



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO

# “Expresión de antígenos tumorales y su correlación por estadios en tejidos de cáncer de vesícula biliar”

**Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniería en Biotecnología.**

***OMAR ANDRÉ BARRÍA CATRICURA***

**Director Seminario de Título: Dr. Flavio Salazar Onfray**

**Profesor Patrocinante: Dra. Daniela Sauma**

Santiago - Chile

Agosto 2018



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Sr:**

**OMAR ANDRÉ BARRÍA CATRICURA**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología

Dr. Flavio Salazar Onfray  
**Director Seminario de Título:**

---

**Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:**

---

**Evaluador:**

---

Santiago de Chile, .....



Omar nació el 30 de diciembre de 1993 en Santiago. Realizó su enseñanza básica en la escuela D-778 y la media en el colegio Villa el Sol. En 2012 ingresa en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el fin de resolver sus dudas y aprender lo que significa ser científico. Durante ese período, realiza su pasantía en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal con la profesora Liliana Cardemil y posteriormente con la profesora Claudia Stange. En 2015 ingresa al Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer (LREIC) en la Facultad de Medicina, conociendo una nueva área biotecnológica. Más tarde realiza su unidad de investigación en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT) y empieza su seminario de título en cáncer de vesícula biliar. En sus tiempos libres, su pasatiempo es practicar diversas danzas urbanas.

## **DEDICATORIA**

Esta Tesis va dedicada a todos los que me apoyaron en este camino, en especial a mi Dios que me ha acompañado en los momentos más difíciles. A mis padres y mi querida hermana que me ayuda aún hasta ahora.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por su apoyo y comprensión. Ha sido un camino largo, por ello agradezco los consejos de ellos en todo momento. También a todos los compañeros y amigos que me apoyaron y ayudaron durante el período de la universidad. Por último, agradezco a quienes, directa o indirectamente apoyaron el desarrollo de mi seminario de título, entre ellos, al profesor Flavio Salazar, a la profesora Mercedes López y al Dr. Daniel Rojas y a la Dra. Paula Fluxá.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. Resumen</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	5
Cáncer de vesícula biliar.....	5
Respuesta inmune antitumoral.....	8
Uso de AAT como blancos terapéuticos contra el cáncer.....	10
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	17
Selección de pacientes.....	17
Anticuerpos.....	17
Inmunohistoquímica.....	17
Análisis.....	18
<b>4. Resultados</b> .....	19
Expresión de AAT en tumores de pacientes chilenos con CVB.....	19
Análisis de la expresión de los AAT en los distintos estadios de CVB.....	24
Análisis de correlación de expresión de AAT en tumores de CVB y sobrevida de los pacientes.....	25
<b>5. Discusión y/o proyecciones</b> .....	28
<b>6. Conclusiones</b> .....	31
<b>7. Bibliografía</b> .....	32

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Distribución de género, estadio de la enfermedad y tiempo de supervivencia post-diagnóstico y la expresión de AAT de los pacientes con CVB analizados en este estudio.....	23
<b>Tabla II.</b> Porcentaje de pacientes que expresan de los antígenos con relación al total.....	24
<b>Tabla III.</b> Porcentaje de pacientes positivos por estadio.....	25

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Expresión de CEA, Survivina y CA19-9 en pacientes con CVB .....	21
<b>Figura 2.</b> Expresión de MUC1, erbB2, MAGE1 Y WT1 en pacientes con CVB .....	22
<b>Figura 3.</b> Sobrevida de pacientes con estadios tempranos y tardíos de CVB.....	25
<b>Figura 5.</b> Sobrevida de pacientes con CVB según expresión tumoral de CA19- 9.....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS

CVB	Cáncer de vesícula biliar
CTB	Cáncer del tracto biliar
IHC	Inmunohistoquímica
NK	Natural killer
CPA	Célula presentadora de antígenos
AAT	Antígeno asociado a tumor
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-4	Interleuquina 4
DAMPs	Patrones moleculares asociados al daño
TLR	Receptores tipo Toll
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
DCs	Células Dendríticas

## RESUMEN

El cáncer de vesícula biliar (CVB) es una enfermedad poco frecuente a nivel mundial, no obstante, países como India, Japón y Chile poseen una elevada tasa de incidencia. En nuestro país, el CVB representa una de las principales causas de muerte por cáncer en mujeres, particularmente en la etnia Mapuche. Los principales factores de riesgo se asocian con la colelitiasis, el género y factores genéticos. Debido a que sus síntomas son inespecíficos en estadios tempranos, esta enfermedad posee un mal pronóstico al momento del diagnóstico. Los tratamientos actuales son la cirugía y la quimioterapia, ambos ineficaces en estadios avanzados. Debido a lo anterior, se hace necesario profundizar el conocimiento acerca de las características del cáncer de vesícula biliar con el fin de desarrollar terapias más eficaces. Una estrategia reportada en varias publicaciones ha sido la búsqueda e identificación de marcadores moleculares que han sido descritos como antígenos asociados a tumor (AAT) en otros cánceres, debido principalmente a que se ha demostrado su presencia en la tumorigénesis y progresión tumoral, por lo que pueden ser utilizados como blancos para dirigir inmunoterapias antitumorales. De esta forma, en esta tesis planteamos que la expresión de los marcadores moleculares; erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, CEA, WT1 y CA19-9 se correlaciona positivamente con el progreso de la enfermedad en los distintos estadios de pacientes chilenos con CVB y podrían constituir candidatos como blancos terapéuticos en el CVB. Para ello se determinó mediante inmunohistoquímica la expresión de cada uno de estos AAT mencionados en biopsias de tumores de 16 pacientes con diversos estadios de CVB. Nuestros resultados mostraron que un alto porcentaje de las biopsias de pacientes con CVB expresan los diferentes AAT: erbB2 (14/16), Survivina (14/16), MAGE1 (14/16), MUC1 (12/16), CEA (11/16), CA19-9 (11/16) y WT1 (14/16). Además, observamos que la expresión de los AAT evaluados

es independiente del estadio en que se encontraban los pacientes. Por último, se observó que la expresión de CA19-9 en tumores se asociaría una mayor supervivencia post-diagnóstico en pacientes con CVB, aunque este hallazgo debe ser confirmado estadísticamente. Esta tesis constituye un aporte en el estudio de la expresión de AAT en CVB en pacientes. Por otro lado, los resultados obtenidos, si se confirman en un número mayor de pacientes, nos permitirían proponer a los AAT estudiados como posibles blancos terapéuticos contra CVB, ya sea utilizándolos como fuentes de antígenos en inmunoterapias celulares o a través de su inhibición mediante la utilización de anticuerpos monoclonales.

## **ABSTRACT**

Gallbladder cancer (CVB) is a rare disease worldwide, however, countries such as India, Japan and Chile have a high incidence rate. In our country, the CVB represents one of the main causes of cancer death in women, particularly in the Mapuche ethnic group. The main risk factors are associated with cholelithiasis, gender and genetic factors. Because its symptoms are nonspecific in early stages, this disease has a poor prognosis at the time of diagnosis.

The current treatments are surgery and chemotherapy, both ineffective in advanced stages. Due to the above, it is necessary to deepen the knowledge about the characteristics of gallbladder cancer in order to develop more effective therapies. A strategy reported in several publications has been the search and identification of molecular markers that have been described as tumor-associated antigens (AAT) in other cancers, mainly because their presence in tumorigenesis and tumor progression has been previously demonstrated. For this reason, they can be used as targets to direct anti-tumor immunotherapies.

In this way, we propose that the expression of molecular markers; erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, CEA, WT1 and CA19-9 correlate positively with the progress of the disease in the different stages of Chilean patients with CVB and could constitute candidates for ATT also for the CVB. To do this, the expression of each of these mentioned AATs was determined in tumor biopsies of 16 patients with different stages of CVB using immunohistochemistry.

Our results showed that a high percentage of biopsies from patients with CVB express the different AATs: erbB2 (14/16), Survivin (14/16), MAGE1 (14/16), MUC1 (12/16), CEA (11 / 16), CA19-9 (11/16) and WT1 (14/16). In addition, we observed that the expression of evaluated TAA is independent of the stage in which the patients were. Finally, it was observed that the expression of CA19-9 in tumors would be associated with greater post-diagnosis survival in patients with CVB, although this finding must be confirmed statistically.

This thesis constitutes a contribution in the study of the expression of AAT in CVB in patients. On the other hand, obtained results, if confirmed in a larger number of patients, would allow us to propose the TAA studied as possible therapeutic targets against CVB, either using them as antigen sources in cellular immunotherapies or through their inhibition by using of monoclonal antibodies.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Cáncer de vesícula biliar**

El incremento en la incidencia del cáncer en los últimos años, lo ha convertido en la segunda causa de muerte a nivel mundial después de las enfermedades cardiovasculares<sup>1</sup>. Dentro de los diversos tipos de neoplasias, se encuentran los carcinomas del tracto biliar (CTB), conjunto de neoplasias que afectan a órganos como el hígado, el intestino delgado y la vesícula biliar. De todos los CTB, el cáncer de vesícula biliar (CVB) es el más frecuente. Este tipo de cáncer se caracteriza por poseer una baja incidencia en occidente, con la excepción de Chile, que tiene la mayor incidencia y mortalidad en el mundo<sup>2</sup>.

Distintos factores de riesgo contribuyen al proceso carcinogénico en el CVB, dentro de los que se encuentran factores genéticos, geográficos, inflamación crónica, anomalías congénitas e incluso el género<sup>3</sup>. Esta neoplasia suele presentarse como adenocarcinoma en la mayoría de los casos y es precedida por cálculos vesiculares (colelitiasis) e inflamación crónica de la vesícula (colecistitis)<sup>4</sup>. Por otra parte, el género femenino se encuentra mucho más propenso a sufrir este tipo de cáncer debido a que los niveles de estrógenos afectan el metabolismo del colesterol, promoviendo la estasis biliar y la aparición de cálculos<sup>5</sup>. El CVB suele presentarse de 2 a 6 veces más en mujeres que en hombres, representando la tercera causa de muerte por neoplasias en mujeres chilenas<sup>2</sup>. Se presume que la manera en que los cálculos contribuyen a la inflamación y al desarrollo del CVB es principalmente por la irritación mecánica de la mucosa que recubre la vesícula producida por los cálculos, afectando su función, lo que llevaría a un vaciado incompleto de la bilis, provocando así la dilatación de la

vesícula y predisponiendo a la inflamación crónica<sup>5</sup>. Finalmente, su elevada incidencia en la zona sur de Chile se encuentra relacionada con la etnia Mapuche. Reportes indican que por cada 1% de herencia genética, es decir, el porcentaje del ADN que coincide con el de ancestros mapuches, aumenta 3,7% el riesgo de muerte por CVB<sup>6</sup>.

En relación a la manera en que se clasifican los estadios del CVB, este ocupa el sistema de estadificación de la AJCC<sup>2</sup> (*American Joint Committee on Cancer*), estos se dividen en 4 y son<sup>7</sup>:

Estadio 0: Las células cancerosas solo se encuentran en el epitelio (capa interna de la vesícula biliar) y no se han extendido a capas más profundas de la vesícula biliar. Esto también se conoce como carcinoma *in situ*. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.

Estadio I: El tumor ha crecido en la lámina propia o en la capa muscular. No se ha propagado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.

Estadio IA: El cáncer ha crecido a través de la capa muscular hasta el tejido fibroso en el lado del peritoneo (revestimiento de la cavidad abdominal).

Estadio IIA: El tumor ha crecido a través de la capa muscular hacia el tejido fibroso del costado del hígado sin invadirlo. Todavía no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.

Estadio IIIA: El cáncer se ha extendido a través de la capa serosa (la cubierta más externa de la vesícula biliar) y/o ha crecido desde la vesícula biliar directamente al hígado o una estructura cercana, como estómago, duodeno, colon, páncreas o conductos biliares fuera del hígado. Todavía no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos ni a sitios distantes.

Estadio IIIB: El cáncer no ha crecido directamente en el hígado ni en órganos cercanos, pero se ha diseminado a no más de 3 ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

Estadio IVA: El tumor ha crecido hasta alcanzar uno de los principales vasos sanguíneos que conducen al hígado (vena porta o arteria hepática) o se ha extendido hasta 2 o más estructuras fuera del hígado. Puede diseminarse a no más de 3 ganglios linfáticos cercanos. No se ha extendido a sitios distantes.

Estadio IVB: El cáncer se ha diseminado a 4 o más ganglios linfáticos cercanos. El cáncer puede haberse diseminado o no a los ganglios linfáticos cercanos. El cáncer se disemina a sitios distantes, como el hígado, el peritoneo o los pulmones.

El principal tratamiento del CVB para estadios tempranos del CVB (0, I y II) es la extirpación quirúrgica de la vesícula biliar (colecistectomía)<sup>8</sup>. Por otra parte, los tratamientos complementarios, principalmente la quimio y radioterapia, que se utilizan en pacientes que se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) son ineficaces en la mayoría de los casos, presentando una supervivencia global de apenas un 38% a los 18 meses de tratamiento<sup>8</sup>. Considerando estos antecedentes y dadas las características de este cáncer, entre ellas, su elevada letalidad, diagnóstico tardío (debido a la inespecificidad de sus síntomas) y su resistencia a los tratamientos actuales, se hace necesario encontrar nuevos blancos terapéuticos que ayuden a tratar de manera más eficaz esta enfermedad.

## **Respuesta inmune antitumoral**

El sistema inmune es un sistema multicelular organizado en diversos órganos, tejidos y fluidos, cuyos procesos biológicos ayudan a mantener la homeostasis del organismo, como así también protegerlo de agresiones, tanto externas (microorganismos patógenos, contaminantes, etc.) como internas (por ejemplo, células cancerosas)<sup>9</sup>. Las células presentadoras de antígenos profesionales (APC) del sistema inmune [células dendríticas (DCs), macrófagos y linfocitos B] están constantemente censando en los tejidos del organismo la presencia de diversas agresiones. En un contexto fisiológico normal, es decir, en ausencia de señales moleculares asociadas a daño y/o inflamación, los antígenos capturados en los tejidos y procesados por las APC (particularmente, pero no exclusivamente por las DCs) son presentados a los linfocitos T antígeno-específicos, a través de un proceso llamado presentación antigénica, induciendo anergia o un tipo de respuesta inmune de tolerancia inmunológica (tolerancia periférica)<sup>11</sup>. Por otro lado, en un contexto de agresión microbiana, inflamación o daño tisular (como en el caso de tumores), las APC activan respuestas inmunes contra los antígenos capturados en el tejido alterado, ya que en este caso el ambiente tisular contiene citoquinas pro-inflamatorias y moléculas llamadas patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que activan y hacen madurar a las APC. Las DCs maduras de esta forma, adquieren la capacidad de migrar a los linfonodos drenantes e iniciar una respuesta inmune mediante la presentación de los antígenos capturados en el sitio tumoral en moléculas de histocompatibilidad (MHC) tipo I o II a linfocitos T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente. Los linfocitos T activados por las DCs (llamado efectores), luego pueden migrar al sitio tumoral, infiltrarlo y en el caso de los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, iniciar una respuesta inmune antitumoral citotóxica específica contra

las células tumorales que presenten los péptidos antigénicos para los cuales ellos son específicos.

La capacidad del sistema inmune de reconocer y eliminar células tumorales ha permitido la exploración y desarrollo de aproximaciones alternativas o complementarias a las terapias convencionales (radioterapia y quimioterapia) para el tratamiento de cánceres, mediante el potenciamiento de las respuestas inmunológicas antitumorales a través de diversas inmunoterapias.

Las inmunoterapias antitumorales basadas en DCs consisten en condicionar *ex vivo* DCS autólogas con el fin de conferirles el potencial de inducir respuestas inmunológicas contra las células tumorales, una vez reinyectadas en pacientes con cáncer. Aspectos fundamentales en este tipo de terapias son: 1) que las DCs generadas tienen que presentar los antígenos específicos o asociados al tumor relevante y 2) deben ser maduras y activadas eficientemente. Se utilizan diversos métodos para inducir la maduración *ex vivo* de las DCs, como la exposición a citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN $\alpha$ , ligandos de receptores tipo Toll como LPS, CpG o poly (I:C), así como también mediante del uso de DAMPs de diversas fuentes<sup>12</sup>. Por otro lado, se han desarrollado diversas estrategias para cargar a las DCs con antígenos tumorales. Entre ellas se encuentran cargar con antígenos específicos del tumor (neoantígenos), péptidos antigénicos inmunodominantes, proteínas recombinantes, RNA, el uso de células tumorales enteras, lisados tumorales y fusión de DCs con células tumorales<sup>12</sup>. Entonces, para el desarrollo de este tipo de inmunoterapias es de suma importancia conocer los antígenos asociados a tumor (AAT) que se expresan con mayor frecuencia o están presentes en el cáncer que se quiere tratar.

El Laboratorio de Inmunología Antitumoral, desarrolló hace unos años una inmunoterapia contra melanoma basada en DCs llamada TAPCells®. Las TAPCells son diferenciadas desde monocitos de sangre periférica de los pacientes utilizando las citoquinas IL-4 y GM-CSF. Luego estas células son incubadas con un lisado condicionado por shock térmico de tres líneas celulares de melanoma alogénicas y llamado TRIMEL, el cual se utiliza como fuente antigénica y agente inductor de maduración y a que contiene varios DAMPs que activan a las TAPCells. Se ha observado que la administración de TAPCells en pacientes con melanoma maligno avanzado induce un aumento significativo de la supervivencia de los pacientes que responden a la terapia<sup>13</sup>. Este modelo tecnológico también se ha utilizado con éxito en pacientes con cáncer de próstata castración resistentes, observándose una disminución del antígeno prostático específico (PSA) y una expansión de linfocitos CD8<sup>+</sup> efectores<sup>14</sup>, lo que sugiere que este tipo de terapia también podría transferir con éxito a otros tipos de patologías oncológicas, como el CVB. En este contexto, al conocer los antígenos expresados tumores de pacientes con CVB, se podrían seleccionar líneas celulares con alta expresión de éstos para ser utilizadas como fuente antigénica de las vacunas terapéuticas basadas en DCs.

### **Uso de AAT como blancos terapéuticos contra el cáncer**

Una alternativa reciente para el tratamiento de varios tipos de cáncer ha sido la detección de moléculas expresadas por células neoplásicas y su uso como blancos terapéuticos, debido a su participación en la formación del tumor<sup>15</sup>. Un subgrupo dentro de estas moléculas se denominan antígenos asociados a tumor (AAT), los cuales son expresadas normalmente en baja cantidad, pero se sobre expresan en células malignas. El estudio de la expresión de los AAT en los distintos tipos de cáncer podría

eventualmente ayudar a generar una respuesta inmune específica contra el tumor por alguna terapia, o bien bloqueando su participación en el proceso carcinogénico mediante el uso de anticuerpos monoclonales<sup>15</sup>. Por ejemplo, se ha demostrado la efectividad del anticuerpo bloqueante de CD30 brentuximab en el tratamiento de linfoma Hodgkin en un estudio clínico fase II, donde se obtuvo una respuesta en un 86% de los pacientes, de cuales el 57% lograron una remisión completa<sup>16</sup>. De manera similar, trastuzumab, un anticuerpo bloqueante de erbB2, ha mostrado ser efectivo para el tratamiento del cáncer de mama<sup>17</sup>.

A la fecha no se han descrito antígenos específicos para el CVB, a pesar de esto, en la clínica se utilizan CEA y CA19-9 como marcadores de prognosis, en algunos estudios se ha demostrado su alta sensibilidad, pero bajo porcentaje de especificidad en los pacientes, es decir, varios de los pacientes con CVB expresan CEA y CA19-9, pero un bajo número del total de pacientes que los expresan posee CVB<sup>18,19</sup>.

Debido a las características de la enfermedad, la falta de tratamientos eficaces y al diagnóstico tardío, los AAT son una interesante alternativa de tratamiento a estudiar. En este contexto, no existen estudios que describan la expresión de AATs en CVB en pacientes chilenos, ni tampoco que se relacionen con el estadio de estos pacientes. En este trabajo nos propusimos analizar la expresión de los antígenos CA19-9, CEA, MUC1, erbB2, Survivina, MAGE1 y WT1 en biopsias de pacientes chilenos diagnosticados con CVB. Se seleccionaron estos AAT debido a los antecedentes descritos en la literatura que se detallan a continuación.

### ***Carbohydrate antigen sialyl Lewis (CA19-9)***

El antígeno CA19-9 (*Carbohydrate antigen sialyl Lewis*), es una glicoproteína expresada normalmente en células epiteliales, que actúa como un ligando del receptor inhibitorio de linfocitos Siglec-7<sup>20</sup>. Su sobreexpresión en distintos tipos de cáncer se relaciona con un mayor crecimiento tumoral y una menor prognosis. Se ha descrito que este antígeno se expresa en mayor proporción en células tumorales sometidas a hipoxia, además de estar implicado en los procesos angiogénicos y metastásicos. La detección de este AAT por si solo es poco específica para el diagnóstico de CVB, ya que se ha detectado su expresión en distintas neoplasias como adenocarcinoma pancreático y en otros cánceres del tracto digestivo<sup>20</sup>.

### **Antígeno Carcinoembrionario (CEA)**

El antígeno CEA (*Carcinoembryonic antigen*) describe a un grupo de proteínas de la familia de las inmunoglobulinas, caracterizado como miembros del clúster CD66. Fue descrito originalmente en los conductos biliares del hígado como una glicoproteína biliar<sup>21</sup>. Está involucrado en procesos de adhesión celular, participando en el anclaje celular y la inhibición de anoikis (apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular)<sup>22</sup>. Se ha demostrado que participa en procesos de desarrollo tumoral y regulación de metástasis, entre otras funciones<sup>21</sup>. Se ha reportado una elevada expresión de CEA en diversos tipos de cáncer<sup>23</sup>. Sus niveles de expresión se han utilizado como marcador de prognosis en CVB en pacientes indios, siendo éste de una alta sensibilidad<sup>19</sup>.

### ***Epidermal growth factor receptor (erbB2)***

El antígeno erbB2 (*Epidermal growth factor receptor*) es un receptor asociado a tirosina quinasa tipo 1, relacionado con la regulación de diferentes procesos, tales como la

proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. Su sobreexpresión se correlaciona con el crecimiento tumoral en cáncer gástrico y cáncer de mama. El bloqueo de ErbB2 en pacientes con cáncer de mama, mediante el anticuerpo humanizado trastuzumab, es una de las primeras experiencias exitosas del uso de AAT como blancos terapéuticos<sup>24</sup>. Debido a que este AAT se sobre expresa en etapas avanzadas del CVB, ha sido propuesto como blanco terapéutico en pacientes asiáticos con esta patología<sup>25</sup>.

### ***Melanoma-associated antigen (MAGE-1)***

El antígeno MAGE-1 (*Melanoma-associated antigen*) pertenece a la familia de genes MAGEA, que comparten una región homóloga de 200 aminoácidos que se denomina MAGE. Existen 12 subtipos (MAGEA1 a MAGEA12) que codifican para proteínas que han sido descritas como antígenos inmunodominantes para los linfocitos T citotóxicos, de ahí su interés de ser utilizados para el diagnóstico y/o inmunoterapia del cáncer<sup>26</sup>. Estas proteínas están clasificadas con relación al nivel de conservación de su secuencia central de aminoácidos en dos tipos: MAGE tipo I, al que pertenecen los subgrupos MAGE-a, MAGE-b y MAGE-c, y MAGE tipo II, al que pertenecen los subgrupos MAGE-d, MAGE-e, MAGE-f, MAGE-g, MAGE-h, MAGE-I2 y Necdin. MAGE-A favorece la formación de tumores al actuar como inhibidor de p53, interfiriendo con su función de regulador transcripcional de genes relacionados con la reparación o apoptosis de células dañadas<sup>15</sup>. No existen antecedentes de la participación de MAGE-1 en CVB, sin embargo, se ha reportado una alta expresión de este AAT en melanoma y en cáncer testicular<sup>27</sup>.

### **Mucina 1 (MUC1)**

MUC1 (Mucina 1) es miembro de las mucinas, proteínas extracelulares que están fuertemente glicosiladas con oligosacáridos complejos<sup>28</sup>. Su función es establecer una barrera molecular selectiva en la superficie epitelial. Las alteraciones en la expresión de mucinas o su glicosilación se asocian a carcinogénesis, crecimiento celular, diferenciación, transformación, adhesión e invasión de las células neoplásicas y la inmunosupresión<sup>29</sup>. Se ha reportado su elevada expresión en cáncer pancreático<sup>30</sup>. Las distintas mucinas han sido utilizadas como marcadores de diagnóstico en varios tipos de neoplasias del tracto digestivo, por ende, se encuentran bajo investigación como posibles blancos terapéuticos<sup>29</sup>.

### ***Wilms' tumor 1 (WT1)***

WT1 (*Wilms' tumor 1*) es un antígeno clonado por primera vez en 1990, conocido como un supresor de tumor de Wilms, que se encuentra expresado normalmente en riñón<sup>31</sup>. Participa en el desarrollo embrionario del riñón, gónadas, vasculatura cardiaca y bazo. Se ha estudiado su rol como factor de transcripción, tanto como supresor de tumores, como oncogen<sup>32</sup>. Actualmente es conocido por ser un supresor en varios tipos de cáncer y se ha utilizado como un marcador de prognosis para tumores sólidos, teniendo mayor incidencia en cáncer gástrico y de pulmón<sup>32</sup>. En el caso del CVB, se ha utilizado como antígeno para cargar DCs *ex vivo*, en inmunoterapias contra los CTB, logrando resultados insatisfactorios, siendo la media de supervivencia de 7,2 meses en pacientes japoneses<sup>33</sup>.

### **Survivina**

Survivina es la proteína más pequeña de la familia de los inhibidores de apoptosis (iAP)<sup>34</sup>. Se suele encontrar en el citoplasma, aunque puede hallarse en núcleo de

células proliferativas, ya que participa en la mitosis<sup>15</sup>. Regula la proliferación y muerte celular, siendo normalmente expresada durante el desarrollo embrionario, pero ausente en etapas adultas, donde hay tejidos diferenciados. Se ha descrito su sobreexpresión en diversas neoplasias, lo que se ha relacionado con la desregulación de procesos como la división celular, la resistencia a quimioterapia y la sobrevida de las células neoplásicas, transformándose, por lo tanto, en un importante blanco terapéutico. Se ha reportado una alta expresión de Survivina en cáncer de próstata y mama<sup>34</sup>. Además, se ha sugerido que la sobreexpresión de Survivina en tumores de CVB se asocian a un pobre pronóstico de esta enfermedad en pacientes indios<sup>35</sup>.

Debido a que la mayor parte de los estudios que describen la expresión de AAT en CVB se han realizado en pacientes de origen asiático, es necesario estudiar su expresión en pacientes chilenos, y correlacionarlos con los estadios de la enfermedad.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permitirán la incorporación de posibles nuevos blancos terapéuticos para mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de estos pacientes en estadios tempranos, y, sobre todo, en estadios avanzados del CVB, para los cuales existen pocas alternativas terapéuticas. Es así como en este trabajo evaluamos mediante inmunohistoquímica (IHC) la expresión de CA19-9, CEA, MUC1, Survivina, erbB2, MAGE1 y WT1 en biopsias de tumores de pacientes chilenos con CVB y evaluamos la asociación de su expresión con los distintos estadios de los pacientes.

## **HIPÓTESIS**

La expresión de los antígenos asociados a tumor; erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, WT1, CEA y CA19-9 son expresados en tejido tumoral de CVB y su presencia se correlaciona positivamente con la progresión de la enfermedad de los pacientes.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la expresión de distintos antígenos asociados a tumor en biopsias de pacientes con CVB y su correlación con la progresión de la patología.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Determinar la expresión de erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, WT1, CEA y CA19-9 en 16 biopsias tumorales conservadas en parafina de pacientes chilenos con CVB.
- II. Investigar la relación entre los niveles de expresión de los antígenos asociados a tumor (erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, WT1, CEA y CA19-9) con distintos estadios de la enfermedad en pacientes chilenos con CBV.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Selección de pacientes**

Las muestras de 16 pacientes con histología adenocarcinoma, diagnosticados con CVB, fueron proveídas por la Dra. Paula Fluxá del hospital El Salvador (Santiago, Chile). El estadio y género de cada paciente están detallados en la Tabla I. Para la inclusión de las muestras en este estudio se contó con la aprobación del Comité de Ética (Acta N°038) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

### **Anticuerpos**

La evaluación de los AATs se realizó mediante inmunohistoquímica, utilizando los siguientes anticuerpos: anti-WT1 (clon 6F-H2, Thermo Scientific, en dilución 1:50), anti-erbB2 (clon 3B5, Thermo Scientific, en dilución 1:200), anti-MUC1 (clon HMG1, Abcam, en dilución 1:200), anti-Survivina (clon 8E2, Thermo Scientific, en dilución 1:200), anti-CEA (clon COL-1, Thermo Scientific, en dilución 1:200), anti-CA19-9 (clon SPM 110, Abcam, en dilución 1:50) y anti-MAGE1 (clon MA454, Thermo Scientific, en dilución 1:100). La recuperación antigénica se realizó mediante calor, a 95°C por 45 min utilizando para todos los anticuerpos buffer citrato pH 6,0.

### **Inmunohistoquímica**

Para el protocolo de inmunohistoquímica en parafina (IHC-P), las muestras fueron desparafinadas con 2 lavados sucesivos en Neo-Clear®, para luego ser hidratadas mediante lavados sucesivos en etanol de 99%, 95% y 70% por 5 min cada uno con un lavado final en agua destilada. La recuperación antigénica se realizó mediante calor a 95°C por 45 min en buffer citrato pH 6,0. La actividad endógena de la peroxidasa se bloqueó con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% por 10 min, seguido por el bloqueo de la actividad inespecífica con PBS/BSA al 4%. Los anticuerpos primarios

fueron incubados por 16 hrs a 4°C en una cámara húmeda seguido de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado a HRP por 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó el cromógeno 3,3-diaminobencidina (DAB) para la formación del color. Se agregó sulfato cúprico a la muestra para aumentar la intensidad del color del cromógeno DAB. Finalmente, las muestras fueron marcadas con hematoxilina. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas con gradientes ascendentes de etanol 70%, 95 y 99% para finalmente ser lavadas con xilol. Las muestras fueron montadas utilizando el reactivo Entellan®, sellando la muestra para su almacenamiento y análisis. Los controles positivos utilizados fueron biopsias de cáncer de colon (para los antígenos Survivina, CEA y CA19-9), cáncer gástrico (MUC1 y erbB2) y melanoma (MAGE1 y WT1), tal como se muestra en las imágenes representativas de la Figura 1. Además, para descartar la unión inespecífica de los anticuerpos secundarios, para cada muestra se utilizó un control sin anticuerpo primario [control negativo (Secundario)].

### **Análisis**

Las muestras fueron evaluadas por un patólogo especialista en base al patrón de marcaje y nivel de expresión de cada antígeno. A partir de esta evaluación y las fichas clínicas de los pacientes, se agruparon los datos de la expresión de los AAT y los estadios de los pacientes mediante software estándar (Microsoft® Excel). El análisis de supervivencia de los pacientes fue realizado utilizando el programa Graphpad Prism®.

## **RESULTADOS**

### **Expresión de AAT en tumores de pacientes chilenos con CVB**

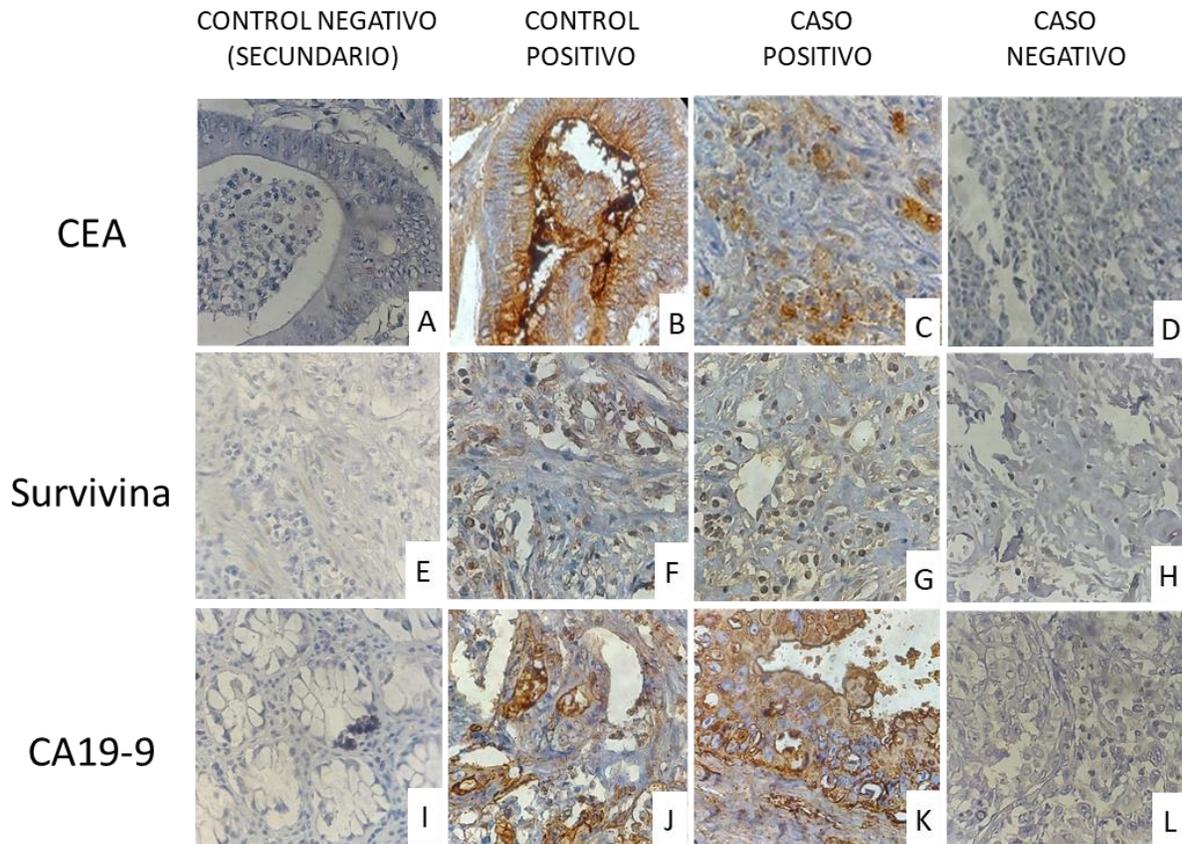
Chile tiene la mayor incidencia y mortalidad del CVB del mundo, principalmente la población mapuche femenina<sup>3</sup>. Sumado a esto, los tratamientos actuales para CVB son ineficaces en etapas avanzadas, lo que se traduce en una alta mortalidad. Debido a la importancia que tiene esta enfermedad en la población femenina en Chile, se hace necesario un mayor conocimiento de las características moleculares de esta neoplasia en pacientes chilenos, que permita postular nuevos blancos terapéuticos y mejores herramientas de diagnóstico. En este contexto se desarrolla este estudio que busca aportar nuevos datos del CVB en pacientes chilenos.

Para el desarrollo del presente trabajo, tuvimos acceso a 16 biopsias de pacientes chilenos con CVB provenientes del Hospital El Salvador, con etiología adenocarcinoma, operados durante el periodo de 2013-2015. La distribución por género de los pacientes fue de 2 hombres y 14 mujeres. En base al estadio, se observa que, del total de los pacientes, dos presentan un estadio I, seis estadio II, dos estadio IIIA, tres estadio IIIB y cuatro estadio IVB (Tabla I). En la Tabla I se muestran las características de cada uno de los pacientes analizados en este trabajo (descritos por código de biopsia), específicamente su género y estadio.

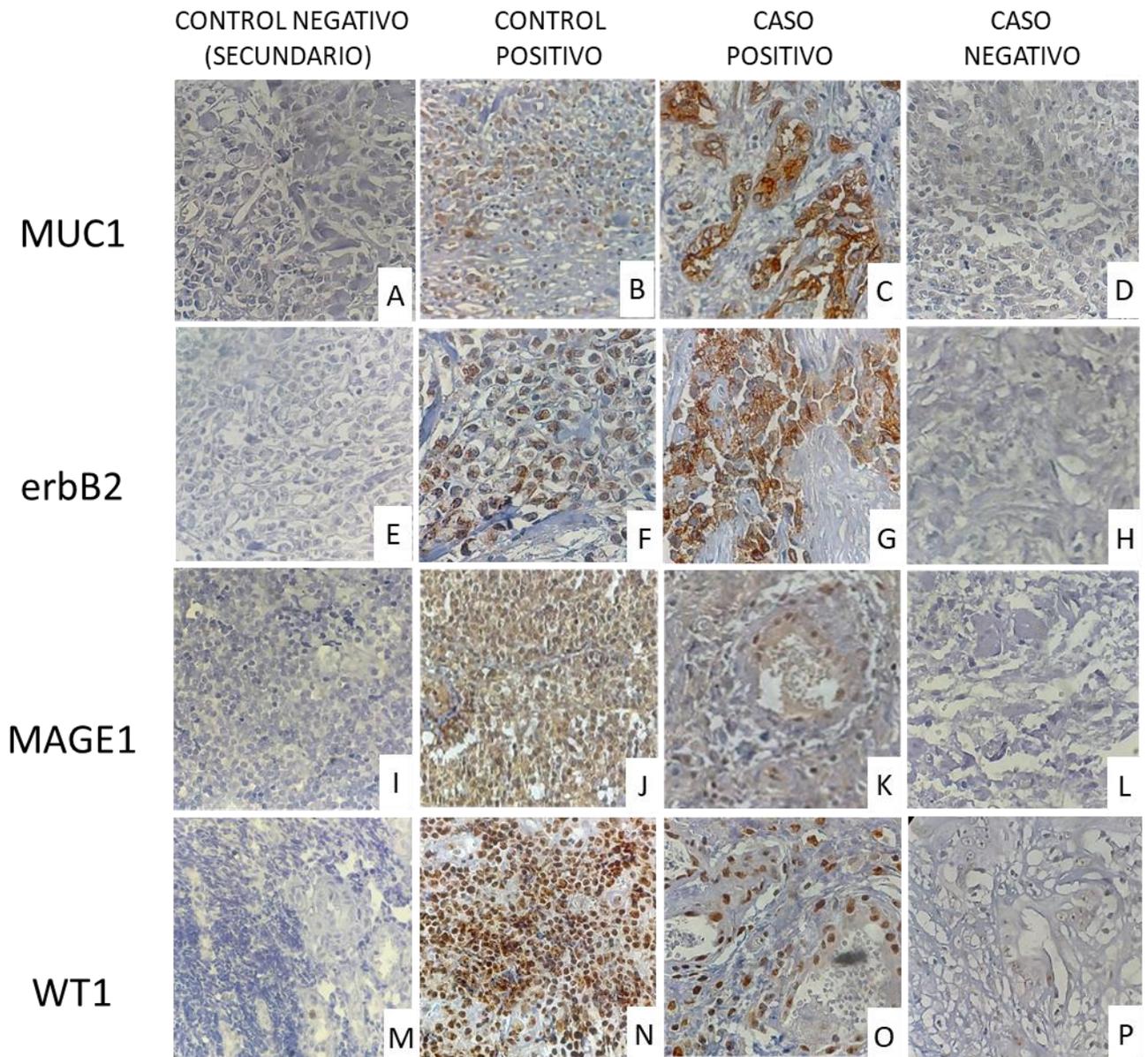
Con el objetivo de buscar nuevos blancos terapéuticos contra el CVB, se analizó la expresión de erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, CEA, WT1 y CA19-9 en las biopsias mencionadas. Las Figuras 1 y 2 muestran fotos representativas de la expresión de los distintos antígenos analizados junto con sus controles positivos y negativos. Observamos que el patrón de tinción para cada uno de los AAT en las muestras de CBV correspondió con el descrito en la literatura. Como se observa en la Figura 1B y

C, CEA se encuentra principalmente en el citoplasma de las células<sup>36</sup>. El patrón de expresión de Survivina y MUC1 mostró que se localizan principalmente en el citoplasma y la membrana plasmática (Figura 1G, Figura 2C)<sup>34,37</sup>. Para los antígenos CA19-9, erbB2 y MAGE1, la literatura indica una distribución en la membrana plasmática (Figura 1K, Figura 2G, Figura 2K) al igual que lo observado en nuestras muestras<sup>38,25,27</sup>. Por último, el patrón de tinción de WT1, muestra una clara expresión nuclear (Figura 2O)<sup>39</sup>.

Posteriormente, se determinaron los niveles de expresión de cada marcador para cada una de las muestras de tumor de cada paciente (Tabla I).



**Figura 1. Expresión de CEA, Survivina y CA19-9 en biopsias de pacientes chilenos con CVB.** Imágenes representativas de la expresión de AAT analizados mediante IHC en biopsias de pacientes chilenos con CVB. *a.* Control de secundario CEA, cáncer de colon; *b.* Control positivo CEA, cáncer de colon; *c.* Biopsia positiva CEA; *d.* Biopsia negativa CEA; *e.* Control de secundario Survivina, cáncer de colon; *f.* Control positivo Survivina, cáncer de colon; *g.* Biopsia positiva Survivina; *h.* Biopsia negativa Survivina; *i.* Control de secundario CA19-9, cáncer de colon; *j.* Control positivo CA19-9, cáncer de colon; *k.* Biopsia positiva CA19-9. *l.* Biopsia negativa CA19-9. Todas las imágenes tienen un aumento de 60x. Control de secundario corresponde a muestra sin anticuerpo primario.



**Figura 2. Expresión de MUC1, erbB2, MAGE1 Y WT1 en biopsias de pacientes con CVB.**

Imágenes representativas de la expresión de AAT analizados mediante IHC en biopsias de pacientes chilenos con CVB. *a.* Control de secundario MUC1, cáncer gástrico; *b.* Control positivo MUC1, cáncer gástrico; *c.* Biopsia positiva MUC1; *d.* Biopsia negativa MUC1; *e.* Control de secundario erbB2, cáncer gástrico; *f.* Control positivo erbB2, cáncer gástrico; *g.* Biopsia positiva erbB2; *h.* Biopsia negativa erbB2; *i.* Control de secundario MAGE1, melanoma; *j.* Control positivo MAGE1, melanoma; *k.* Biopsia positiva MAGE1; *l.* Biopsia negativa MAGE1; *m.* Control de secundario WT1, melanoma; *n.* Control positivo WT1, melanoma; *o.* Biopsia positiva

WT1; p. Biopsia negativa WT1. Todas las imágenes tienen un aumento de 60x. Control de secundario corresponde a muestra sin anticuerpo primario.

**Tabla I. Distribución de género, estadio de la enfermedad y tiempo de sobrevida post-diagnóstico y la expresión de AAT de los pacientes con CVB analizados en este estudio.**

Tabla resumen que indica el número de biopsia, antecedentes del paciente y la expresión de cada marcador. Para erbB2 se muestra el grado de expresión medido por la escala utilizada para HercepTest™ (ensayo para medir erbB2 en IHC), que va de 0 a 3 (0 = Sin expresión; 1 = Baja expresión; 2 = Mediana expresión; 3 = Alta expresión). M: masculino; F: femenino.

Biopsia	Sexo	Estadio	CEA	Survivina	MUC1	erbB2	MAGE 1	WT1	CA19-9
13-2069	F	I	+	+	+	2	+	+	+
13-7268	F	I	-	+	+	1	+	+	-
13-8265	M	II	+	+	-	2	+	+	+
14-1389-N2	F	II	-	-	+	0	+	+	+
14-2612	F	II	+	+	+	1	-	-	+
14-6949-2	F	II	+	+	+	2	+	+	+
15-2902	F	II	+	+	+	1	+	+	-
13-5600	F	IIIA	+	+	+	2	+	-	+
13-6148	M	IIIA	+	+	+	1	+	+	-
14-4688-B	F	IIIB	+	-	+	0	+	+	+
14-6300-4B	M	IIIB	+	+	-	2	+	+	-
15-1004	M	IIIB	-	+	-	1	+	+	+
13-7642	F	IVB	-	+	+	1	+	+	+
14-2535	F	IVB	+	+	+	2	+	+	+
14-3834-1D1	F	IVB	+	+	+	1	-	+	+
13-5675	F	IVB	-	+	-	1	+	+	-

Al agrupar los datos obtenidos se observó un alto porcentaje de pacientes con expresión positiva para cada marcador, siendo Survivina, erbB2, MAGE1 y WT1, los AAT más expresados (88%) (Tabla III).

**Tabla III. Porcentaje de tumores positivos para cada uno de los antígenos evaluados.** Se consideró el porcentaje de tumores de pacientes que expresaron cada uno de los AAT en relación al total de 16 pacientes.

<b>Marcador</b>	<b>Pacientes positivos</b>
<b>CEA</b>	69%
<b>Survivina</b>	88%
<b>MUC1</b>	75%
<b>erbB2</b>	88%
<b>MAGE 1</b>	88%
<b>WT1</b>	88%
<b>CA19-9</b>	69%

#### **Análisis de la expresión de los AAT en los distintos estadios de CVB**

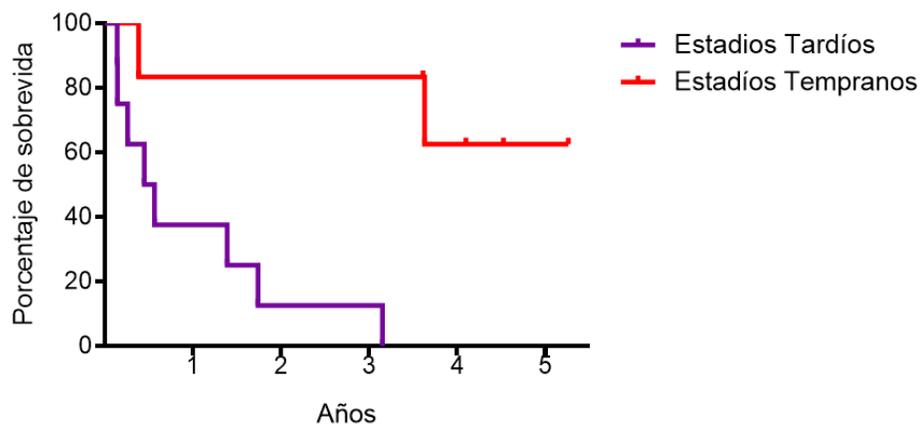
Posteriormente se analizó la posible correlación entre el porcentaje de tumores positivos para cada uno de los AAT y el estadio de cada paciente. Observamos que una alta proporción de los tumores fueron positivos para la expresión de los diferentes antígenos estudiados, independientemente del estadio de los pacientes (Tabla IV). Por ejemplo, el 80% de los pacientes en estadio II (4/5) fueron positivos para cada uno de los marcadores. Sin embargo, no podemos sacar conclusiones de este análisis debido al bajo número de pacientes por cada estadio.

**Tabla IV. Porcentaje de pacientes positivos para cada AAT separados por estadio de CVB.** Dentro de paréntesis se indica el número de pacientes totales por estadio.

<b>Estadio</b>	I (2)	II (5)	IIIA (2)	IIIB (3)	IVB (4)
<b>Marcador</b>					
<b>CEA</b>	50%	80%	100%	67%	50%
<b>Survivina</b>	100%	80%	100%	67%	100%
<b>MUC1</b>	100%	80%	100%	33%	75%
<b>erbB2</b>	100%	80%	100%	67%	100%
<b>MAGE 1</b>	100%	80%	100%	100%	75%
<b>WT1</b>	100%	80%	50%	100%	100%
<b>CA19-9</b>	50%	80%	50%	67%	75%

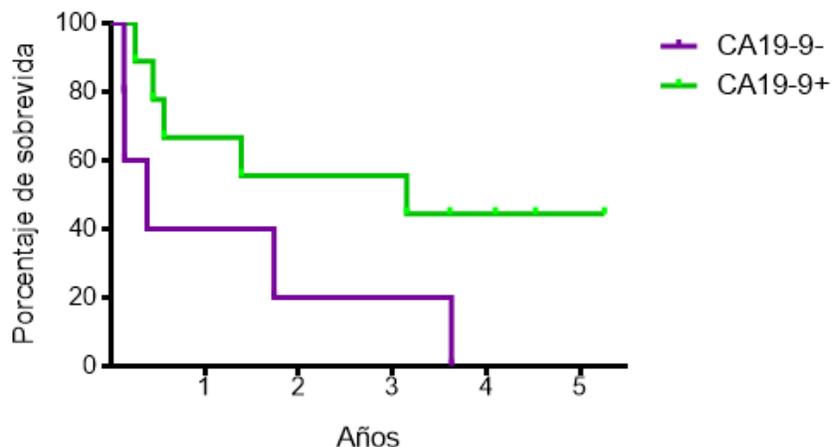
### **Análisis de correlación de expresión de AAT en tumores de CVB y sobrevida de los pacientes**

A partir de la fecha de diagnóstico y de defunción de los pacientes fue posible realizar los análisis de sobrevida a 5 años de pacientes que fallecieron a causa del CVB. Tal como se esperaba observamos una menor sobrevida (siendo 0% a los 3 años) en pacientes de estadios avanzados de CVB (III y IV) en comparación a los de etapas más tempranas (I y II) [62,5% a los 5 años] (Figura 3).



**Figura 3. Sobrevida de pacientes con estadios tempranos y tardíos de CVB.** Se comparó la sobrevida de pacientes de estadios tempranos (I y II) con estadios tardíos (III y IV). El número de pacientes por grupo es: estadios tempranos = 10 pacientes; estadios tardíos = 6 pacientes.

Al analizar el impacto de la expresión tumoral de cada uno de los AAT en la sobrevida de los pacientes, observamos que solo la expresión del antígeno CA19-9 se asoció con una tendencia hacia una mayor sobrevida en pacientes que lo expresan (Figura 4). Teniendo en consideración el bajo el número de muestras analizadas, estos resultados tienen un carácter preliminar, pero nos motivan a realizar este mismo análisis en un mayor número de pacientes para definitivamente determinar el impacto de la expresión tumoral de CA19-9 en la sobrevida de pacientes chilenos con CVB.



**Figura 4. Sobrevida de pacientes con CVB según expresión tumoral de CA19-9.** Se comparó la sobrevida post-diagnóstico de pacientes con CVB con expresión positiva o negativa para CA19-9 en los tumores. El número de pacientes por grupo es: CA19-9 + = 11; CA19-9 - = 5.

En resumen, nuestros resultados nos permiten concluir que la gran mayoría de los pacientes chilenos con CBV expresan los AAT erbB2, Survivina, MAGE1, MUC1, CEA, WT1 y CA19-9 independientemente del estado de progresión de la enfermedad, lo que sugiere la posibilidad de ser considerados como posibles blancos terapéuticos contra el CVB, independientemente del estadio de los pacientes. La expresión tumoral de CA19-9 se asociaría a un mejor pronóstico. Cabe destacar que todos los resultados son preliminares y se requiere comprobarlos en una cohorte de mayor tamaño.

## **DISCUSIÓN Y/O PROYECCIONES**

El CVB es una enfermedad poco común, pero con gran incidencia en un reducido número de países, destacándose nuestro país por poseer la mayor incidencia a nivel mundial<sup>2</sup>. Se caracteriza por poseer síntomas inespecíficos en estadios tempranos, por lo que suele detectarse en estadios avanzados de la enfermedad, donde las terapias existentes son ineficaces<sup>3</sup>. La poca frecuencia de este tipo de tumores se traduce además la escasa investigación, en comparación con otros tipos de cáncer, por lo que se requiere un mayor esfuerzo por parte de investigadores chilenos para aumentar nuestro conocimiento de esta enfermedad<sup>4</sup>. Este estudio intenta contribuir al estudio y caracterización del CVB en busca de nuevas posibilidades de tratamiento contra esta neoplasia.

Los resultados obtenidos nos sugieren que existe una alta proporción en pacientes chilenos que expresan cada uno de los AAT en los distintos estadios. A pesar de que la expresión de los AAT estudiados no se correlacionó con una progresión de la enfermedad, es decir, una mayor expresión en estadios avanzados<sup>15</sup>, en cambio nuestros resultados muestran una expresión de varios AAT en los tejidos a través de todos los estadios y en gran parte de los pacientes, lo que sugiere que existe una importante expresión de estos en esta neoplasia. Sumado a lo anterior, en este estudio se determinó la expresión de antígenos no descritos previamente para esta neoplasia tales como WT1, lo que agrega potenciales nuevos blancos terapéuticos en CVB.

Pese a la falta de correlación de la expresión de los antígenos con estadios particulares de los pacientes, su alto porcentaje de expresión en estos, permitiría ser considerados como nuevos blancos terapéuticos para terapias en base al uso de anticuerpos monoclonales que bloqueen específicamente la acción de cada antígeno,

tal como se utiliza con las terapias de cáncer de mama con el anticuerpo trastuzumab contra el antígeno erbB2.

Con respecto a la expresión de AAT y las terapias basadas en DCs, como la terapia TAPCells<sup>13</sup>, en un artículo publicado recientemente por miembros de nuestro laboratorio, se utiliza esta tecnología aplicada al CVB, donde se utilizaron *in vitro* líneas de esta neoplasia, las cuales expresan algunos de los AAT estudiados, con el fin de generar un lisado celular que, al igual que TRIMEL descrito en melanoma, pueda actuar como fuente antigénica y estímulo de maduración de DCs. Como resultado, los monocitos estimulados por los lisados tuvieron un alto incremento de marcadores de maduración de DCs, las cuales fueron capaces de inducir la activación de linfocitos T CD4 y CD8<sup>40</sup>. Por lo tanto, este estudio avala el uso de líneas celulares con una alta expresión de cada uno de los antígenos estudiados, para la elaboración de lisados celulares alogénicos de CVB, utilizados como fuente de antígenos y estímulo de maduración para DCs humanas, las cuales inducirían una respuesta antitumoral *in vivo* específica contra estos antígenos.

Cabe destacar que el hecho de que se expresen a través de los distintos estadios, indica que la presencia del antígeno no dependería de la etapa del cáncer y podrían ser utilizados como blancos terapéuticos independiente del estadio del paciente. Sin embargo, a pesar de los resultados obtenidos, estos son solo resultados preliminares ya que representan un número bajo respecto a la población chilena que experimenta esta neoplasia, lo que se traduce en la necesidad de extender el estudio analizando una mayor cantidad de pacientes, desafío que se encuentra actualmente en desarrollo a través de un proyecto Fondecyt.

Con respecto a los análisis de sobrevida, se observó que, de todos los antígenos, CA19-9 es el que mayor correlación mostró con la sobrevida de los pacientes, puesto que los pacientes que expresan este marcador tienden a poseer una mayor sobrevida. Se ha descrito que determinados niveles de CA19-9 en suero de pacientes de CVB y cáncer pancreático se relaciona con una menor sobrevida<sup>19,41</sup>. Sin embargo en nuestros resultados su presencia en el tejido tumoral se relaciona con una mayor sobrevida, lo que podría deberse a que el proceso de formación de tumor es distinto en pacientes chilenos, o que la localización del marcador en tejido es indirectamente proporcional al marcador soluble en suero. Por otra parte, el bajo número de muestras analizadas en este trabajo no representa necesariamente lo que sucede a escala global. Lo anterior alude a la necesidad de estudiar mayor cantidad de pacientes con CVB.

En base a la alta frecuencia de expresión de todos los antígenos analizados, surge la duda de cuáles serían los mejores candidatos para una eventual inmunoterapia, ya sea, en base a anticuerpos monoclonales o DCs. Esta selección también es válida si se desea buscar buenos candidatos para diagnosticar el CVB en estadios más tempranos. Se propone, como primer parámetro, buscar antígenos con alta presencia en el tumor, parámetro que en nuestro estudio se cumple para todos los antígenos analizados, pero en especial para Survivina, erbB2, MAGE1 y WT1, los cuales se expresan en mayor proporción, es decir, en un 88% del total de los casos. El segundo parámetro sería analizar la importancia de la localización celular del antígeno (nuclear, citoplasmática o extracelular), ya sea para bloquear su acción o inducir una respuesta antitumoral. Pese a que la literatura describe que MAGE-1 y erbB2<sup>24</sup> se distribuyen hacia la membrana celular, no existe información determinante de que la localización del antígeno afecte a la respuesta inmune, a excepción de algunos artículos que

sugieren que este parámetro influye en la respuesta inmune en algunos modelos de estudio, por lo que sería interesante indagar en este aspecto en el futuro<sup>42,43</sup>. Por todo lo anterior, el análisis de ambos parámetros nos permitiría diferenciar en forma más detallada los distintos antígenos, discriminando entre ellos con el fin de obtener el mejor candidato como nuevo blanco terapéutico contra esta neoplasia.

En conclusión, este estudio aporta antecedentes importantes en el estudio de los AAT en pacientes con CVB, junto con caracterizar la expresión de antígenos no descritos previamente en esta enfermedad, cumpliendo las expectativas del proyecto. Esta información debería ser utilizada como base para el desarrollo de nuevas terapias que involucren a los AAT en CVB.

## **CONCLUSIONES**

Este estudio marca una contribución en la identificación y caracterización de la expresión de AAT en CVB y su relación con los estadios en pacientes chilenos con esta neoplasia, lo que abre la oportunidad de ser considerados como nuevos blancos terapéuticos para nuevos tratamientos, como la inmunoterapia TAPCells o las basadas en anticuerpos monoclonales. Por otro lado, también abre la posibilidad de utilizarse como marcadores de diagnóstico para CVB.

En este estudio se logró observar la presencia de todos los antígenos en varios estadios de la enfermedad, abriendo la posibilidad de utilizar estas nuevas terapias contra los AAT en todo tipo de pacientes, incorporando nuevas herramientas contra este cáncer de alta incidencia y mortalidad en nuestro país.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition. Atlanta: American Cancer Society; 2017.
2. Kanthan, R., Singer, J.-L., Ahmed, S., & Kanthan, S. C. (2015). Gallbladder Cancer in the 21st Century. *Journal of Oncology*, 2015, 967472.
3. Wistuba, II, Gazdar AF. Gallbladder cancer: lessons from a rare tumour. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 695–706.
4. Boutros C, Gary M, Baldwin K, Somasundar P. Gallbladder cancer: Past, present and an uncertain future. *Surg Oncol*. 2012;21(4):e183–e191
5. Everson, G. T., McKinley, C., & Kern, F. (1991). Mechanisms of gallstone formation in women. Effects of exogenous estrogen (Premarin) and dietary cholesterol on hepatic lipid metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 87(1), 237–246.
6. Lorenzo Bermejo, J., Boekstegers, F., González Silos, R., Marcelain, K., Baez Benavides, P., Barahona Ponce, C., ... Rothhammer, F. (2017). Subtypes of Native American ancestry and leading causes of death: Mapuche ancestry-specific associations with gallbladder cancer risk in Chile. *PLoS Genetics*, 13(5), e1006756.
7. Meriggi F. Gallbladder carcinoma surgical therapy. An overview. *J Gastrointestin Liver Dis*. 2006;15:333–335
8. Singh PK, Kapoor R, Kumar R, Bahl A, Kumar N, Gupta R, Sharma SC. Best supportive care compared with chemotherapy and radiotherapy for unresectable gallbladder cancer: A tertiary care institute experience. *Clin Cancer Investig J* 2014;3:153-6.

9. Medler, T. R., Cotechini, T., & Coussens, L. M. (2015). Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance. *Trends in Cancer*, 1(1), 66–75.
10. Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annual Review of Immunology*, 31, 443–473. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095910>
11. Vigneron N. (2015) Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy, *BioMed Research International*, vol. 2015, Article ID 948501, 17 pages.
12. Shang, N., Figini, M., Shangguan, J., Wang, B., Sun, C., Pan, L., ... Zhang, Z. (2017). Dendritic cells based immunotherapy. *American Journal of Cancer Research*, 7(10), 2091–2102.
13. Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, Pereda C, Hevia D, García T, Salazar L, Ferreira A, Hermoso M, Mendoza-Naranjo A, Ferrada C, Garrido P, López MN, Salazar-Onfray F (2011) Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 17: 2474–2483.
14. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, Pereda C, Castellon E, Valdevenito R, Huidobro C, Ines Becker M, Lladser A, Lopez MN, et al. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer* 2013; 109:1488-97
15. Sarmiento-Rubiano, L. A. (2015). Antígenos asociados a tumores y su potencial uso en el tratamiento del cáncer. *Salud Uninorte*, 31(1), 118-137.
16. A.M. Bradley, M. Devine, D. DeRemer, Brentuximab vedotin: an anti-CD30 antibody–drug conjugate, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 70 (2013) 589–597.

17. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, et al. (2014) Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 25(8):1544–1550.
18. Wang, Y.-F., Feng, F.-L., Zhao, X.-H., Ye, Z.-X., Zeng, H.-P., Li, Z., Peng, Z.-H. (2014). Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(14), 4085–4092.
19. Kankonkar, S. , Joshi, S. and Deshpande, R. (2013) Significance of tumour markers in cancer of gall bladder. *Open Journal of Immunology*, 3, 33-36
20. Kannagi R. Carbohydrate antigen sialyl Lewis A—its pathophysiological significance and induction mechanism in cancer progression. *Chang Gung Med J* 2007;30:189–209.
21. Gray-Owen SD, Blumberg RS. (2006). CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat Rev Immunol* ;6:433–446.
22. Beauchemin N, Arabzadeh A: Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2013, 32 (3–4): 643-671.
23. Hammarstrom S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissue. *Semin Cancer Biol* 1999;9:67–81.
24. J Baselga, M Swain. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*, 9 (2009), pp. 463–475.
25. Roa, I., de Toro, G., Schalper, K., de Aretxabala, X., Churi, C., & Javle, M. (2014). Overexpression of the HER2/neu Gene: A New Therapeutic Possibility for

26. Patients With Advanced Gallbladder Cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, 7(2), 42–48.

27. T.B. Lee, S.C. Lim, Y.S. Moon, C.H. Choi, Melanoma antigen gene family A as a molecular marker of gastric and colorectal cancers. *Oncol. Rep.* 30, 234–238 (2013).

28. Von Boehmer, L., Keller, L., Mortezaei, A., Provenzano, M., Sais, G., Hermanns, T., Wild, P. J. (2011). MAGE-C2/CT10 Protein Expression Is an Independent Predictor of Recurrence in Prostate Cancer. *PLoS ONE*, 6(7), e21366.

29. Kim, S.-M., Oh, S.-J., & Hur, B. (2012). Expression of MUC1 and MUC4 in Gallbladder Adenocarcinoma. *Korean Journal of Pathology*, 46(5), 429–435.

30. Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat. Rev. Cancer* 4, 45–60

31. Kaur, S., Kumar, S., Momi, N., Sasson, A. R., & Batra, S. K. (2013). Mucins in pancreatic cancer and its microenvironment. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(10), 607–620.

32. Nakatsuka S, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Mod Pathol* 2006; 19: 804–814.

33. Hohenstein P., Hastie N. D. (2006). The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Hum. Mol. Genet.* 15, R196–R201.

34. Kobayashi M, Sakabe T, Abe H, Tanii M, Takahashi H, Chiba A, Yanagida E, Shibamoto Y, Ogasawara M, Tsujitani S, Koido S, Nagai K, Shimodaira S, Okamoto M, Yonemitsu Y, Suzuki N, Nagaya M, DC-vaccine study group at the Japan Society of Innovative Cell Therapy (J-SICT): advanced biliary tract cancer. *J Gastrointest Surg* 2013, 17: 1609–1617. 10.1007/s11605-013-2286-2

35. Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P., & Dubey, S. (2016). Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International*, 16, 49.
36. Nigam J, Chandra A, Kazmi HR, Parmar D, Singh D, Gupta V. Prognostic significance of survivin in resected gallbladder cancer. *J Surg Res* 2015;194:57-62.
37. Kriplani, D., & Patel, M. M. (2013). Immunohistochemistry: A diagnostic aid in differentiating primary epithelial ovarian tumors and tumors metastatic to the ovary. *South Asian Journal of Cancer*, 2(4), 254–258.
38. Bafna, S., Kaur, S., & Batra, S. (2010). Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells. *Oncogene*, 29(20), 2893–2904.
39. Ichibara, T., Nagura, H., Nakao, A., Sakamoto, J., Watanabe, T., and Takagi, H. Immunohistochemical localization of CA 19-9 and CEA in pancreatic carcinoma and associated diseases. *Cancer (Phila.)*, 61: 324-333, 1988.
40. Castiglioni, V., De Maglie, M., Queliti, R., Rustighi, A., Del Sal, G., & Radaelli, E. (2013). Immunohistochemical Characterization of a Renal Nephroblastoma in a Trp53-mutant and Prolyl Isomerase 1-deficient Mouse. *Journal of Toxicologic Pathology*, 26(4), 423–427
41. Rojas-Sepúlveda, D., Tittarelli, A., Gleisner, M.A. et al. *Cancer Immunol Immunother* (2018).
42. Berger, A. C., Garcia, M., Hoffman, J. P., Regine, W. F., Abrams, R. A., Safran, H., Willett, C. G. (2008). Postresection CA 19-9 Predicts Overall Survival in Patients With Pancreatic Cancer Treated With Adjuvant Chemoradiation: A Prospective Validation by RTOG 9704. *Journal of Clinical Oncology*, 26(36), 5918–5922.
43. Zeelenberg, I. S., van Maren, W. W. C., Boissonnas, A., Van Hout-Kuijper, M. A., Brok, Den, M. H. M. G. M., Wagenaars, J. A. L., van der Schaaf, A., Jansen, E. J. R.,

44. Amigorena, S., Théry, C., Figdor, C. G., and Adema, G. J. (2011). Antigen localization controls T cell-mediated tumor immunity. *J. Immunol.* 187, 1281–1288.
45. Anyaegbu, C. C., Lake, R. A., Heel, K., Robinson, B. W., & Fisher, S. A. (2014). Chemotherapy Enhances Cross-Presentation of Nuclear Tumor Antigens. *PLoS ONE*, 9(9), e107894.
46. Riener MO, Wild PJ, Soll C, Knuth A, Jin B, Jungbluth A, et al. Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2009; 124: 352–35.
47. Y. Bar Dayan, Alex Vilkin, Y. Niv. Gallbladder mucin plays a role in gallstone formation (2004) *European Journal of Internal Medicine*, 15 (7), pp. 411-414.
48. H. J. Kim, H. Cantor. CD4 T-cell subsets and tumor immunity: The helpful and the not-so-helpful. *Cancer Immunol. Res.* 2, 91–98 (2014).