	: <i>Infectious Salmon Anemia Virus Fusion protein</i> , proteína de fusión del virus de la anemia infecciosa del salmón
<b>kDa</b>	: kilo Dalton
<b>KHCO<sub>3</sub></b>	: Bicarbonato de potasio
<b>LDH</b>	: Lactato deshidrogenasa
<b>Lipo-ARV</b>	: Lipofectamina-proteína de fusión p10 de ARV

<b>Lipo-ISAV</b>	: Lipofectamina-proteína de fusión de ISAV
<b>MAPK</b>	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> , proteína quinasas activadas por mitógenos
<b>MDCK</b>	: <i>Madin-Darby Canine Kidney</i> , riñón canino Madin-Darby
<b>MHC-I</b>	: <i>Major Histocompatibility Complex I</i> , complejo mayor de histocompatibilidad I
<b>MHC-II</b>	: <i>Major Histocompatibility Complex II</i> , complejo mayor de histocompatibilidad II
<b>MiliQ</b>	: agua ultrapura
<b>mm</b>	: milímetros
<b>M-MLV</b>	: <i>Moloney murine leukemia virus</i>
<b>mRNA</b>	: ácido ribonucleico mensajero
<b>MTT</b>	: 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro
<b>mV</b>	: milivolt
<b>N/P</b>	: relación grupo -NH <sub>2</sub> del CH versus grupo -PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> del pDNA
<b>Na<sub>2</sub>EDTA</b>	: Dihidrato etilendiaminatetraacetato disódico
<b>NH<sub>2</sub></b>	: radical amino
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	: cloruro de amoníaco
<b>NK</b>	: <i>Natural Killer</i> , asesinos naturales
<b>nm</b>	: nanómetro
<b>NP</b>	: nanopartícula
<b>NP-ARV</b>	: nanopartícula con gen de proteína ARV-p10
<b>NP-ISAV</b>	: nanopartícula con gen de proteína ISAV-F
<b>OligodT</b>	: oligos de timina
<b>p10</b>	: proteína de fusión de ARV
<b>pb</b>	: pares de bases
<b>PBS</b>	: <i>Phosphate buffered saline</i> , tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	: <i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD-1</b>	: <i>Programmed cell death protein 1</i> , proteína 1 muerte celular programada
<b>PD-L1</b>	: <i>Programmed death-ligand 1</i> , ligando 1 de muerte programada
<b>PD-L2</b>	: <i>Programmed death-ligand 2</i> , ligando 2 de muerte programada

<b>pDNA</b>	: DNA plasmidial
<b>PE</b>	: <i>Phycoerythrin fluorophore</i> , fluorocromo ficoeritrina
<b>pGFP</b>	: <i>Green fluorescent protein plasmid</i> , plásmido expresión de proteína fluorescente verde
<b>pKa</b>	: logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
<b>PM</b>	: peso molecular
<b>PMA</b>	: <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> , éster de forbol
<b>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	: anión fosfato
<b>RORγt</b>	: <i>Retinoic acid-related orphan receptor gamma</i> , receptor gamma huérfano asociado a ácido retinoico
<b>RPMI</b>	: <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> , medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RT-PCR</b>	: <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> , transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa
<b>s.c.</b>	: Subcutáneo
<b>SFB</b>	: Suero fetal bovino
<b>TAE</b>	: Tris-acetato-EDTA
<b>Tbet</b>	: factor de transcripción de células Th1
<b>TCR</b>	: <i>T cell receptor</i> , receptor de célula T
<b>Th1</b>	: <i>helper 1 T cell</i> , linfocito T colaborador 1
<b>Th17</b>	: <i>helper 17 T cell</i> , linfocito T colaborador 17
<b>TIL</b>	: <i>T infiltrated lymphocytes</i> , linfocitos infiltrantes de tumor
<b>TNF</b>	: <i>Tumor necrosis factor</i> , factor de necrosis tumoral
<b>Treg</b>	: linfocitos T reguladores
<b>VD</b>	: Vector Desnudo
<b>VTM</b>	: Volumen Tumoral Máximo

## RESUMEN

El melanoma maligno es un tipo de cáncer a la piel de baja incidencia, pero elevada tasa de mortalidad, por ello continúa la búsqueda de terapias complementarias para su tratamiento. La viroterapia antitumoral aprovecha la destrucción celular que producen algunos virus durante su ciclo infectivo, para eliminar las células tumorales. Sin embargo, a pesar de los promisorios resultados, esta terapia produce efectos adversos debido a la utilización de virus activos. El uso de proteínas virales, como las proteínas de fusión viral, han sido evaluadas como una alternativa en diversas estrategias antitumorales, ya que inducen la formación de sincicios altamente inestables que llevan a una muerte celular capaz de activar a células el sistema inmune *in vitro*. Sin embargo, la expresión intratumoral de este tipo de proteínas y su efecto modulador en una respuesta inmune antitumoral *in vivo*, aún no se ha estudiado en detalle.

En este estudio, se evaluó y caracterizó el efecto de la expresión de la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial humano (hRSV), del reovirus aviar (ARV) y del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV) en células de melanoma murino. Se sintetizaron nanopartículas homogéneas utilizando quitosano y vectores de expresión para las proteínas ARV-p10 (NP-ARV) e ISAV-F (NP-ISAV). La expresión de ambas proteínas mediante la transfección con nanopartículas *in vitro* produjo la formación de sincicios a las 48 horas post-transfección, y un efecto citotóxico a las 120 horas en el caso de NP-ARV y a partir de las 48 horas post-transfección para NP-ISAV.

El tratamiento intratumoral de tumores de melanoma con NP-ARV y NP-ISAV indujo un retraso en el crecimiento tumoral e incluso casos de regresión completa del tumor, además de un aumento de linfocitos Th1 sistémicos para NP-ARV. Resultados similares fueron obtenidos tras el tratamiento intratumoral con una suspensión de quitosano (CH), sugiriendo un papel inmunomodulador antitumoral.

Por lo tanto, en melanoma murino 1)- la expresión de ARV-p10 e ISAV-F utilizando nanopartículas de quitosano como método de transfección produce la muerte celular mediada por la formación de sincicios *in vitro* y 2)- el tratamiento intratumoral con CH, NP-ARV y NP-ISAV produce un control del desarrollo del tumor, posiblemente mediado por una respuesta inmune antitumoral de tipo Th1.

## ABSTRACT

Malignant melanoma is a type of skin cancer with low incidence, but a high mortality rate. Therefore, the search for complementary therapies for its treatment continues. The antitumor virotherapy takes advantage of the cellular destruction that some viruses produce during their infective cycle, to eliminate the tumor cells. However, despite the promising results, this therapy produces adverse effects due to the use of active viruses. The use of viral proteins, such as viral fusion proteins, have been evaluated as an alternative in various antitumor strategies, since they induce the formation of highly unstable syncytia that lead to cell death capable of activating the immune system cells *in vitro*. However, intratumoral expression of this type of proteins and its modulating effect on an antitumor immune response *in vivo* has not yet been studied in detail.

In this study, the effect of expression of fusion protein of human respiratory syncytial virus (hRSV), avian reovirus (ARV) and infectious salmon anemia virus (ISAV) on murine melanoma cells was evaluated and characterized. Homogeneous nanoparticles were synthesized using chitosan and expression vectors for the ARV-p10 (NP-ARV) and ISAV-F (NP-ISAV) proteins. The expression of both proteins by transfection with nanoparticles *in vitro* produced the formation of syncytia at 48 hours post-transfection, and a cytotoxic effect at 120 hours in the case of NP-ARV and after 48 hours post-transfection for NP-ISAV.

Intratumoral treatment of melanoma tumors with NP-ARV and NP-ISAV induced a delay in tumor growth and even cases of complete regression of the tumor, in addition to an increase in systemic Th1 lymphocytes for the case of NP-ARV. Comparable results were obtained after intratumoral treatment with a suspension of chitosan (CH), suggesting an antitumor immunomodulatory role.

Therefore, in murine melanoma 1)- the expression of ARV-p10 and ISAV-F using chitosan nanoparticles as transfection method produces cell death mediated by the formation of syncytia *in vitro* and 2)- the intratumoral treatment with CH, NP-ARV and NP-ISAV produce a control of tumor development, possibly mediated by a Th1 type antitumor immune response.

## INTRODUCCION

### 1. Melanoma.

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, donde en Chile es la segunda causa de muerte por enfermedades no transmisibles que es liderada por las patologías cardiovasculares (©OMS|Cancer. 2014). De los tipos de cáncer que afectan a la piel, el melanoma maligno es el causante del 75% de las muertes a pesar de corresponder sólo al 1% de los casos diagnosticados dentro de esta categoría (American Cancer Society. 2016). Este cáncer se origina en los melanocitos, los que corresponden a las células productoras de pigmento (melanina) que se localizan en distintas zonas de nuestro organismo. Este cáncer posee una mayor incidencia en piel y en menor medida en zonas como el tracto gastrointestinal, ojos, pulmones y mucosa genital y oral (Ethesda. 2017). El melanoma se clasifica en cinco estadios generales (0, I, II, III y IV) que dependen del grosor del tumor (escala de Breslow), presencia de ulceración, existencia de diseminación del tumor a los ganglios linfáticos cercanos y a zonas del cuerpo distantes, es decir metástasis (Ethesda. 2017). Estos parámetros físicos (localización y estadio) sumados a parámetros fisiológicos y genéticos, como los niveles de Lactato Deshidrogenasa en sangre (indicador de progreso de la enfermedad) y el tipo de mutación génica presente en los melanocitos, además del estado de salud general del paciente, son determinantes en la prognosis y el tipo de tratamiento a utilizar (Buchbinder y Flaherty. 2016; Bethesda. 2017). La escisión quirúrgica seguida por radioterapia y quimioterapia se encuentra entre los principales tratamientos de elección, sin embargo, dada su baja eficiencia en estadios avanzados, son actualmente complementados con tratamientos de terapia dirigida e inmunoterapia. Un ejemplo de terapia dirigida corresponde al uso de inhibidores de la vía MAPK/ERK, cuya sobre activación es crucial en la proliferación y metástasis de las células de melanoma. La inhibición de esta vía no siempre es efectiva, debido a que puede llevar a su propia hiperactivación paradójica o incluso a la

activación de vías alternativas, que pueden provocar el desarrollo de neoplasias secundarias (Burotto, Chiou, y cols. 2014; Rozeman, Dekker, y cols. 2017). Por otra parte, el uso de tratamientos de inmunoterapia basados en la inducción de la respuesta inmune mediante el tratamiento con citoquinas recombinantes como Interleuquina 2 (IL-2) e Interferón- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) producen la proliferación inespecífica y la acción de linfocitos que regulan negativamente el desarrollo del tumor. Sin embargo, este tratamiento se asocia a efectos secundarios, como fiebre, escalofríos, fatiga, mialgias, deterioro psicocognitivo y eventos autoinmunes (Eggermont y Schadendorf. 2009; Bhatia, Tykodi, y cols. 2009; Garbe, Eigentler, y cols. 2011). Otra estrategia utilizada se basa en el uso de anticuerpos contra puntos de control inmunitarios, con el objetivo de regular la activación o inactivación de una respuesta inmune efectora. Se han utilizado por ejemplo, anticuerpos que bloquean la interacción entre receptores CTLA-4 y PD-1 (presentes en la superficie de los linfocitos T) y sus ligandos B7 (presentes en células presentadoras de antígenos) y PD-L1 y PD-L2 (presentes en células inmunes y no inmunes, como células de melanoma), respectivamente, los cuales actúan inhibiendo la activación y acción efectora de los linfocitos (Buchbinder y Desai. 2016). A pesar de poseer una tasa de respuesta global de 11-19% (anti-CTLA-4) y de 40-44% (anti-PD-1), estos tratamientos resultan tóxicos e incluso fatales, en un número considerable de los pacientes tratados (Rozeman, Dekker, y cols. 2017). Debido a la amplia diversidad de respuesta frente a los distintos tratamientos, la búsqueda de nuevas drogas o tratamientos contra el melanoma resulta necesaria. Es por ello que desde el año 2007 existe la Alianza de Investigación de Melanoma (MRA) enfocada en la búsqueda de herramientas de prevención, diagnóstico, estadificación y tratamiento del melanoma (Melanoma Research Alliance. 2017).

## **2. Uso de proteínas de fusión viral como tratamiento antitumoral.**

En los últimos años, la Viroterapia ha sido utilizada para el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Esta se basa en la destrucción celular que producen algunos virus durante su ciclo

infectivo (Vile, Ando, y cols. 2002). Una de las principales problemáticas asociadas a esta terapia es la necesidad de utilizar virus completos y activos lo que genera una elevada inmunogenicidad e inespecificidad en la infección, transformándola en una terapia riesgosa. Estas complicaciones han llevado al desarrollo de estrategias basadas en la expresión de proteínas en la superficie viral o el uso de promotores específicos de células tumorales que aseguren el oncotropismo, convirtiéndola en una terapia técnicamente compleja y de alto costo (Singh, Doley, y cols. 2012; Pol, Bloy, y cols. 2013).

Un mecanismo de citotoxicidad viral se asocia a la expresión de proteínas con actividad fusogénica en el hospedero, cuya acción lleva a la formación de células multinucleadas (sincicios) altamente inestables (Avendaño y M. Ferrés. 2011). En el caso de virus envueltos, estas proteínas se clasifican como glicoproteínas fusogénicas de membrana (FMGs). Las FMGs se localizan en la membrana de la envoltura viral y median la entrada del virus a la célula por fusión entre esta membrana y la membrana celular, o entre la membrana viral y la membrana endosomal si la actividad de la proteína depende de una disminución de pH (White, Delos, y cols. 2009). En algunos casos durante la replicación viral, la expresión de proteínas de fusión en la membrana celular, previo a la formación de la partícula viral, produce la fusión de la célula infectada con células vecinas y con ello la consecuente formación de sincicios (White, Delos, y cols. 2009). De este modo, se ha planteado la utilización de sólo estas proteínas fusogénicas como alternativa al uso de virus completos para inducir la formación de sincicios y la consiguiente destrucción de las células tumorales. En modelos tumorales humanos de hepatocarcinoma, melanoma y fibrosarcoma *in vitro*, la expresión de la proteína de fusión del Virus de la Leucemia del mono Gibón (GALV-F) produce muerte celular mediada por la formación de sincicios y la liberación de vesículas extracelulares tipo exosomas, llamados sinciciomas (Higuchi, Bronk, y cols. 2000; Bateman, Bullough, y cols. 2000; Bateman, Harrington, y cols. 2002). De forma similar, el tratamiento intratumoral en ratones inmunodeficientes que portan tumores derivados de carcinoma de pulmón humano, con los genes que codifican la proteína GALV-F o la proteína F del retrovirus W endógeno humano (HERV-W), muestra un importante retraso en el crecimiento

tumoral (Lin, Salon, y cols. 2009). Los sinciciomas liberados *in vitro* por células de melanoma humano (Mel888 y Mel624) que expresan la proteína GALV-F actúan como fuente antigénica tumoral, activando linfocitos T CD8+ mediante presentación cruzada de gp100, un antígeno asociado a melanoma y expresado en dichas líneas celulares (Bateman, Harrington, y cols. 2002). En conjunto, estos antecedentes respaldan la idea de que la expresión de proteínas de fusión viral en células tumorales provocaría la muerte de estas por medio de la formación de sincicios, y la posterior liberación de sinciciomas cargados con antígenos tumorales, lo que provocaría la activación del sistema inmune llevando a la inducción de una respuesta inmune antitumoral (Bateman, Harrington, y cols. 2002; Zhu, Yang, y cols. 2014).

Con la idea de buscar nuevas alternativas a las proteínas de fusión viral ya existentes, en nuestro laboratorio se ha evaluado la acción fusogénica *in vitro* de proteínas de fusión viral de diversos virus. Una de ellas es la proteína de fusión del virus respiratorio sincicial humano (hRSV-F). hRSV-F forma parte de la partícula viral ubicándose en la envoltura del virus y es necesaria para la entrada del virus a la célula mediante su unión al receptor celular. Esta unión, produce su activación que lleva a la fusión entre la membrana viral y la celular, liberando el contenido del virus al citoplasma (Griffiths, Drews, y cols. 2017). Esta proteína es una FMG clasificada como una proteína de fusión de tipo I, sintetizada como un precursor inactivo que requiere de un corte por una proteasa celular, necesario para su posterior activación (Colman, Lawrence, y cols. 2003). Como miembro de este grupo de proteínas de fusión, posee una secuencia hidrofóbica, conocida como péptido de fusión (FP) ubicado en la región amino terminal, el cual es insertado en la membrana blanco para iniciar el acercamiento de las membranas facilitando su fusión (Harrison. 2015). En etapas posteriores del ciclo infeccioso, la proteína hRSV-F es transportada a la superficie celular para el ensamblaje de las nuevas partículas virales. Desde aquí puede fusionar la membrana de la célula infectada con la de células adyacentes dando lugar a la formación de sincicios que aumentan la difusión horizontal de la infección (Walsh y Hruska. 1983).

Un segundo candidato, es la proteína de fusión del virus de la anemia infecciosa del

salmón (ISAV-F). Esta corresponde a una proteína estructural ubicada en la envoltura del virus asociada a la proteína Hematuglinina-esterasa (HE), encargada del reconocimiento del receptor en la célula blanco necesario para iniciar la infección. La unión del virus a la célula gatilla que la partícula viral sea internalizada en endosomas, donde en respuesta a una disminución de pH local, la proteína ISAV-F media la fusión de la membrana viral con la endosomal, liberando el contenido viral al citoplasma (Eliassen, Frøystad, y cols. 2000). La adición de tripsina al medio de cultivo durante la replicación de ISAV ha demostrado tener un efecto beneficioso en la producción de partículas virales infectivas (Falk, Namork, y cols. 1997), sugiriendo que la replicación de ISAV depende de una activación proteolítica extracelular para ejercer infectividad. Esto radica en el hecho de que la proteína ISAV-F al igual que hRSV-F, corresponde a una proteína de fusión de membranas de tipo I, por lo que requiere de un corte proteolítico previo a su activación por una disminución de pH (Aspehaug, Mikalsen, y cols. 2005). Su mecanismo de fusión es propio de las proteínas de su categoría, como el descrito para la proteína hRSV-F.

Una tercera proteína, llamada p10, es codificada en el genoma del reovirus aviar (ARV), un virus que carece de envoltura. La proteína ARV-p10 corresponde a una proteína no estructural expresada y transportada a la membrana de la célula infectada en etapas tardías del ciclo viral en una topología de tipo 1, es decir, un dominio central hidrofóbico transmembrana que separa dos dominios de igual tamaño: ectodominio y endodominio (Shmulevitz y Duncan. 2000). Su función es producir la fusión de la membrana de la célula infectada con la membrana de las células vecinas, aumentando la tasa de propagación horizontal del virus (Duncan, Chen, y cols. 1996; Bodelón, Labrada, y cols. 2002). Su acción fusogénica la clasifica como una proteína pequeña de membrana asociada a fusión (FAST, Fusion-Associated Small Transmembrane) (Ciechonska y Duncan. 2014), la cual no necesita de un proceso de activación previo (disminución de pH o unión a receptor) para mediar la fusión celular, debido a que se expresa en la membrana celular en una conformación activa. Esto se debe a que el péptido hidrofóbico (HP; análogo a FP) se encuentra expuesto y libre para ser insertado en la membrana blanco dando inicio a la fusión de las membranas y a la consiguiente formación de sincicios (Shmulevitz, Corcoran, y cols. 2004;

Boutillier, and Duncan. 2011). Finalmente, estos sincicios sufren alteraciones que llevan a su muerte, liberando la nueva progenie viral favoreciendo la diseminación de la infección a nivel sistémico (Duncan, Chen, y cols. 1996; Bodelón, Labrada, y cols. 2002; Salsman, Top, y cols. 2005). Así, la acción de p10 clasifica a este virus como uno de los pocos virus sin envoltura que inducen fusión célula-célula y por tanto, capaz de producir la formación de sincicios (Duncan. 1999).

Estos antecedentes proponen a las proteínas de fusión de hRSV, ISAV y ARV como candidatas para ser expresadas en tumores, con el fin de generar una muerte celular localizada mediada por la formación de sincicios que traduzca en un control del crecimiento tumoral.

### **3. Sistema inmune y cáncer**

Diversos estudios evidencian que el sistema inmunológico es clave para el desarrollo de una respuesta antitumoral (Dunn, Old, y cols. 2004; Vesely, and Schreiber. 2013). Esto se respalda por el hecho de que tratamientos con quimioterapéuticos y radioterapia son efectivos cuando se asocian a una potente inducción de una respuesta inmunológica (Medler, Cotechini, y cols. 2015).

Una de las características de la inestabilidad genómica de las células cancerígenas es llevar a la expresión génica aberrante o la expresión de proteínas mutadas que lleva a la generación de Antígenos asociados a tumor (AATs) (Paschen. 2009). En el microambiente tumoral estos AATs son presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) de las células tumorales, pudiendo ser reconocidos por el receptor de los linfocitos T (TCR) del subtipo CD8+, pudiendo en teoría, inducir su acción citotóxica sobre la célula tumoral. Por otra parte, las proteínas liberadas al medio extracelular por células tumorales viables, muertas o restos celulares, son endocitadas y procesadas por células presentadoras de antígenos (APCs) profesionales y presentadas por moléculas de MHC de clase II a células T CD4+, lo que gatillaría la acción de células efectoras secretoras de diversas citoquinas que potencian la destrucción

tumoral (Abbas, Lichtman, y cols. 1999; Hadrup, Donia, y cols. 2013).

Mediante el mecanismo planteado debería desencadenarse una respuesta inmune antitumoral, sin embargo, para generar este tipo de respuesta es necesaria la activación previa de linfocitos antígeno específicos. Esto se produce cuando células T vírgenes que son capaces de reconocer a un antígeno específico, pero que no han tenido contacto con el anteriormente, son activadas por medio de dos señales (Smith-Garvin, Koretzky, y cols. 2009). La primera corresponde al reconocimiento del antígeno presentado por las moléculas MHC-I o MHC-II, que se encuentran en la superficie de las APCs, por los TCR presentes en los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) o células T CD4+ (helper), respectivamente (Neefjes, Jongsma, y cols. 2011). La segunda señal (señal de coestimulación) consiste en la interacción entre una molécula de coestimulación como CD28 presente en el linfocito y su ligando B7-1 y B7-2 (también llamados CD80 y CD86) presente en las APCs (Chen, and Flies. 2013). Ambas señales deben ocurrir simultáneamente, ya que en presencia de la primera pero ausencia de la segunda, las células T se vuelven anérgicas (no activas) o mueren (Smith-Garvin, Koretzky, y cols. 2009). Debido a que las células tumorales no expresan moléculas de coestimulación, pero si moléculas MHC, se promueve un estado de tolerancia inmunológica frente antígenos tumorales lo que favorece el desarrollo del tumor (Thibodeau, Bourgeois-Daigneault, y cols. 2012).

En una eficiente respuesta inmune antitumoral la acción CD8+ citotóxica (CTLs) es crucial, debido a que destruye directamente las células potencialmente malignas por medio de la exocitosis de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzima o indirectamente a través de la secreción de citoquinas, incluido el interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Abbas, Lichtman, y cols. 1999; Durgeau, Virk, y cols. 2018). Por ello, en tumores sólidos como el melanoma, el nivel de linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) de tipo CTLs se asocia directamente con un mejor pronóstico (Peske, Woods, y cols. 2015). Por otra parte, los mecanismos inductores y reguladores de la respuesta inmune celular mediados por la acción de los linfocitos T CD4+, dependen de la diferenciación de estos en subpoblaciones *helper* (Th1 y Th17, entre otras) o

reguladoras (Treg). La subpoblación Th1 promueve una respuesta inmune antitumoral mediada por la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$  e IL-2, que inducen la maduración de células dendríticas (DCs) al aumentar la expresión de MHC-I y II y promueven la activación de células T CD8+ y CD4+ (Knutson, and Disis. 2005; Kennedy, and Celis. 2008; Bailey, Nelson, y cols. 2014). De forma contraria, la subpoblación Treg suprime la inmunidad antitumoral por medio de la secreción de citoquinas como IL-10 y TGF- $\beta$  y la expresión constitutiva de CTLA-4, que inhiben la acción de las APCs y la activación de linfocitos T, volviéndolos tolerogénicos (Mougiakakos, Choudhury, y cols. 2010; Bailey, Nelson, y cols. 2014; Tanaka, and Sakaguchi. 2016). Este tipo celular y su incremento a nivel sistémico, se correlaciona además con un mal pronóstico en pacientes (Mougiakakos, Choudhury, y cols. 2010). Por su parte, los linfocitos Th17 poseen una acción controversial, siendo pro o antitumoral dependiendo del tipo de cáncer, terapia utilizada y estímulo al que las células son expuestas durante su activación (Bailey, Nelson, y cols. 2014). En melanoma se asocian a una respuesta antitumoral, debido a la secreción de IL-17A e IL-2 que promueven el reclutamiento de DCs al tumor, y la activación y expansión de linfocitos CD8+ (Muranski, Boni, y cols. 2008; Diller, Kudchadkar, y cols. 2016).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y, que la proteína de fusión de GALV-F induce la activación de la respuesta inmune específica contra melanoma *in vitro*, es que en este estudio se propuso evaluar el efecto de la expresión de proteínas de fusión viral en tumores de melanoma murino. Como estrategia de transfección se utilizaron nanopartículas de quitosano (CH), polisacárido lineal compuesto por distintas relaciones de unidades de D-glucosamina (GlcN) y N-acetil-D-glucosamina (AcGlcN) unidas por enlaces  $\beta(1-4)$ , lo que les confiere diversidad en cuanto a peso molecular (PM) y porcentaje de GlcN o grado de deacetilación (%DDA) (Agirre, Zarate, y cols. 2014). Este polímero es obtenido a partir de la deacetilación alcalina de la quitina, polisacárido presente en el exoesqueleto de crustáceos, artrópodos marinos, insectos y también en la pared celular de algunos hongos (Nwe, Furuike, y cols. 2009; Buschmann, Merzouki, y cols. 2013). Debido a sus propiedades biológicas favorables como biocompatibilidad, biodegradabilidad, inocuidad y bioadhesividad, ha sido utilizado como excipiente farmacéutico

para la administración de diversos fármacos (Rodrigues, Dionísio, y cols. 2012; Lungu, Neculae, y cols. 2015). Además, su carga positiva le permite unir electrostáticamente el DNA de carga negativa, formando complejos CH/DNA con características de nanopartículas que poseen un nivel de eficiencia de transfección medio y una baja toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, incluso a altas concentraciones (Kean, and Thanou. 2010; Buschmann, Merzouki, y cols. 2013). Gracias a estas características el CH ha sido estudiado como vector no viral para introducir material genético foráneo en distintos tipos celulares (Lai, and Lin. 2009; Xu, Wang, y cols. 2010; Buschmann, Merzouki, y cols. 2013).

## **HIPÓTESIS**

La expresión de las proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial humano, del reovirus aviar o del virus de la anemia infecciosa del salmón en células de melanoma utilizando nanopartículas de quitosano como método de transfección, produce 1)- un efecto citotóxico mediado por la formación de sincicios *in vitro* y 2)- un control del crecimiento tumoral asociado a la inducción de una respuesta inmune antitumoral *in vivo*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de la expresión de las proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial humano, reovirus aviar y del virus de la anemia infecciosa del salmón, utilizando nanopartículas de quitosano como método de transfección, sobre la viabilidad celular *in vitro* y el crecimiento tumoral *in vivo* en el modelo de melanoma murino B16.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la expresión de las proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial humano, reovirus aviar y del virus de la anemia infecciosa del salmón utilizando nanopartículas de quitosano como método de transfección, en la línea celular de melanoma murino B16.
2. Caracterizar el efecto del tratamiento intratumoral con nanopartículas de quitosano y vectores de expresión para las proteínas de fusión del virus respiratorio sincicial humano, reovirus aviar y del virus de la anemia infecciosa del salmón, sobre el crecimiento tumoral y las poblaciones linfocitarias asociadas a una respuesta inmune antitumoral en melanoma murino B16.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. Generación de nanopartículas

Se generaron complejos por el método de coacervación (Sun, Zhang, y cols. 2012) utilizando quitosano (Sigma, facilitado por la Dra. Silvia Matiacevich, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile) y el vector pcDNA3.1-GFP. El quitosano utilizado poseía un grado de deacetilación entre 75-85% y un bajo peso molecular (50,000-190,000 Da). Se preparó una solución de quitosano al 0.25% en ácido acético, pH 5.5. A partir de esta se realizó una mezcla de quitosano y DNA plasmidial (pDNA) en agua MiliQ, la cual se incubó por 5 min a 55°C y luego por un mínimo de 30 min a temperatura ambiente hasta su utilización. Se mantuvo constante la cantidad de pDNA y se varió la cantidad de quitosano (Tabla 1), generando relaciones N/P (grupo -NH<sub>2</sub> del CH versus grupo -PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> del pDNA) de 4, 20, 28 y 40 (Fórmula 1, donde PM corresponde al peso molecular.).

$$N/P = (\mu g CH)(PM pDNA)/(PM CH)(\mu g pDNA)$$

Fórmula 1

**Tabla 1: Cantidad de pDNA y quitosano utilizada para la generación de los complejos.**

Relación N/P*	4	20	28	40
Quitosano (μg)	6,1	30,5	42,7	61
pDNA (μg)	2,5	2,5	2,5	2,5

\*Para cada relación N/P el volumen de quitosano y pDNA fue de 100 μl.

### 2. Caracterización de nanopartículas

Los complejos de quitosano/pDNA previamente sintetizados a las distintas relaciones N/P fueron caracterizados en base a los siguientes parámetros:

## 2.1 Encapsulación del pDNA.

- a. **Migración electroforética:** se evaluó el retardo en la migración electroforética del pDNA acomplejado por el quitosano en comparación al pDNA libre, utilizando un gel de agarosa al 0.8% en buffer TAE, teñido con Gel Red (Biotium).
- b. **Eficiencia de carga:** la suspensión de los distintos complejos fue centrifugada a 14000 g por 10 min y se cuantificó el pDNA presente en el sobrenadante utilizando el equipo Tecan Infinite 200pro. Se determinó el porcentaje de pDNA acomplejado, en base a la cantidad de pDNA inicial con que se generaron los complejos (2,5 µg) y a la cantidad de pDNA presente en el sobrenadante (pDNAsn) según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ pDNA encapsulado} = (2.5 \mu\text{g} - \text{pDNAsn } \mu\text{g})100 / (2.5 \mu\text{g}) \quad \text{Fórmula 2}$$

## 2.2 Parámetros físicos:

- a. **Tamaño:** se midió el diámetro de los complejos en una suspensión de 1 ml utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido).
- b. **Carga superficial:** se determinó el valor del potencial zeta, como medida de la carga superficial del complejo, utilizando el equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Reino Unido).
- c. **Morfología:** se observó la morfología de los complejos en suspensión sintetizados a una relación N/P de 20 y 28, por microscopía de fuerza atómica (AFM) con el Equipo NanoScope IIIa Multimode (Digital Instruments, USA).

## 2.3 Citotoxicidad celular:

- a. **Viabilidad celular:** 3,5x10<sup>4</sup> células B16 fueron tratadas con los complejos quitosano/pDNA y se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo MTT (Sigma-Aldrich, M2128) a las 24, 48

y 120 horas (Twentyman, and Luscombe. 1987), midiendo la absorbancia a 570 nm utilizando el equipo Infinite M200 Pro (Tecan, Suiza). El valor de absorbancia de las células no tratadas (control), fue utilizado como 100% de viabilidad.

## **2.4 Funcionalidad:**

**a. Eficiencia de transfección:**  $5 \times 10^4$  células HEK-293 (células embrionarias de riñón humano) y  $5 \times 10^4$  células tumorales B16 fueron tratadas con una suspensión de los complejos de quitosano/pcDNA3.1-GFP sintetizados a las distintas relaciones N/P. La eficiencia de transfección se evaluó por citometría de flujo utilizando el equipo BD Accuri C6 (BD Bioscience, USA) 48 horas post-tratamiento, determinando el porcentaje de células positivas para GFP con relación a células sin tratar. Como control positivo de transfección se utilizó lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668027) y como control negativo el pcDNA3.1-GFP desnudo.

## **3. Construcción de vectores con la secuencia codificante de las proteínas de fusión viral.**

Las secuencias que codifican para la proteína F del virus sincicial respiratorio humano (hRSV-F), la proteína p10 del reovirus aviar (ARV-p10) y la proteína F del virus de la anemia infecciosa del salmón (ISAV-F) insertas en el vector pUC57, fueron subclonadas en el vector de expresión comercial para células eucariontes pIRES2 (BD Biosciences Clontech, PT3267-5) cuya expresión génica es comandada por el promotor de citomegalovirus ( $P_{CMV}$ ). Para esto, se utilizaron las enzimas de restricción EcoRI y XhoI (Fermentas, FD0274 y FD0694, respectivamente) y la enzima T4 ligasa (Promega, M1801), bajo las recomendaciones del fabricante. Los productos de ligación fueron utilizados para transformar bacterias *Escherichia coli* (*E. coli*) Dh5 $\alpha$ , las cuales se sembraron en medio sólido Luria Bertani (LB, MO BIO Laboratories, Inc, 12106-1) con 100  $\mu$ g/ml de kanamicina, para la posterior selección de las colonias positivas por PCR utilizando GoTaq DNA Polymerase (Promega, M7122). Se realizó una purificación plasmidial con Plasmid Mini kit II

(E.Z.N.A. OMEGA) a partir de un cultivo líquido de las colonias seleccionadas. Se corroboró la presencia de los insertos por digestión de los plásmidos con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI y por PCR utilizando partidores que hibridan en las regiones flanqueantes del sitio de multiclonamiento del vector (Fw: 5'-GGCGGTAGGCGTGTA-3' y Rv: 5'-CCTCACATTGCCAAAAGACG-3'). Los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV obtenidos fueron utilizados en los análisis posteriores para la expresión de estas proteínas en células B16 tumorales.

#### **4. Verificación de la expresión del mRNA por RT-PCR**

Se evaluó la expresión del mRNA de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16 transfectadas con nanopartículas de quitosano conteniendo los plásmidos pIRES-ARV o pIRES-ISAV sintetizadas en una relación N/P de 20, mediante RT-PCR convencional. Se utilizó Lipofectamina (Invitrogen, 11668027) como control positivo de transfección. Tras 48 horas se recolectaron las células y se extrajo el RNA total con Trizol® Reagent (Gibco, 15596026) según las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, 1 µg de RNA total fue tratado con DNAsa (RQ1 Dnasa libre de Rnasa Promega, M610A) por 30 min a 37°C, para eliminar las trazas de DNA residual. Este RNA fue utilizado para la síntesis de cDNA, usando transcriptasa reversa M-MLV y OligodT15 (Promega, C1101) según las instrucciones del fabricante. Los transcritos de cada proteína fueron detectados por PCR con partidores específicos diseñados para cada secuencia, utilizando como transcrito de expresión constitutiva, el de la enzima Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Tabla 2). El producto obtenido fue observado en un gel de agarosa al 1%, teñido con Gel Red (Biotium, 41002).

**Tabla 2: Secuencia de partidores específicos diseñados para la detección de transcritos de GAPDH, ARV-p10 e ISAV-F.**

Transcrito	Secuencia (Fw/Rv) (5'- 3')	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Amplicón (pb)
GAPDH	TCGGTGTGAACGGATTTGGC	58.2	20	149
	TTTGCCGTGAGTGGAGTCATACTG	58.9	24	
ARV	CAGGGTCATGTAACGGAGCTA	56.3	21	143
	CAGCAGGAATCCTCCTCCAGC	59.9	21	
ISAV	ATCGAAGCTTATGGCATTCTGACTAT	57.9	27	148
	CCTGGTGCACCTTCGGACG	58.9	18	

## 5. Evaluación de fusión celular por microscopía confocal:

### 5.1 Marcaje intracelular.

Células MDCK a una confluencia del 40-60% fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668027) con 1.6 µg de los plásmidos pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras 24 horas, las células fueron marcadas con Cell Tracker™ Green CMFDA (Invitrogen, C7025) y se cocultivaron durante 24 horas en cubreobjetos, en una relación 1:1 con células MDCK sin transfectar marcadas con Cell Tracker™ Red CMTPX (Invitrogen, C34552). Ambos marcajes fueron realizados según las recomendaciones del fabricante. Las células fueron observadas por microscopía confocal.

### 5.2 Marcaje de microfilamentos de actina.

Células MDCK sembradas en cubreobjetos y a una confluencia de 40-60%, fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668027) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con 0,5 µg de los plásmidos pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV. Tras 48 horas, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con para-formaldehído al 1% por 15 min, permeabilizadas con Triton X-100 0,1% por 5 min, lavadas con PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4) e incubadas con Phalloidin-Fluorescein isothiocyanate

(Sigma, P5282-1MG) por 15 min en oscuridad. Posterior a este marcaje, las células fueron incubadas por 5 min con DAPI 0,5 mg/ml para la detección del núcleo. Los cubre objetos fueron montados en porta objetos con DABCO y se observaron al microscopio confocal LSM 700 Zeiss (Universidad de Chile).

### **5.3 Marcaje de membrana celular.**

Células B16 sembradas en cubreobjetos y a una confluencia de 40-60%, fueron transfectadas utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668027) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, con 0,5 µg de los plásmidos pIRES-ARV y pIRES-ISAV o con NPs sintetizadas a una relación N/P de 20 conteniendo 2,5 µg de cada uno de los plásmidos. A las 48 horas post-transfección, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con la sonda CellMask Orange plasma membrane stain (Life technologies, C10045) según las recomendaciones del fabricante, luego fijadas con para-formaldehído al 3,75% por 30 min a 37°C y finalmente, incubadas con DAPI 0,5 mg/ml por 5 min. Los cubre objetos fueron montados en porta objetos con DABCO y se observaron al microscopio confocal LSM 800 Zeiss (Universidad de Santiago de Chile).

### **6. Inmunocitoquímica para proteína ARV-p10.**

Células B16 a una confluencia de 40-60% fueron transfectadas con NPs de quitosano y pIRES-ARV (relación N/P de 20) y lipofectamina (Invitrogen, 11668027). A las 48 horas post-transfección, las células fueron lavadas con PBS, fijadas con para-formaldehído al 4% por 10 min, permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PBS por 10 min y bloqueadas con suero de cabra al 10% en PBS por 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubó con un suero policlonal de conejo anti-p10 de ARV (Donado gentilmente por el Dr. Roy Duncan, Dalhousie University, Nueva Escocia) a una dilución de 1:500 en suero de cabra al 10% a 4°C durante toda una noche con agitación suave. Se realizaron tres lavados con PBS de 10 min cada uno en agitación suave

y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario de mono anti-IgG de conejo conjugado con Alexa Fluor 546 (LifeTech, A10040) a una dilución de 1:2000 en suero de cabra al 10%. Se repitieron tres lavados de 10 min cada uno y se incubó 5 min con DAPI 0,5 mg/ml. Finalmente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos utilizando Prolong Gold (Invitrogen, P36930). Las muestras fueron visualizadas en el microscopio confocal LSM 700 Zeiss (Universidad de Chile).

### **7. Citotoxicidad por expresión de proteínas virales.**

Se evaluó la viabilidad de  $3,5 \times 10^4$  células B16 transfectadas con nanopartículas de quitosano conteniendo 2,5 µg de plásmidos pIRES-ARV y pIRES-ISAV a una relación de N/P de 20 tras 24, 48 y 120 horas post-transfección. Para ello, a dichos tiempos se eliminó 3/4 del medio de cultivo, se agregó 20 µl de MTT al 0,05% y se incubó a 37°C por 3 horas. Posteriormente, se extrajo el medio con MTT, se resuspendieron las células en 100 µl de DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm con el equipo Infinite M200 Pro (Tecan, Suiza). El valor de absorbancia de células sin transfectar fue utilizado como valor de 100% de viabilidad.

### **8. Animales.**

Ratones de 8 a 10 semanas de la cepa C57BL/6J tipo silvestre y C57BL/6J FoxP3<sup>GFP+</sup> transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del promotor *Foxp3* en células Treg, fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile. Los animales fueron mantenidos con alimentación *ad libitum* bajo un ciclo de luz y oscuridad. Los protocolos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Chile (Carta N°489).

## **9. Inducción de tumor de melanoma y tratamiento.**

Se utilizaron suspensiones de células B16 para inducir el desarrollo de tumores en ratones de la cepa C57BL/6J tipo silvestre y C57BL/6J FoxP3<sup>GFP+</sup> inyectando por vía subcutánea (s.c.) en la zona lumbar  $2 \times 10^5$  células vivas (Desafío). Una vez alcanzado un volumen tumoral de  $2.1 \text{ mm}^3$  los animales fueron separados en 4 grupos: i)- Sin tratamiento, ii)- CH: tratados con quitosano, iii)- NP-ARV: tratados con NPs de quitosano + pIRES-ARV y iv)- NP-ISAV: tratados con NPs de quitosano + pIRES-ISAV. El tratamiento con CH consistió en la inyección intratumoral (i.t.) de 122  $\mu\text{g}$  de quitosano en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. Para los tratamientos con NP-ARV y NP-ISAV esta inyección consistió en una suspensión de nanopartículas sintetizadas a una relación N/P de 20 compuestas por 122  $\mu\text{g}$  de quitosano y 10  $\mu\text{g}$  de plásmido pIRES-ARV o pIRES-ISAV, respectivamente, en 100  $\mu\text{l}$  de PBS. El crecimiento tumoral fue evaluado midiendo el tamaño tumoral utilizando un pie de metro y calculando el volumen tumoral según la fórmula de media esfera ( $V=2/3\pi r^2$ , donde v corresponde al volumen en  $\text{mm}^3$  y r al radio del tumor en mm). Se utilizó como criterio de punto final un volumen tumoral máximo (VTM) de  $260 \text{ mm}^3$ , momento en el que los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y procesados para la realización de los análisis posteriores.

## **10. Evaluación de poblaciones linfocitarias:**

### **10.1 Extracción de esplenocitos y linfocitos infiltrantes de tumor.**

**a. Ratones C57BL/6 FoxP3<sup>GFP+</sup>.** Tras la eutanasia se extrajo el bazo y el tumor de cada animal. El bazo se disgregó en una rejilla metálica de 100 mesh y posteriormente se eliminaron los eritrocitos por medio de una lisis diferencial utilizando buffer ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  155 mM,  $\text{KHCO}_3$  10 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  1 mM, pH 7,3) durante 5 min en agitación suave. En paralelo, el tumor fue cortado y tratado con Tripsina (HyClone, SH30042.01) en medio RPMI 1640 (Gibco, 31800022), durante 30 min a  $37^\circ\text{C}$  con agitación constante. Tras esto se eliminaron los restos tumorales sólidos y la solución restante, al igual que la obtenida a partir del bazo,

fue centrifugada a 1600 g por 5 min, descartando el sobrenadante. Los esplenocitos y las células del tumor, se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Gibco, 31800022) con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Biological, DW105804-127-1A).

**b. Ratones C57BL/6J tipo silvestre.** Tras la eutanasia se extrajo el bazo y el tumor de cada animal. El bazo fue procesado utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente. El tumor se extrajo y se recibió en una placa con buffer HBSS (Gibco, 24020117) + 5% SFB (Biological, DW105804-127-1A) en hielo y se disgregó utilizando tijeras. El homogenado fue recolectado y tratado con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV (Sigma, C-5138) y 0.05 mg/ml de DNAsa (Promega, M6101) por 30 minutos a 37°C con agitación suave. El extracto digerido fue tamizado utilizando una malla de 100 mesh y el filtrado fue lavado con HBSS+5% SFB y centrifugado a 600 g por 7 minutos a 4°C. El pellet de células obtenido fue tratado con buffer de lisis de eritrocitos ACK (NH<sub>4</sub>Cl 155mM, KHCO<sub>3</sub> 10mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1mM, pH 7,3) por 5 min a temperatura ambiente. Se repitió el paso de lavado y centrifugado, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en percoll (GE Healthcare, 17-0891-01) al 40% en HBSS. A esta suspensión se le agregó el mismo volumen de percoll al 70% por debajo de las células utilizando una pipeta pasteur de vidrio. Se llevó a centrifugación a 750 g por 20 min a temperatura ambiente con aceleración y desaceleración baja. Luego, se extrajeron los linfocitos T presentes entre las dos fases formadas tras la centrifugación, fueron lavados HBSS+5% SFB y centrifugados a 600 g por 7 minutos a 4°C y finalmente resuspendidos en medio RPMI 1640 con SFB al 10%.

## **10.2 Activación de linfocitos T.**

Para la detección de las citoquinas intracelulares IFN $\gamma$  e IL17A, 2x10<sup>6</sup> esplenocitos y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) fueron previamente activados. Para inducir la síntesis de citoquinas la activación se realizó mediante el tratamiento de los linfocitos con 0,25  $\mu$ M de PMA (Sigma, P1585) y 1  $\mu$ g/ml de Ionomicina (StemCell, 73722). Simultáneamente se inhibió el tránsito vesicular, y

con ello la liberación de las citoquinas al medio extracelular, por tratamiento con 10 ug/ml de Brefeldina A (StemCell, 73012). Este tratamiento fue realizado durante 4 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Como control negativo de activación se utilizaron células tratadas solo con Brefeldina A (Nuñez, Saez, y cols. 2013).

### 10.3 Citometría de flujo.

**a. Ratones C57BL/6 FoxP3<sup>GFP+</sup>:** Para el marcaje de los esplenocitos se utilizaron 2x10<sup>6</sup> células y para las células de tumor 150 µl de la suspensión de células previamente obtenida. Todos los marcajes se realizaron durante 30 min a 4°C en oscuridad utilizando los anticuerpos en una dilución de 1:10 del stock comercial en buffer IF (SFB al 2% en PBS para los anticuerpos de superficie; y en Buffer de permeabilización (eBioscience, 88-8824-00) para los anticuerpos intracelulares. Para el marcaje de poblaciones CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, se utilizaron los anticuerpos Anti-Mouse CD8a-PE (eBioscience, Clone: 53-6.7) y Anti-Mouse CD4-PE (eBioscience, Clone: GK1.5), respectivamente. Para las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> las células fueron fijadas y permeabilizadas con buffer Fix-Perm (Intracellular fixation permeabilization buffer set, eBioscience, 88-8824-00) durante 30 min a 4°C y posteriormente marcadas. Para la subpoblación CD4<sup>+</sup>Foxp3 (Treg) se utilizó el marcaje FoxP3-GFP propio de los ratones reporteros; para CD4<sup>+</sup>RORγt (Th17) el anticuerpo anti-Mouse RORγt-APC (eBioscience, Clone B2D) y para CD4<sup>+</sup>Tbet (Th1) el anticuerpo anti-Human/Mouse Tbet-PE-Cyanine7 (eBioscience, Clone: eBio4B10).

**b. Ratones C57BL/6 tipo silvestre.** Para la detección de los linfocitos en bazo y TIL se utilizaron 2x10<sup>6</sup> células. Los marcajes se realizaron durante 30 min a 4°C en oscuridad utilizando los anticuerpos en una dilución de 1:10 del stock comercial en buffer IF para los anticuerpos de superficie y en Buffer de permeabilización (eBioscience, 88-8824-00) para los anticuerpos intracelulares. Para asegurar el análisis de poblaciones de linfocitos se realizó un marcaje de CD45 con el anticuerpo Anti-mouse CD45.2-APC (eBioscience, Clone: 104).

Para la detección de poblaciones CD8+ y CD4+, se utilizaron los anticuerpos Anti-Mouse CD8a-PE (eBioscience, Clone: 53-6.7) y Anti-Mouse CD4-FITC (eBioscience, Clone: RM4-5), respectivamente. Para la detección de las subpoblaciones CD4+ las células fueron fijadas y permeabilizadas con buffer Fix-Perm (Intracellular fixation permeabilization buffer set, eBioscience). Se detectó la población CD4+Foxp3+ (Treg) utilizando el anticuerpo Anti-mouse/rat Foxp3 PE-Cy5 (eBioscience, Clone: FJK-16s). Las poblaciones CD4+IFN $\gamma$ + (Th1) y CD4+IL17A+ (Th17) se detectaron utilizando los anticuerpos Anti-mouse IFN $\gamma$ -PE (eBioscience, Clone: XMG1.2) y Anti-mouse IL17A-PerCP (eBioscience, Clone: TC11-18H10.1), respectivamente, en linfocitos previamente activados con PMA e Ionomicina.

Para ambas cepas de ratones, se utilizó el equipo BD Accuri C6 (BD Bioscience, USA) para la adquisición de los datos de citometría de flujo y el programa FlowJo 7.6.1 (para el análisis de las poblaciones).

#### **11. Análisis estadístico.**

Los resultados presentados en gráficas indican el valor promedio  $\pm$  SEM y fueron analizados por test no paramétrico Mann Whitney. El efecto sobre el crecimiento tumoral fue analizado por test exacto de Fischer. En ambos test se utilizó un valor de confianza de 95%. Todos los análisis se realizaron con el programa computacional GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA).

## RESULTADOS

### 1. Nanopartículas de quitosano.

La búsqueda de un método de transfección de baja toxicidad y alta eficiencia nos llevó a utilizar nanopartículas de quitosano. Este es un polímero de origen natural compuesto por unidades de GlcN y AcGlcN que presenta carga positiva, la cual le permite unir por interacción electrostática el DNA, formando complejos quitosano/DNA (CH/DNA) (Agirre, Zarate, y cols. 2014).

Se generaron complejos compuestos por quitosano de bajo PM y alto %DDA y en conjunto con el plásmido pcDNA3.1-GFP (pGFP) variando las cantidades de polisacárido y manteniendo constante la cantidad de pGFP. Estos complejos fueron caracterizados evaluando su capacidad para encapsular pGFP, diversos parámetros físicos, su efecto citotóxico en cultivo celular y su uso como método de transfección de células tumorales.

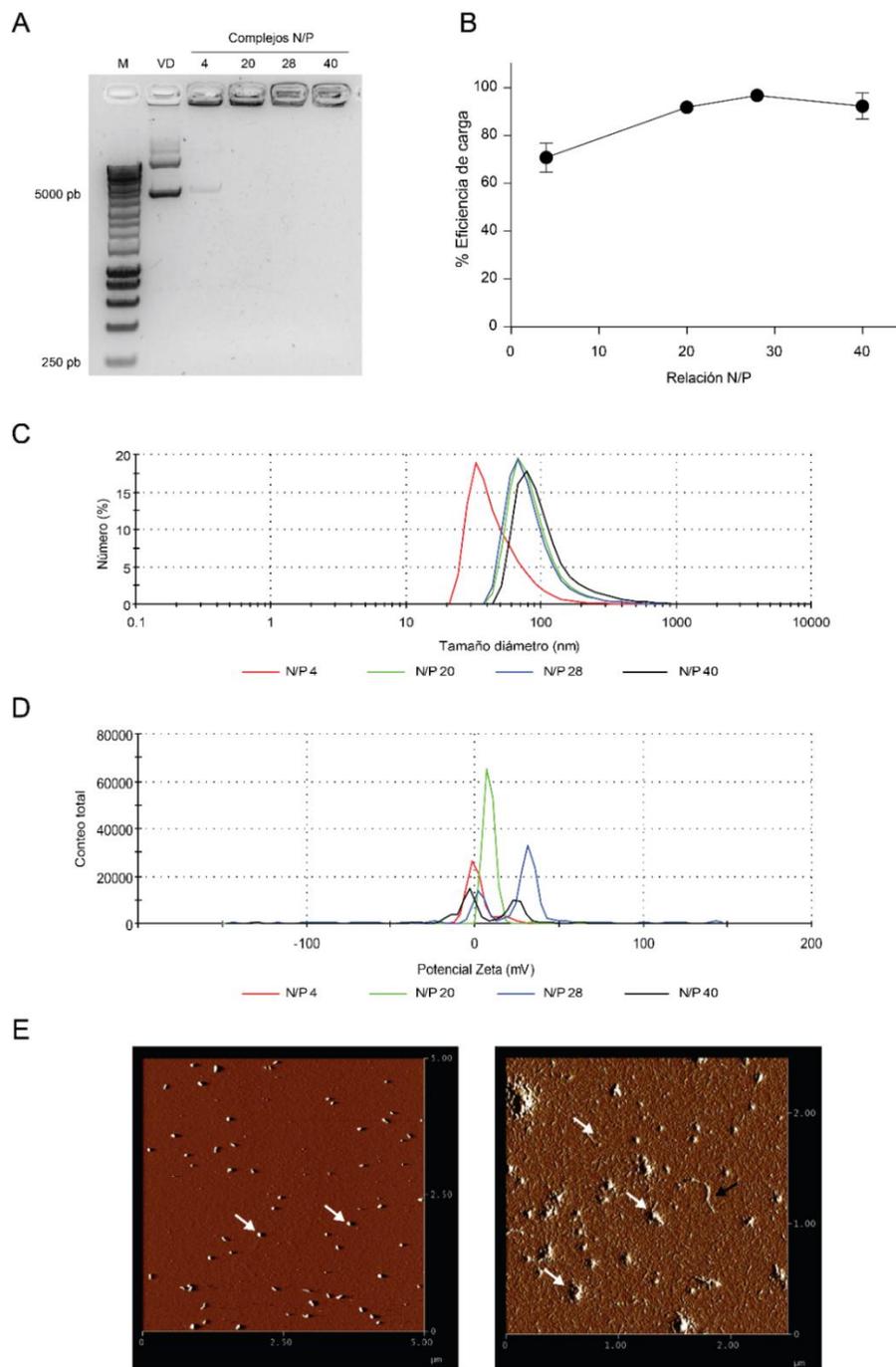
Para caracterizar la formación de complejos entre el quitosano y el pGFP, se evaluó el retraso en la migración electroforética del pDNA en presencia de quitosano en un gel de agarosa. En el caso de los complejos sintetizados a una relación N/P de 4, se observó un patrón de bandas similar al obtenido en el control sin quitosano (Figura 1A), indicando que parte del pGFP se encontraba libre sin interacción con el CH. Por el contrario, en los complejos sintetizados en presencia de una mayor cantidad de quitosano (N/P 20, 28 y 40) no se observó migración del pGFP evidenciando su completa interacción con el polisacárido. Para determinar la eficiencia en la formación de complejos se cuantificó la cantidad de pGFP acomplejado por el quitosano, parámetro conocido como eficiencia de carga. Se observó que los complejos formados a las distintas relaciones N/P (4, 20, 28 y 40) mostraron diferencias en su eficiencia de carga. Los complejos sintetizados con una baja cantidad de quitosano (N/P 4) fueron capaces de acomplejar el 70% del pDNA disponible. No obstante, al aumentar la cantidad de quitosano en relaciones

N/P de 20, 28 y 40 se logró acomplejar en promedio el 92%, 97% y 93% del pGFP, respectivamente (Figura 1B).

Una vez confirmada la formación de los complejos, se analizaron parámetros físicos como el tamaño, la carga superficial (determinada por el potencial Zeta) y la morfología. Se observó que los complejos sintetizados a una relación N/P de 4 poseen una monodispersión en base a su diámetro evidenciado por la presencia de un solo pico a los 32,7 nm en la gráfica de distribución. En las relaciones N/P de 20 y 28 se observó un pico a los 68,1 nm de diámetro y en la relación N/P de 40 a los 78,8 nm (Figura 1C). Estos resultados muestran que el diámetro de todos los complejos evaluados fue inferior a los 100 nm, por ello de aquí en adelante los complejos CH/pGFP serán llamados nanopartículas (NPs).

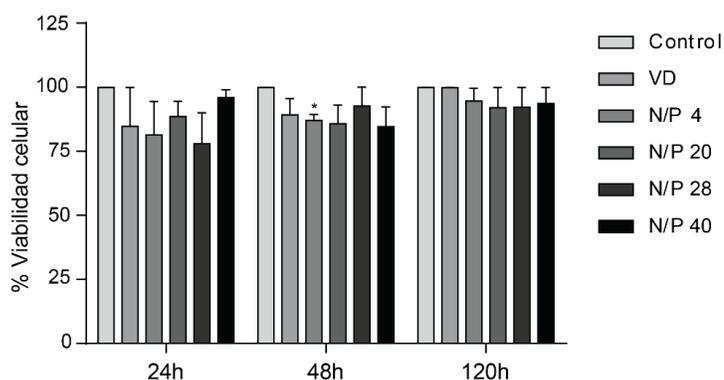
La carga superficial de las NPs se evaluó midiendo el potencial zeta. Las nanopartículas sintetizadas a una relación N/P de 4 mostraron una monodispersión con un pico a -1,22 mV, mientras que a una N/P de 28 y 40 se observan dos picos (N/P 28: 2,08 y 31,8 mV; N/P 40: -2,81 y 23,2 mV), indicando una polidispersión de NPs con carga superficial heterogénea. Por otro lado, las nanopartículas a una relación N/P de 20 muestran una distribución homogénea con un único pico positivo cercano a los 7,15 mV (Figura 1D). Estos resultados indican que las nanopartículas que presentan un potencial zeta positivo, poseen carga superficial positiva. Esta característica aumenta su solubilidad en suspensiones acuosas y permite su interacción con la membrana celular, que posee carga negativa, necesaria para la entrada a la célula.

Finalmente, la morfología fue confirmada utilizando microscopía de fuerza atómica. Las nanopartículas sintetizadas a una relación N/P de 20, poseen una morfología homogénea de tipo esférica. Sin embargo, al aumentar la cantidad de quitosano a una relación N/P de 28 se observó que además de la presencia de nanopartículas esféricas, se encuentran fibras de quitosano libres no acomplejadas (Figura 1E).



**Figura 1: Caracterización de complejos quitosano/pDNA3.1-GFP.** Migración electroforética del pGFP presente en los complejos **(A)**. Porcentaje de eficiencia de carga del pGFP en los complejos ( $n = 3$ ) **(B)**. Gráfica representativa de distribución de diámetro **(C)** y de Potencial zeta de los complejos **(D)**. Imagen de AFM de los complejos sintetizados a una relación N/P de 20 (izquierda) y N/P de 28 (derecha), en una dilución de 1:10. Flechas blancas: nanopartículas. Flecha negra: fibra de quitosano libre. **(E)**. M: marcador de tamaño; VD: vector pGFP desnudo; nm: nanómetros; mV: milivolts.

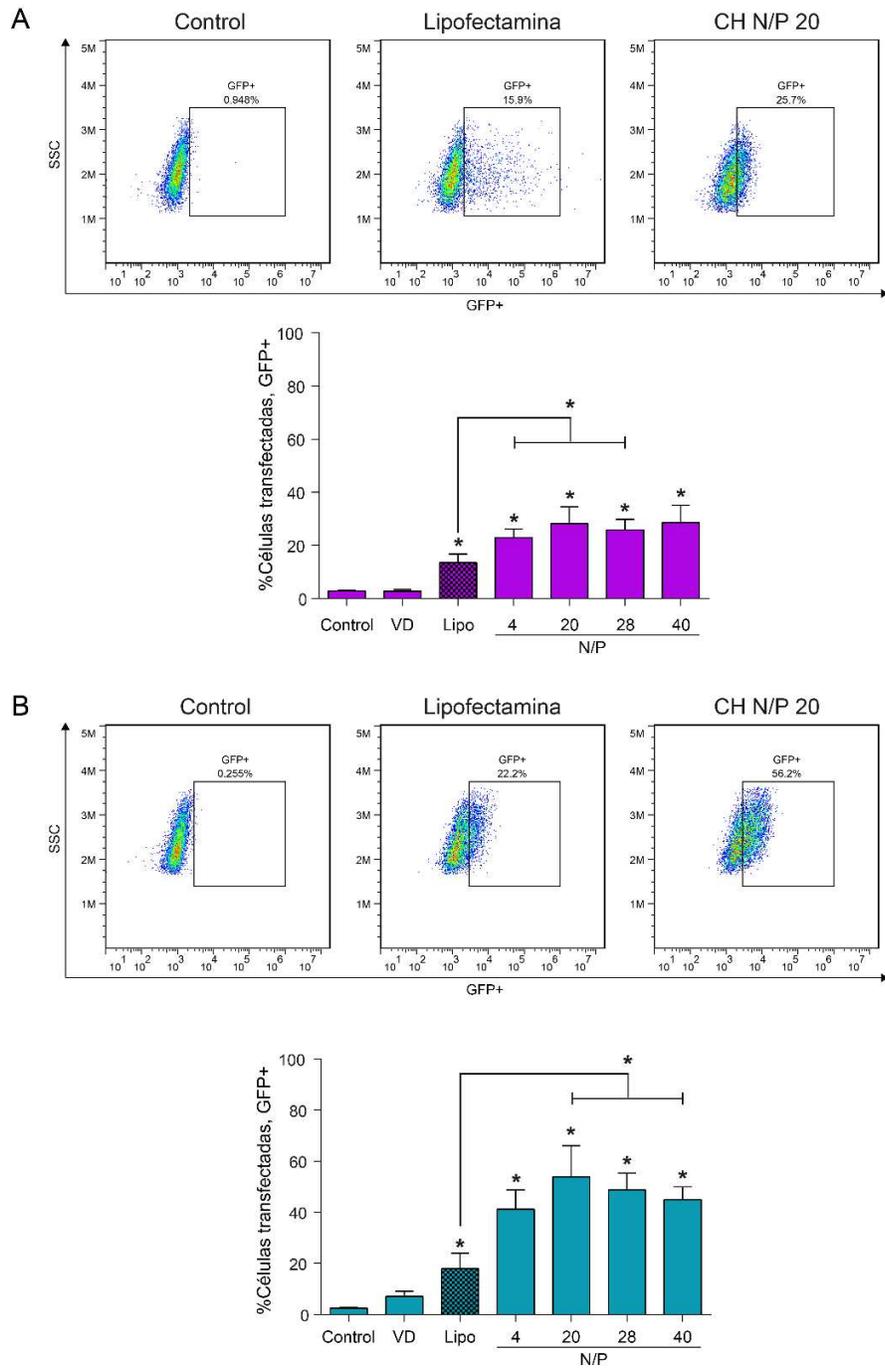
Se evaluó el efecto citotóxico del tratamiento con nanopartículas durante 24, 48 y 120 horas sobre células tumorales B16, determinando la actividad metabólica por ensayo MTT. En ninguno de los casos estudiados se observaron diferencias significativas de la viabilidad de las células tratadas con nanopartículas en comparación al grupo control sin tratar (Figura 2), a excepción de las células tratadas con NPs a una N/P de 4 durante 48 horas. Estos resultados indican que las nanopartículas compuestas por CH y pGFP no producen un efecto citotóxico en células B16.



**Figura 2: Evaluación del efecto citotóxico de las nanopartículas de quitosano/pGFP.**

Gráfica de porcentaje de viabilidad celular, en base a la determinación de actividad metabólica por ensayo MTT, de células B16 tratadas con las NPs quitosano/pGFP sintetizadas a una relación N/P de 4, 20, 28 y 40, en relación con células sin transfectar (control), evaluada a las 24, 48 y 120 horas post-tratamiento. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes, analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas  $p < 0.05$ . VD: vector pGFP desnudo.

Para finalizar la caracterización de las NPs CH/pGFP, se evaluó la capacidad de transfección de las nanopartículas en las líneas celulares HEK-293 y B16. La eficiencia de transfección fue determinada por citometría de flujo cuantificando el porcentaje de células GFP positivas (GFP+). En células HEK-293 todas las NPs evaluadas lograron sobre un 20% de células GFP+ (indicado por el rectángulo en los dotplots, Figura 3A) con valores significativamente mayores en comparación con las células control y las células transfectadas con Lipofectamina (15%; control positivo). De forma similar, en la línea celular B16 todas las nanopartículas evaluadas mostraron sobre el 40% de células GFP+, siendo significativamente mayores a lo observado en las células control y en células transfectadas con Lipofectamina (18%) (Figura 3B).



**Figura 3: Eficiencia de transfección de nanopartículas de quitosano/pcDNA3.1-GFP.** Dotplots representativos y gráfica de eficiencia de transfección en células HEK293 (**A**) y células tumorales B16 (**B**). Los dotplots representativos muestran el control de células sin transfectar y células transfectadas con Lipofectamina y con NPs en una relación N/P de 20. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes, analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas  $p < 0.05$ . VD: vector pGFP desnudo, Lipo: Lipofectamina, SSC: side scattered (complejidad celular).

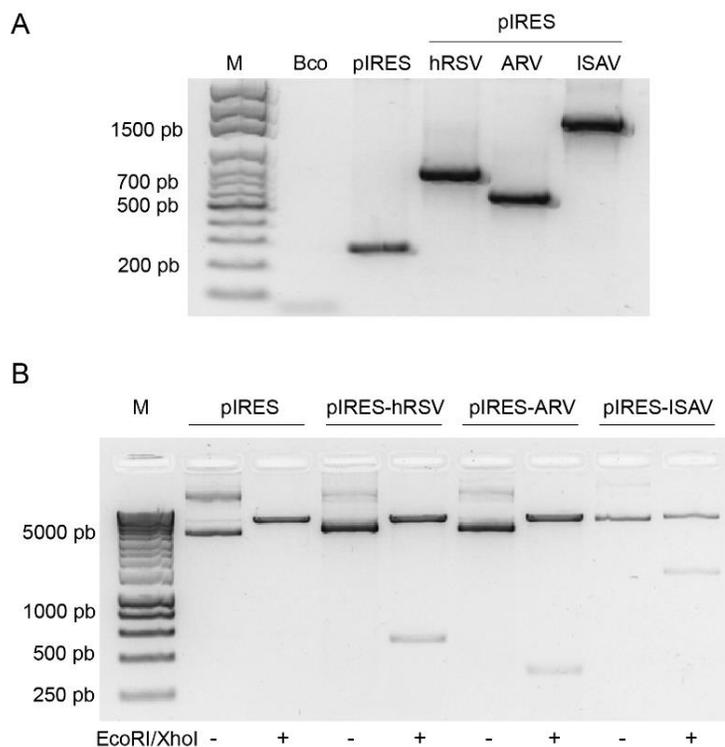
Se determinó en base al tamaño, carga superficial positiva, morfología esférica y eficiencia de transfección en la línea tumoral B16, que la relación N/P de 20 entre quitosano y pDNA permite la formación de nanopartículas eficientes para la transfección de células de melanoma murino B16. Por ello, los posteriores estudios fueron realizados utilizando NPs sintetizadas bajo estas condiciones.

## **2. Vectores de expresión para proteínas de fusión viral**

Para evaluar si la expresión de las proteínas hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F permitía la formación de sincicios en cultivo celular, se construyeron vectores de expresión que contenían las secuencias codificantes para estas proteínas. Se realizó el sub-clonamiento de cada secuencia codificante en el vector de expresión pIRES2 (pIRES), dando como resultado los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV.

El uso de partidores específicos para las regiones flanqueantes al sitio de inserción en el plásmido pIRES, permitió verificar la presencia de los cDNA insertos. La amplificación de dicha secuencia de los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV dio como resultado productos de amplificación cercanos al tamaño esperado de 754 pb, 550 pb y 1588 pb, respectivamente (Figura 4A). Por su parte, el producto obtenido tras la amplificación del vector pIRES sin inserto fue cercano a 255 pb, que corresponde al largo de la región de multiclonamiento del vector, verificando la ausencia de inserto (Figura 4A).

Paralelamente, se realizó la verificación del sub-clonamiento por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI. La digestión de los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV dio como resultado la liberación de bandas con tamaño cercano al esperado de 515 pb, 311 pb y 1349 pb para las secuencias codificantes de las proteínas hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F, respectivamente (Figura 4B). La digestión del vector vacío liberó una secuencia de 16 pb que por su tamaño no fue posible observar en el gel.



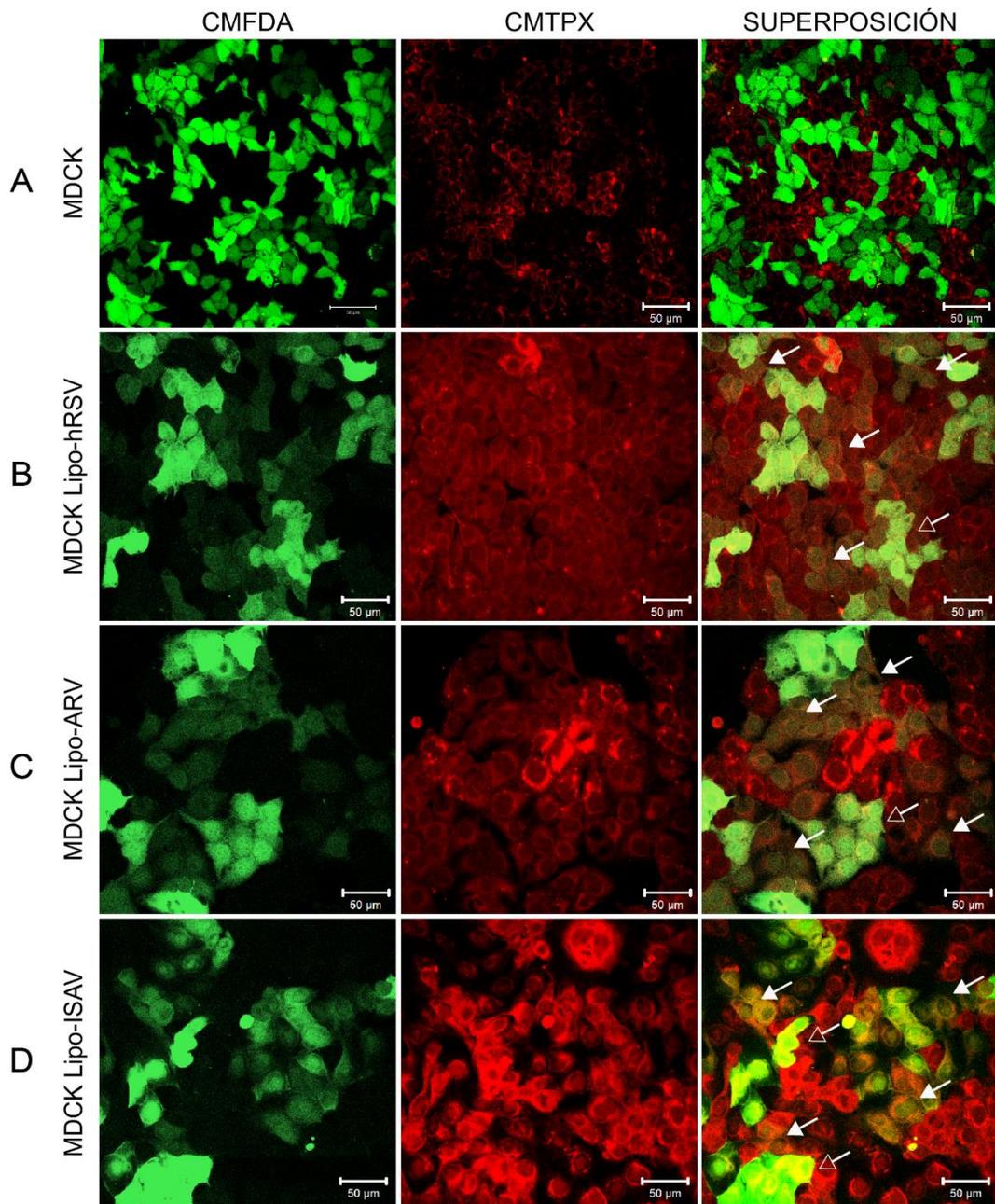
**Figura 4: Verificación de la presencia de la secuencia codificante de hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F en el vector pIRES.** Verificación por PCR utilizando partidores que hibridan en regiones flanqueantes al sitio de multiclonamiento **(A)**. Verificación por digestión con enzimas de restricción EcoRI y XhoI de vectores pIRES vacío, pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV, en relación con los vectores sin digerir **(B)**. M: marcador de tamaño; Bco: control negativo de PCR.

### 3. Expresión de las proteínas hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F en células MDCK.

Para determinar si los vectores permitían la expresión de proteínas funcionales en cultivo celular, se evaluó la formación de sincicios.

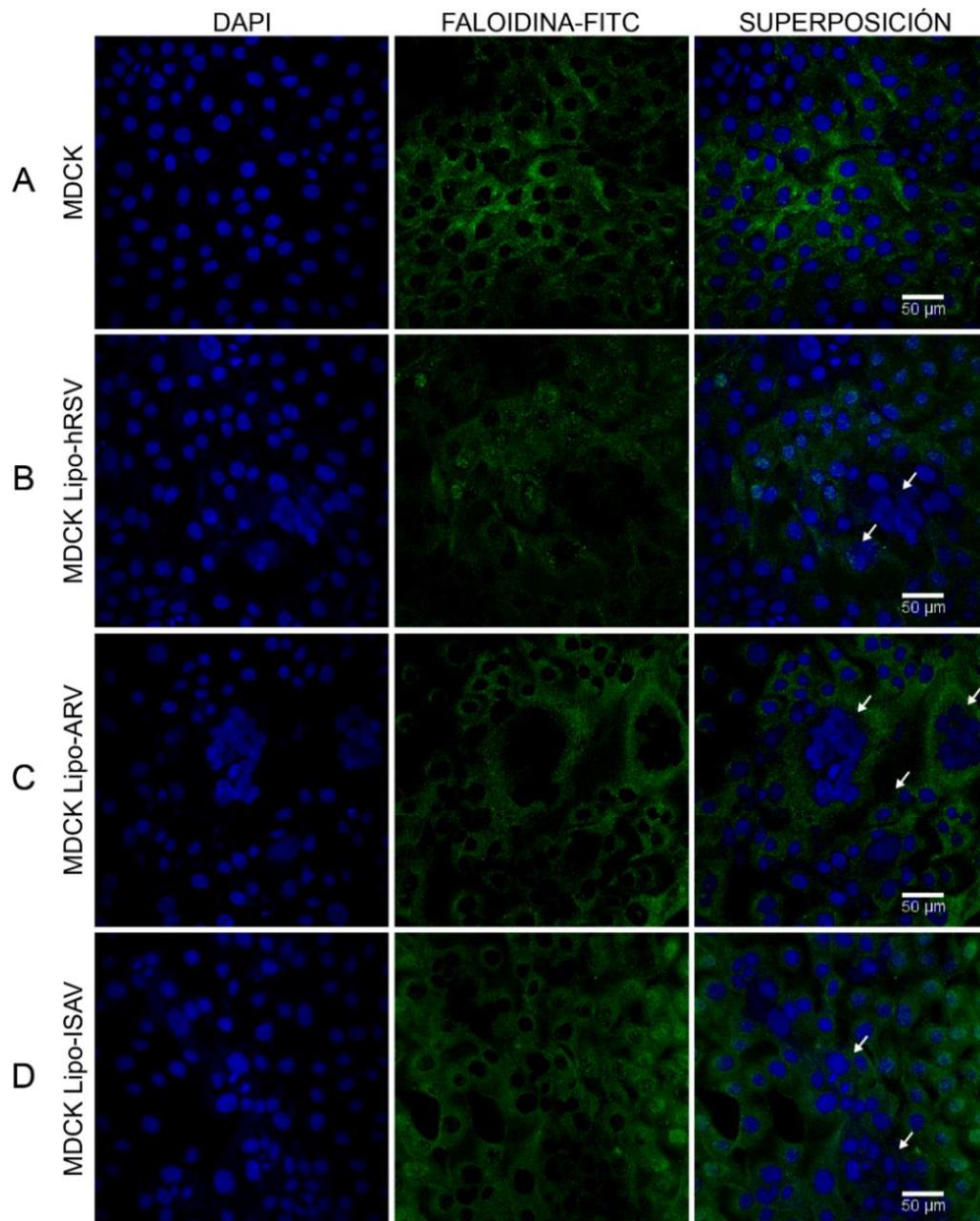
Las células B16, al ser tumorales, no presentan inhibición de crecimiento por contacto célula-célula lo que hace difícil visualizar por microscopía la formación de sincicios inducidos por las proteínas de fusión. Es por esto, que la evaluación de la actividad fusogénica de las proteínas de hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F se realizó en la línea celular MDCK (epitelio de riñón canino Madin-Darby), que sí presenta inhibición de crecimiento por contacto, asegurando su distribución en monocapa lo que facilita la visualización de sincicios.

Se diseñó un cocultivo entre células MDCK transfectadas utilizando Lipofectamina con los plásmidos pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV marcadas con la sonda CMFDA (color verde) que se distribuye mayormente en el núcleo; y células MDCK sin transfectar marcadas con la sonda CMTPX (marca roja) con distribución en el citoplasma. La visualización mediante microscopia confocal de los cocultivos 24 horas post-expresión de hRSV-F (Figura 5B), ARV-p10 (Figura 5C) e ISAV-F (Figura 5D) indicó la colocalización de ambas sondas como células de color amarillo (Figura 5, flechas blancas vacías) y células verdes con límites rojos (Figura 5 flechas blancas sólidas), lo cual no fue observado en células sin transfectar (Figura 5A). Esta colocalización indica que tras la expresión de las proteínas se produjo un intercambio citoplasmático entre células, lo que sería una consecuencia de la acción fusogénica de estas proteínas en células MDCK.



**Figura 5: Evaluación de la actividad fusogénica de las proteínas de fusión viral en células MDCK: colocalización de fluoróforos.** Cocultivo de células MDCK sin transfectar (A) y transfectadas con los plásmidos pIRES-hRSV (B), pIRES-ARV (C) y pIRES-ISAV (D) utilizando Lipofectamina, 48 horas post-transfección. Las imágenes se observan con un aumento de objetivo de 40X/oil y un aumento digital de 2.4X. Para cada imagen se observan los canales de fluorescencia verde (CMFDA) y rojo (CMPX) de manera independiente y la posterior superposición de imágenes (SUPERPOSICIÓN), donde se observa la colocalización como células amarillas (flechas blancas vacías) y la colocalización como células de núcleo verde y borde rojo (flechas blancas sólidas). Las imágenes fueron analizadas con el software LSM Imagen Browser.

La colocalización indica que las proteínas producen la fusión celular, pero no permite visualizar la estructura de los sincicios por sí mismos. Con el objetivo de lograr su visualización se realizó un marcaje del citoesqueleto (microfilamentos de actina) con Faloidina-FITC y del núcleo con DAPI, de células MDCK transfectadas con lipofectamina y los vectores de expresión. Se observó que la expresión de hRSV-F (Figura 6B), ARV-p10 (Figura 6C) e ISAV-F (Figura 6D) induce la formación de sincicios, no observado en células sin transfectar (Figura 6A).



**Figura 6: Evaluación de la actividad fusogénica de las proteínas de fusión viral en células MDCK: marcaje de microfilamentos de actina.** Células MDCK sin transfectar (**A**) y transfectadas utilizando lipofectamina con los plásmidos pIRES-hRSV (**B**) pIRES-ARV (**C**) y pIRES-ISAV (**D**) marcadas con DAPI y Faloidina-FITC, 48 horas post-transfección. Las flechas blancas indican la presencia de sincicios. Las imágenes se observan con un aumento de objetivo de 40X/oil y un aumento digital de 2.4X. Para cada imagen se observan los canales de fluorescencia azul (DAPI) y verde (Faloidina-FITC) de manera independiente y la posterior superposición de imágenes (SUPERPOSICIÓN). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ.

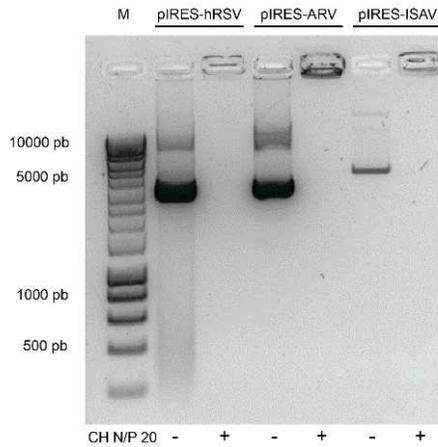
#### **4. Nanopartículas de quitosano y vectores de expresión.**

Una vez generados y evaluados los vectores para la expresión de las proteínas de fusión de hRSV, ARV e ISAV, se utilizaron para sintetizar nanopartículas de quitosano a una relación N/P de 20. Considerando que estos vectores tienen tamaños distintos: 5,8 kb pb (pIRES-hRSV), 5,6 kb (pIRES-ARV) y 6,6 kb (pIRES-ISAV), se realizaron ensayos para la caracterización de los nuevos complejos. Se logró verificar la formación de complejos entre el quitosano y los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV, indicado por el retraso en la migración electroforética (Figura 7A). Los complejos que contienen pIRES-ARV y pIRES-ISAV poseen un diámetro cercano a los 100 nm (Figura 7B), mientras que los con pIRES-hRSV presentan una polidispersión formando dos poblaciones: una a 1000 nm y otra entre 1000 y 10000 nm de diámetro (Figura 7B). Finalmente, el análisis del potencial zeta de los complejos formados con los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV mostró que estos poseen picos a 2.99 mV, 1.79 mV y 5.57 mV, respectivamente (Figura 7C), indicando una carga superficial positiva.

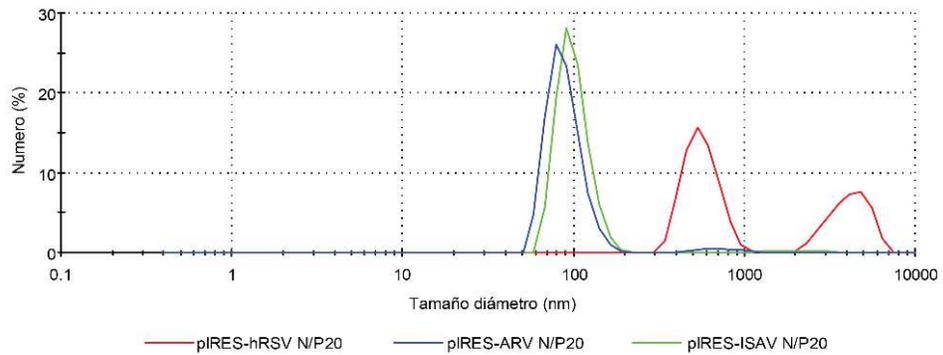
Debido a la polidispersión en la distribución de tamaño de las partículas que contenían el vector pIRES-hRSV, se decidió descartar su uso en los posteriores análisis. De este modo, el efecto de la expresión de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16 sería dependiente sólo del tipo de proteína expresada y no de las características fisicoquímicas de las nanopartículas utilizadas para su expresión.

Con el fin de simplificar la nomenclatura las nanopartículas de quitosano que contienen el gen de la proteína de ARV-p10 y de ISAV-F serán llamados durante el resto del estudio NP-ARV y NP-ISAV, respectivamente.

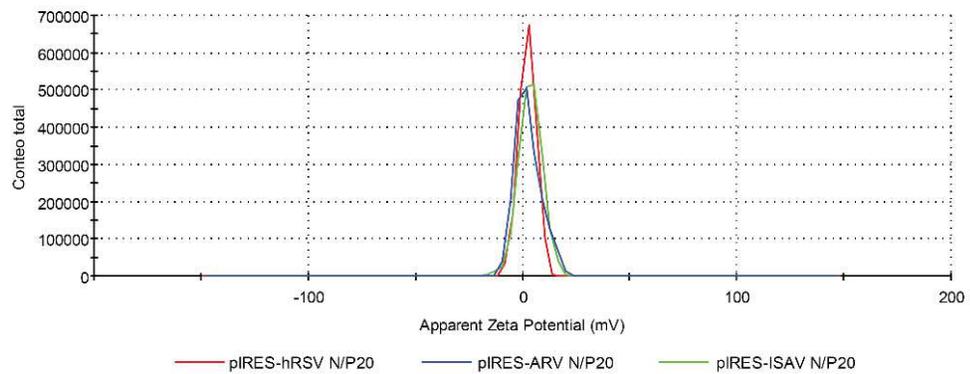
A



B



C



**Figura 7: Caracterización de complejos quitosano/pIRES-hRSV, -ARV e -ISAV.** Migración electroforética de los vectores pIRES-hRSV, pIRES-ARV y pIRES-ISAV presentes en los complejos sintetizados a un N/P de 20 respecto a cada vector desnudo (A). Gráfica de dispersión de diámetro (B) y Potencial zeta de los complejos (C). M: marcador de tamaño; nm: nanómetros; mV: milivolts.

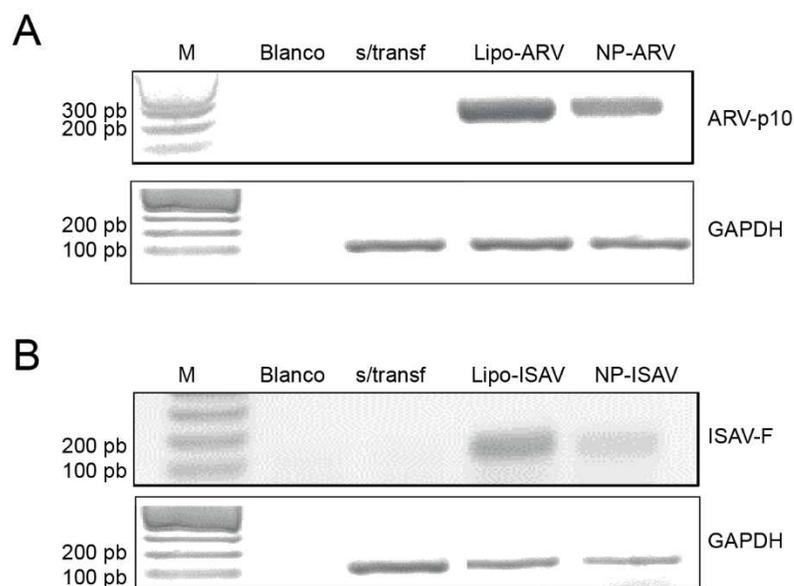
## **5. Expresión de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células tumorales por transfección con nanopartículas de quitosano.**

### **5.1 Expresión de transcritos de ARV-p10 e ISAV-F en células B16.**

Para evaluar si los vectores transportados por las nanopartículas permitían la expresión de los transcritos de las proteínas, se aisló el RNA total de células B16 transfectadas con NP-ARV y NP-ISAV 48 horas post-transfección y se determinó la expresión de cada transcrito mediante RT-PCR convencional.

En primer lugar, se determinó la presencia del transcrito de GADPH utilizado como control de expresión constitutiva. Tanto en células sin transfectar como en aquellas transfectadas con NPs y lipofectamina, se obtuvo un producto de PCR de 122 pb que corresponde al tamaño esperado del amplicón de este transcrito (Figura 8).

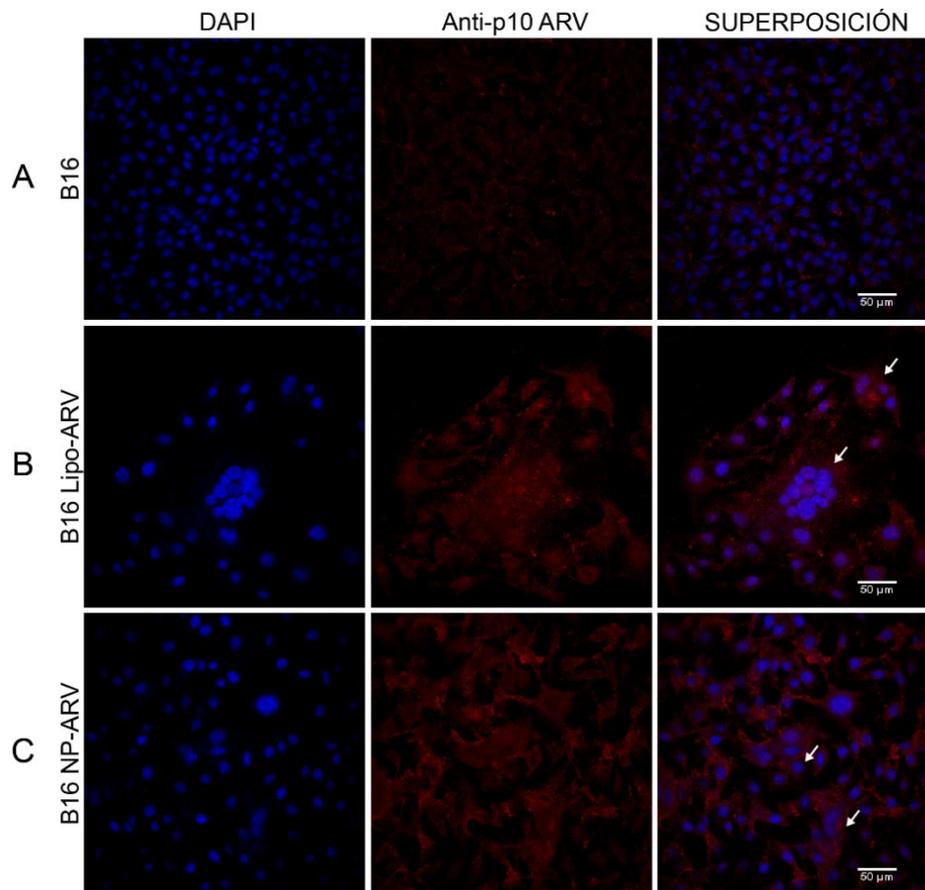
Por su parte, los productos de amplificación para los transcritos de cada proteína viral poseen un tamaño cercano al esperado de 202 pb (ARV) y 138 pb (ISAV), siendo detectados tras la transfección tanto con las NPs como con Lipofectamina, pero no en las células sin transfectar (Figura 8). Estos resultados indican que los vectores de expresión presentes en las NPs son incorporados por las células B16, lo que permite la síntesis de los transcritos de las proteínas virales.



**Figura 8: Detección de transcritos de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16.** RT-PCR de células sin transfectar y transfectadas para la expresión de la proteína ARV-p10 (**A**) e ISAV-F (**B**) utilizando NPs de quitosano y lipofectamina, 48 horas post-transfección. El transcrito de GAPDH se utilizó como control de expresión constitutiva. M: marcador de tamaño; Blanco: control negativo de PCR; s/transf: RT-PCR a partir de células B16 sin transfectar; Lipo: Lipofectamina; CH: quitosano; GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

## 5.2 Expresión de la proteína ARV-p10 en células B16.

Tras la detección de los transcritos de las proteínas virales en células B16 transfectadas con NPs sintetizadas a una relación N/P de 20, se evaluó la expresión de una de estas proteínas por inmunocitoquímica. En células transfectadas tanto con lipofectamina (Figura 9B) como con NPs de quitosano (Figura 9C) se detectó la expresión de la proteína ARV-p10 (marcaje rojo, Figura 9) e incluso la presencia de sincicios (flechas blancas). En las células sin transfectar solo se observó un marcaje basal por la unión inespecífica del suero policlonal anti-p10 utilizado (Figura 9A). Estos resultados indican que las NPs de quitosano que contienen la secuencia codificante para la proteína ARV-p10, también permiten la expresión de la proteína funcional en células tumorales B16.

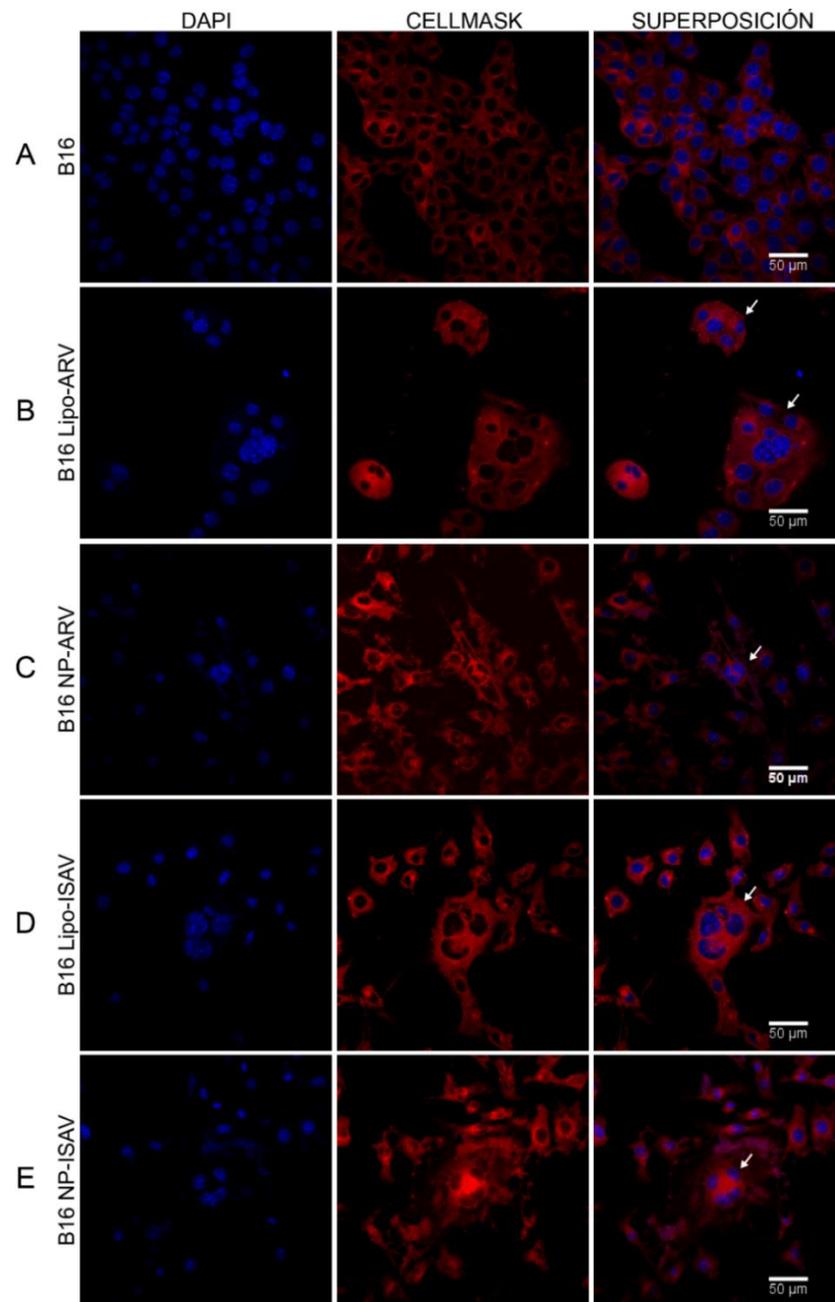


**Figura 9: Detección de la expresión de la proteína ARV-p10 en células B16.** Inmunocitoquímica de células B16 sin transfectar (A) y transfectadas con pIRES-ARV utilizando Lipofectamina (B) y NPs de CH sintetizadas a una N/P de 20 (C) marcadas con DAPI y un suero policlonal Anti-p10 ARV unido a un anti-IgG Alexa 546, 48 horas post-transfección. Las flechas blancas indican la presencia de sincicios en células transfectadas. Para cada imagen se observan los canales de fluorescencia azul (DAPI) y rojo (Anti-p10 ARV Alexa 546) de manera independiente y la posterior superposición de imágenes (SUPERPOSICIÓN). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ y muestran un aumento de objetivo de 40X/oil y un aumento digital de 2.4X.

### 5.3 Actividad fusogénica de ARV-p10 e ISAV-F en células B16.

Luego de determinar la expresión de la proteína ARV-p10 en células B16 (figura 9) y considerando que previamente se demostró la efectiva actividad fusogénica de ambas proteínas (ARV-p10 e ISAV-F) en células MDCK transfectadas con lipofectamina (Figura 6), se evaluó si en células tumorales B16 transfectadas con NPs de quitosano se observaba la presencia de

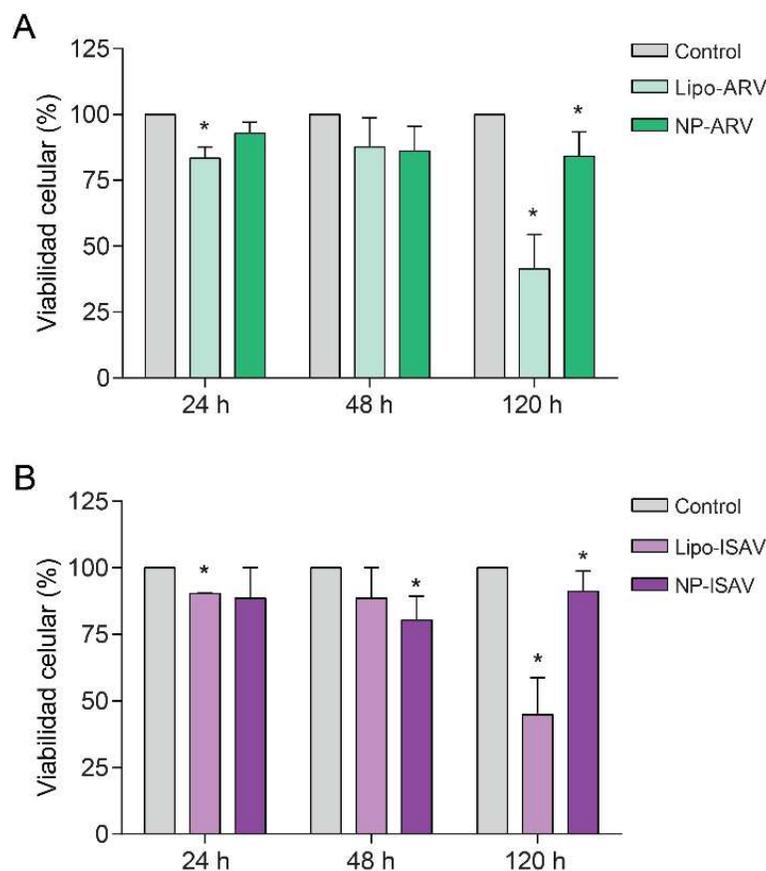
sincicios. Para ello, se marcó la membrana plasmática (sonda CellMask) y el núcleo (DAPI) de células B16 sin transfectar y transfectadas con NPs de CH y lipofectamina. Tanto la expresión de la proteína ARV-p10 por transfección con NPs (Figura 10B) y lipofectamina (Figura 10C) como la expresión de la proteína ISAV-F (Figura 10D y E) produjo la formación de sincicios (Figura 10, flechas blancas). Estos resultados evidencian que la transfección con NPs de quitosano permite la expresión de proteínas ARV-p10 e ISAV-F con actividad fusogénica en células tumorales B16.



**Figura 10: Evaluación de la actividad fusogénica de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en células B16.** Imágenes de células B16 sin transfectar (A) y transfectadas con lipofectamina y pIRES-ARV (B) y pIRES-ISAV (C); y NPs de CH sintetizadas a un N/P de 20 con pIRES-ARV (D) y pIRES-ISAV (E) marcadas con CellMask para detección de la membrana celular y DAPI para el núcleo, 48 horas post-transfección. Las flechas blancas indican la presencia de sincicios en células transfectadas. Para cada imagen se muestran los canales de fluorescencia azul (DAPI) y rojo (CellMask) de manera independiente y la posterior superposición de imágenes (SUPERPOSICIÓN). Las imágenes fueron analizadas con el software ImageJ y muestran un aumento de objetivo de 40X/oil y un aumento digital de 2.4X.

## **6. Citotoxicidad mediada por ARV-p10 e ISAV-F en células B16.**

Se ha descrito que la formación de sincicios está asociada a la inducción de muerte celular. Por ello, se evaluó el efecto de la expresión de las proteínas de fusión ARV-p10 e ISAV-F sobre la viabilidad de células B16 transfectadas con NPs de quitosano, mediante la determinación de la actividad metabólica por ensayo MTT. Se observó una disminución significativa ( $p= 0.0286$ ) en la viabilidad celular en relación con el grupo control, a las 120 horas post transfección al utilizar NP-ARV (Figura 11A) y a partir de las 48 horas ( $p= 0.0286$ ) hasta las 120 horas ( $p= 0.0286$ ) post transfección cuando se utilizó NP-ISAV (Figura 11B). Por su parte, la utilización de lipofectamina (Lipo-ARV y Lipo-ISAV) produjo una disminución significativa inicial a las 24 horas ( $p=0.0286$  para ambos casos) posiblemente debido a la toxicidad propia del compuesto, y luego a las 120 horas ( $p=0.0159$  y  $p=0.0286$ , respectivamente) post-transfección.



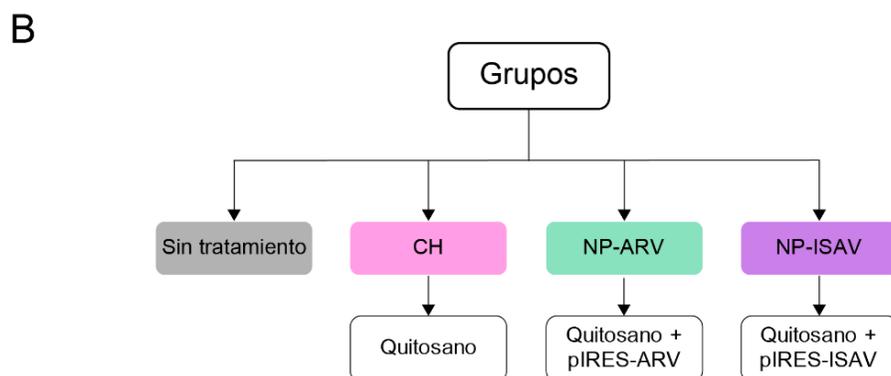
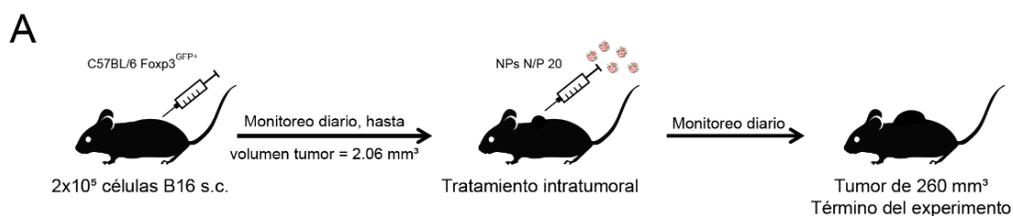
**Figura 11: Citotoxicidad producida por la expresión de ARV-p10 e ISAV-F en células B16.** Gráficas del porcentaje de viabilidad, en base a la determinación de actividad metabólica por ensayo MTT, de células B16 transfectadas con NP-ARV (A) y NP-ISAV (B), en relación con células sin transfectar y transfectadas con Lipofectamina. Los resultados corresponden a 3 experimentos independientes evaluados a las 24, 48 y 120 horas post-transfección, analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). La viabilidad celular de las células control fue utilizada como 100% de viabilidad.

En resumen, estos resultados indican que las nanopartículas de quitosano que contienen un vector de expresión con la secuencia codificante para las proteínas ARV-p10 e ISAV-F, permiten su expresión en células tumorales B16. Las proteínas expresadas poseen actividad fusogénica formando sincicios a las 48 horas post-transfección, proceso que lleva a una disminución significativa en la viabilidad celular entre las 48 y 120 horas. Por lo tanto, la formación de sincicios mediada por la expresión de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F tiene un efecto citotóxico en células de melanoma murino B16. Con estos antecedentes, el siguiente paso fue

evaluar el efecto de la expresión intratumoral de ambas proteínas sobre el desarrollo de tumores de melanoma en ensayos *in vivo*.

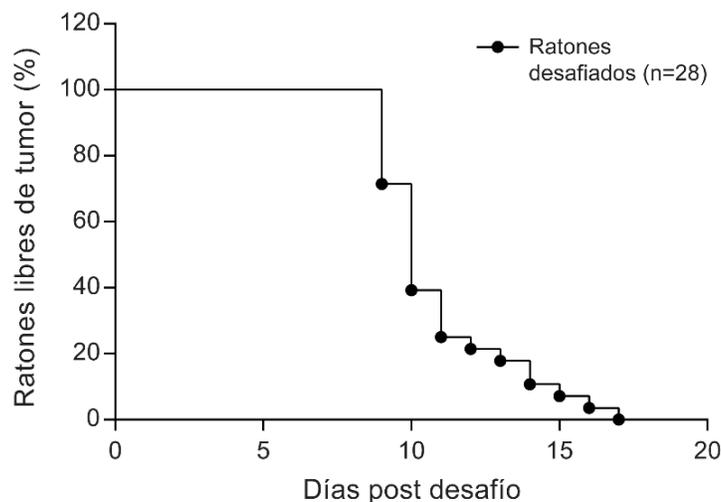
**7. Evaluación de la expresión intratumoral de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F con nanopartículas de quitosano sobre el crecimiento tumoral y el porcentaje de poblaciones linfocitarias en bazo y tumor de melanoma murino en ratones en ratones reporteros.**

El siguiente objetivo fue determinar el efecto sobre el crecimiento tumoral de la transfección *in situ*, por inyección intratumoral (i.t.), de tumores de melanoma murino B16 con las NP-ARV y NP-ISAV. Para esto, ratones de la cepa C57BL/6J Foxp3<sup>GFP+</sup> fueron desafiados con  $2 \times 10^5$  células B16 vivas vía s.c. en la zona lumbar (Figura 12A). Una vez que el tumor alcanzó un volumen aproximado de  $2 \text{ mm}^3$ , los animales fueron divididos en 4 grupos de estudio: sin tratamiento, inyectados con quitosano e inyectados con NP-ARV y NP-ISAV (Figura 12B). Posterior a cada tratamiento, los animales fueron monitoreados diariamente evaluando el crecimiento tumoral.



**Figura 12: Diseño experimental para ensayos *in vivo*.** Planificación de los ensayos *in vivo* (A). Grupos de trabajo (B). Sin tratamiento: 10 animales que no recibieron tratamiento. Grupo CH: 6 animales tratados con quitosano. Grupo NP-ARV: 6 animales tratados con NPs que contenían 10 µg pIRES-ARV y Grupo NP-ISAV: 6 animales tratados con NPs con 10 µg de pIRES-ISAV. Los grupos que recibieron tratamiento fueron inyectados i.t con 100 µl de cada preparación en PBS.

Tras el desafío de los ratones con células B16, se determinó el tiempo que transcurrió hasta la formación de un tumor detectable al tacto (aproximadamente de 0,3 mm<sup>3</sup>). Este parámetro se denominó tiempo de aparición tumoral y ocurrió entre los días 9 y 17 post-desafío en todos los animales utilizados en este estudio (Figura 13).

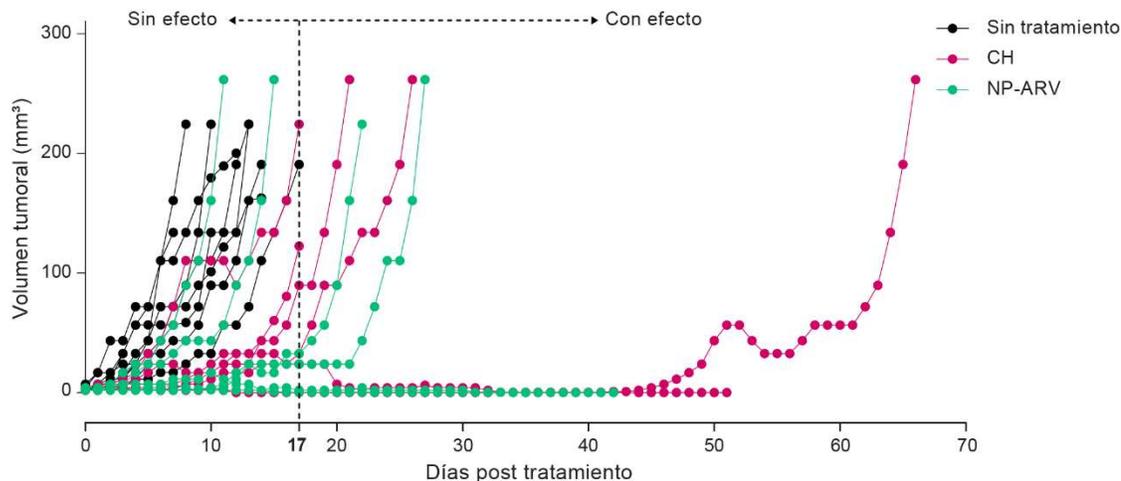


**Figura 13: Inducción tumoral por desafío con células B16 vivas en ratones reporteros.** Gráfico de Kaplan Meier de ratones C57BL/6J Foxp3<sup>GFP+</sup> libres de tumor que indica el tiempo de aparición tumoral tras el desafío con  $2 \times 10^5$  células B16. Se indican todos los animales ( $n = 28$ ) utilizados en este estudio, que posteriormente fueron separados en los distintos grupos. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism.

### 7.1 Tratamiento intratumoral con NP-ARV.

El volumen tumoral en los ratones fue evaluado diariamente hasta alcanzar un máximo de  $260 \text{ mm}^3$ . Este volumen tumoral máximo (VTM) se utilizó como criterio para el término del ensayo y el consecuente sacrificio de los animales (Figura 12A). El tiempo máximo en que los animales que no recibieron tratamiento alcanzaron el VTM, fue de 17 días (Figura 14). Este tiempo se utilizó como parámetro para evaluar la efectividad de los tratamientos evaluados, es decir, se consideró un retraso en el crecimiento tumoral sólo cuando el VTM fue alcanzado posterior a 17 días.

Se utilizaron seis ratones para evaluar el efecto del tratamiento i.t. con CH, de ellos se observó un retraso en el crecimiento tumoral en tres animales e incluso se observó la regresión completa de la masa tumoral en un cuarto ratón (Figura 14, CH). Por su parte, seis ratones fueron tratados con NP-ARV, en donde cuatro de ellos mostraron un retraso en el crecimiento tumoral y dos una regresión completa del tumor (Figura 14, NP-ARV). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos (Tabla 3).



**Figura 14: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones reporteros.** Gráfico del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> de ratones C57BL/6J Foxp3<sup>GFP+</sup> tratados i.t. con CH (n = 6) y con NPs de CH que contienen 10 µg de pIRES-ARV (NP-ARV, n = 6) sintetizadas en una relación N/P de 20, en comparación a ratones sin tratamiento (n = 10). El día cero corresponde a un volumen tumoral de 2,1 mm<sup>3</sup>, que indica el inicio del tratamiento. El día 17 indica el día en que el último animal sin tratamiento alcanzó el VTM (línea negra segmentada).

**Tabla 3: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratones reporteros.**

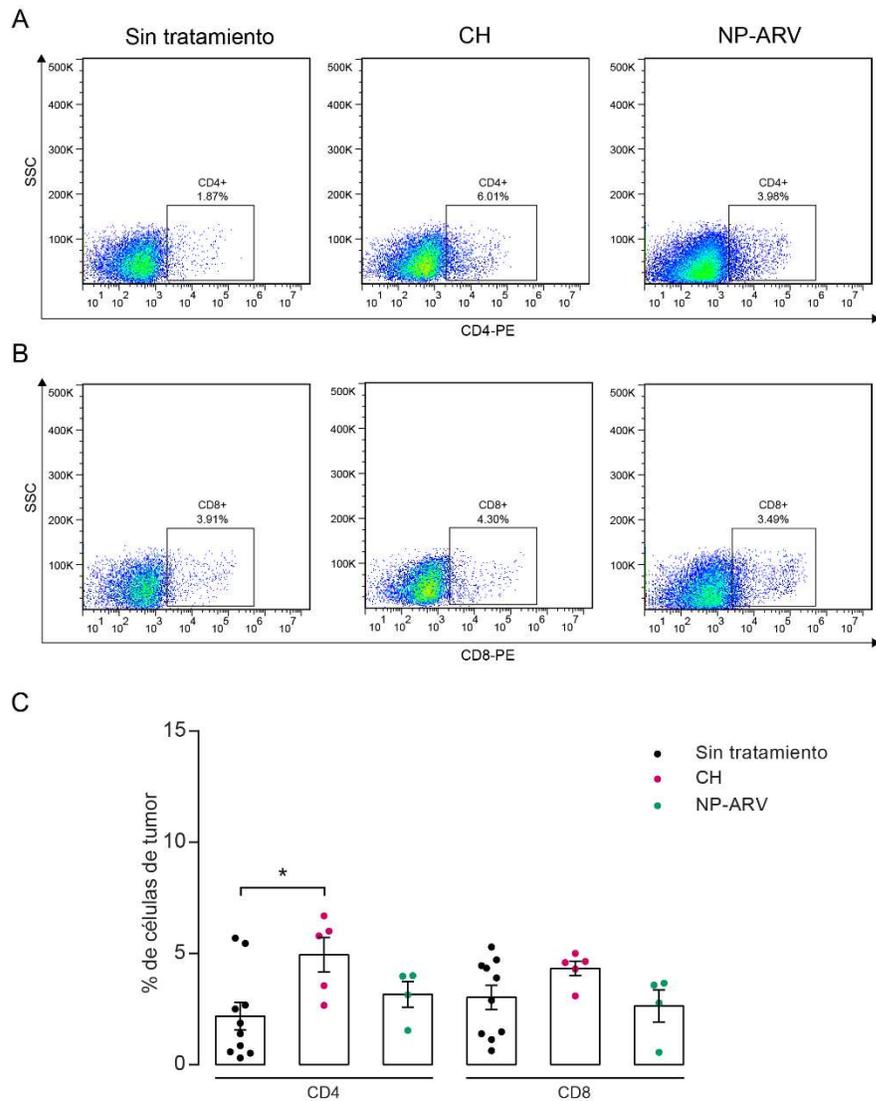
Tratamiento	Animales (N° / %)		Tipo de efecto	N°/%
	Sin efecto	Con efecto <sup>#</sup>		
Sin tratamiento	10/100	0/0	Retraso	-
			Regresión	-
CH	2/33	4/67*	Retraso	3/75
			Regresión	1/25
NP-ARV	2/33	4/67*	Retraso	2/50
			Regresión	2/50

<sup>#</sup>Datos analizados mediante test exacto de Fischer, donde \* indica p<0,05 en comparación al grupo sin tratamiento. Se consideró un efecto sobre el crecimiento tumoral si: el VTM fue alcanzado posterior al día 17 post-tratamiento o se observó una regresión tumoral.

El siguiente objetivo fue determinar si el retraso en el crecimiento tumoral producido por los tratamientos se asociaba a una variación en el porcentaje de las principales poblaciones linfocitarias involucradas en una respuesta inmune antitumoral, tanto a nivel localizado (linfocitos infiltrantes de tumor), como a nivel sistémico (en bazo).

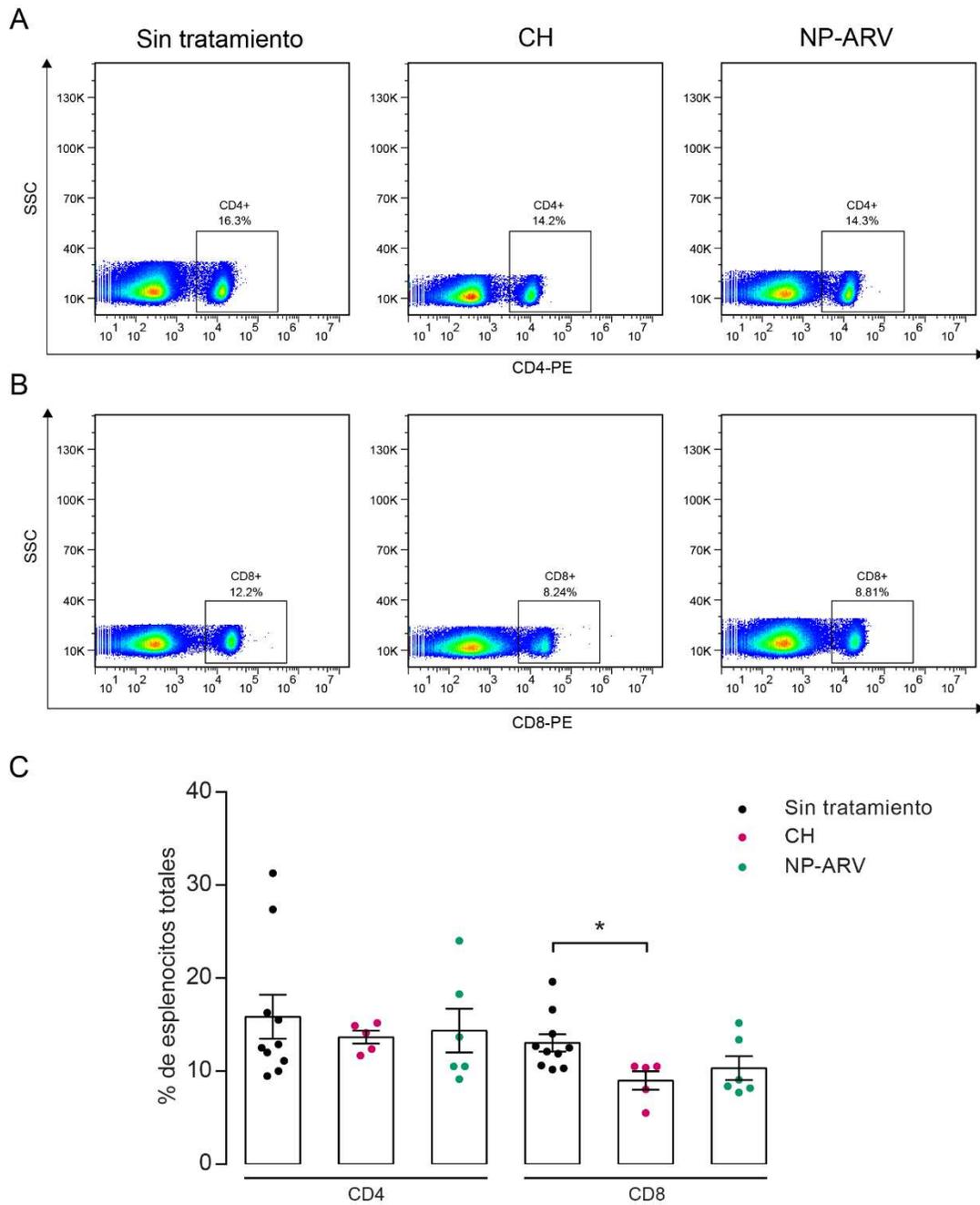
En primera instancia, se evaluaron las poblaciones CD4+ y CD8+ infiltrantes de tumor. El tratamiento con CH produjo un aumento significativo (p=0,0127) de la población CD4+ (Figura

15A y C, CH) sin variación en la población CD8+ (Figura 15B y C, CH), respecto al grupo sin tratamiento. Por su parte, el tratamiento con NP-ARV no indujo cambios significativos en ninguna de las poblaciones infiltrantes, al comparar con el grupo sin tratamiento o al tratado con CH (Figura 15, NP-ARV).



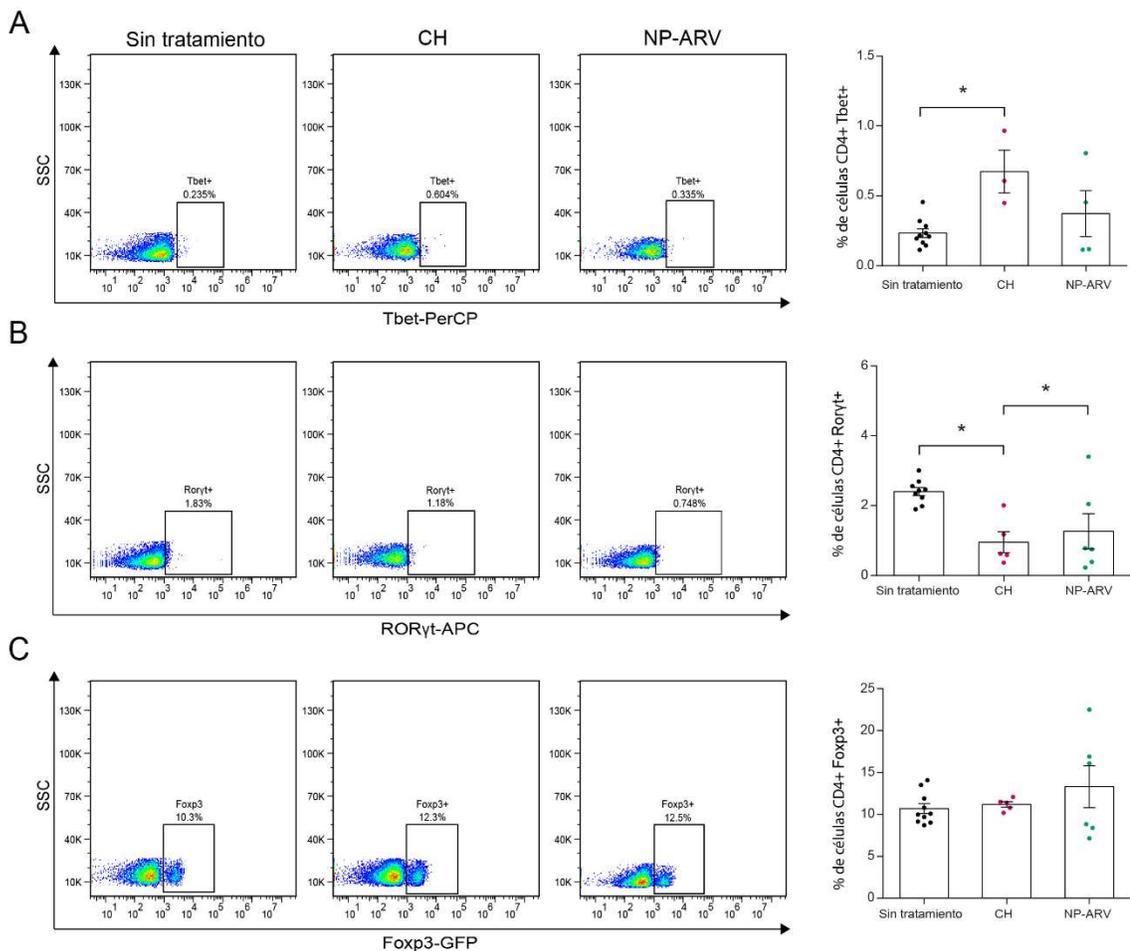
**Figura 15: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre porcentaje de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones reporteros.** Dotplots representativos para la población CD4+ (A) y CD8+ (B) infiltrante de tumor. Gráfico del porcentaje de células de tumor CD4+ y CD8+ para animales sin tratamiento (n = 10) y tratados con CH (n = 5) y con NP-ARV (n = 4) (C). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de  $p < 0.05$ . SSC: side scattered (complejidad celular).

Al analizar las poblaciones linfocitarias a nivel sistémico, se observó que el tratamiento con CH indujo una disminución significativa ( $p=0,0180$ ) de la población CD8+ (Figura 16B y C, CH) respecto al grupo sin tratamiento, sin cambios en la población CD4+ (Figura 16A y C, CH). De forma similar a lo observado en las poblaciones infiltrantes de tumor, el tratamiento con NP-ARV no indujo cambios en ninguna de las poblaciones a nivel sistémico (Figura 16, NP-ARV) respecto al grupo sin tratamiento o al tratado con CH.



**Figura 16: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones reporteros.** Dotplot representativos para la población CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**) en bazo. Gráfico del porcentaje de esplenocitos CD4+ y CD8+ para animales sin tratamiento (n = 10) y tratados con CH (n = 5) y con NP-ARV (n = 6) (**C**). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de  $p < 0.05$ . SSC: side scattered (complejidad celular).

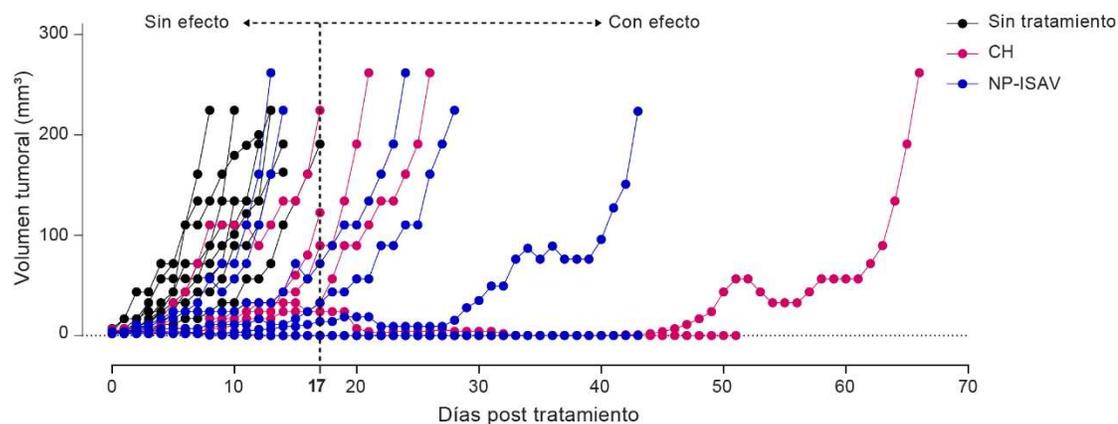
La evaluación de las subpoblaciones CD4+ en bazo, mostró que el tratamiento con CH indujo un aumento significativo de la población CD4+Tbet+ ( $p=0,014$ ) y CD4+RORyt+ ( $p=0,004$ ) que corresponden a las poblaciones Th1 (Figura 17A, CH) y Th17 (Figura 17B, CH), respectivamente, en relación con el grupo sin tratamiento. Por su parte, el tratamiento con NP-ARV indujo un aumento significativo de la población CD4+RORyt+ (Figura 17B, NP-ARV), en relación con el grupo tratado con CH.



**Figura 17: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones reporteros.** Dotplots representativos (izquierda) y gráfica del porcentaje de células (derecha) CD4+Tbet+, Th1 (A), CD4+RORyt, Th17 (B) y CD4+Fosp3+, Treg (C) para ratones sin tratamiento ( $n = 10$ ) y tratados con CH ( $n = 3-5$ ) y con NP-ARV ( $n = 4-6$ ). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de  $p < 0.05$ . SSC: side-scattered (complejidad celular).

## 7.2 Tratamiento intratumoral con NP-ISAV.

Se utilizaron seis ratones para evaluar el efecto del tratamiento i.t. con NP-ISAV, donde se observó un retraso en el crecimiento tumoral en tres de ellos e incluso la regresión completa del tumor en un cuarto ratón (Figura 18, NP-ISAV). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas respecto al efecto observado en el grupo tratado con CH (Tabla 4).



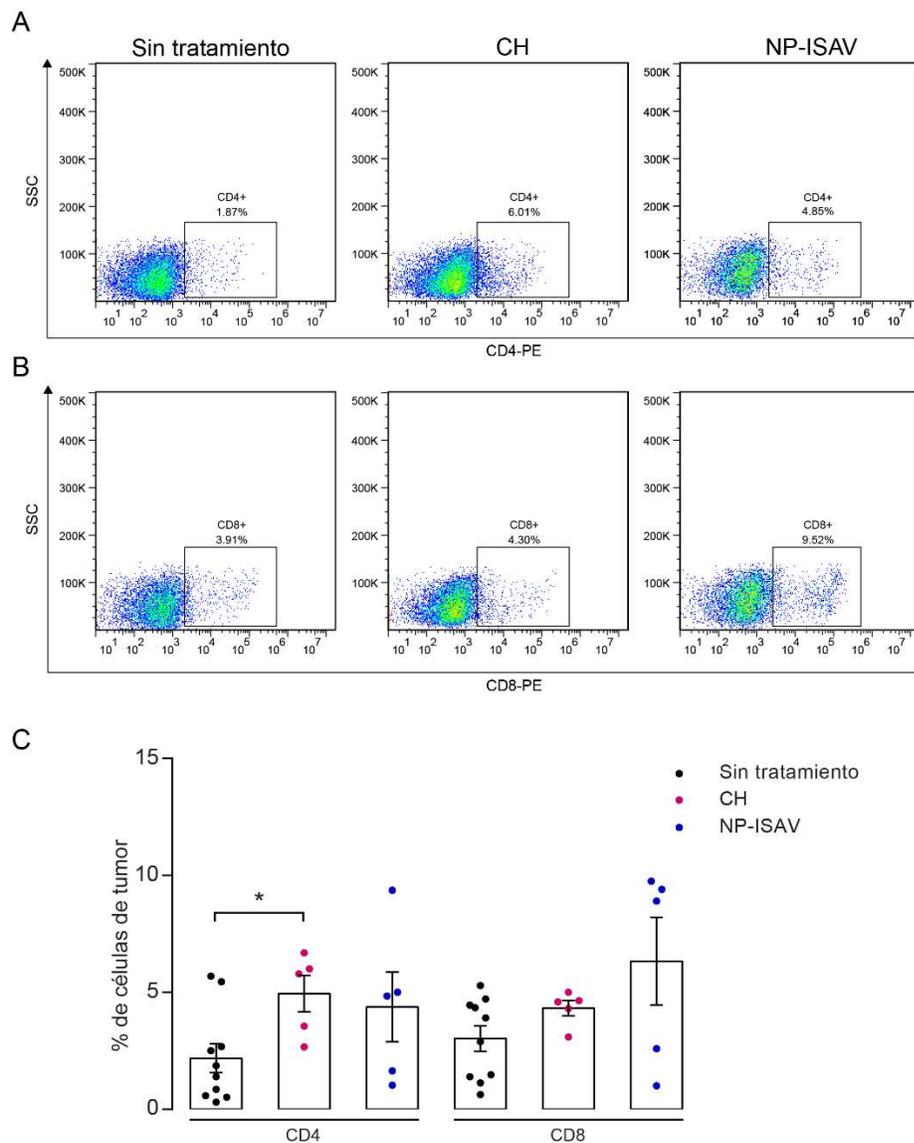
**Figura 18: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones reporteros.** Gráfico del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> de ratones C57BL/6J Foxp3<sup>GFP+</sup> tratados i.t. con CH (n = 6) y con NPs de CH que contienen 10 µg de pIRES-ISAV (NP-ISAV, n = 6) sintetizadas en una relación N/P de 20, en comparación a ratones sin tratamiento (n = 10). El día cero corresponde a un volumen tumoral de 2,1 mm<sup>3</sup>, indicando el inicio del tratamiento. El día 17 corresponde el día en que el último animal sin tratamiento alcanzó el VTM (línea negra segmentada).

**Tabla 4: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratones reporteros.**

Tratamiento	Animales (N° / %)		Tipo de efecto	N°/%
	Sin efecto	Con efecto <sup>#</sup>		
Sin tratamiento	10/100	0/0	Retraso	-
			Regresión	-
CH	2/33	4/67*	Retraso	3/75
			Regresión	1/25
NP-ISAV	2/33	4/67*	Retraso	3/75
			Regresión	1/25

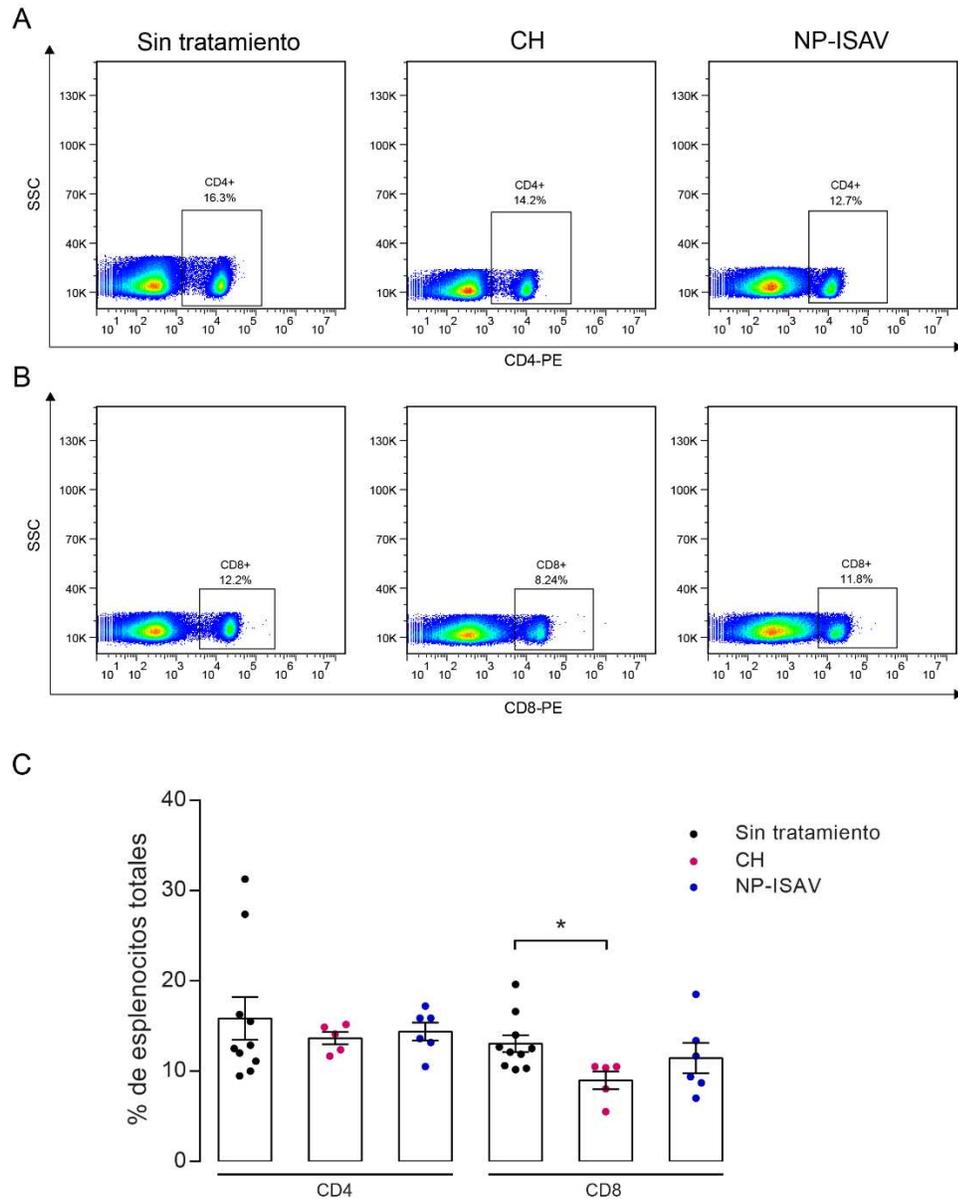
<sup>#</sup>Datos analizados mediante test exacto de Fischer, donde \* indica p<0,05 en comparación al grupo sin tratamiento. Se consideró un efecto sobre el crecimiento tumoral si: el VTM fue alcanzado posterior al día 17 post-tratamiento o se observó una regresión tumoral.

Similar a lo observado con el tratamiento con NP-ARV, el análisis de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor tras el tratamiento con NP-ISAV, no evidenció una variación en el porcentaje de las poblaciones CD4+ (Figura A y C, NP-ISAV) y CD8+ (Figura B y C, NP-ISAV), respecto al grupo sin tratamiento o al grupo tratado con CH.



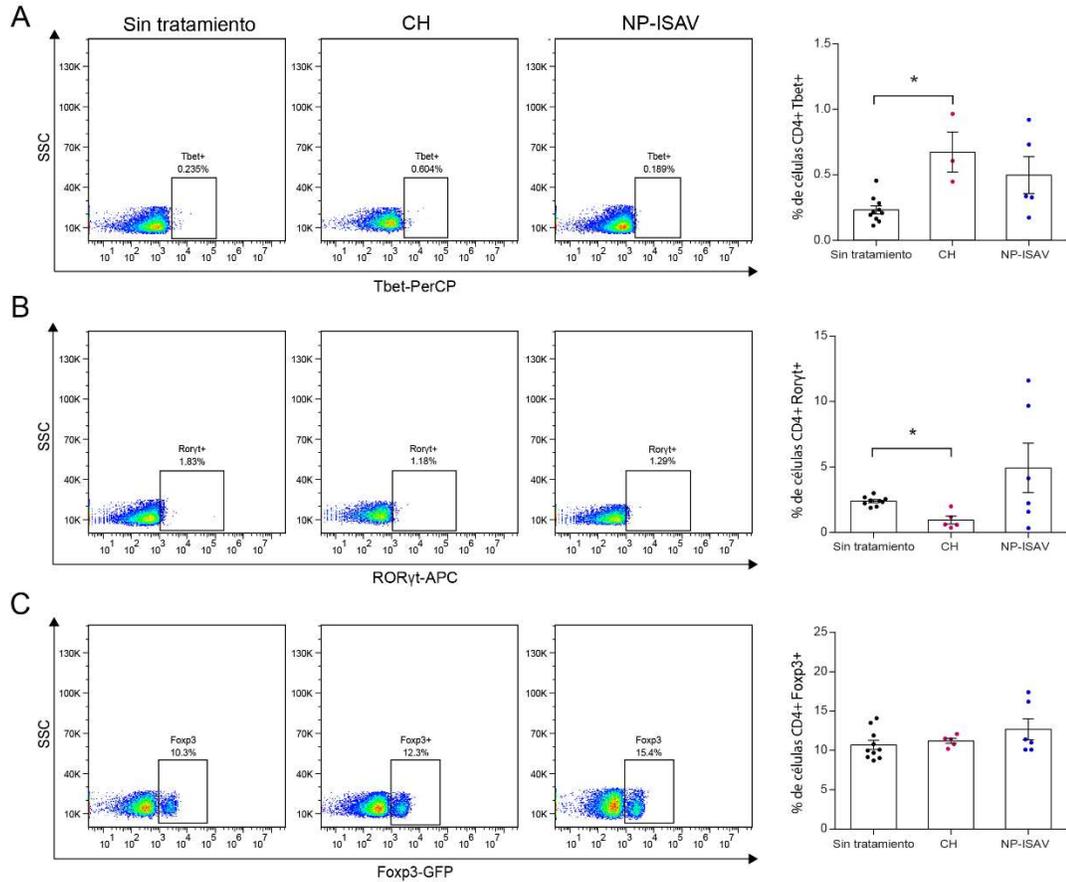
**Figura 19: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones reporteros.** Dotplots representativos para la población CD4+ (**A**) y CD8+ (**B**) infiltrante de tumor. Gráfico del porcentaje de células de tumor CD4+ y CD8+ para ratones sin tratamiento (n = 10) y tratados con CH (n = 5) y con NP-ISAV (n = 5) (**C**). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de  $p < 0.05$ . SSC: side-scattered (complejidad celular).

Al igual que lo observado en las poblaciones CD4+ y CD8+ infiltrantes de tumor, el tratamiento con NP-ISAV no indujo variación a nivel sistémico en comparación con el grupo sin tratamiento o con el grupo tratado con CH (Figura 20, NP-ISAV).



**Figura 20: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones reporteros.** Dotplot representativos para la población CD4+ (A) y CD8+ (B) en bazo. Gráfico del porcentaje de esplenocitos CD4+ y CD8+ para ratones sin tratamiento (n= 10) y tratados con CH (n = 5) y con NP-ISAV (n = 6) (C). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de p<0.05. SSC: side scattered (complejidad celular).

En el análisis de las subpoblaciones CD4+ en bazo que expresaran Tbet, RORyt y Foxp3, nuevamente se observó que el tratamiento con NP-ISAV no produjo cambios en las poblaciones evaluadas, al comparar con el grupo sin tratamiento o al tratado con CH (Figura 21, NP-ISAV).



**Figura 21: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones reporteros.** Dotplots representativos (izquierda) y gráfica del porcentaje de células (derecha) CD4+Tbet+, Th1 (A), CD4+RORyt+, Th17 (B) y CD4+Foxp3+, Treg (C) para ratones sin tratamiento (n = 10) y tratados con CH (n = 3-5) y con NP-ISAV (n = 5-6). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de p<0.05. SSC: side-scattered (complejidad celular).

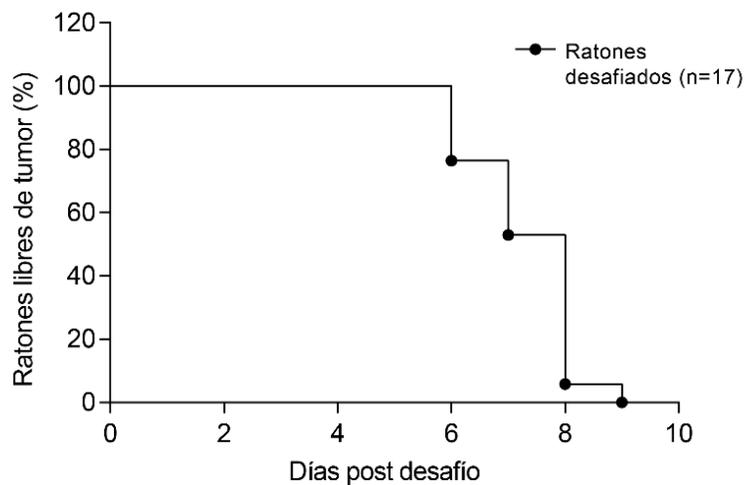
Los resultados aquí expuestos muestran que, en melanoma murino B16, el tratamiento i.t. con nanopartículas de quitosano en conjunto con la secuencia codificante para las proteínas de fusión de ARV e ISAV, produce un retraso en el crecimiento tumoral e incluso casos de regresión

completa del tumor. Sin embargo, a pesar de producir un efecto sobre el crecimiento tumoral, ambos tratamientos no indujeron cambios en las poblaciones celulares inmunes estudiadas, en comparación a animales sin tratamiento. Sorprendentemente, el tratamiento con una suspensión de CH, además de afectar el crecimiento tumoral (similar al tratamiento con NP-ARV y NP-ISAV), indujo un aumento de la población de linfocitos CD4+ infiltrantes y CD4+Tbet+ sistémicos, además de una disminución de linfocitos CD8+ sistémicos y CD4+RORyt+ infiltrantes, sugiriendo que el tratamiento i.t. con CH tendría por si solo un efecto antitumoral al inducir una respuesta inmune posiblemente asociada a linfocitos Th1.

#### **8. Evaluación de la expresión intratumoral de ARV-p10 con nanopartículas de quitosano sobre el crecimiento tumoral y el porcentaje de poblaciones linfocitarias en bazo y tumor de melanoma murino en ratones tipo silvestre.**

El tratamiento con CH, así como con NP-ARV y NP-ISAV tuvo un efecto sobre el crecimiento tumoral y, además el tratamiento con CH indujo una variación en el porcentaje de las poblaciones inmunes asociadas a una respuesta antitumoral, sin embargo, estos resultados no permiten la detección de linfocitos activos que aseguren la acción de una respuesta inmune antitumoral. Por ello, el siguiente paso fue evaluar subpoblaciones CD4+ funcionales, por medio de la detección de células productoras de citoquinas. Para esto, ratones C57BL/6J tipo silvestre fueron tratados i.t. con CH y NP-ARV para la evaluación tanto en bazo como en tumor de las poblaciones CD4+ y CD8+ y la subpoblación CD4+Foxp3+ (Treg), junto con las subpoblaciones CD4+ que expresaban las citoquinas IFN $\gamma$  e IL-17A, con el fin de evaluar poblaciones linfocitarias Th1 y Th17 activas, respectivamente.

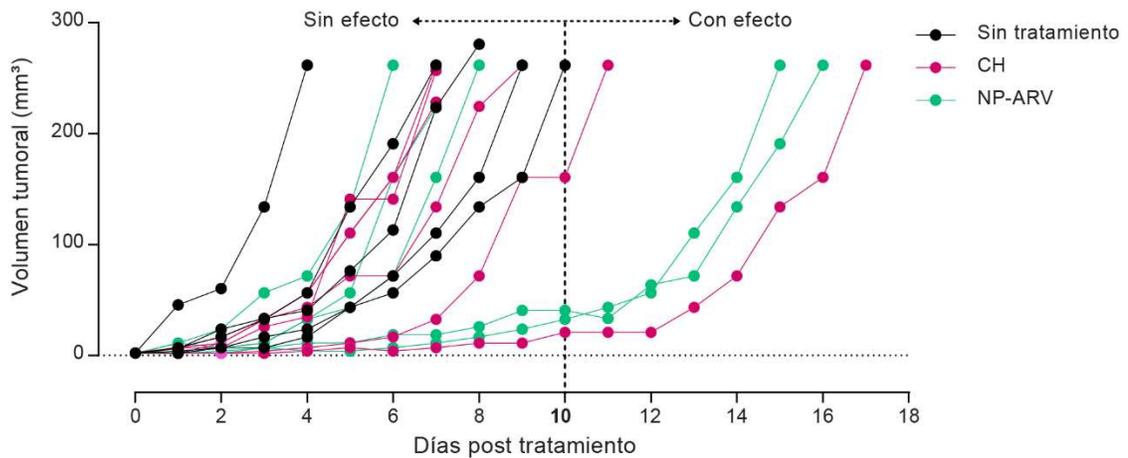
El tiempo de aparición tumoral tras el desafío con células tumorales fue de 6 a 9 días para todos los animales utilizados en este estudio (Figura 22).



**Figura 22: Inducción tumoral por desafío con células B16 vivas en ratones tipo silvestre.** Gráfico de Kaplan Meier de animales C57BL/6J tipo silvestre libres de tumor que indica el tiempo de aparición tumoral tras el desafío con  $2 \times 10^5$  células B16. Se indican todos los animales utilizados en este estudio ( $n = 17$ ), que posteriormente fueron separados en los distintos grupos. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism.

### 8.1 Tratamiento intratumoral con NP-ARV.

Al evaluar el efecto sobre el crecimiento tumoral, se observó que el tratamiento tanto con CH como con NP-ARV produjo un retraso en el crecimiento tumoral con relación al grupo que no recibió tratamiento (Figura 23). Este efecto se observó en dos de los seis animales tratados con CH y en dos de los cinco animales tratados con NP-ARV (Tabla 4). En este caso, el tiempo máximo en que los animales que no recibieron tratamiento alcanzaron el VTM, fue de 10 días (Figura 23).



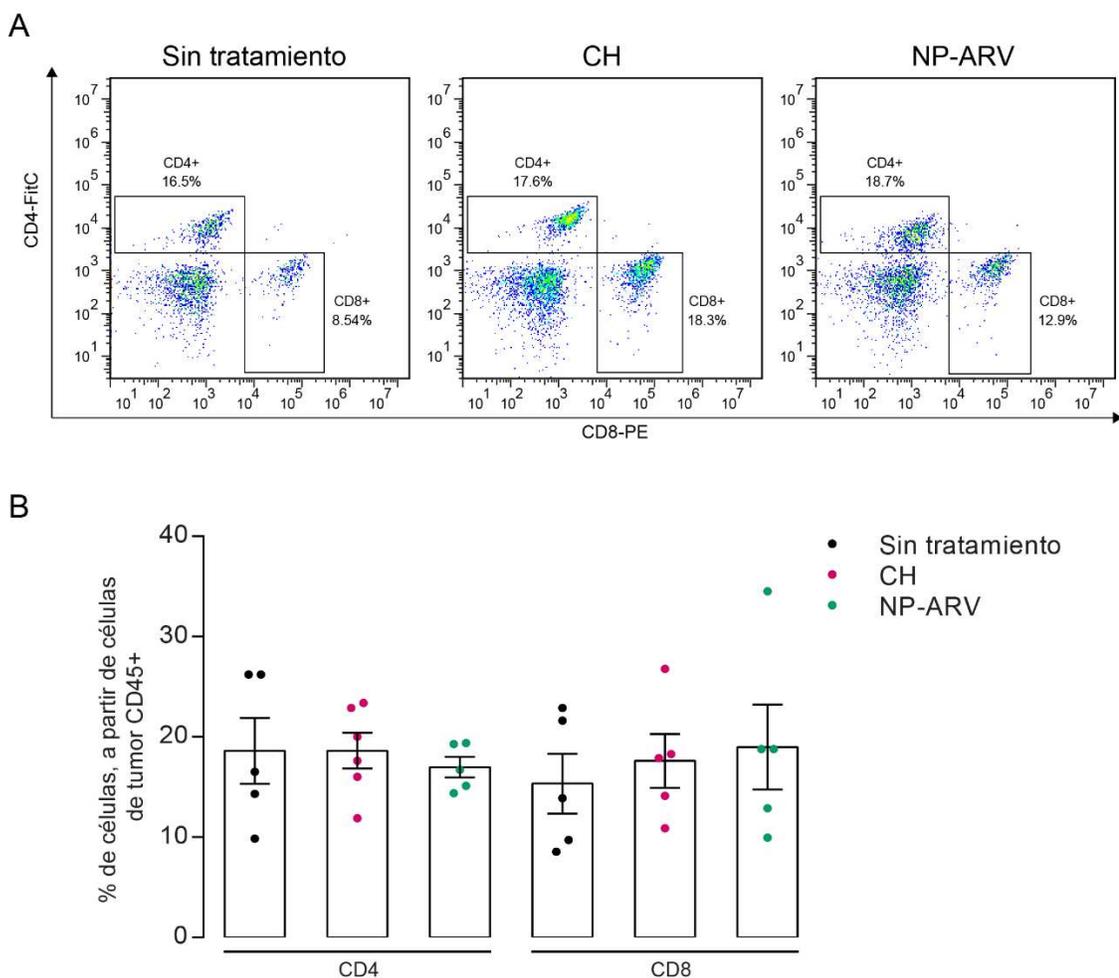
**Figura 23: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino en ratones tipo silvestre.** Gráfico del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> de ratones tipo silvestre tratados i.t. con CH (n = 6) y con NPs de CH que contienen 10 µg de pIRES-ARV (NP-ARV, n = 5) en una relación N/P de 20, en comparación a ratones sin tratamiento (n = 6). El día cero corresponde a un volumen tumoral de 2,1 mm<sup>3</sup>, indicando el inicio del tratamiento. El día 10 corresponde el día en que el último animal sin tratamiento alcanzó el VTM (línea negra segmentada).

**Tabla 5: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el crecimiento tumoral de melanoma murino B16 en ratones tipo silvestre.**

Tratamiento	Animales (N° / %)			N°/%
	Sin efecto	Con efecto <sup>#</sup>		
Sin tratamiento	6/100	0/0	Retraso	-
			Regresión	-
CH	4/67	2/33*	Retraso	2/100
			Regresión	0/0
NP-ARV	3/60	2/40*	Retraso	2/100
			Regresión	0/0

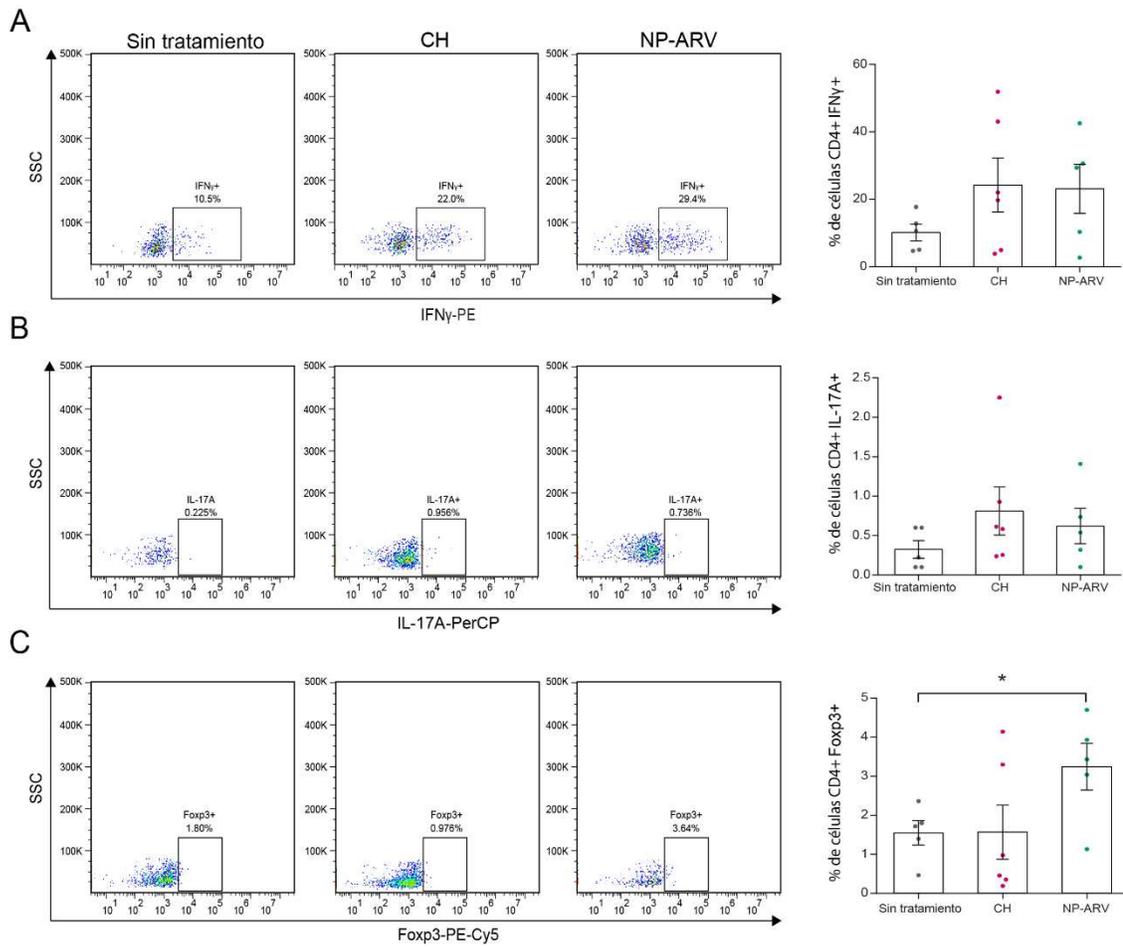
<sup>#</sup>Datos analizados mediante test exacto de Fischer, donde \* indica p<0,05 en comparación al grupo sin tratamiento. Se consideró un efecto sobre el crecimiento tumoral si: el VTM fue alcanzado posterior al día 17 post-tratamiento o se observó una regresión tumoral.

La evaluación de las poblaciones infiltrantes de tumor indicó que tanto el tratamiento con CH, como con NP-ARV no produjo cambios en las poblaciones CD4+ y CD8+, en comparación al grupo sin tratamiento (Figura 24, CH y NP-ARV).



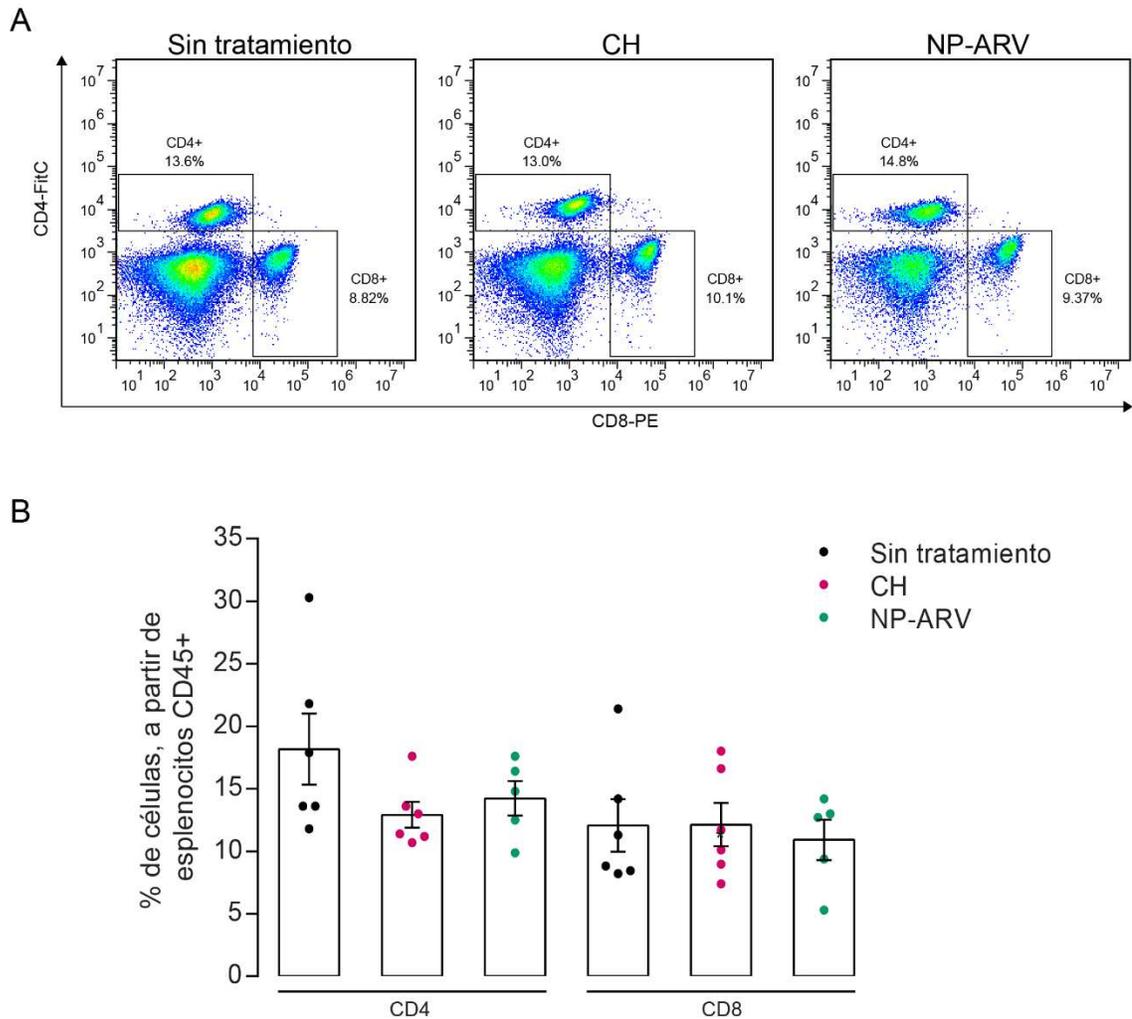
**Figura 24: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias infiltrantes de tumor en ratones tipo silvestre.** Dotplots representativos para la población CD4+ y CD8+ (A) infiltrante de tumor. Gráfico del porcentaje de células de tumor CD4+ y CD8+ a partir de células CD45+ para ratones tipo silvestre sin tratamiento (n = 6) y ratones tratados con CH (n = 6) y con NP-ARV (n = 5) (B). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico.

El análisis de las subpoblaciones CD4+ infiltrantes de tumor mostró que al utilizar el tratamiento con NP-ARV se indujo un aumento significativo ( $p=0,0476$ ) de la subpoblación CD4+Foxp3+ (Treg) con relación al grupo sin tratamiento (Figura 25C, NP-ARV), sin observar cambios en las subpoblaciones CD4+IFN $\gamma$ + (Th1) y CD4+IL-17A+ (Th17) (Figura 25A y B, respectivamente). Por otro lado, el tratamiento con CH no mostró cambios en ninguna de las subpoblaciones evaluadas (Figura 25, CH).



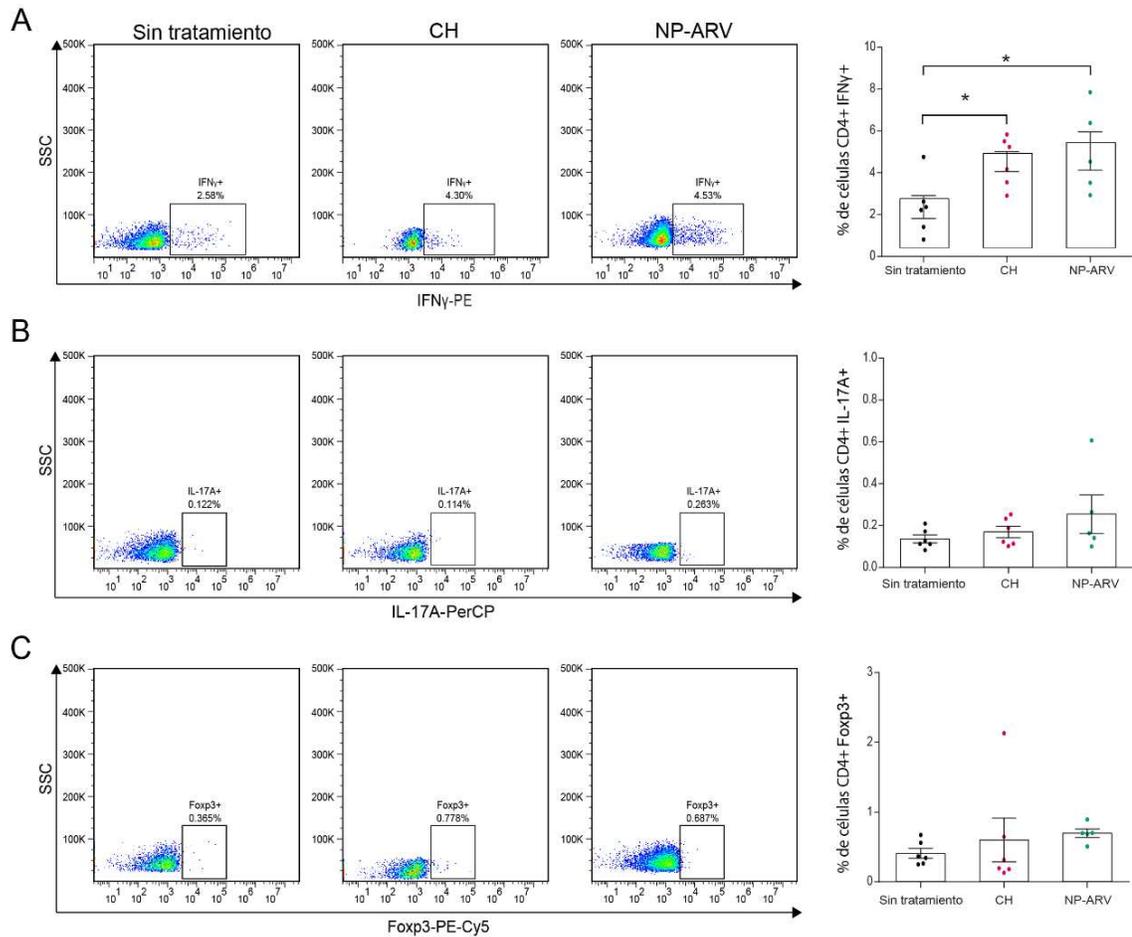
**Figura 25: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ infiltrantes de tumor en ratones tipo silvestre.** Dotplots representativos (izquierda) y gráfica del porcentaje de células (derecha) CD4+IFN $\gamma$ +, Th1 **(A)**, CD4+IL-17A+, Th17 **(B)** y CD4+Foxp3+, Treg **(C)** a partir de células CD45+ para ratones tipo silvestre sin tratamiento (n = 5) y ratones tratados con CH (n = 6) y con NP-ARV (n = 5). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de p<0.05. SSC: side scattered (complejidad celular).

El análisis a nivel sistémico en bazo mostró que ambas poblaciones CD4+ y CD8+ se mantuvieron sin variación tras ambos tratamientos, en comparación al grupo que no recibió tratamiento (Figura 26). Estos resultados son similares a lo observado en ratones C57BL/6Foxp3<sup>GFP+</sup> (Figura 16).



**Figura 26: Efecto del tratamiento con NP-ISAV sobre el porcentaje de las poblaciones linfocitarias en bazo de ratones tipo silvestre.** Dotplot representativos para la población CD4+ y CD8+ (A) en bazo. Gráfico del porcentaje de esplenocitos CD4+ y CD8+ a partir de células CD45+ para ratones tipo silvestre sin tratamiento (n = 6) y ratones tratados con CH (n = 6) y con NP-ARV (n = 5) (B). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico.

En cuanto a las subpoblaciones CD4+ en bazo, el tratamiento con CH y con NP-ARV produjo un aumento significativo ( $p=0,0152$ ) de la subpoblación CD4+IFN $\gamma$ + (Th1) con relación al grupo sin tratamiento (Figura 27A), sin observar una variación en el porcentaje de las subpoblaciones CD4+IL-17A+ (Th17) y CD4+Foxp3+ (Treg) (Figura 27B y C).



**Figura 27: Efecto del tratamiento con NP-ARV sobre el porcentaje de las subpoblaciones linfocitarias CD4+ en bazo de ratones tipo silvestre.** Dotplots representativos (izquierda) y gráfica del porcentaje de células (derecha) CD4+IFN $\gamma$ +, Th1 (A), CD4+IL-17A+, Th17 (B) y CD4+Foxp3+, Treg (C) a partir de células CD45+ para ratones tipo silvestre sin tratamiento (n = 6) y ratones tratados con CH (n = 6) y con NP-ARV (n = 5). En la gráfica se muestra el valor obtenido para cada ratón analizado. Los datos fueron analizados con GraphPad Prism mediante test de Mann Whitney no paramétrico, donde \* indica diferencias significativas de  $p<0.05$ . SSC: side scattered (complejidad celular).

Estos resultados indican que el tratamiento i.t. con quitosano y con NPs de quitosano que contienen la secuencia codificante para la proteína ARV-p10 (NP-ARV), induce un retraso en el desarrollo de tumores de melanoma en ratones C57BL/6J tipo silvestre. Tras ambos tratamientos se observó variación en las poblaciones celulares evaluadas, específicamente, un aumento en la subpoblación de linfocitos CD4+IFN $\gamma$ + a nivel sistémico con el tratamiento con CH y NP-ARV y un aumento de la subpoblación CD4+Foxp3+ infiltrante de tumor, sólo con NP-ARV. Estos resultados apoyan la acción antitumoral de ambos tratamientos observada en ratones C57BL/6J Foxp3<sup>GFP+</sup> (Figura 14) posiblemente asociada a la acción de linfocitos Th1.

## DISCUSIÓN

La expresión intratumoral de proteínas de fusión viral es una estrategia prometedora para ser utilizada como terapia génica contra el cáncer. En esta tesis se evaluó el efecto de la expresión *in vitro* e *in vivo*, utilizando nanopartículas de quitosano como vehículo, de dos proteínas de fusión viral, ARV-p10 e ISAV-F en melanoma murino B16. En cultivo celular, la expresión de ambas proteínas produjo un efecto citotóxico asociado a la formación de sincicios e *in vivo*, el tratamiento intratumoral con las nanopartículas provocó un retraso en el desarrollo de los tumores observándose incluso casos de regresión completa del tumor, además de un aumento de poblaciones celulares relacionadas a una respuesta inmune antitumoral. Estos resultados se asemejan a lo descrito para la expresión de una variante altamente fusogénica de la proteína GALV-F en células tumorales humanas, la cual produce la formación de sincicios inestables de corta vida media, lo que provoca una elevada citotoxicidad *in vitro* (Bateman, Bullough, y cols. 2000; Lin, Salon, y cols. 2009; Zhu, Yang, y cols. 2014) y una inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* (Lin, Salon, y cols. 2009; Zhu, Yang, y cols. 2014).

Las nanopartículas de quitosano sintetizadas bajo las distintas condiciones evaluadas permitieron una alta eficiencia de transfección *in vitro*. En algunas de estas condiciones, la transfección de las dos líneas celulares evaluadas, HEK-293 y B16, fue significativamente mayor a lo obtenido con lipofectamina, a diferencia de lo descrito previamente tanto para células HEK-293 (Mao, Roy, y cols. 2001; Lavertu, Méthot, y cols. 2006), como para células B16 (Sato, Ishii, y cols. 2001) al utilizar nanopartículas de quitosano de características similares. Esto confirma la funcionalidad de las nanopartículas CH/pDNA como un eficiente vehículo de transfección y corrobora que la eficiencia de esta transfección depende del tipo celular y de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (Mao, Roy, y cols. 2001; Agirre, Zarate, y cols. 2014).

Una característica importante de un vehículo de transfección es que debe producir una

baja o nula toxicidad en la célula. Los estudios disponibles que evalúan la toxicidad del quitosano en cultivo celular varían en función del tipo de célula, la concentración y el tiempo de incubación, además del tipo de ensayo de citotoxicidad utilizado. Estas variables, más las variaciones intrínsecas del quitosano como polímero (PM, %DDA, etc.), se traducen en una amplia gama de respuestas que son prácticamente imposibles de comparar, debido a condiciones de evaluación no estandarizadas (Rodrigues, Dionísio, y cols. 2012). Sin embargo, la tendencia general indica que el quitosano produce un cierto grado de toxicidad que depende de la dosis, %DDA, PM (Huang, Khor, y cols. 2004), pH y tiempo de incubación (Loh, Yeoh, y cols. 2010). En células A549 (carcinoma de pulmón humano) la evaluación de la viabilidad celular por ensayo MTT tras la incubación durante 4 horas con distintas concentraciones de nanopartículas de CH produce una disminución significativa de la viabilidad celular a dosis mayores de 0,714 mg/ml de CH, con un IC<sub>50</sub> entre 1,1 y 1,2 mg/ml (Huang, Khor, y cols. 2004). Basándonos en la Tabla 1, que indica las cantidades de CH utilizadas para la síntesis de las nanopartículas, las concentraciones de CH evaluadas por ensayo MTT en células B16 fue entre 2,25 y 22,5 µg/ml, es decir sobre tres órdenes de magnitud menor a lo descrito como dosis tóxica en células A549 por el grupo de Huang y cols., lo que podría explicar la ausencia de efecto citotóxico observado incluso tras 120 horas de incubación con las diferentes nanopartículas en células B16.

Los estudios del efecto antitumoral mediado por proteínas de fusión viral se han basado principalmente en la acción de una variante altamente fusogénica de la proteína GLAV-F, la cual forma parte de la envoltura del virus de la leucemia del mono Gibón y es la encargada de mediar la fusión entre la membrana viral y la membrana de la célula blanco, para permitir la entrada del virus al citoplasma celular. La expresión de GALV-F en células H322 y A549 de carcinoma de pulmón humano produce una disminución del 55,5% y 78,9% en la viabilidad celular a los 4 y 5 días post-transfección, respectivamente (Lin, Salon, y cols. 2009). Este efecto citotóxico se le atribuye a la formación de células multinucleadas o sincicios producto de la fusión celular mediada por GALV-F. Estos sincicios son inicialmente viables y permanecen activos tanto metabólicamente como transcripcionalmente (Bateman, Bullough, y cols. 2000), sin embargo, finalmente pierden

su adherencia y sufren un tipo de muerte celular que hasta la fecha no se ha caracterizado completamente (Bateman, Harrington, y cols. 2002) debido a la existencia de evidencia que apoya tanto un tipo de muerte apoptótica (Salsman, Top, y cols. 2005) como no apoptótica (Bateman, Harrington, y cols. 2002).

Previamente en nuestro laboratorio, se había evaluado la expresión de proteínas de fusión de distintos virus en variadas terapias contra tumores murinos (Morales, Barrera-Avalos, y cols. 2017; datos no publicados). Entre estas proteínas, se encuentran hRSV-F, ARV-p10 e ISAV-F las cuales son codificadas en el genoma de virus que infectan células de tres especies distintas (humanos, aves y peces, respectivamente), cuya acción permite la fusión de membranas por medio de distintos mecanismos. Ambas diferencias podrían ser claves al momento de evaluar su posible acción antitumoral.

La expresión de ARV-p10 mediante transfección con lipofectamina y nanopartículas de quitosano generó sincicios en células tumorales B16 *in vitro* a las 48 horas post-transfección, concordante con la elevada actividad fusogénica descrita para esta proteína, clasificada como un fusógeno promiscuo, cuya expresión ha mostrado ser suficiente para inducir la fusión celular y la consecuente formación de sincicios en diversas líneas celulares (Bodelón, Labrada, y cols. 2002; Key y Duncan. 2014). Por otro lado, este corresponde al segundo reporte de actividad fusogénica de la proteína ISAV-F en células de mamíferos (Morales, Barrera-Avalos, y cols. 2017). La evaluación de fusión celular mediada por la proteína ISAV-F se ha restringido a cultivos de células de peces mantenidas a 15-20°C (Eliassen, Frøystad, y cols. 2000; Aspehaug, Mikalsen, y cols. 2005), sin embargo, nuestros resultados demuestran que la proteína ISAV-F posee actividad a temperaturas muy por sobre su temperatura óptima (37°C para el cultivo de células B16) apoyando estudios previos de nuestro laboratorio (Morales, Barrera-Avalos, y cols. 2017). Más aún, diversos estudios proponen que para la inducción de fusión celular mediada por ISAV-F, es necesaria una disminución del pH del medio de cultivo en conjunto con la adición de tripsina, sugiriendo que el corte proteolítico necesario para la acción de esta proteína sería realizado por

una proteasa extracelular (Falk, Namork, y cols. 1997; Aspehaug, Mikalsen, y cols. 2005). No obstante, recientemente se ha planteado que la mayoría de las proteínas F de distintas cepas de ISAV pueden sufrir el corte proteolítico intracelularmente, permitiendo su expresión en la superficie celular en un estado preactivado capaz de inducir niveles moderados de fusión celular, incluso a pH neutro (Fourrier, Lester, y cols. 2015). Más aún, la secuencia codificante para ISAV-F utilizada en este estudio corresponde a la de una cepa altamente virulenta aislada en el sur de Chile (ISAV752\_09), la cual presenta una secuencia de inserción (IN) en el sitio en que ocurre el corte proteolítico. Esta IN mejoraría el procesamiento de la proteína al aumentar el número de sitios de reconocimiento para proteasas intracelulares, favoreciendo el proceso de fusión de membranas (Cottet, Cortez-San Martin, y cols. 2010), lo que podría explicar la actividad de ISAV-F observada en células B16 cultivadas en ausencia de tripsina y a pH neutro.

De acuerdo con la inducción de muerte celular como consecuencia de la formación de sincicios mediada por la acción de la proteína GALV-F (Higuchi, Bronk, y cols. 2000), la observación de sincicios en células B16 transfectadas con nanopartículas para la expresión de ARV-p10 o ISAV-F fue acompañada de una disminución significativa de la viabilidad celular con una temporalidad similar a la descrita para GALV-F (Bateman, Harrington, y cols. 2002). Para ambas proteínas, este es el primer estudio en asociar su acción fusogénica con un efecto citotóxico en cultivo de células tumorales de mamífero.

El efecto antitumoral mediado por la acción de las proteínas de fusión viral se basa tanto en la función destructiva propia de las proteínas, así como en la acción del sistema inmune. Ambos efectos han sido demostrados. Por un lado, estudios demuestran que la expresión intratumoral de las proteínas de fusión de GALV y HERV-W inhibe el crecimiento de tumores de carcinoma de pulmón humano inducidos en ratones inmunodeficientes (*nude*) (Lin, Salon, y cols. 2009), confirmando que la formación de sincicios mediada por dichas proteínas es suficiente para producir citotoxicidad al destruir las células tumorales y eventualmente eliminar el tumor. Por otro lado, se ha descrito mediante ensayos *in vitro* que, la muerte celular producida como

consecuencia de la formación de sincicios corresponde a un tipo de muerte altamente inmunogénica, durante la cual se liberan vesículas tipo exosomas cargadas con antígenos tumorales, llamados sinciciomas (Bateman, Harrington, y cols. 2002). Estos, han resultado ser una eficiente fuente antigénica para la maduración y activación de células presentadoras de antígenos capaces de activar a linfocitos CTLs, lo que podría conducir al montaje de una respuesta inmune antitumoral *in vivo* (Linardakis, Bateman, y cols. 2002; Larmonier, Mérimo, y cols. 2006; Errington, Jones, y cols. 2006; Errington, Bateman, y cols. 2006). De forma similar, un estudio de nuestro laboratorio demostró que la privación de nutrientes en células de melanoma B16 que expresan la proteína ISAV-F produce cuerpos celulares (CBs-B16-ISAV) que sirven como fuente antigénica para células presentadoras de antígenos *in vitro*. Estos cuerpos celulares son captados y procesados por DCs llevando a su maduración y a la posterior presentación cruzada de estos antígenos exógenos por medio de moléculas MHC-I en la superficie celular, lo que podría activar a linfocitos CD8+. Además, la inmunización preventiva con CBs-B16-ISAV en ratones induce un retraso en el crecimiento tumoral de melanoma B16 asociado a un aumento en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ esplénicas (Morales, Barrera-Avalos, y cols. 2017). Estos hechos demuestran la acción clave que juega el sistema inmune en el reconocimiento, procesamiento y eliminación de tumores al ser activado por restos celulares procedentes de células que expresan proteínas de fusión viral.

En este estudio, el tratamiento con NP-ARV produjo un retraso en el crecimiento tumoral y un aumento de la población de linfocitos infiltrantes de tumor CD4+Foxp3+ (Treg) junto a un aumento de la población CD4+IFN $\gamma$ + esplénica en ratones tipo silvestre. Por su parte, el tratamiento con NP-ISAV no indujo cambios en las poblaciones evaluadas. La ausencia de una clara variación en las poblaciones celulares que demuestren el desarrollo de una respuesta inmune puede tener relación con la etapa del crecimiento tumoral en la cual dichas poblaciones fueron evaluadas. Esto se basa en que la relación tumor-sistema inmune, conocida como inmunomodulación, describe tanto las acciones protectoras del huésped como las del sistema inmune que no solo previenen, sino que también moldean el crecimiento tumoral (Vesely y Schreiber.

2013; Kaja, Kiran, y cols. 2017). La capacidad de inmunoección del cáncer es el resultado de tres fases secuenciales que se denominan como las tres E de la inmunoección: Eliminación, Equilibrio y Escape. La primera representa el proceso de inmunovigilancia por medio del cual el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar potenciales células tumorales. En la fase de equilibrio, existe un período de latencia mediada por el sistema inmune, debido a la abolición incompleta del tumor durante la fase de eliminación. Finalmente, ocurre el escape en el cual los tumores que han superado las restricciones inmunológicas impuestas en la fase de equilibrio logran proliferar (Finn. 2012; Teng, Galon, y cols. 2015). Los factores externos pueden influir en la direccionalidad del flujo de estas etapas, explicando por ejemplo, el efecto que tiene la inmunoterapia en el crecimiento de tumores en pacientes con cáncer (Schreiber, Old, y cols. 2011).

La curva de crecimiento de los tumores que recibieron tratamiento mostró que, en aquellos en que se observó una respuesta, el volumen del tumor se mantuvo sin variación durante aproximadamente 10 días post-tratamiento, a diferencia de lo ocurrido en animales no tratados en los que el tumor aumentó su volumen de forma considerable desde el día cero. Esto sugiere que el efecto observado podría deberse al desarrollo de una respuesta inmune antitumoral gatillada por el tratamiento, lo que mantendría el desarrollo del tumor en una etapa de equilibrio. Posterior a este periodo de equilibrio, se observó un cambio brusco en la pendiente de la curva de crecimiento producto del rápido aumento del volumen tumoral, posiblemente debido a un proceso de escape del tumor al efecto del tratamiento o a la acción del sistema inmune, que habría mantenido bloqueado su desarrollo durante la fase de equilibrio. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con NP-ARV y NP-ISAV no solo conservaría el crecimiento del tumor en una fase de equilibrio prolongada, sino que además, induciría la eliminación del tumor, tal como se observó en algunos ratones reporteros que lograron la erradicación completa del tumor posterior al tratamiento.

En base al análisis de la cinética de crecimiento de los tumores, es posible que la

variación en el porcentaje de las poblaciones inmunes tras el tratamiento con NP-ARV y la ausencia de variación tras el tratamiento con NP-ISAV, reflejen una respuesta inmune antitumoral de fase tardía, cuya acción habría sido superada por las células tumorales llevando al crecimiento del tumor. Más aún, el aumento de la población de linfocitos infiltrantes de tumor de tipo Treg provocada por el tratamiento con NP-ARV, evidencia la existencia de un microambiente protumoral al momento del análisis (Tanaka y Sakaguchi. 2016).

Considerando estas observaciones, como siguiente paso sería importante evaluar las poblaciones celulares efectoras de una respuesta inmune antitumoral en tiempos tempranos del desarrollo del tumor, por ejemplo, durante la etapa de equilibrio; además de la evaluación de otros tipos celulares que tienen un rol importante en este tipo de respuesta, como los linfocitos *natural killer* (NK) (Li, Dong, y cols. 2018). Este análisis permitiría determinar el efecto del tratamiento con NP-ARV y NP-ISAV sobre las poblaciones celulares inmunes durante el periodo de tiempo en que está ocurriendo una batalla entre el sistema inmune y las células tumorales, lo que podría explicar el retraso del crecimiento tumoral en animales con tumores de melanoma.

El quitosano ha sido evaluado por su actividad antitumoral desde la década de los ochenta, donde se observó que la administración oral de oligo-derivados de quitosano en ratones con tumores sólidos de Sarcoma 180 (Suzuki, Mikami, y cols. 1986) e intravenosa en ratones con tumor Meth-A (Tokoro, Tatewaki, y cols. 1988) produjo una inhibición de su crecimiento, acompañado de un aumento de IL-1 e IL-2 y una polarización a linfocitos T citotóxicos, en el caso de tumores Meth-A. Desde entonces se ha estudiado como compuesto antitumoral frente a otros tipos de tumores por administración oral, intragástrica, intravenosa e intraperitoneal (Maeda, and Kimura. 2004; Qi, and Xu. 2006). Más aún, existen estudios recientes que proponen el uso de quitosano como adyuvante para vacunas y drogas (Mori, Oleszycka, y cols. 2012; Li, Min, y cols. 2013; Lin, Lou, y cols. 2014; Carroll, Jin, y cols. 2016) debido a que ha demostrado que por sí solo sería capaz activar al sistema inmune. En ensayos *in vitro*, el quitosano ha mostrado activar a células dendríticas (Carroll, Jin, y cols. 2016; Li, Dong, y cols. 2018) y macrófagos (Bueter, Lee,

y cols. 2011; Bueter, Lee, y cols. 2014) ocasionando la liberación de IL-1 $\beta$  e IL-12, citoquinas cruciales para la polarización de linfocitos CD4+ a linfocitos Th1 efectores y productores de IFN $\gamma$ , importante citoquina de acción antitumoral (Ikeda, Old, y cols. 2002). Por otro lado, se ha observado que el tratamiento intraperitoneal con quitosano gatilla una respuesta inmune antitumoral en modelo de melanoma murino B16 por medio de la acción de células dendríticas que lleva a la activación y acción de linfocitos *natural killer* (NK) altamente secretores de IFN $\gamma$  (Li, Dong, y cols. 2018). Estos resultados proponen una relación estrecha entre el quitosano y la activación del sistema inmune hacia la producción de IFN $\gamma$ .

En esta tesis, el retraso en el crecimiento tumoral e incluso el caso de regresión completa del tumor en ratones reporteros tras el tratamiento con quitosano, apoyaría la idea de que este polímero podría inducir una respuesta celular antitumoral, posiblemente comandada por linfocitos Th1. Más aún, debido a que no se observaron diferencias entre el efecto en el crecimiento tumoral producido por el tratamiento con quitosano y el con las nanopartículas NP-ARV y NP-ISAV, es posible que el quitosano (presente en todos los tratamientos) sea por sí solo el responsable de dicho efecto y que este estaría o podría estar mediado por la acción de poblaciones celulares productoras de IFN $\gamma$  como Th1, basándose en el aumento de esta población celular observado en el bazo de ratones tratados con NP-ARV (ratones tipo silvestre) y con quitosano (ratones tipo silvestre y reporteros). Para dilucidar si la respuesta observada es producto de la acción del quitosano o también es potenciada por la presencia de vectores de expresión para las proteínas de fusión viral, es necesario evaluar si el tratamiento con NP-ARV y NP-ISAV permite la expresión de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F en el tejido tumoral, respectivamente. Junto a este análisis y considerando que *in vitro* en células B16, la expresión de estas proteínas indujo la formación de sincicios, es necesario también evaluar si estos son formados en el tumor *in vivo*, tal y como ha sido determinado en estudios similares en tumores de carcinoma de pulmón humano tratados para inducir la expresión de GALV-F (Lin, Salon, y cols. 2009).

Si eventualmente el retraso del crecimiento tumoral se debe solo al efecto del quitosano

y no a la expresión de las proteínas de fusión en el tumor tras el tratamiento con las NP-ARV y NP-ISAV, este hecho podría ser explicado en función de las características fisicoquímicas del quitosano, y por tanto de las nanopartículas. Como se mencionó previamente, el quitosano posee grupos amino con carga positiva a pH ácido, esencial para permitir su solubilidad. Si estos grupos no se encuentran disponibles debido a su interacción con los grupos fosfatos del DNA, como ocurre en la estructura de las nanopartículas, puede producirse una disminución en la solubilidad de los complejos. Si, simultáneamente aumenta el pH del medio, estas nanopartículas pueden formar agregados poco solubles (Buschmann, Merzouki, y cols. 2013). Considerando que para la administración intratumoral de las nanopartículas estas fueron resuspendidas en buffer fosfato salino pH 7,4, es posible que el tamaño, carga y/o solubilidad de las nanopartículas, y probablemente la dosis intratumoral inyectada, se hayan visto comprometidas. Esto último podría explicar la dispersión en los resultados de crecimiento tumoral y del porcentaje de las poblaciones inmunes celulares observada en los ratones que recibieron tratamiento. Una alternativa para aumentar la solubilidad de las nanopartículas a pH neutro, es la modificación de los grupos amino del quitosano por la adición de grupos trimetilo, generando polímeros de quitosano con distinto grado de cuaternización (Mourya y Inamdar. 2009), lo que podría asegurar que las nanopartículas mantengan, en el PBS, la estructura necesaria para ser captadas por las células tras su inyección intratumoral. Por otro lado, si bien el microambiente de tumores sólidos se caracteriza por una mala perfusión, que junto a una elevada tasa metabólica producen un ambiente ácido (Zhang, Lin, y cols. 2010), una condición que podría evitar la posible agregación de las nanopartículas planteada anteriormente, y así asegurar su captación e internalización por las células tumorales, este fenómeno es algo que debe ser comprobado.

## CONCLUSIÓN

Los resultados expuestos en esta tesis demuestran, por primera vez, la utilización de nanopartículas de quitosano como método de transfección eficiente para la expresión de proteínas de fusión viral en células B16 de melanoma murino *in vitro*. La expresión de dos proteínas de fusión de origen viral, ARV-p10 o ISAV-F, evidenció su actividad fusogénica en células de mamífero, una especie distinta al hospedero comúnmente infectado por el virus que las codifica (aves y peces, respectivamente), bajo condiciones de cultivo de pH y temperatura distintas a las previamente descritas, en especial para ISAV-F. La disminución en la viabilidad celular observada tras la expresión de ambas proteínas las propone como una alternativa a la expresión de la extensamente estudiada proteína GALV-F como estrategia para inducir la destrucción de células tumorales como consecuencia de la formación de sincicios. Así mismo, el efecto negativo producido en el crecimiento de tumores de melanoma murino tras el tratamiento i.t. con CH, NP-ARV y NP-ISAV, junto al aumento de linfocitos Th1 en esplénicos, plantea su posible uso como terapia complementaria contra melanoma. Sin embargo, surge la necesidad de determinar si el tratamiento con NP-ARV y NP-ISAV permite la expresión intratumoral de las proteínas ARV-p10 e ISAV-F, respectivamente, o si el efecto antitumoral observado se debe solo a una acción propia del quitosano o a una respuesta del organismo frente a este.

## REFERENCIAS

- ©OMS|Cancer. 2014. Enfermedades no transmisibles en Chile. ENT Perfiles de países.
- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 1999. Inmunidad Antitumoral. *Inmunología Celular y Molecular*. 2° Español. p. 428–53.
- Agirre M, Zarate J, Ojeda E, Puras G, Desbrieres J, and Pedraz JL. 2014. Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: From bench to bedside. *Polymers*. 6(6):1727–55.
- American Cancer Society. 2016. Cancer Facts & Figures 2016. *Cancer Facts & Figures 2016*. :1–9.
- Aspehaug V, Mikalsen AB, Snow M, and Biering E. 2005. Characterization of the Infectious Salmon Anemia Virus Fusion Protein. *79(19):12544–53*.
- Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, and Paulos CM. 2014. Th17 cells in cancer : the ultimate identity crisis. *5(June):1–13*.
- Bateman A, Bullough F, Murphy S, Emiliusen L, Lavillette D, Cattaneo R, Russell SJ, and Vile RG. 2000. Fusogenic Membrane Glycoproteins As a Novel Class of Genes for the Local and Immune-mediated Control of Tumor Growth. *Cancer Research*. 60:1492–7.
- Bateman AR, Harrington KJ, Kottke T, Ahmed A, Melcher AA, Gough MJ, Linardakis E, Riddle D, Dietz A, Lohse CM, Strome S, Peterson T, Simari R, and Vile RG. 2002. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Research*. 62(22):6566–78.
- Bhatia S, Tykodi SS, and Thompson JA. 2009. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. 23(6):488–96.

Bodelón G, Labrada LL, Martínez-Costas J, Benavente J, Martínez-Costas J, and Benavente J. 2002. Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells. Viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *Journal of Biological Chemistry*. 277(20):17789–96.

Boutillier J, and Duncan R. 2011. The Reovirus Fusion-Associated Small Transmembrane (FAST) Proteins: Virus-Encoded Cellular Fusogens. *Current Topics in Membranes*.

Buchbinder EI, and Desai A. 2016. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*. 39(1):98–106.

Buchbinder EI, and Flaherty KT. 2016. Biomarkers in Melanoma: Lessons from Translational Medicine. *Trends in Cancer*. 2(6):305–12.

Bueter CL, Lee CK, Rathinam VAK, Healy GJ, Taron CH, Specht CA, and Levitz SM. 2011. Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry*. 286(41):35447–55.

Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, and Levitz SM. 2014. Spectrum and Mechanisms of Inflammasome Activation by Chitosan. *The Journal of Immunology*. 192(12):5943–51.

Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, and Kohn EC. 2014. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *NIH Public Access*. 120(22):3446–56.

Buschmann MD, Merzouki A, Lavertu M, Thibault M, Jean M, and Darras V. 2013. Chitosans for delivery of nucleic acids. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 65(9):1234–70.

Carroll EC, Jin L, Mori A, Muñoz-Wolf N, Oleszycka E, Moran HBT, Mansouri S, McEntee CP, Lambe E, Agger EM, Andersen P, Cunningham C, Hertzog P, Fitzgerald KA, Bowie AG, and Lavelle EC. 2016. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity*. 44(3):597–608.

- Chen L, and Flies DB. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology*. 13(4):227–42.
- Ciechonska M, and Duncan R. 2014. Reovirus FAST proteins: Virus-encoded cellular fusogens. *Trends in Microbiology*. 22(12):715–24.
- Colman PM, Lawrence MC, Walter T, and Hall E. 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. 4(April).
- Cottet L, Cortez-San Martin M, Tello M, Olivares E, Rivas-Aravena A, Vallejos E, Sandino AM, and Spencer E. 2010. Bioinformatic Analysis of the Genome of Infectious Salmon Anemia Virus Associated with Outbreaks with High Mortality in Chile. *Journal of Virology*. 84(22):11916–28.
- Diller ML, Kudchadkar RR, Delman KA, Lawson DH, and Ford ML. 2016. Balancing inflammation: The link between Th17 and regulatory T cells. *Mediators of Inflammation*. 2016.
- Duncan R. 1999. Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreoviruses: a species proposal. *Virology*. 260(2):316–28.
- Duncan R, Chen Z, Walsh S, and Wu S. 1996. Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress. *Virology*. 224(2):453–64.
- Dunn GP, Old LJ, and Schreiber RD. 2004. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*. 22(1):329–60.
- Durgeau A, Virk Y, Corgnac S, and Mami-Chouaib F. 2018. Recent advances in targeting CD8 T-cell immunity for more effective cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*. 9(JAN).
- Eggermont AMM, and Schadendorf D. 2009. Melanoma and Immunotherapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 23(3):547–64.
- Eliassen TM, Frøystad MK, Dannevig H, Jankowska M, Brech A, Romøren K, Gjølven T, Dannevig BH, and Falk K. 2000. Initial Events in Infectious Salmon Anemia Virus Infection : Evidence for the

Requirement of a Low-pH Step Initial Events in Infectious Salmon Anemia Virus Infection : Evidence for the Requirement of a Low-pH Step. *Journal of Virology*. 74(1):218–27.

Errington F, Bateman A, Kottke T, Thompson J, Harrington K, Merrick A, Hatfield P, Selby P, Vile R, and Melcher A. 2006. Allogeneic tumor cells expressing fusogenic membrane glycoproteins as a platform for clinical cancer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. 12(4):1333–41.

Errington F, Jones J, Merrick A, Bateman A, Harrington K, Gough M, O'Donnell D, Selby P, Vile R, and Melcher A. 2006. Fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumour cell fusion activates human dendritic cells for enhanced IL-12 production and T-cell priming. *Gene Therapy*. 13(2):138–49.

Ethesda M. 2017. PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Melanoma Treatment. National Cancer Institute.

Falk K, Namork E, Rimstad E, Mjaaland S, and Dannevig BH. 1997. Characterization of infectious salmon anemia virus, an orthomyxo-like virus isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of virology*. 71(12):9016–23.

Finn OJ. 2012. Immuno-oncology: Understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*. 23(SUPPL.8):8–11.

Fourrier M, Lester K, Markussen T, Falk K, Secombes, Christopher J. McBeath A, and Collet B. 2015. Dual mutation events in the haemagglutinin-esterase and fusion protein from an infectious salmon anaemia virus HPR0 genotype promote viral fusion and activation by an ubiquitous host protease. *PLoS ONE*. 10(10):1–19.

Garbe C, Eigentler TK, Keilholz U, Hauschild A, and Kirkwood JM. 2011. Systematic Review of Medical Treatment in Melanoma: Current Status and Future Prospects. *The Oncologist*. 16(1):5–24.

Griffiths C, Drews SJ, and Marchant DJ. 2017. Respiratory Syncytial Virus : Infection , Detection , and New Options for Prevention and Treatment. 30(1):277–319.

Hadrup S, Donia M, and Straten P. 2013. Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. :123–33.

Harrison SC. 2015. Viral membrane fusion. *Virology*. 479–480:498–507.

Higuchi H, Bronk SF, Bateman A, Harrington K, Vile RG, and Gores GJ. 2000. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: Implications for gene therapy. *Cancer Research*. 60(22):6396–402.

Huang M, Khor E, and Lim LY. 2004. Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*. 21(2):344–53.

Ikeda H, Old LJ, and Schreiber RD. 2002. The roles of IFN $\gamma$  in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 13(2):95–109.

Kaja S, Kiran SVNS, Kattapagari K, Chitturi R, Chowdary Sd, and Reddy BR. 2017. A review on tumor immunology. *Journal of Orofacial Sciences*. 9(1):7.

Kean T, and Thanou M. 2010. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 62(1):3–11.

Kennedy R, and Celis E. 2008. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunological Reviews*. 222(1):129–44.

Key T, and Duncan R. 2014. A Compact, Multifunctional Fusion Module Directs Cholesterol-Dependent Homomultimerization and Syncytiogenic Efficiency of Reovirus p10 FAST Proteins. *PLoS Pathogens*. 10(3).

Knutson KL, and Disis ML. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. :721–8.

L.F. Avendaño, M. Ferrés ES. 2011. *Virología Clínica*.

Lai WF, and Lin MCM. 2009. Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives. *Journal of*

Controlled Release. 134(3):158–68.

Larmonier N, Mérino D, Nicolas A, Cathelin D, Besson A, Bateman A, Solary E, Martin F, Katsanis E, and Bonnotte B. 2006. Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: An equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis*. 11(9):1513–24.

Lavertu M, Méthot S, Tran-Khanh N, and Buschmann MD. 2006. High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*. 27(27):4815–24.

Li X, Dong W, Nalin AP, Wang Y, Pan P, Xu B, Zhang Y, Tun S, Zhang J, Wang LS, He X, Caligiuri MA, and Yu J. 2018. The natural product chitosan enhances the anti-tumor activity of natural killer cells by activating dendritic cells. *OncolImmunology*. 7(6).

Li X, Min M, Du N, Gu Y, Hode T, Naylor M, Chen D, Nordquist RE, and Chen WR. 2013. Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: The novel adjuvants for cancer vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013, 2013:e387023.

Lin E, Salon C, Brambilla E, Lavillette D, Szecsi J, Cosset F, and Coll J. 2009. Fusogenic membrane glycoproteins induce syncytia formation and death in vitro and in vivo: a potential therapy agent for lung cancer. *Cancer Gene Therapy*. 17(4):256–65.

Lin YC, Lou PJ, and Young TH. 2014. Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials*. 35(31):8867–75.

Linardakis E, Bateman A, Phan V, Ahmed A, Gough M, Olivier K, Kennedy R, Errington F, Harrington KJ, Melcher A, and Vile R. 2002. Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Research*. 62(19):5495–504.

Loh JW, Yeoh G, Saunders M, and Lim LY. 2010. Uptake and cytotoxicity of chitosan nanoparticles in human liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 249(2):148–57.

Lungu M, Neculae A, Bunoiu M, and Biris C. 2015. Nanoparticles' Promises and Risks. Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment.

Maeda Y, and Kimura Y. 2004. Antitumor effects of various low-molecular-weight chitosans are due to increased natural killer activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in sarcoma 180-bearing mice. *The Journal of nutrition*. 134(4):945–50.

Mao HQ, Roy K, Troung-Le VL, Janes KA, Lin KY, Wang Y, August JT, and Leong KW. 2001. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*. 70(3):399–421.

Medler TR, Cotechini T, and Coussens LM. 2015. Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance. *Trends Cancer*. 1(1):66–75.

Melanoma Research Alliance. 2017. Annual Reports: Ten Years of Powerful Research and Results.

Morales J, Barrera-Avalos C, Castro C, Castillo S, Barrientos C, Robles-Planells, Claudia. López X, Torres E, Montoya M, Cortez-San Martín, Marcelo. Riquelme D, Escobar, Alejandro. Fernández R, Imarai M, Sauma D, Rojo LE, Leiva-Salcedo E, and Acuña C. 2017. Dead tumor cells expressing infectious salmon anemia virus fusogenic protein favor antigen cross-priming in Vitro. *Frontiers in Immunology*. 8(OCT):1170.

Mori A, Oleszycka E, Sharp FA, Coleman M, Ozasa Y, Singh M, O'Hagan DT, Tajber L, Corrigan OI, McNeela EA, and Lavelle EC. 2012. The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses. *European Journal of Immunology*. 42(10):2709–19.

Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, and Johansson CC. 2010. Regulatory T cells in cancer. *Advances in cancer research*. 107(10):57–117.

Mourya VK, and Inamdar NN. 2009. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery.

Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 20(5):1057–79.

Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, and Kerstann NP. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 112(2):362–73.

Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, and Bakke O. 2011. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*. 11(12):823–36.

Núñez S, Saez JJ, Fernandez D, Flores-Santibañez F, Alvarez K, Tejon G, Ruiz P, Maldonado P, Hidalgo Y, Manriquez V, Bono MR, Roseblatt M, and Sauma D. 2013. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology*. 139(1):61–71.

Nwe N, Furuike T, and Tamura H. 2009. The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*. 2(2):374–98.

Paschen A. 2009. T Cell Antigens in Cancer. *Tumor-Associated Antigens*.

Peske JD, Woods AB, and Engelhard VH. 2015. Control of CD8 T-Cell Infiltration into Tumors by Vasculature and Microenvironment. 1st ed. *Advances in Cancer Research*.

Pol J, Bloy N, Obrist F, Eggermont A, Galon J, Cremer I, Erbs P, Limach J-M, Preville X, Zitvogel L, Kroemer G, and Galluzzi L. 2013. Oncolytic viruses for cancer therapy. *Oncology, Trial watch*. 2(6):1–13.

Qi L, and Xu Z. 2006. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 16(16):4243–5.

Rodrigues S, Dionísio M, López CR, and Grenha A. 2012. Biocompatibility of Chitosan Carriers with Application in Drug Delivery. *Journal of Functional Biomaterials*. 3(4):615–41.

Rozeman EA, Dekker TJA, Haanen JBAG, and Blank CU. 2017. *Advanced Melanoma: Current*

Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives. *American Journal of Clinical Dermatology*.

Salsman J, Top D, Boutilier J, and Duncan R. 2005. Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *Journal of virology*. 79(13):8090–100.

Sato T, Ishii T, and Okahata Y. 2001. In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*. 22(15):2075–80.

Schreiber RD, Old LJ, and Smyth MJ. 2011. Cancer Immunoediting : Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. 331(6024):1565–70.

Shmulevitz M, Corcoran J, Salsman J, Duncan R, Shmulevitz M, Corcoran J, Salsman J, and Duncan R. 2004. Cell-Cell Fusion Induced by the Avian Reovirus Membrane Fusion Protein Is Regulated by Protein Degradation Cell-Cell Fusion Induced by the Avian Reovirus Membrane Fusion Protein Is Regulated by Protein Degradation.

Shmulevitz M, and Duncan R. 2000. A new class of fusion-associated small transmembrane ( FAST ) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. 19(5):902–12.

Singh PK, Doley J, Kumar GR, Sahoo AP, and Tiwari AK. 2012. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. (October):571–84.

Smith-Garvin JE, Koretzky GA, and Jordan MS. 2009. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*. 27(1):591–619.

Sun Y, Zhang S, Peng X, Gong Z, Li X, Yuan Z, Li Y, Zhang D, and Peng Y. 2012. Preparation, characterization and transfection efficacy of chitosan nanoparticles containing the intestinal trefoil factor gene. *Molecular Biology Reports*. 39(2):945–52.

Suzuki K, Mikami T, Okawa Y, Tokoro A, Suzuki S, and Suzuki M. 1986. Antitumor effect of hexa-

- N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate research*. 151:403–8.
- Tanaka A, and Sakaguchi S. 2016. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research*. 27(1):109–18.
- Teng MWL, Galon J, Fridman W, and Smyth MJ. 2015. From mice to humans : developments in cancer immunoediting. 125(9).
- Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault M-C, and Lapointe R. 2012. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 1(6):908–16.
- Tokoro A, Tatewaki N, Suzuki K, Mikami T, Suzuki S, and Suzuki M. 1988. Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 36(2):784–90.
- Twentyman PR, and Luscombe M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*. 56(3):279–85.
- Vesely MD, and Schreiber RD. 2013. Cancer immunoediting: Antigens, mechanisms, and implications to cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1284(1):1–5.
- Vile R, Ando D, and Kirn D. 2002. The oncolytic virotherapy treatment platform for cancer : Unique biological and biosafety points to consider. :1062–7.
- Walsh EE, and Hruska J. 1983. Monoclonal Antibodies to Respiratory Syncytial Virus Proteins : Identification of the Fusion Protein. 47(1):171–7.
- White JM, Delos SE, Brecher M, and Schornberg K. 2009. Structures and Mechanisms of Viral Membrane Fusion Proteins: 43(3):189–219.
- Xu Q, Wang C-H, and Pack DW. 2010. Polymeric carriers for gene delivery: chitosan and poly(amidoamine) dendrimers. *Current pharmaceutical design*. 16(21):2350–68.
- Zhang X, Lin Y, and Gillies RJ. 2010. Tumor pH and its measurement. *HHS Public Access*.

51(8):1167–70.

Zhu B, Yang J, Fu X, and Jiang Y. 2014. Anti-tumor Effects of Gene Therapy with GALV Membrane Fusion Glycoprotein in Lung Adenocarcinoma. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 69(3):577–82.