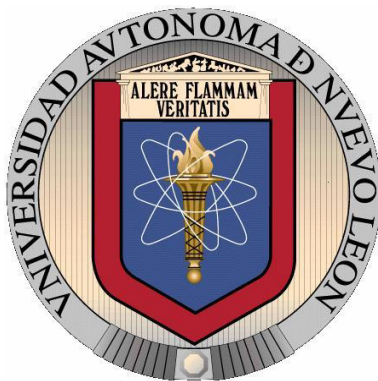


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



INDUCCIÓN DE MUERTE INMUNOGENICA MEDIANTE EL TRATAMIENTO  
CON IMMUNEPOTENT CRP EN UN MODELO DE MELANOMA MURINO  
B16F10

POR

M.A.C. MARÍA DEL CARMEN RODRÍGUEZ SALAZAR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

FEBRERO 2017

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

## AGRADECIMIENTOS

**A la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.** Jefa del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, Directora de tesis de este trabajo, le agradezco por creer en mí, permitirme realizar esta investigación y principalmente por su disponibilidad y apoyo durante todo el desarrollo del proyecto.

**Al Dr. Moisés Armides Franco Molina.** Le agradezco por ser mi asesor en este trabajo, por creer en mí, por su apoyo, por todas las valiosas enseñanzas que me dejó y amistad.

**A mi comité de tesis:**

**Dr. Edgar Mendoza Gamboa.** Le agradezco su apoyo para la realización de este trabajo, por su tiempo para asesorías y revisiones y por su amistad.

**Dra. Ana Carolina Martínez Torres.** Muchas gracias por sus enseñanzas, asesorías y apoyo en el desarrollo de esta investigación.

**Dr. Pablo Zapata Benavides.** Gracias por sus asesorías y apoyo para la realización de este trabajo.

**A mis amigos del L6.** Yareellys, Erika, Silvia, Alex, gracias por su apoyo, enseñanzas y amistad.

**A los integrantes del LIV.** A la Dra. Diana Caballero por sus enseñanzas en el manejo de ratones. A Cesar Iván Romo, Santiago Saavedra, Felipe Torres del muro por sus asesorías. A Don David por su apoyo y amistad.

**A mi amiga Crystel Aleyvick Sierra Rivera,** le agradezco por las enseñanzas, su apoyo, consejos y amistad.

**A mi familia y amigos.** Fam. Salazar Cabral, Fam. Hurtado Robles, Fam. Rios Coronado; Edgar, Selene, Pamela, Imelda Ramírez Puente, Dr. Víctor (☺), Hermila Duran Rivas. Gracias por creer en mí y brindarme su apoyo incondicional a pesar de la distancia.

## DEDICATORIA

A Dios.

A mi esposo José Manuel Ríos Coronado.

A mi mamá Ma. del Carmen Salazar Hurtado.

A mi abuelita María Hurtado Robles.

A mis hermanas Valeria y María Celeste Rodríguez Salazar.

A mi abuelito Candelario Salazar Miranda (☺).

A Crystel Aleyvick Sierra Rivera.

Al Dr. Moisés A. Franco Molina.

A ustedes les dedico con mucho cariño este trabajo, que sin su apoyo no hubiera podido lograrlo. Muchas gracias.

José, muchísimas gracias porque siempre me has apoyado e impulsado a seguir adelante con mis objetivos. Te amo.

Mami y ama, les estaré eternamente agradecida por todo lo que me han enseñado, a ustedes les debo lo que soy.

Vale y Cele, gracias por estar siempre conmigo a pesar de la distancia apoyándome y haciéndome reír con sus locuras. Las adoro mis princesas.

A Crystel y al Dr. Moises por ser mis pilares y mentores en el camino de la investigación, por su amistad y todo el apoyo que me han brindado.

# ÍNDICE

<b>Tabla de contenido</b>	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 Cáncer</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Melanoma</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.1 Factores de riesgo</b> .....	<b>4</b>
<b>2.2.2 Sintomatología y diagnóstico</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2.3 Tratamiento</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3 Inmunoterapia</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4 Muerte inmunogénica</b> .....	<b>10</b>
2.4.1 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) .....	11
2.4.1.1 Calreticulina .....	11
2.4.1.2 Proteínas de choque térmico .....	14
2.4.1.3 Proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1) .....	17
2.4.1.4 Adenosin trifosfato (ATP) .....	20
<b>2.5 Inductores de muerte inmunogénica</b> .....	<b>23</b>
2.5.1 Oxaliplatino .....	24
<b>2.6 IMMUNEPOTENT CRP (ICRP)</b> .....	<b>26</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
<b>5.1 Objetivo general</b> .....	<b>30</b>
<b>5.2 Objetivos específicos <i>in vitro</i>:</b> .....	<b>30</b>
<b>5.3 Objetivos específicos <i>in vivo</i>:</b> .....	<b>30</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>6.1 Línea celular y condiciones de cultivo</b> .....	<b>31</b>

6.2	Reactivos y anticuerpos .....	31
6.3	Evaluación de citotoxicidad.....	31
6.4	Evaluación de exposición de calreticulina .....	32
6.5	Análisis de Western blot .....	32
6.6	Evaluación de la secreción de ATP al medio extracelular.....	33
6.7	Ensayo de medición de liberación de la proteína HMGB1 .....	33
6.8	Animales.....	34
6.9	Experimentos <i>In vivo</i> de vacunación anti-tumoral .....	34
6.10	Análisis estadístico .....	34
7.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
7.1	Muerte celular inducida por los tratamientos con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la línea celular B16F10. ....	35
7.2	Inducción de la exposición de calreticulina por los tratamientos con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la línea celular B16F10.....	36
7.3	Liberación de ATP por la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP e ICRP + OXP. ....	37
7.4	Expresión de las proteínas HSP70, HSP90 y HMGB1 en la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP. ....	38
7.5	Efecto <i>in vivo</i> de los DAMPs derivados de tumor en lisados celulares de la línea B16F10 tratadas con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la prevención del melanoma. ....	41
8.	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
9.	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
10.	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
	Mecanismo hipotético de la muerte inmunogénica inducida por el IMMUNEPOTENT CRP y su combinación con oxaliplatino en melanoma. ....	48
11.	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>50</b>
	<b>RESUMEN BIOGRÁFICO .....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

CONT.		PÁGINA
Figura 1.	Características del melanoma.....	5
Figura 2.	Escala de Clark y Breslow para la determinación del grado de extensión del melanoma.....	6
Figura 3.	Requerimientos para el proceso de muerte inmunogénica.....	11
Figura 4.	Proceso de translocación de la calreticulina del retículo endoplásmico a la membrana plasmática.....	14
Figura 5.	Proteínas de choque térmico durante la muerte inmunogénica.....	17
Figura 6.	Liberación de HMGB1 durante la muerte inmunogénica.....	20
Figura 7.	Principales vías de secreción de ATP.....	23
Figura 8.	Clasificación de los inductores de muerte inmunogénica.....	24
Figura 9.	Estructura química del oxaliplatino.....	24
Figura 10.	Formación de aductos por el oxaliplatino.....	25
Figura 11.	Los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP inducen muerte sobre la línea celular de melanoma murino B16F10.....	35
Figura 12.	Los tratamientos con ICRP, OXP, ICRP + OXP inducen la exposición de calreticulina en la línea celular de melanoma murino B16F10.....	36

Figura 13. Liberación de ATP en respuesta a los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP.....	37
Figura 14. Expresión y liberación de las proteínas HSP70, HSP90 y HMGB1 en respuesta a los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP.....	39
Figura 15. Liberación de la proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1) por las células B16F10 después de los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP .....	40
Figura 16. Efecto de los lisados tumorales ricos en DAMPs derivados del tratamiento de la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP e ICRP + OXP en la prevención de melanoma.....	42
Figura 17. Mecanismo hipotético de la muerte inmunogénica inducida por el IMMUNEPOTENT CRP y su combinación con oxaliplatino en melanoma.....	48



## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracilo
AIF	Factor inductor de apoptosis
Apaf-1	Factor-1 activador de la proteasa apoptótica
APC	Aloficocianina
ASC	Apoptosis-asociada a la proteína semejante a speck conteniendo CARD
ATP	Adenosin trifosfato
B16F10	Línea celular de melanoma murino
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CD91	Grupo de diferenciación 91
CPA	Célula presentadora de antígeno
CRT	Calreticulina
CT26	Línea celular de carcinoma de colon murino
DACH	Diaminociclohexane
DAMPs	Patrón molecular asociado a daño
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDLb	Extracto dializable de leucocitos bovino
eIF2 $\alpha$	Factor de iniciación eucariótico 2-alfa
EL4	Línea celular de linfoma murino
ERp57	Proteína 57 residente del retículo endoplásmico
GADD34	Proteína 34 inducible a daño del DNA y arresto del crecimiento
HEPES	Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico
HMG	Proteína de alta movilidad
HMGB1	Proteína de alta movilidad del grupo caja-1
HSP70	Proteína del shock térmico 70
HSP90	Proteína del shock térmico 90
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
ICRP+OXP	IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino
IFN $\gamma$	Interferón gamma

IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-18	Interleucina 18
kDa	Kilodaltones
LPS	Lipopolisacárido
MCA205	Línea celular de fibrosarcoma murino
MCP	Muerte celular programada
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MyD88	Gen 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NLRP3	Familia del receptor parecido a NOD, conteniendo el dominio de pirina 3
NOD	Receptores del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
OXP	Oxaliplatino
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PERK	Kinasa del retículo endoplásmico semejante al RNA de la protein kinase
PP1	Proteína fosfatasa 1
PRR	Receptor de reconocimiento de patrón
RAGE	Receptor para productos finales avanzados de glicalización
RIG	Gen de la proteína inducible del ácido retinoico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
TBS	Tris-buffer salino
TLR2	Receptor Toll like 2
TLR4	Receptor Toll like 4
U	Unidad
UFC-GM	Unidades formadoras de colonias- granulocitos-monocitos
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar

## RESUMEN

La muerte inmunogénica es una modalidad de muerte celular que estimula al sistema inmune para establecer una respuesta específica contra las células de cáncer. El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es una mezcla de sustancias de bajo peso molecular obtenidas de bazo de bovino, se ha reportado que *in vitro* tiene actividad citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer e *in vivo* modula la respuesta inmunológica. El objetivo de este estudio fue determinar si el efecto citotóxico del ICRP y su combinación con oxaliplatino (OXP) en la línea celular B16F10 de melanoma murino es mediante muerte inmunogénica. El ensayo de citotoxicidad con la tinción de yoduro de propidio - anexina V, y la determinación de la exposición de calreticulina fueron realizados por citometría de flujo. La determinación de la liberación de ATP fue realizado por ensayo de bioluminiscencia, HSP70 y HSP90 por Western blot y la liberación de HMGB1 determinada por Western blot y por ELISA. Nuestros estudios *in vitro* demuestran que los tratamientos con ICRP u OXP causaron muerte celular de una manera dependiente de tiempo, pero el tratamiento con la combinación de ICRP + OXP incrementó el efecto citotóxico desde las 24 horas. La exposición de calreticulina y la liberación de ATP, HSP70, HSP90 y HMGB1 fueron inducidos por los tratamientos con ICRP y la combinación de ICRP + OXP, este último, incrementó significativamente la exposición y liberación de estos DAMPs; el tratamiento con OXP indujo la exposición de calreticulina y liberación de ATP y HMGB1. En los experimentos *in vivo* se observó que la administración subcutánea del lisado tumoral rico en DAMPs (tratado con ICRP y con la combinación de ICRP + OXP) previno la aparición del melanoma cuando fueron retados con células tumorales viables, contrario a lo observado con la administración del lisado tumoral tratado con OXP. Nuestros resultados sugieren que el IMMUNEPOTENT CRP puede ser usado como un agente capaz de incrementar la capacidad antitumoral de fármacos e inducir muerte inmunogénica previniendo el desarrollo de melanoma.

## ABSTRACT

Immunogenic cell death is a cell death modality that stimulates the immune system to fight against cancer. The IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) is a mixture of substances of low molecular weight obtained from bovine spleen, *in vitro* has cytotoxic activity on different tumor cell lines and *in vivo* modulates the immune response. The aim of this study was to determine if the cytotoxic effect of ICRP and its combination with oxaliplatin (OXP) on B16F10 murine melanoma cells was through immunogenic cell death. The cytotoxic assay was determined by Annexin V and propidium iodide staining, and calreticulin exposure by flow cytometry. ATP release by bioluminescence, HSP70 and HSP90 by Western blot and HMGB1 release by Western blot and ELISA assays. Our *in vitro* studies showed that treatments with ICRP or OXP induced cell death in a time- dependent manner, but the treatment with the combination of ICRP + OXP increased the cytotoxic effect since 24 h. The calreticulin exposure and ATP, HSP70, HSP90 and HMGB1 release were induced by the treatment with ICRP, and the combination of ICRP + OXP increased the exposure and release of DAMPs, while OXP treatment only induced calreticulin exposure, ATP and HMGB1 release. *In vivo* experiments, showed that the administration of tumor-derived DAMPs-rich cell lysates derived from B16F10 cells treated with ICRP and the combination of ICRP + OXP prevented the melanoma growth, however; the OXP treatment didn't. Our results suggest that IMMUNEPOTENT CRP could be used as an agent able to increase the capacity of anti-tumor drugs to induce immunogenic cell death and prevent the melanoma growth.

# 1. INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada (MCP) es un proceso regulado mediante el cual una célula desencadena su propia muerte, es fundamental para mantener la homeostasia de los organismos, ya que participa en procesos como la remodelación de extremidades en etapas embrionarias, en el desarrollo del sistema inmune, por ejemplo, en la selección positiva y negativa de linfocitos T, combate infecciones previniendo la diseminación de los microorganismos hacia células adyacentes. Sin embargo, cuando los mecanismos de muerte celular fallan se desencadenan enfermedades autoinmunes o se inicia el desarrollo de células tumorales. La MCP puede ocurrir por mecanismos que en ocasiones conduce a tolerancia inmunológica o no tienen efecto sobre el sistema inmune. Un nuevo concepto de muerte celular llamado “muerte inmunogénica”, es de interés debido a que el sistema inmune se activa contra antígenos expuestos o liberados por las células tumorales muertas. Este tipo de muerte es de importancia en el contexto de que algunos agentes empleados en la quimioterapia anticáncer, ejercen su efecto sobre las células cancerosas conduciéndolas a la liberación de moléculas antigénicas, despertando la activación del sistema inmune específico de tumor, logrando determinar la eficacia antitumoral eliminando la enfermedad.

Estas moléculas normalmente se encuentran en el interior de la célula cumpliendo funciones celulares específicas, sin embargo, cuando se encuentran en el exterior son antígenos derivados de células tumorales con la capacidad de activar la respuesta inmune innata y específica contra las células tumorales. Estas moléculas son conocidas como alarminas o DAMPs (damage-associated molecular patterns). Las principales alarminas son: calreticulina (CRT), su exposición en la cara externa de la membrana plasmática, es la primera señal “cómeme” que expone la célula tumoral; el ATP (adenosin trifosfato), su secreción constituye uno de los principales quimioatrayentes al tumor. Las proteínas de choque térmico: HSP70 y HSP90, en conjunto con la proteína HMGB1 (high-mobility group box 1) al ser liberadas al espacio extracelular promueven su reconocimiento y la maduración de células dendríticas conduciendo a la activación del sistema inmune específico.

Se ha reportado que solo cierto tipo de terapias pueden inducir muerte inmunogénica *in vitro* e *in vivo*, algunos de estos inductores se han considerado como vacunas contra células tumorales y han sido usados para prevenir el cáncer residual. Sin embargo es importante continuar la búsqueda de nuevas alternativas que favorezcan este tipo de muerte. Trabajos previos del grupo de investigación del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL, han demostrado que el tratamiento con ICRP (mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular (10-12 kDa), que son obtenidas de la liberación de leucocitos desintegrados o tejido linfoide de bazo bovino) induce muerte en diferentes líneas celulares de cáncer humano *in vitro* y modula la respuesta inmune *in vivo*, por lo tanto el propósito de esta investigación es demostrar si el ICRP al ser utilizado como monoterapia o en combinación con oxaliplatino induce muerte de tipo inmunogénico en la línea celular de melanoma murino B16F10.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Cáncer

El cáncer es definido como un crecimiento anormal de las células que puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo e invadir tejido adyacente, diseminándose a puntos distantes del organismo mediante el transporte de estas células malignas por la sangre o el sistema linfático, provocando metástasis (NIH, 2016).

El cáncer se produce por cambios que ocurren en la información genética de la célula, estos cambios pueden ser causados por factores externos del medio ambiente o factores internos del propio individuo. Los principales factores externos son: exposición a agentes químicos carcinogénicos como el asbesto, arsénico, componentes del tabaco, aflatoxinas y radiación ultravioleta e ionizante. Los carcinógenos de origen biológico comprenden infecciones causadas por algunos virus como el causante de hepatitis B y C, algunos tipos de papiloma virus humanos, bacterias y parásitos. Las causas de origen interno que pueden provocar el desarrollo de células tumorales son el envejecimiento, ya que los mecanismos de reparación celular se van perdiendo con el paso del tiempo y la predisposición genética del individuo (WHO, 2015).

Siendo el cáncer la principal causa de muerte en el mundo, en el 2012 se reportaron 14 millones de casos nuevos, 8.2 millones de muertes relacionadas al cáncer y 32 millones de personas se encontraban padeciendo la enfermedad (5 años después del diagnóstico). Se prevé que el número de casos nuevos aumente un 70% en los próximos 20 años. Los tipos de cáncer más comunes en el mundo tanto en hombres y mujeres fueron: cáncer de pulmón, mama, colorrectal, próstata, estómago, hígado y de cuello uterino. Las causas más comunes de muerte por cáncer en el mundo tanto en hombres y mujeres fueron: pulmonar (19% de todas las muertes por cáncer; 1.6 millones de personas), hepático (9% de todas las muertes por cáncer; 745,000 personas), gástrico (9% de todas las muertes por cáncer; 723,000 personas), colorrectal (9% de todas las muertes por cáncer; 694,000 personas), mamario (6% de todas las muertes por cáncer; 522,000 personas), cáncer de esófago (5% de todas las muertes por cáncer; 400,000 personas) y cáncer de páncreas (4% de todas las muertes por cáncer; 330,000 personas) (CDC, 2015).



## **2.2 Melanoma**

El melanoma es un tipo de cáncer de piel que se origina en las células de la piel llamadas melanocitos, cuya función es producir la melanina, un pigmento color marrón que le da el color a la piel, cabello y ojos (American Cancer Society, Inc, 2016).

A nivel mundial se registran anualmente de 2 a 3 millones de casos con cáncer de piel tipo no melanoma y 132,000 casos de melanoma. De acuerdo a la Skin Cancer Foundation, 1 de cada 3 casos de cáncer diagnosticados es de piel, y se estima que 1 de cada 5 americanos desarrollarán cáncer de piel en el transcurso de sus vidas. La incidencia de cáncer de piel en el mundo se ha incrementado en las últimas décadas y se prevé siga aumentando en los próximos años, esto se ha relacionado al cambio climático y al daño producido a la capa de ozono, que funciona como un filtro de los rayos UV emanados por el sol, ocasionando 300, 000 casos de cáncer de piel tipo no melanoma y 4,500 casos de melanoma, adicionales a los casos relacionados a otros factores de riesgo.











Se estima que a nivel mundial 65,000 personas mueren al año por melanoma. En México se registran alrededor de 1,000 casos anuales de melanoma, ocupando el tercer lugar con 7.9%, y causa el 75% de muertes por cáncer de piel. De acuerdo a el Registro Nacional de Neoplasias Malignas, el cáncer de piel tiene mayor incidencia en las ciudades de México, Guadalajara y Monterrey (WHO, 2016), (SmeO, 2015), (Jurado *et al.*, 2016), (Secretaria de Salud, 2015). El melanoma afecta a personas adultas principalmente, sin embargo, se han reportado casos en niños y adolescentes. En los hombres se puede encontrar con frecuencia en el tronco, cabeza o cuello y en las mujeres a menudo aparece en brazos y piernas (NIH, 2016).

### **2.2.1 Factores de riesgo**

Los factores de riesgo para el desarrollo de melanoma son: la exposición prolongada a la luz UV, aparición de lunares atípicos, ser de raza blanca, color de cabello (rubio o pelirrojo), antecedentes familiares de melanoma u otros tipos de cáncer de piel, historial de quemaduras solares con ampollas e inmunosupresión.

## 2.2.2 Sintomatología y diagnóstico

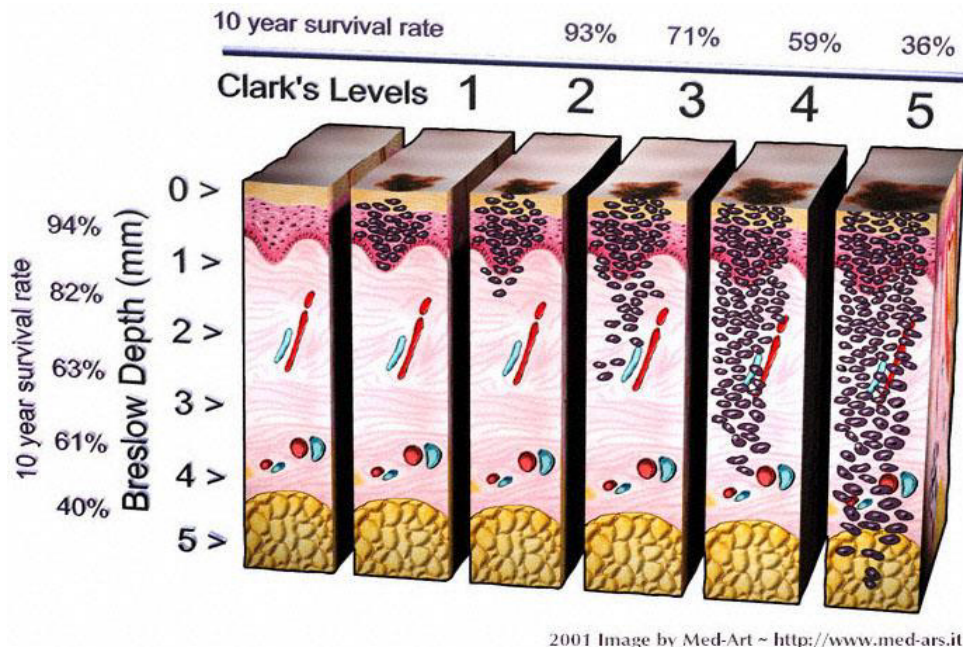
Los síntomas de melanoma son la aparición de lunares o lesiones que se caracterizan por presentar las características de la regla nemotécnica “ABCDE” que son: su asimetría, bordes irregulares, color heterogéneo, aumento del diámetro y evolución de la lesión o lunar con el tiempo (Figura 1).

NORMAL		CANCEROUS
	<b>A: ASYMMETRY</b> If you draw a line through the centre of the lesion, the two halves of a melanoma won't match.	
	<b>B: BORDER IRREGULARITY</b> The border of a melanoma is irregular, typically geographic: peninsulas, bays, islands.	
	<b>C: COLOUR VARIEGATION</b> Healthy moles are a uniform colour. A variety of different colours in the same lesion is suspicious.	
	<b>D: DIAMETER &gt; 6 MM</b> Greater than 6 mm is suspicious, although melanomas can be smaller.	
	<b>E: EVOLVING</b> Recent change in size, shape or colour, or bleeding or scabbing are suspicious.	

**Figura 1. Características del melanoma.** Regla nemotécnica “ABCDE” que describe las características físicas que presenta una lesión o lunar de melanoma.

Para un correcto diagnóstico de melanoma se debe tomar una biopsia excisional con un pequeño margen libre. El reporte histológico debe seguir la clasificación del “The American Joint Committee on Cancer (AJCC)”, que clasifica el melanoma por etapas utilizando el sistema TNM (tumor thickness, nodes and metastasis). La letra T significa “tumor”, mide lo que es profundidad del tumor en milímetros utilizando una escala del 0 al 4 (escala Breslow), también se le agrega una letra minúscula, ya sea a o b para señalar si hay ulceración e índice mitótico. La letra N indica propagación hacia los ganglios linfáticos cercanos y es señalada con número del 0 al 3, además de asignar una letra minúscula a, b ó c. Por último, la letra M indica si el tumor de melanoma ha hecho “metástasis” a órganos distantes. Ya que se han determinado los grupos T, N, M entonces son combinados para proveer una etapa general, a lo que se conoce como

agrupación por etapas (niveles de Clark) usando números romanos que van del I al IV y en algunas etapas se subdivide utilizando letras mayúsculas. La etapa 0 ó también conocido como melanoma *in situ* porque solo afecta a la epidermis (primera capa de piel), y no ha afectado a la siguiente capa que es la dermis. Si la lesión es localizada y ha afectado la dermis se clasifica en el estadio I-II; en el estadio III, la lesión regional ha afectado de uno a tres ganglios linfáticos adyacentes al tumor, o se ha propagado a piel cercana, lo que se conoce como tumores satélites o a los canales linfáticos (tumores de tránsito). La última fase caracterizada por: lesión metastásica (estadio IV), que es donde el melanoma ya se ha propagado más allá de la piel hacia los ganglios linfáticos y otros órganos. También es importante reportar la presencia de ulceraciones y grado de regresión de los márgenes quirúrgicos (Dummer R *et al.*, 2010; Fong Z.V *et al.*, 2013).



**Figura 2. Escala de Clark y Breslow para la determinación del grado de extensión del melanoma.** Mediante la combinación de estas escalas se establece el grado de extensión y progresión de la lesión de melanoma, en base a esto establecer el tratamiento más adecuado.

### 2.2.3 Tratamiento

El tratamiento para lesiones de etapa I es remover la lesión y un margen de piel normal de aproximadamente medio centímetro mediante biopsia excisional. En esta etapa se

puede recomendar el uso de crema imiquimod. Cuando el paciente se encuentra en etapa 1B se considera que puede haber propagación hacia los ganglios linfáticos por lo que se debe realizar una biopsia del ganglio centinela, en caso de que se encuentren células cancerosas en el ganglio centinela, se procede a la disección de los ganglios linfáticos adyacentes al tumor.

En la etapa III del melanoma, se requiere excisión quirúrgica amplia de la zona del tumor y disección de los ganglios linfáticos, también se considera el uso terapias adyuvantes para evitar que haya regresión del melanoma, entre los que destacan está el uso del interferón alfa-2 aprobado por Food and Drug Administration, inyecciones de interleucina-2, vacuna del Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) y la radioterapia. También se puede incluir el uso combinado de quimioterapia con radioterapia o la inmunoterapia. En esta etapa en algunos pacientes no es posible curar el melanoma.

La etapa IV del melanoma es la más difícil de curar porque ya existe propagación de las células cancerosas hacia los ganglios linfáticos y otras partes del organismo, sin embargo, los tumores o ganglios linfáticos agrandados pueden ser extirpados por cirugía o tratados con radioterapia, y las metástasis que no se pueden extirpar pueden tratarse con radiación, inmunoterapia, terapia dirigida o quimioterapia o la combinación de estas terapias. En los últimos años se ha implementado el uso de la inmunoterapia para tratar el melanoma debido a los resultados favorables reportados, entre los que destacan el uso de ipilimumab, pembrolizumab o nivolumab. La terapia dirigida también ha mostrado éxito con el uso de vemurafenib, dabrafenib, trametinib y cobimetinib cuando las células de melanoma presentan cambios genéticos en el gen BRAF. Cuando las células de melanoma presentan cambios en el gen C-KIT, se pueden utilizar medicamentos dirigidos como el imatinib y nilotinib. Estas terapias han mostrado ser efectivas prolongando la vida de los pacientes, sin embargo, no se ha demostrado que curen el melanoma (American Cancer Society, Inc, 2016).

### **2.3 Inmunoterapia**

La inmunoterapia del cáncer es un término acuñado por el médico inglés William Coley, quien observó regresión tumoral completa en un paciente con sarcoma que

adicionalmente presentaba una infección bacteriana con *Streptococcus pyogenes* que contrajo después de una cirugía, lo que lo llevo a utilizar a esta bacteria (toxina del Dr. Coley) para tratar otros tipos de tumores obteniendo resultados positivos. Años más tarde, el Dr. Lloyd Old comprobó el efecto de la vacuna contra la tuberculosis BCG (Bacillus Calmette y Guérin) en tumores, determinando su efecto preventivo hacia la aparición de tumores y aumento de la sobrevivencia de un modelo murino con tumor, hoy en día esta terapia está aprobada para el tratamiento del cáncer de vejiga. El Dr. Jedd Wolchock ha jugado un papel importante en el desarrollo de tratamientos basados en inmunoterapia para tratar el melanoma con el uso del ipilimumab y nivolumab. Estudios han demostrado el papel central del sistema inmune en el control y la eliminación de los tumores, sin embargo, a pesar de esto las células tumorales han desarrollado numerosos mecanismos de evasión con progresión tumoral y metástasis (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 2015).

La inmunoterapia del cáncer tiene como objetivo estimular al sistema inmune para el rechazo del tumor de una manera específica, con una respuesta de larga duración y memoria inmunológica. La inmunoterapia suele usarse en etapas de remisión del cáncer o cuando el tumor es resistente a tratamientos, se puede dar sola o combinada con terapias convencionalmente utilizadas o con algún otro tipo de inmunoterapia. Se ha clasificado a los tratamientos con distintos enfoques utilizando el sistema inmune o buscando la manera de activarlo contra las células tumorales: en la terapia celular adoptiva se extrae sangre del paciente para la obtención y generación de linfocitos específicos de tumor *in vitro*, posteriormente son administrados al paciente para la destrucción de las células tumorales. También se utilizan anticuerpos monoclonales como terapia dirigida para bloquear alguna proteína en específico de las células tumorales; en la inmunoterapia no específica, se busca estimular al sistema inmune utilizando terapias con interferones, interleucinas y factores estimulantes de colonias; en la inmunoterapia activa se estimula al sistema inmune responsable de la respuesta antitumoral con la administración de vacunas (Chiang C *et al.*, 2015; Arango y González, 2002).

La magnitud de la respuesta hacia la vacuna de antígenos tumorales completos va depender del estado en el que se encuentra el sistema inmune. En pacientes con cáncer su inmunidad está comprometida, asimismo la administración de quimioterapéuticos o radioterapia lo afecta aún más, presentando una respuesta inmune deficiente. Para obtener resultados más eficaces en la terapia contra el cáncer se ha empleado la administración de inmunoterapia para complementar tratamientos oncológicos convencionales como cirugía, quimioterapia y radioterapia. Actualmente se estudian distintas estrategias de vacunación anticáncer buscando estimular en el paciente una respuesta específica antitumoral a través del uso de vacunas antígeno-específicas, vacunas de células dendríticas, vacunas con células tumorales modificadas genéticamente para producir citocinas que promuevan la respuesta antitumoral y las vacunas de células tumorales completas (Chiang C *et al.*, 2015).

Las vacunas de células tumorales completas se clasifican en: vacunas de células tumorales autólogas que provienen del mismo paciente y vacunas de células alogénicas que es una combinación de células tumorales del mismo tipo histológico, pero de diferentes pacientes. Son elaboradas a partir de las células tumorales tratadas *in vitro* con alguno de los tratamientos convencionales para inducir muerte celular y expresión de antígenos tumorales, posteriormente estas células son inyectadas a los pacientes (Chiang C *et al.*, 2015; Arango y González, 2002).

Resultados de un meta-análisis en 1,800 pacientes que eran inmunizados con vacunas de lisados completos de células tumorales demostraron un 8.1% de eficacia en comparación con pacientes que fueron vacunados con antígenos tumorales específicos sintéticos (3.6%) (Chiang C *et al.*, 2015). Hasta el momento solo se han aprobado dos vacunas, para tratar cáncer de próstata y melanoma metastásico, sin embargo, de acuerdo a datos del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, existen varios ensayos clínicos de vacunas contra diferentes tumores.

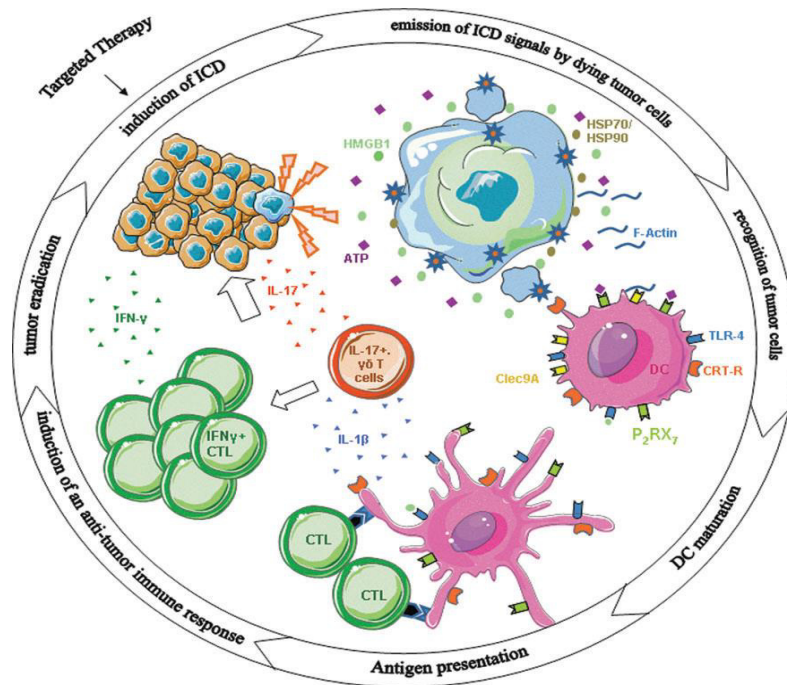
Las vacunas de lisados tumorales completos poseen la ventaja de ser usados como vacunas directamente sin la necesidad de obtener células dendríticas del paciente para que sean activadas y transfundidas al paciente, además pueden inducir una respuesta

inmune protectora, sin embargo, poseen la desventaja de que las células tumorales viables son poco inmunogénicas y pueden liberar factores solubles que inhiben la activación de las células presentadoras de antígeno y de linfocitos T, por lo que se buscan estrategias como el uso de moléculas adyuvantes que hagan a estas células tumorales altamente inmunogénicas, permitiendo mejor reconocimiento de estas células por el sistema inmunológico (Wang, 2012).

## **2.4 Muerte inmunogénica**

Algunas terapias contra el cáncer pueden llevar a la célula tumoral a un proceso de muerte donde secreta al medio extracelular o expone en la cara externa de la membrana plasmática moléculas que provocan su reconocimiento y englobamiento por células presentadoras de antígeno, estas moléculas normalmente se localizan en diferentes compartimentos celulares llevando a cabo funciones específicas en la célula y que al ser liberadas (mediante muerte celular, estrés o daño), les permite actuar como señales de daño o alarma que el sistema inmunológico reconoce, estas moléculas son llamadas desde el año 2004, patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o señales de peligro, también conocidas como alarminas (Matzinger P et al., 1994, 2002). La presencia de los DAMPS conduce a la activación de células presentadoras de antígeno y linfocitos T específicos de tumor, estimulando de esta manera al sistema inmunológico (Tesniere A et al., 2008; Keep O et al., 2009a; Krysko D et al., 2012; Kroemer G et al., 2013). Las señales de peligro fueron establecidas por primera vez en 1994 por Polly Matzinger como parte de un modelo propuesto, el cual sugiere que el sistema inmune responde al daño causado por toxinas o daño mecánico donde no hay agentes patógenos presentes. Los DAMPs son reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se localizan a nivel de membrana o citoplasma ((receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors) y receptores tipo RIG (Retinoic acid- inducible protein gene)) en las células del sistema inmune innato. Los DAMPs de las células tumorales al ser expuestos en la membrana plasmática o liberados al medio extracelular cumplen una función específica estimulando y facilitando el reclutamiento de células dendríticas específicas del tumor. Logrando una óptima presentación de antígeno a los linfocitos T, activándose la

producción y liberación de IL-1 $\beta$  e IFN  $\gamma$ , efectuando una respuesta celular específica de linfocitos T citotóxicos contra el tumor (Figura 3) (Takeda K et al., 2003; Apetoch L et al., 2007; Kono y Rock, 2008; Zitvogel L et al., 2010; Krysko D *et al.*, 2012).



**Figura 3. Requerimientos para el proceso de muerte inmunogénica.** Ciertas terapias inducen que la célula tumoral emita señales de peligro (DAMPs) que son reconocidas principalmente por células dendríticas que presentan estos antígenos a los linfocitos T, promoviendo una respuesta inmune celular específica contra las células tumorales (Ladoire et al., 2013).

### 2.4.1 Patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)

Las principales proteínas que se han estudiado hasta el momento por participar de manera importante en la muerte inmunogénica de las células tumorales son las que se describen a continuación:

#### 2.4.1.1 Calreticulina

La calreticulina (CRT) aislada por primera vez en 1974 por Ostwald y MacLennan. Se ha encontrado en diferentes especies y en plantas. En los humanos el cromosoma 19 es donde se localizan los genes codificantes de calreticulina. Es una proteína soluble localizada en el lumen del retículo endoplásmico. Se caracteriza por ser una proteína



altamente conservada de 46 kDa conformada por tres dominios: globular amino-terminal dominio-N que se une a dominios ricos en carbohidratos, dominio central-P rico en prolina que se pliega en un “brazo extendido” que interactúa con ERp57 (endoplasmic reticulum resident protein 57); y un dominio-C ácido carboxil-terminal de unión a calcio (Panaretakis T *et al.*, 2008).

Se le han encontrado diferentes funciones en la célula donde tiene funciones como reguladora del transporte nuclear, proliferación celular y migración, pero su función principal es en el retículo endoplásmico como chaperona en el plegamiento de proteínas y regulación de la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$  (Michalak M *et al.*, 1999).

Otra función extracelular importante es participar en la muerte inmunogénica de las células tumorales. Durante la muerte inmunogénica, la calreticulina es una de las primeras proteínas que se transloca a la membrana plasmática de la célula donde es expuesta en su cara externa dando la señal “cómeme”, aumentando de esta manera la inmunogenicidad de la célula al permitir la atracción de células presentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas y macrófagos, que sean positivas para el receptor CD91 permitiendo el reconocimiento de la calreticulina y el englobamiento de estas células estimulando la fagocitosis (Obeid M *et al.*, 2007c).

Se ha descrito que la exposición de calreticulina durante la muerte inmunogénica es crucial para el reconocimiento de las células que exponen la calreticulina por el sistema inmune para su destrucción. Esto fue comprobado por Michel Obeid y colaboradores, determinando que la exposición de calreticulina dicta la inmunogenicidad de las células tumorales, utilizando células CT26 de cáncer de colon de ratón que fueron tratadas con diferentes tipos de quimioterapéuticos de la familia de las antraciclinas y radiación gamma, observando que estos tratamientos inducían la translocación de CRT en un promedio de tiempo de una hora. El bloqueo de la exposición de calreticulina por medio de RNAs cortos de interferencia fue suficiente para inhibir la fagocitosis de las células tumorales previamente tratadas con antraciclinas inhibiendo de esta manera la inmunogenicidad de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo,

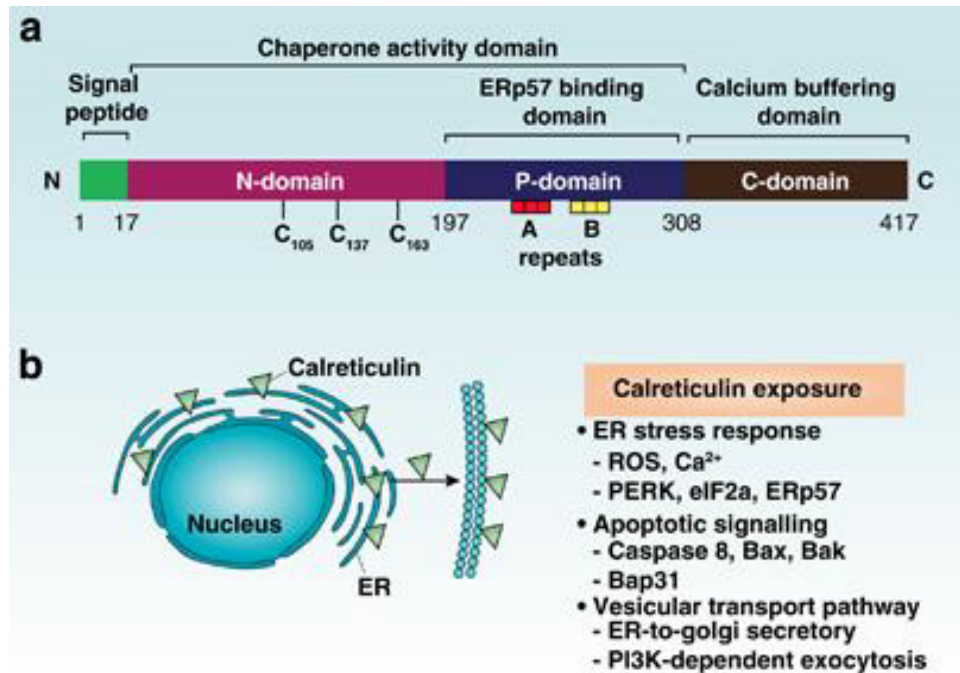
cuando a estas células se les administraba calreticulina recombinante esta era absorbida en la superficie celular restaurando la inmunogenicidad de las células tumorales. En el modelo *in vivo* los ratones fueron inyectados de forma subcutánea con células tumorales tratadas *in vitro* con antraciclinas y retados una semana después con células tumorales viables de la misma línea, observando que no había formación de tumor, sugiriendo que la exposición de calreticulina por las células tumorales determina la activación de la respuesta inmune contra el tumor (Obeid M et al., 2007a, 2007b).

Se ha estudiado el mecanismo de translocación de la calreticulina a la membrana plasmática para poder activarlo en diferentes líneas de cáncer y con quimioterapéuticos que se han reportado como no inmunogénicos, como la mitomicina C y el etopósido. Se describió que la translocación de calreticulina del retículo endoplásmico a la membrana plasmática se relaciona con la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2). Sin embargo, puede ser desfosforilada por la unión de la subunidad catalítica PP1 (protein phosphatase 1) y del adaptador GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34), por lo que se usan bloqueadores químicos como tautomicina o caliculin A para inhibir PP1 y salubrinal para inhibir GADD34 en conjunto a quimioterapias reportadas como no inmunogénicas, permitiendo la exposición de calreticulina sin efectos citotóxicos mayores para las células (Obeid M et al., 2007a, 2007b; Kepp O et al., 2009b).

Para que se lleve a cabo la translocación de la calreticulina a la membrana plasmática se realiza en conjunto con proteínas del retículo endoplásmico principalmente de ERp57. Indicando que células tumorales que tengan alguna falla en el mecanismo de translocación ya sea de calreticulina o de ERp57 hace a la célula tumoral resistente a la terapia con antraciclinas inhibiendo la activación de una respuesta inmune antitumoral (Panaretakis T et al., 2008, 2009).

Para la translocación del complejo CRT/ERp57 hacia la membrana plasmática antes de las primeras señales apoptóticas de la célula, se han descrito una vía que puede mediar su exposición. Tras estímulos de estrés al retículo endoplásmico, hay activación de PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase) que conduce a la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , seguido de la activación parcial de caspasa 8, conduciendo al

rompimiento de la proteína BAP31 del retículo endoplásmico y a la activación de Bax y Bak. Finalmente, la calreticulina es transportada en vesículas desde el aparato de Golgi, para ser secretada mediante exocitosis de manera dependiente de las proteínas SNARE, conduciendo finalmente a la exposición de ecto-calreticulina en la superficie de la membrana plasmática (Figura 4) (Panaretakis T et al., 2009; Zitvogel L et al., 2010).



**Figura 4. Proceso de translocación de la calreticulina del retículo endoplásmico a la membrana plasmática.** Cuando hay estrés en el retículo endoplásmico la calreticulina forma un complejo con ERp57, para ser transportada por medio de vesículas del aparato de Golgi a la membrana plasmática. Este proceso se lleva a cabo por la vía de PERK e intervienen proteínas apoptóticas (Bax, Bak, Bap31).

#### 2.4.1.2 Proteínas de choque térmico

Las proteínas de choque térmico (HSPs), son proteínas altamente conservadas cuya expresión puede ser inducida por diferentes tipos de estrés. Fueron descubiertas en 1962 y se han clasificado en cinco familias de acuerdo a su tamaño molecular: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 (Krause y Rodríguez-Krause., 2011). Los dos miembros de esta familia con funciones inmunogénicas son HSP70 y HSP90 (Tesniere A et al., 2007; Keep O et al., 2009; Wells y Malkovski., 2000).

En condiciones normales están constitutivamente presentes en las células cumpliendo su función como chaperonas. La principal función de las proteínas de choque térmico como

chaperonas es asegurar el correcto plegamiento de proteínas en condiciones de estrés. Las proteínas de choque térmico se sobreexpresan cuando las células sufren hipotermia, cambio de pH, hipoxia o algún otro tipo de estrés. Se encuentra generalmente en el compartimiento intracelular donde cumplen otras funciones como inhibir la apoptosis en múltiples niveles, pero estas proteínas se pueden translocar a la cara externa de la membrana citoplasmática donde son expuestas en la superficie o pueden ser liberadas al medio extracelular pudiendo activar de esta manera células presentadoras de antígeno que las reconozcan y activar una respuesta inmune específica (Seigneuric R et al., 2011).

Se ha reportado a la proteína HSP70 como un regulador negativo de la apoptosis inhibiendo el estrés inducido a la célula, previniendo la permeabilización de la membrana mitocondrial a través del bloqueo de la translocación de Bax y mediante la interacción con las proteínas AIF (apoptosis inducing factor) y Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1). Igualmente se ha reportado que HSP90 puede inhibir la apoptosis como resultado de un efecto negativo sobre la oligomerización de Apaf-1 e inhibe el reclutamiento de procaspasa 9. La familia de proteínas HSP90 está conformada por dos miembros HSP90  $\alpha$  y HSP90  $\beta$  y está asociada con proteínas de señalización y ligandos dependientes de factores de transcripción permitiendo la maduración conformacional de estas proteínas (Schmitt E et al., 2007).

Se ha encontrado sobreexpresión de HSP70 en cáncer de mama, del endometrio y gástrico. Además, se ha relacionado con metástasis, pobre pronóstico de curación y resistencia a quimioterapia o radiación. La disminución en la expresión de HSP70 incrementa la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos, *in vivo* se ha observado que una baja en la producción de HSP70 disminuye significativamente la tumorigenicidad (Nylandsted J et al., 2000; Gurbuxani S et al., 2001). HSP90 se ha encontrado sobreexpresada en cáncer de mama, pulmón, leucemias y enfermedad de Hodgkin's. En cáncer de mama la sobreexpresión de HSP70 y HSP90 se relaciona con un mal pronóstico de la enfermedad (Whitesell L et al., 2005; Neckers L., 2002).

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado la importancia de la expresión de las proteínas de choque térmico y el incremento de la inmunogenicidad de las células

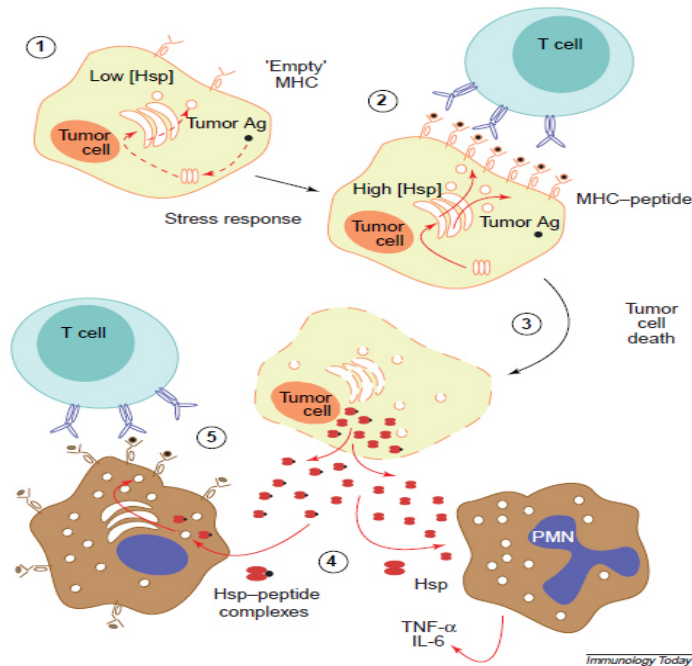
tumorales que las expresan. Pueden ser reconocidas por receptores que se encuentran presentes en células dendríticas, principalmente de tipo Toll (TLR2 y TLR4) y por el receptor RAGE (receptor for advanced glycation end products), activando la maduración de estas células, lo cual facilita el procesamiento y presentación del antígeno a los linfocitos T (Tesniere A et al., 2008; Keep O et al., 2009).

Se ha descrito que las proteínas HSP70 y HSP90 pueden influir aumentando la inmunogenicidad de las células tumorales, describiendo tres posibles alternativas:

- Las proteínas de choque constituyen una señal de peligro para el sistema inmune, ya que se ha observado que HSP70 posee efectos moduladores directos sobre células inflamatorias.
- Las proteínas de choque térmico liberadas por las células tumorales en proceso de muerte pueden transferir péptidos antigénicos a células presentadoras de antígeno, las cuales van a activar linfocitos T específicos.
- Las proteínas de choque térmico pueden aumentar la capacidad de las células tumorales a procesar y presentar antígenos tumorales endógenos directamente a células T específicas del tumor (Figura 5) (Wells y Malkovski., 2000).

Por ejemplo, en 1998 Melcher y colaboradores describieron que el incremento de la proteína HSP70 inducida por un tipo de muerte no apoptótico puede dar una señal inmunoestimuladora *in vivo*, colaborando en el desarrollo de una respuesta inmune hacia las células tumorales en lugar de tolerancia inmunológica (Melcher A et al., 1998).

Menoret y colaboradores reportaron que la inmunización de modelos murinos con proteínas HSP purificadas de tumores inmunogénicos protegió a los animales del reto con la inmunización de las células tumorales viables de donde se purificaron las proteínas HSP. Igualmente comprobaron que la forma inducida de HSP70, pero no la forma constitutiva HSC70 (Proteína cognato de shock térmico 70), está involucrada en la inmunogenicidad de los tumores. Esto fue observado usando un modelo de carcinoma de colon de rata donde se utilizaron diferentes clonas tumorales y evaluaron parámetros inmunológicos y secreción de HSP70 y HSC70 (Ménoret A et al., 1995).



**Figura 5. Proteínas de choque térmico durante la muerte inmunogénica.** Durante la muerte celular las proteínas HSP son liberadas al medio extracelular o expuestas en la membrana plasmática, activando la respuesta inmune celular de linfocitos T CD8+ y de otras células para la producción de citocinas inflamatorias (Wells AD et al., 2000).

#### 2.4.1.3 Proteína de alta movilidad caja 1 (HMGB1)

La familia de proteínas del grupo de alta movilidad (HMGB), es la más abundante en cuanto a proteínas HMG, está conformada por cuatro miembros (HMGB1, HMGB2, HMGB3, HMGB4). La proteína HMGB1 es altamente conservada y la que tiene mayor expresión de todos los miembros de la familia HMG, en humanos está conformada por 215 aminoácidos y forma dos dominios de unión al DNA nombrados como caja A (9-79 aminoácidos) y B (95-163 aminoácidos) y posee una región C-terminal también conocida como cola ácida (186-215 aminoácidos) (Yang H et al., 2013).

HMGB1 posee una homología del 99% entre roedores y humanos, solamente la parte C-terminal de la proteína contiene dos aminoácidos que difieren entre humanos y ratones. HMGB1 puede movilizarse entre el núcleo y el citoplasma y normalmente se acumula en el núcleo donde se une a la cromatina. HMGB1 es la proteína con mayor movilidad en el núcleo, debido a su alta movilidad puede ser encontrada en el citosol (mitocondria, lisosoma, membrana celular y espacio extracelular). La localización de la proteína va a depender del tipo de célula, tejido o señales de estrés. La expresión nuclear de HMGB1 está implicada en varios eventos como replicación del DNA, reparación, recombinación, transcripción y estabilidad genómica. Además de otras funciones que puede tener a nivel extracelular en la inflamación, inmunidad, proliferación celular y muerte celular (Kang R et al., 2014).

Su expresión se lleva a cabo en todas las células nucleadas, así como en células del sistema inmune de la línea mieloide y células NK y representa la proteína no histona más abundante. Es liberada al espacio extracelular por células que se encuentran en fase de necrosis primaria o secundaria. A nivel extracelular la proteína HMGB1 juega un papel importante como señal de peligro (DAMP) que puede montar respuestas inmunes, ya que puede interactuar con los receptores TLR2, TLR4, TLR9 y RAGE presentes en células presentadoras de antígenos. HMGB1 activa la liberación de citocinas proinflamatorias por las células presentadoras de antígeno al interactuar principalmente con el receptor TLR-4, igualmente se puede unir a receptores RAGE modulando funciones en células endoteliales y tumorales (Figura 6) (Bianchi M., 2007).

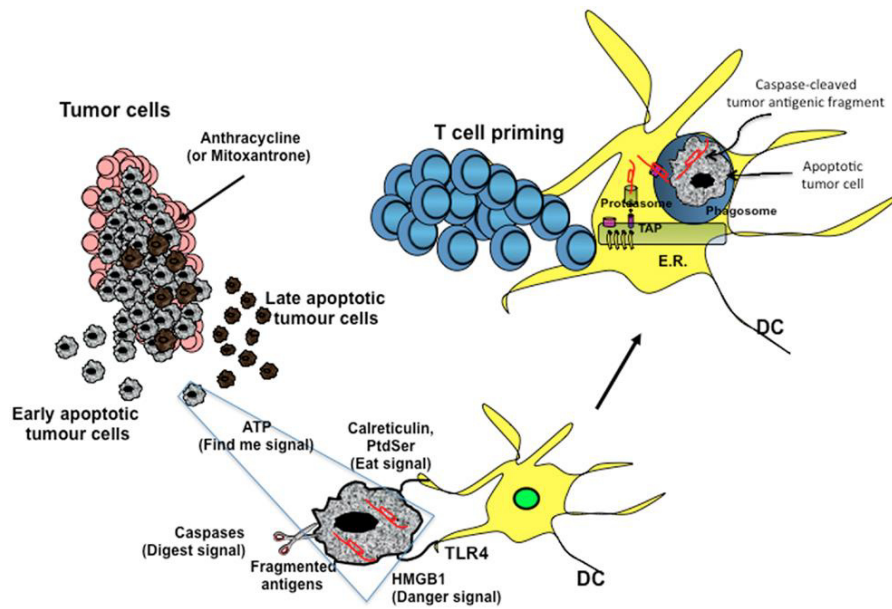
Para montar una eficiente respuesta inmune contra las células tumorales se requiere del receptor TLR4 y de la proteína MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88). Esto fue comprobado utilizando la transferencia adoptiva de células dendríticas que expresan el receptor TLR4 previamente activadas con células tumorales muertas en ratones con deficiencia de expresión del receptor TLR4, observando que la terapia restauró la respuesta inmune, concluyendo la importancia del receptor TLR4/MyD88 en la muerte inmunogénica. La activación de la vía TLR4/MyD88 provocado por la unión de HMGB1 inhibe la fusión entre fagosomas y lisosomas

facilitando el procesamiento y presentación del antígeno tumoral que es esencial para la estimulación de una respuesta anticáncer (Yamazaki T et al., 2014).

La reducción de HMGB1 en las células MCA205 (fibrosarcoma murino) empleando RNA cortos de interferencia específicos disminuye la inmunogenicidad de estas células. Esto fue comprobado en un modelo murino donde se inoculó de manera subcutánea las células MCA205 que expresaban HMGB1 y células MCA205 en las que estaba bloqueada la expresión de HMGB1, ambas previamente tratadas con doxorrubicina, diez días después fueron retados con células viables y sin transfectar de la línea MCA205, los ratones fueron monitoreados cada tercer día para evaluar la formación de tumor, concluyendo que el grupo que recibió la vacuna con células MCA205 tratadas con doxorrubicina y que expresaban HMGB1 reducían la progresión del tumor, mientras que el grupo vacunado con células MCA205 tratadas con doxorrubicina pero que había sido bloqueada la expresión de HMGB1, fallaban en prevenir la formación de tumores (Yamazaki T et al., 2014).

Se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen que codifica para TLR4, asociándose la presencia del SNP Asp299Gly en el gen de TLR4 con el fallo en la unión de HMGB1 a dominios extracelulares del receptor TLR4, por lo que no ocurre la activación de la célula dendrítica. Esto se comprobó en 280 mujeres que presentaban cáncer de mama con desarrollo en nódulos linfáticos y que fueron tratadas con cirugía, seguido de terapia adyuvante con irradiación y quimioterapia con antraciclina. Fue genotipificado TLR-4 y analizado en términos de progresión o disminución tumoral después de la terapia, encontrando mayor prevalencia del SNP Asp299Gly en estas pacientes (Apetoh L et al., 2007b).





**Figura 6. Liberación de HMGB1 durante la muerte inmunogénica.** Al ser liberada la proteína HMGB1 de las células tumorales muertas, es reconocida por el receptor TLR4 presente en las células dendríticas inmaduras, llevando a la activación de las mismas, para una óptima presentación del antígeno a los linfocitos T.

#### 2.4.1.4 Adenosin trifosfato (ATP)

La adenosina trifosfato (ATP) es un nucleótido trifosfato que proporciona energía a la célula, se compone de adenosina y tres grupos fosfato. La liberación de ATP por las células es un evento que puede ocurrir cuando la célula recibe estrés, daño físico o químico. Durante la muerte inmunogénica ocurre la secreción de ATP en etapas tempranas de muerte celular, posterior a la exposición de CRT en la cara externa de la membrana plasmática. Es el más abundante metabolito intracelular, considerado el más importante quimioatrayente de monocitos que median la limpieza de los cuerpos apoptóticos. Cuando es secretado por la célula en proceso de muerte hacia el espacio extracelular es reconocido por los receptores purinérgicos inotrópicos P2X o metabotrópico P2Y, los cuales son abundantemente expresados en células del sistema inmune incluyendo macrófagos y células dendríticas (Kroemer G et al., 2013).

Los receptores purinérgicos se clasifican en P2X y P2Y. Los receptores inotrópicos (P2X) son de tipo canales iónicos activados por ligando. Se han identificado siete receptores de este tipo que van de P2X1 a P2X7. Este tipo de receptores se expresan

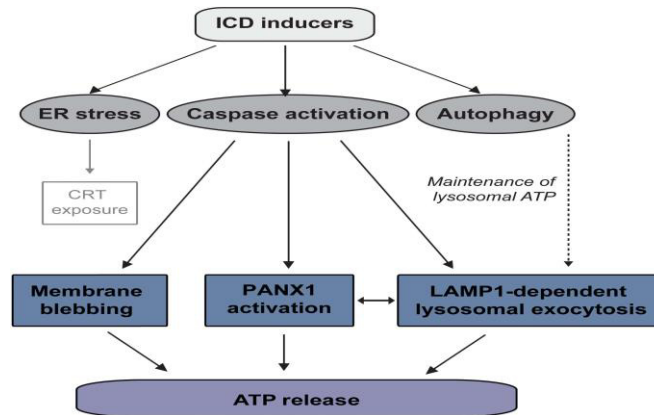
principalmente en el sistema nervioso, plaquetas y células del músculo liso. Los receptores P2Y o conocidos como receptores metabotrópicos que provienen de la familia de receptores acoplados a proteína G, hasta el momento se han identificado ocho receptores de este tipo (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14). Se expresan en una amplia variedad de tejidos (Figura 7) (Yang G et al., 2014).

Se ha reportado que el ATP extracelular es reconocido por los receptores P2X, principalmente por P2RX7, los cuales están conformados por dos dominios transmembrana y un largo bucle extracelular con la habilidad de unirse al ATP. En respuesta a la unión del ATP al receptor presente en las células presentadoras de antígeno, hay una abertura de los canales que produce el flujo de iones de calcio y potasio, conduciendo a la despolarización de la membrana plasmática, lo que provoca la activación del inflamasoma, el cual es descrito como un sensor para patógenos o alarminas en respuesta a la señal de peligro. El receptor NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) interactúa con la proteína ASC (Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing A CARD) formando el inflamasoma, principal complejo activador de caspasa-1. La activación de caspasa-1 es requerida para estimular la maduración proteolítica de pro-IL-1 $\beta$  y la subsecuente secreción de IL-1 $\beta$  e IL-18 al medio extracelular. La IL-1 $\beta$  al ser liberada por la célula presentadora de antígeno contribuye a la activación de linfocitos T citotóxicos (CD8+) específicos del tumor que producen IFN- $\gamma$  contra las células tumorales (Ghiringhelli F et al., 2009; Ferrari D et al., 2016).

Se ha determinado que distintos tratamientos anticáncer pueden inducir la liberación de ATP por las células tumorales, sin embargo, cuando no se forma el inflamasoma conduce a falla en la activación de una respuesta inmune antitumoral. Esto se comprobó con células tumorales de la línea EL4 que no presentaban Casp-1 y NLRP3, que son componentes del inflamasoma. Estas células fueron implantadas en ratones y se observó que no respondieron al tratamiento con oxaliplatino por lo que se concluyó que la actividad anti-tumoral del oxaliplatino depende de la formación del inflamasoma (Ghiringhelli F et al., 2009).

En otro experimento se observó que el bloqueo de los receptores purinérgicos empleando inhibidores de ATP, o la depleción de ATP en células de cáncer de colon de ratón (CT26) tratadas con doxorubicina o mitoxantrona inhibe la capacidad de estos tratamientos de proteger contra la formación de tumores cuando estos ratones fueron retados con las células CT26 viables (Ghiringhelli F et al., 2009).

La liberación de ATP por las células puede ocurrir a través de una variedad de mecanismos: exocitosis en vesículas, secreción de ATP del citoplasma a través uniones gap, canales de panexina y transportador ABC (del inglés ATP binding cassette (Kroemer G et al., 2013). De acuerdo a reportes, la autofagia es otro mecanismo que facilita la liberación de ATP por las células en proceso de muerte. Se trata de una serie de pasos en los cuales el material citoplasmático de la célula es secuestrado dentro de autofagosomas para luego fusionarse con lisosomas y mediante hidrolasas degradar el material celular para ser reciclado a través del metabolismo energético o reacciones anabólicas. Se ha descrito que la inhibición genética de reguladores de autofagia (Atg5, Atg7, Atg10, Atg12, Beclin 1, Lamp2, Vps34) o el uso de inhibidores farmacológicos (bafilomicina A1 o 3-hidroxicloroquine) reduce considerablemente la secreción de ATP por la célula en proceso de muerte y como consecuencia es suprimida la inmunogenicidad de la misma. Se observó que la autofagia es necesaria en las células tumorales tratadas con quimioterapia para que ocurra una óptima liberación de ATP. Las células tumorales que no presentaron activación de autofagia manifestaron deficiente liberación de ATP *in vivo*, lo cual se correlacionó con la insuficiente activación de células presentadoras de antígeno y la ausencia de activación de una respuesta inmune antitumoral (Michaud M et al., 2011; Martins I et al., 2014).



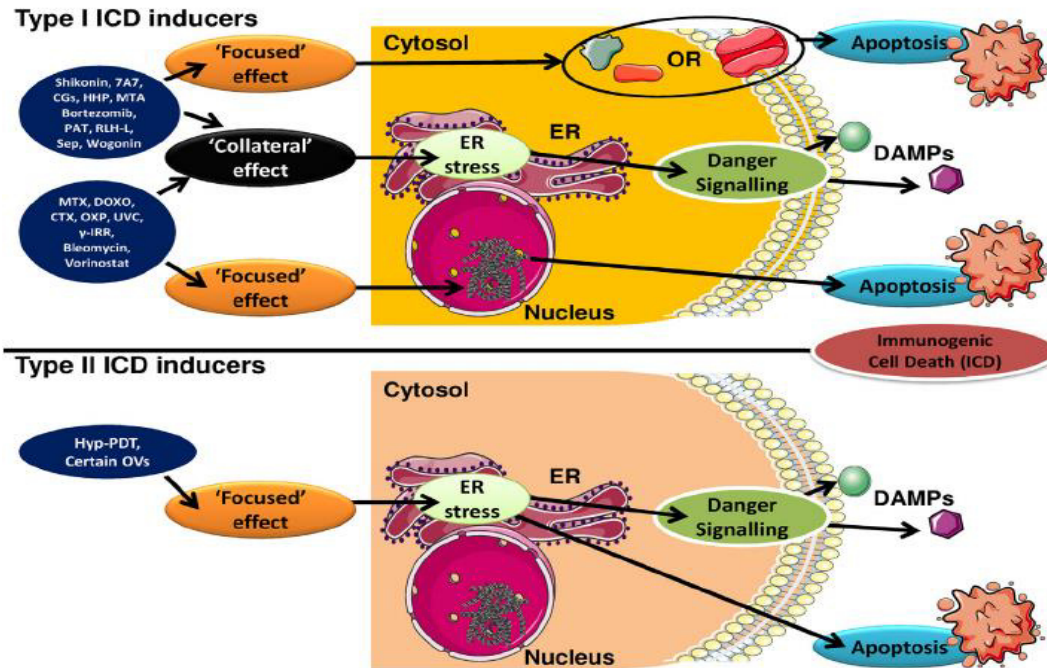
**Figura 7. Principales vías de secreción de ATP.**

## 2.5 Inductores de muerte inmunogénica

Mientras algunos quimioterapéuticos causan una muerte celular que no es inmunogénica, otros quimioterapéuticos pueden favorecer la activación de células efectoras del sistema inmune mientras inducen muerte celular. La muerte inmunogénica puede ser inducida por diversas modalidades terapéuticas que se han clasificado en tipo I y tipo II de acuerdo al mecanismo de daño que inducen en las células tumorales.

Los de tipo I se caracterizan por ser su blanco proteínas del citoplasma, proteínas transmembranales o proteínas nucleares como el DNA y proteínas reparadoras. El efecto producido sobre estas proteínas provoca un daño colateral al retículo endoplásmico por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este grupo se clasifican a los quimioterapéuticos como mitoxantrona, antraciclinas, oxaliplatino y ciclofosfamida, además de otras terapias con glucósidos cardiacos, vorinostat, shikonin, bortezomib y la radiación ultravioleta.

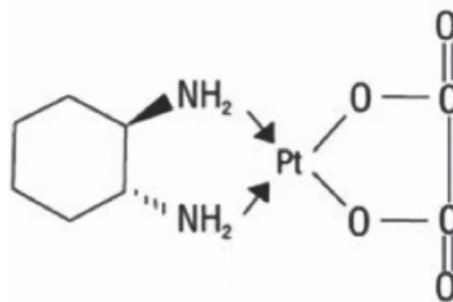
Las terapias del grupo II se caracterizan por tener como blanco el retículo endoplásmico, entre los cuales tenemos la terapia fotodinámica con hipericina y Coxsackievirus B3 (Figura 8) (Dudek A et al., 2013; Inoue H et al., 2014; Pol J et al., 2015; Bezu L et al., 2015).



**Figura 8. Clasificación de los inductores de muerte inmunogénica.** Las terapias reportadas como inmunogénicas se han clasificado en dos grupos: tipo I los cuales su blanco son proteínas del citoplasma produciendo un daño colateral al retículo endoplásmico. Los de tipo II su blanco es el retículo endoplásmico, causando estrés con la producción de ROS.

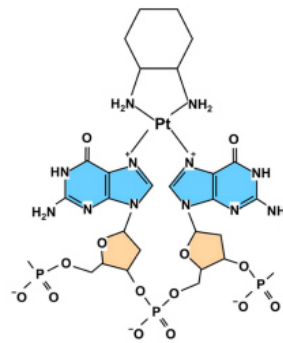
### 2.5.1 Oxaliplatino

Agente citotóxico a base de platino de tercera generación utilizado como terapia en el cáncer. Su estructura (cis-[(1R,2R)-1,2-cyclohexanediamine-N,N'] [oxalato(2-)-O,O'] platinum) en la cual el átomo de platino está acoplado con DACH (1,2-diaminociclohexano) y con un ligando de oxalato (Raymond E et al., 1998; Perego y Robert., 2016).



**Figura 9. Estructura química del oxaliplatino**

Su blanco terapéutico es el DNA. La retención del anillo DACH por el oxaliplatino activado da como resultado la formación de aductos DNA-platino. El átomo de platino se une covalentemente a la posición N<sup>7</sup> de la guanina, formando enlaces cruzados, lo que impide la replicación del DNA. Se ha reportado que la formación de aductos inducido por el oxaliplatino son más efectivos al inhibir la síntesis del DNA y más citotóxico que los aductos formados por el cisplatino o carboplatino (Figura 10) (Lawrence T et al., 2003; Mehmood R et al., 2014).



Oxaliplatin adduct

**Figura 10. Formación de aductos por oxaliplatino.** Se forman enlaces entrecruzados entre dos residuos contiguos de guanosina, formando los aductos que impiden la síntesis del DNA.

Se empezó a usar en los Estados Unidos en la clínica en el año 2002. Actualmente se utiliza como terapia de cáncer colorrectal metastásico. Se usa en terapia combinada con 5-fluorouracilo y leucovorina. En otros estudios se ha reportado al oxaliplatino como inductor de muerte inmunogénica en diferentes líneas tumorales, ya que estimula la exposición de calreticulina, secreción de ATP además de liberación de la proteína nuclear HMGB1 y de las proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90 por la célula tumoral, favoreciendo la activación de la respuesta inmunológica contra las células tumorales (Dudek AM et al., 2013; Hato S et al., 2014; Tesniere et al., 2010). Se comprobó su efecto como inductor de la exposición de calreticulina y liberación de HMGB1 en diferentes líneas de cáncer de colon humano y murino. *In vivo* se observó que la inoculación de células tumorales de la línea CT26 tratadas con oxaliplatino induce una respuesta inmune antitumoral (Tesniere et al., 2010).

## 2.6 IMMUNEPOTENT CRP (ICRP)

El IMMUNEPOTENT CRP fue desarrollado y patentado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, es un extracto dializable de leucocitos de bovino (EDLb) formado por componentes de bajo peso molecular (10-12 kDa) provenientes de la desintegración de tejido linfoide obtenido de bazos de bovino, el EDLb se obtiene de  $1 \times 10^8$  leucocitos que es definido como una unidad (1U). Para su preparación es dializado, liofilizado y finalmente se determina que esté libre de pirógenos por medio del ensayo del lisado de amebiocitos *Limulus* y libre de bacterias por medio del cultivo del EDLb en diferentes medios de cultivo y además de su inoculación en ratones.

De acuerdo a estudios realizados en el laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, se ha comprobado que el ICRP tiene efectividad clínica en el tratamiento de una variedad de enfermedades. *In vitro* ha mostrado ser citotóxico de una manera dependiente de dosis en diferentes líneas celulares de cáncer como MCF-7, BT-474, MDA-MB-453, A-427, Calu-1, U937 y L5178Y. Además, se observó que el ICRP a diferentes concentraciones no afecta la viabilidad de células mononucleares de sangre periférica normales de humano (PBMC) a 72 horas del tratamiento (Franco-Molina MA., et al 2006).

Se ha demostrado el efecto protector del ICRP contra los efectos del 5-FU (5-fluorouracilo) sobre las células de medula ósea en ratones tratados con 5-FU. Se observó que el ICRP incrementa el conteo celular, la formación de UFC-GM (Unidad formadora de colonias granulocito-monocito), el arresto de células de la medula ósea en fase G0/G1, incremento en el porcentaje de leucocitos, granulocitos y poblaciones eritroides, reducción de la formación de ROS (Reactive oxygen species) y mejoró los niveles hematológicos y ganancia de peso de los ratones tratados con 5-FU (Coronado et al., 2016).

Igualmente se ha demostrado su efecto inmunomodulador *in vivo*, de acuerdo a lo observado en un estudio realizado en 24 pacientes diagnosticados con cáncer primario

de pulmón. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: grupo 1: fue tratado con un régimen convencional de radioterapia y quimioterapia por 6 semanas, el grupo 2: fue tratado con el mismo régimen que el grupo 1 más la administración del ICRP (5U) a partir del tercer día del tratamiento, por vía oral e intramuscular diariamente por 180 días. Se observó un incremento significativo del porcentaje de linfocitos T en el grupo 2 en comparación del grupo 1, principalmente de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>+</sup>, sugiriéndose un efecto inmunológico protector del ICRP sobre los efectos secundarios de la quimioterapia (Franco-Molina MA., et al 2008).

Asimismo, se ha observado un efecto antiangiogénico y antitumoral del ICRP sobre el melanoma murino B16F10. *In vitro* las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de ICRP por 72 horas, observándose una disminución de la viabilidad de la línea B16F10 dependiente de dosis. Se determinó por medio de la técnica de TUNEL que el mecanismo de muerte inducido por el tratamiento es apoptosis y se confirmó la activación de caspasa-3 en las células tratadas, una disminución de la producción de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), además de que el tratamiento previene la metástasis, retarda la aparición de tumores, disminuye el peso del tumor y aumenta la sobrevivencia de los ratones portadores del tumor de melanoma (Franco-Molina MA., et al 2010).

El ICRP también ha mostrado tener un efecto modulador en la expresión de genes de citocinas proinflamatorias en el shock endotóxico murino en ratones BALB/c. Se administró ICRP después del LPS (lipopolisacáridos), se observó que el ICRP suprimió la expresión de IL-10, IL-6 e indujo la disminución en la expresión de TNF $\alpha$ , IL- $\beta$  e IL-12p40, mejorando la sobrevivencia de los ratones (Franco-Molina MA., et al 2004).



### 3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existen diversas modalidades de tratamientos contra el cáncer, sin embargo pocos agentes quimioterapéuticos empleados de manera rutinaria en la clínica (doxorrubicina, mitoxantrona, oxaliplatino y ciclofosfamida) tienen la capacidad de inducir muerte inmunogénica sobre las células tumorales, este nuevo mecanismo de acción es deseado, ya que se ha comprobado clínicamente que esta modalidad de muerte activa la respuesta inmune adaptativa en contra de las células tumorales y adicionalmente genera memoria inmunológica, lo cual favorece el pronóstico de curación de la enfermedad. La activación del sistema inmune impediría la recidiva del tumor, ya que se ha comprobado la acción citotóxica de las células T sobre las células madres del tumor. Es por esto que es de relevancia el descubrimiento e identificación de inductores de muerte celular inmunogénica así como el de explotar la acción de nuevos y antiguos agentes que han mostrado inducir muerte celular regulada no inmunogénica que al combinarlos con regímenes quimioterapéuticos induzcan inmunogenicidad que favorezcan la acción citotóxica sobre las células tumorales.

El IMMUNEPOTENT CRP ha mostrado ser citotóxico en diferentes líneas celulares de cáncer y tener efecto inmunomodulador *in vivo*, por lo que es importante determinar si adicionalmente estimula la inmunogenicidad de las células tumorales al utilizarse solo o como adyuvante con terapias antineoplásicas convencionales para incrementar la inmunogenicidad.

## **4. HIPÓTESIS**

El tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP induce el efecto de muerte celular inmunogénica al ser empleado como monoterapia o terapia conjunta en el tratamiento de melanoma murino.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP y su combinación con oxaliplatino sobre la inducción de muerte celular inmunogénica en melanoma murino.

### 5.2 Objetivos específicos *in vitro*:

1. Determinar el efecto del ICRP, oxaliplatino e ICRP/oxaliplatino sobre la viabilidad de la línea celular de melanoma murino B16F10.
2. Determinar el efecto del ICRP, oxaliplatino e ICRP/ oxaliplatino sobre la inducción de alarminas (calreticulina, HSP70, HSP90, HMGB1 y ATP) en la línea celular de melanoma murino B16F10.

### 5.3 Objetivos específicos *in vivo*:

1. Determinar si la administración subcutánea del extracto de células de la línea B16F10 tratadas con ICRP, oxaliplatino e ICRP/ oxaliplatino previene la aparición del melanoma.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Línea celular y condiciones de cultivo

Se utilizó la línea celular B16F10 (melanoma de ratón), la línea celular fue cultivada y mantenida en medio DMEM/F-12 1:1 (1X) + 2.50 mM L-Glutamina, + 15mM HEPES Buffer (HyClone, Logan, UT, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco, Grand Island NY, USA) y 100 U/ml de antibiótico penicilina/estreptomina. La línea celular fue incubada a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### 6.2 Reactivos y anticuerpos

El oxaliplatino fue obtenido de Industrias Farmacéuticas Teva (México, D.F). El IMMUNEPOTENT CRP fue producido por el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Las soluciones de tinción de yoduro de propidio y anexina V-APC se obtuvieron de BD Pharingen (San Jose, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales de calreticulina (FMC-75) (conjugado con ficoeritrina) y el isotipo control IgG1 (MOPC-21) (conjugado con ficoeritrina) se adquirieron de Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA). Los anticuerpos monoclonales de ratón para HSP70 (IgG2a), HMGB-1 (HAP 46.5), beta actina (AC-15) y el anticuerpo policlonal de conejo HSP90  $\alpha/\beta$  (H-114) se consiguieron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Coctel inhibidor de proteasas (100X) se obtuvo de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Kit de detección de ATP por bioluminiscencia fue adquirido de Promega (Madison, WI, USA). Kit de ELISA High Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1) BioAssay™ (mouse) fue adquirido de US Biological Life Science (Salem, MA, USA).

### 6.3 Evaluación de citotoxicidad

Se evaluó el efecto citotóxico de los tratamientos con ICRP, oxaliplatino e ICRP + oxaliplatino sobre la línea celular B16F10 mediante la técnica de yoduro de propidio y Anexina V. Fueron cultivadas ( $1 \times 10^5$ ) células de la línea B16F10 en placas de cultivo de

12 pozos y se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> toda la noche. Las células fueron tratadas con ICRP (1 U/ml), OXP (800 µM) y la combinación de ICRP (1 U/ml) + OXP (800 µM) por 24, 48 y 72 h. Después de los tratamientos, las células fueron colectadas y lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y resuspendidas en buffer de unión (1X) suplementado con el fluorocromo alofococianina (APC) conjugado con Anexina V (5 µl por muestra) y yoduro de propidio (1 µl por muestra), las muestras fueron incubadas en hielo y en oscuridad por 15 minutos. El análisis de las muestras se determinó por citometría de flujo en un citómetro Accuri C6 (Becton Dickenson, San Jose, CA, USA).

#### **6.4 Evaluación de exposición de calreticulina**

Se evaluó la exposición de calreticulina en la línea celular B16F10 después de ser tratada con ICRP (1 U/ml), oxaliplatino (800 µM) y la combinación de ICRP (1 U/ml) + oxaliplatino (800 µM) a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas. Las células B16F10 fueron cultivadas a una concentración de  $1 \times 10^5$  células, en placas de 12 pozos, en medio DMEM/F-12, se incubaron a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> toda la noche para permitir la adherencia de las células a la placa, al día siguiente se retiró el medio de cultivo y se añadió el tratamiento. Posteriormente las células tratadas se recolectaron en tubos de 1.5 ml y fueron centrifugados a 1600 rpm por 10 minutos, se desechó el sobrenadante y al pellet de células se le añadió el anticuerpo monoclonal de anti-ratón para la detección de calreticulina conjugado con el fluorocoromo ficoeritrina, para esta técnica se utilizó una dilución del anticuerpo 1:100 en 50 µl de PBS 1X, se dio un ligero vortex a las muestras y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente protegidas de la luz. Finalmente, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

#### **6.5 Análisis de Western blot**

Células B16F10 ( $5 \times 10^6$ ) fueron tratadas con ICRP (1 U/ml), OXP (800 µM) y la combinación de ICRP (1 U/ml) + OXP (800 µM) por 24, 48 y 72 h. Posteriormente, las células y los sobrenadantes fueron colectados individualmente. Las células fueron lavadas con PBS y homogenizadas en buffer de lisis SET 2X suplementado con un coctel inhibidor de proteasas. La cuantificación de proteínas de las muestras se llevó a

cabo con un kit de cuantificación (BIO-RAD). Se cargaron cantidades iguales de proteína en cada pozo (50 µg) y se corrió una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% para la separación de proteínas, posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa por electrotransferencia. Sitios inespecíficos de unión fueron bloqueados incubando la membrana en TBS-tween-20 suplementado con 5% de leche baja en grasa por 1h, seguido por la incubación de los anticuerpos primarios HSP70, HSP90, HMGB1 toda la noche a 4° C. Los anticuerpos primarios fueron detectados con el apropiado anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano y las bandas fueron visualizadas empleando un kit de detección ECL (GE Healthcare) y revelado en un film por quimioluminiscencia. Se empleó un anticuerpo de beta-actina como control endógeno de la reacción.

#### **6.6 Evaluación de la secreción de ATP al medio extracelular**

Se evaluaron los niveles de ATP extracelular en sobrenadante de la línea celular de melanoma murino B16F10 tratadas con ICRP (1 U/ml), OXP (800 µM) y la combinación de ICRP (1 U/ml) + OXP (800 µM) por 24, 48 y 72 h. Se utilizó un kit de detección cuantitativa por quimioluminiscencia (ENLITEN® ATP Assay System Bioluminescence Detection Kit for ATP Measurement, PROMEGA). La lectura de las muestras se realizó en el equipo Microplate Autoreader EL311 (BioTek Instruments, USA).

#### **6.7 Ensayo de medición de liberación de la proteína HMGB1**

La concentración de HMGB1 fue determinada en los sobrenadantes de células no tratadas (control) y de células tratadas con (1 U/ml), OXP (800 µM) y la combinación de ICRP (1 U/ml) + OXP (800 µM) por 24, 48 y 72 h empleando de un kit de ELISA para la detección de HMGB1 de acuerdo a las instrucciones de la compañía manufacturera (US Biological, Salem, MA, USA).

## **6.8 Animales**

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 de seis a ocho semanas, obtenidos de Harlan México, S.A. de C.V. Fueron alimentados con una dieta balanceada de ratón y agua *ad libitum*, temperatura controlada de 25° C, controlando ciclos de iluminación (12 horas/luz-oscuridad), se siguieron los protocolos experimentales que fueron aprobados por el Comité de Ética para Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## **6.9 Experimentos *In vivo* de vacunación anti-tumoral**

Se trataron *In vitro*  $5 \times 10^6$  células B16F10 con ICRP (3 U/ml), OXP (12.600  $\mu$ M) o la combinación de ICRP (1.2 U/ml) + OXP (900  $\mu$ M) por 48 h. Posteriormente, las células fueron recolectadas, lavadas y centrifugadas dos veces con PBS a 800 x g por 15 minutos, finalmente las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS e inoculadas de manera subcutánea en el flanco izquierdo del ratón. Siete días después, los ratones fueron retados con células B16F10 viables que fueron resuspendidas en 200  $\mu$ l de PBS e inoculadas de manera subcutánea en el flanco derecho. El desarrollo tumoral fue monitoreado en el ratón todos los días en ambos sitios de inoculación por 60 días.

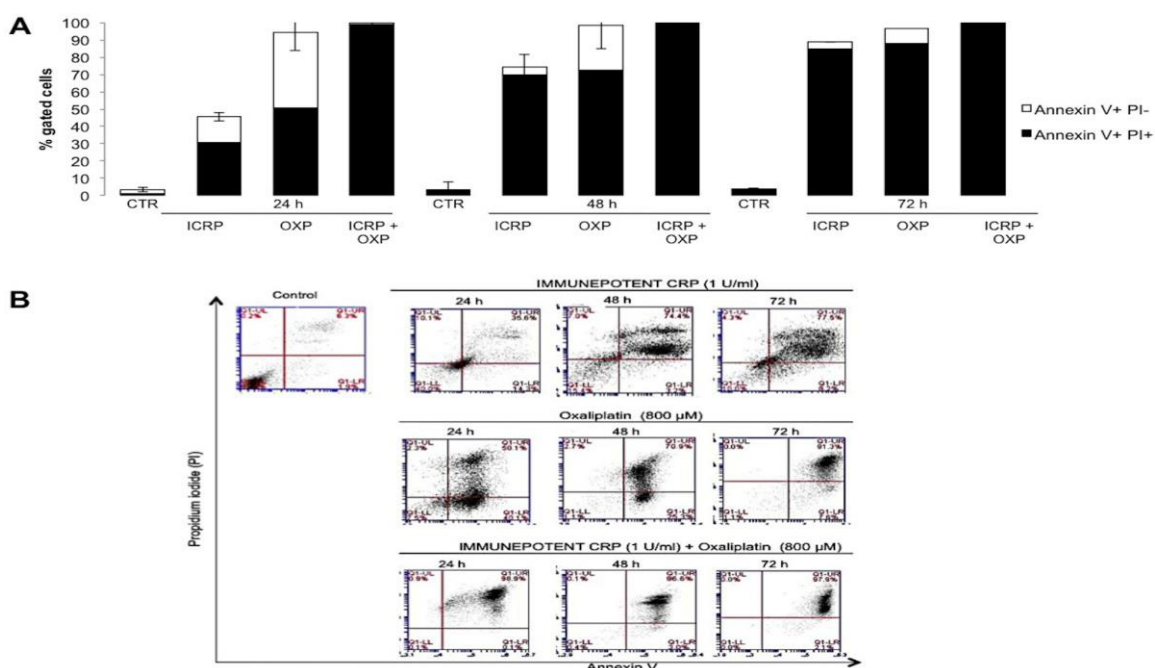
## **6.10 Análisis estadístico**

Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, el análisis estadístico fue realizado usando análisis de varianza (ANOVA). Los resultados fueron considerados estadísticamente significativos si el valor de  $P < 0.05$  ó  $< 0.001$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Muerte celular inducida por los tratamientos con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la línea celular B16F10.

Se encontró que los tratamientos con ICRP (24 h (30.6%), 48 h (69.6%), y 72 h (85%)) y OXP (24 h (50.5%), 48 h (72.6%) y 72 h (88%)) indujeron muerte celular de una manera dependiente de tiempo. El tratamiento con la combinación de ICRP + OXP indujo un efecto citotóxico en todos los tiempos evaluados (24 h (98.8%), 48 h (100%), y 72 h (100%)) (**Figura 11A y Figura 11B**). Las células B16F10 sin tratamiento no se vio afectada su viabilidad.

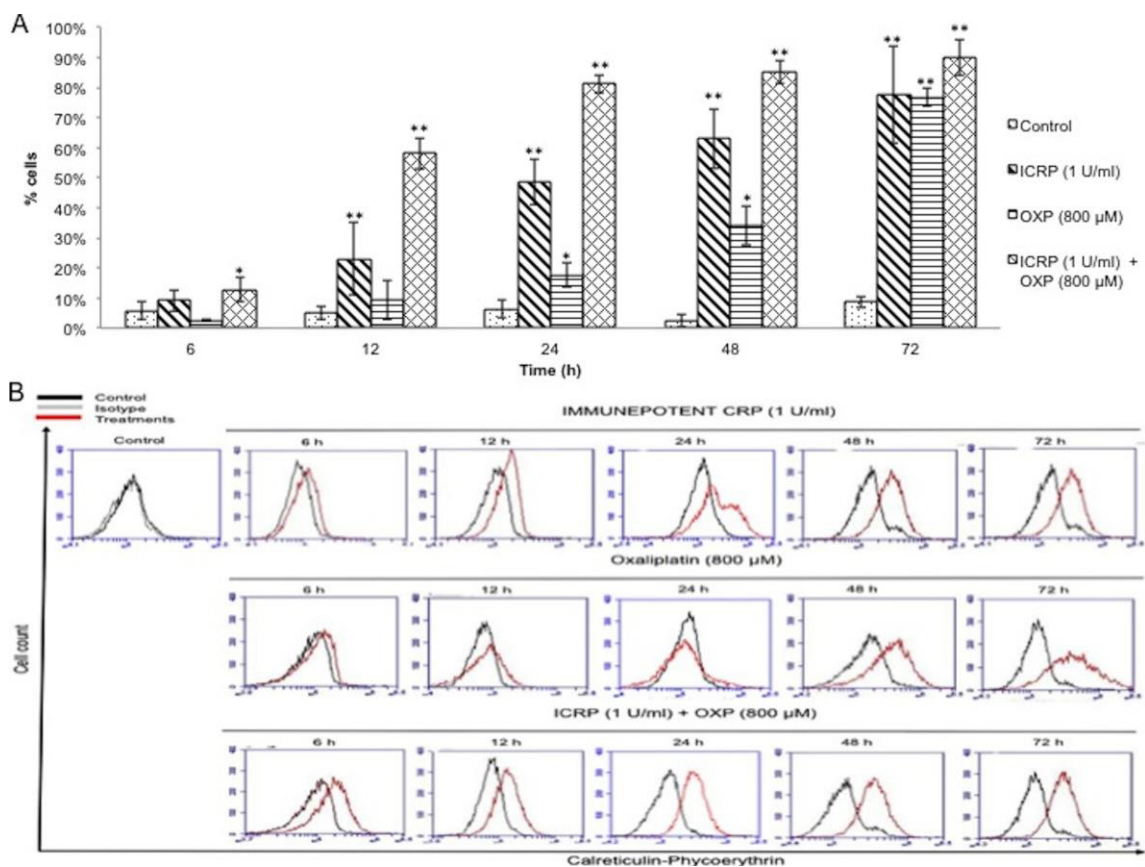


**Figura 11.** Los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP indujeron la muerte sobre la línea celular de melanoma murino B16F10. Las células fueron cultivadas en presencia de los tratamientos a diferentes tiempos y posteriormente recolectadas y teñidas con Anexina V- Aloficocianina y yoduro de propidio, fueron analizadas por citometría de flujo. **(A)** Gráficos representativos de los datos obtenidos de los triplicados (media y desviación estándar  $\pm$ ). **(B)** Datos representativos como dot plot.



## 7.2 Inducción de la exposición de calreticulina por los tratamientos con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la línea celular B16F10.

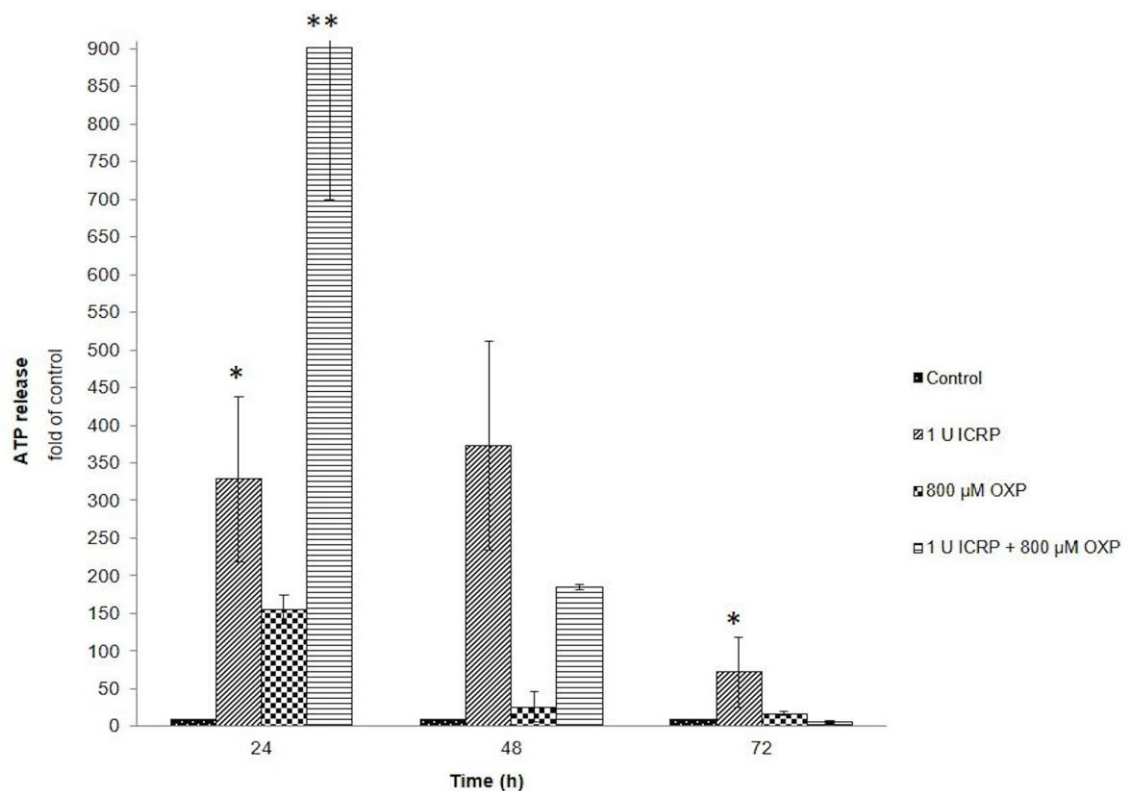
Los tratamientos con ICRP u OXP indujeron exposición de calreticulina en una manera dependiente de tiempo ((ICRP: 6 h (9.1%), 12 h (23%), 24 h (48.6%), 48 h (63%) y 72 h (77.4%))  $P < 0.001$ ; (OXP: 24 h (17.7%), 48 h (29%) y 72 h (76.8%))  $P < 0.05$ . El tratamiento con la combinación de ICRP + OXP indujo mayor exposición de calreticulina desde las 24 h de tratamiento, sin embargo, desde las 6 horas de tratamiento con ICRP + OXP la exposición de calreticulina fue mayor que con los tratamientos individuales (24 h (85.4%), 48 h (85.10%) y 72 h (90%))  $P < 0.001$  (**Figura 12A y 12B**).



**Figura 12. Los tratamientos con ICRP, OXP, ICRP + OXP indujeron la exposición de calreticulina en la línea celular de melanoma murino B16F10.** Las células tratadas fueron teñidas usando un anticuerpo monoclonal anti-ratón para calreticulina y un control de isotipo, ambos conjugados con ficoeritrina, posteriormente analizadas por citometría de flujo. Los resultados son triplicados de tres experimentos (media y desviación estándar  $\pm$ ). (A) Gráficos representativos de los datos obtenidos por citometría de flujo, los análisis estadísticos fueron realizados por la prueba de Dunnett y ANOVA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  comparado con el control. (B) Dots plot representativos de los experimentos.

### 7.3 Liberación de ATP por la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP e ICRP + OXP.

La liberación de ATP se incrementó significativamente a las 24 h de tratamiento con ICRP ( $P<0.05$ ) y la combinación de ICRP + OXP ( $P<0.001$ ). Después de 48 h de tratamiento la liberación de ATP no fue detectada, excepto por el tratamiento con ICRP a las 72 h ( $P<0.01$ ) (Figura 13). La disminución de la concentración de ATP después de 48 h fue probablemente porque el ATP extracelular no es estable por la presencia de varias enzimas que degradan el ATP (ATPasas) o la descomposición de ATP a ADP, AMP, adenosin o fosfato inorgánico.

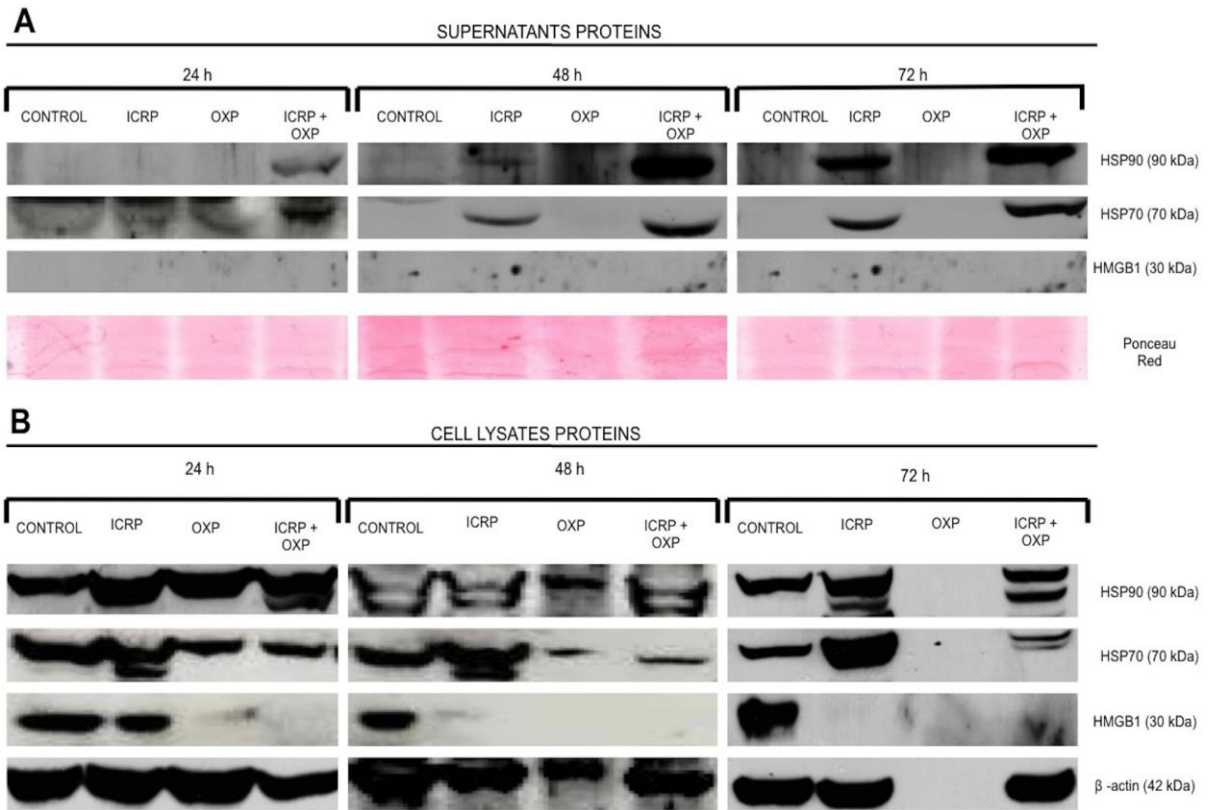


**Figura 13. Liberación de ATP en respuesta a los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP+OXP.** Las células fueron tratadas con los tratamientos indicados a diferentes tiempos, posteriormente se tomaron 100 µl de los sobrenadantes para las mediciones de ATP por medio de un kit de bioluminiscencia, de acuerdo a las instrucciones de la compañía manufacturera. Datos cuantitativos fueron reportados (media y desviación estándar). Se realizaron análisis estadísticos mediante ANOVA empleando la prueba de Dunnett \* $P<0.05$  \*\* $P<0.001$  comparado con el control.

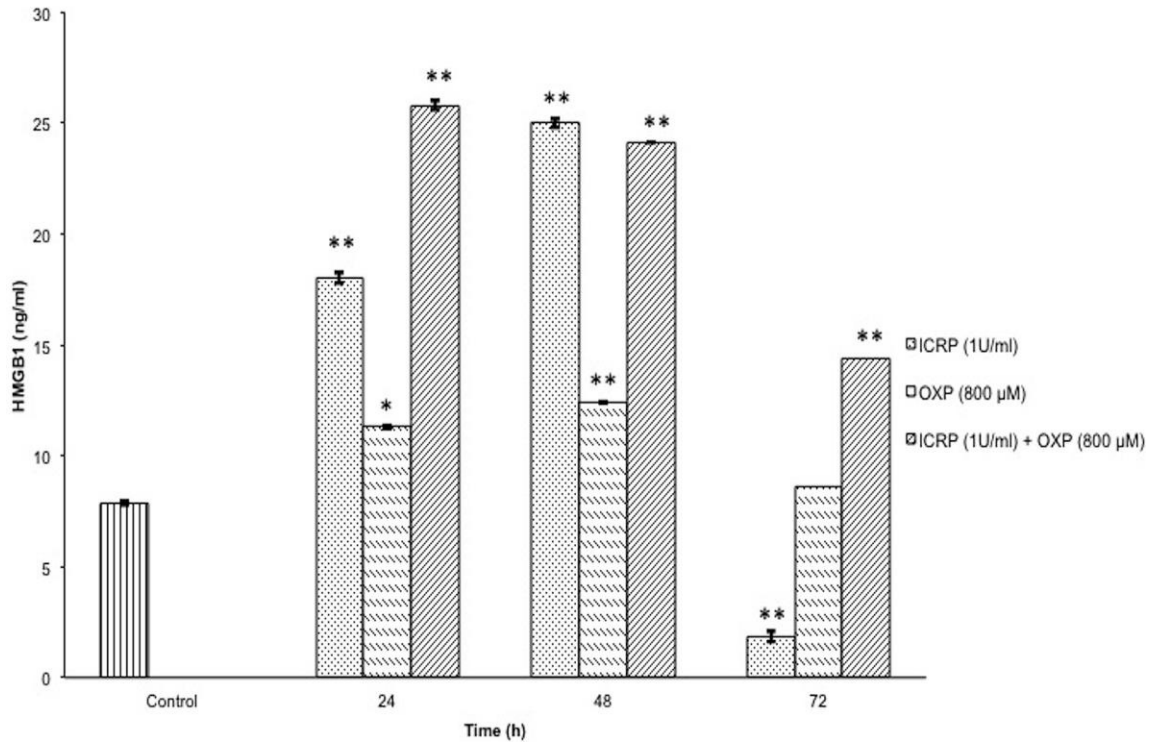
#### **7.4 Expresión de las proteínas HSP70, HSP90 y HMGB1 en la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP.**

En los sobrenadantes, el tratamiento con ICRP + OXP indujo la liberación de HSP90 y HSP70 en la línea celular B16F10 en todos los tiempos evaluados, incrementando la producción a las 48 y 72 horas. El tratamiento con ICRP indujo la liberación de estas proteínas y fueron detectadas a las 48 horas, incrementado su liberación en sobrenadantes a las 72 horas. El oxaliplatino no indujo la liberación de HSP70 y HSP90 en todos los tiempos evaluados. La proteína HMGB1 no fue detectada en ninguno de los tratamientos por Western blot (**Figura 14A**). Así que se decidió usar un kit de ELISA de mayor sensibilidad para su detección, encontrando que todos los tratamientos ICRP, OXP o ICRP + OXP incrementaron la liberación de HMGB1 a las 24 y 48 horas ( $p < 0.001$ ), el tratamiento con ICRP disminuyó significativamente la liberación de HMGB1 a las 72 horas ( $p < 0.001$ ), el tratamiento con OXP no afectó la liberación, y la combinación de ICRP + OXP incrementó la liberación de HMGB1 pero en menor concentración que lo mostrado a 24 ó 48 horas, comparado con el control ( $p < 0.01$ ) (**Figura 15**).

En los lisados celulares, se detectó la presencia de HSP70, HSP90 y HMGB1 en el control a todos los tiempos evaluados. HSP70 y HSP90 fueron detectados en los tratamientos con ICRP o ICRP + OXP a las 24, 48 y 72 horas, pero no fue detectado en el tratamiento con OXP a las 72 horas. La proteína HMGB1 solo fue detectada en el tratamiento con ICRP a las 24 y 48 horas (**Figura 14B**).



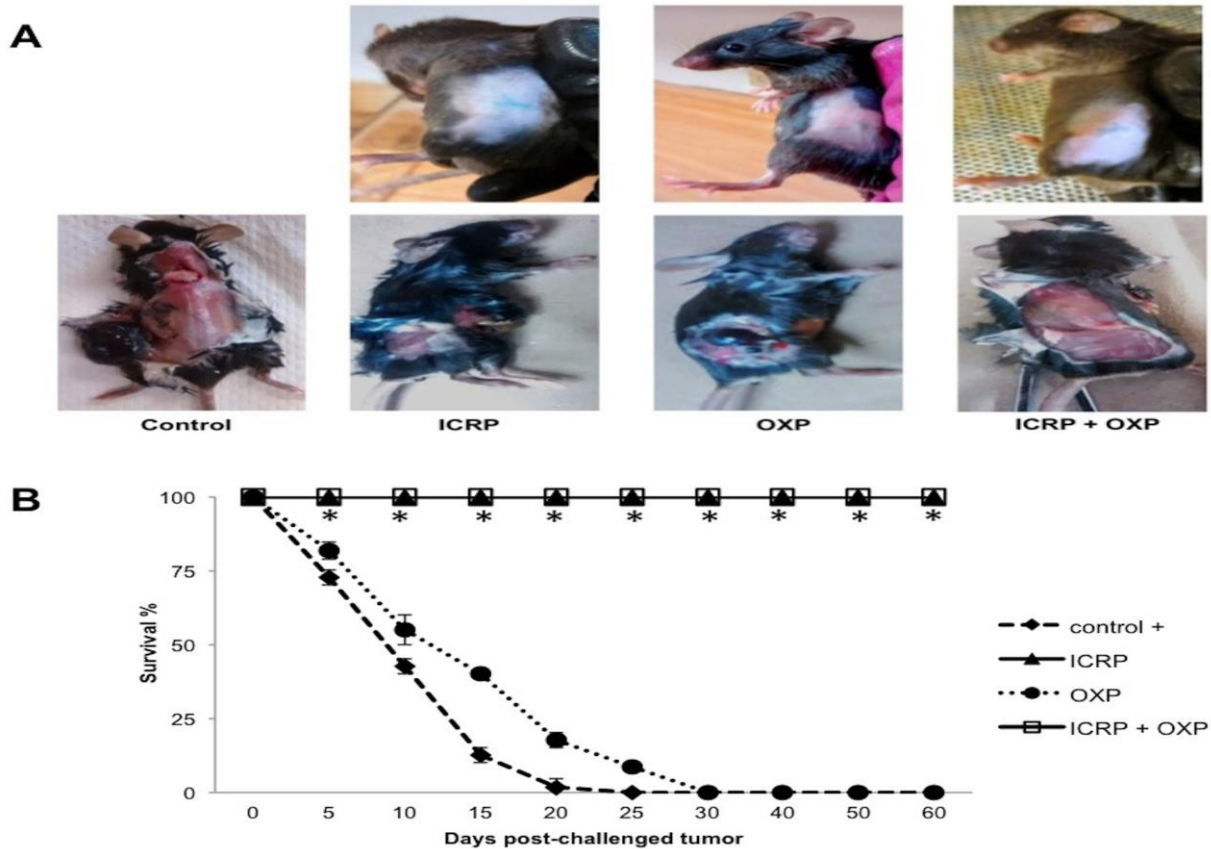
**Figura 14. Expresión y liberación de las proteínas HSP70, HSP90 y HMGB1 en respuesta a los tratamientos con ICRP, OXP e ICRP + OXP.** El Western blot fue realizado usando los sobrenadantes (A) y los lisados celulares (B) de las células B16F10 tratadas con ICRP (1 U/ml), OXP (800  $\mu$ M) e ICRP + OXP (1 U/ml + 800  $\mu$ M) a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas).  $\beta$ -actina fue usada como control endógeno.



**Figura 15. Liberación de HMGB1 por las células B16F10 después de los tratamientos.** Las células fueron tratadas a diferentes tiempos y posteriormente recolectadas, los sobrenadantes fueron separados. La concentración de HMGB1 fue analizada por ELISA en los sobrenadantes de las células B16F10 tratadas con ICRP, OXP e ICRP + OXP. Los resultados son triplicados de tres experimentos (media y desviación estándar). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA y la prueba de Dunnet. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$  comparado con el control.

### **7.5 Efecto *in vivo* de los DAMPs derivados de tumor en lisados celulares de la línea B16F10 tratadas con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP en la prevención del melanoma.**

Experimentos *in vitro* mostraron el efecto citotóxico y la inducción de DAMPs, característicos de la muerte inmunogénica inducidos por los tratamientos con ICRP, OXP, o la combinación de ICRP + OXP. Para evaluar la muerte inmunogénica *in vivo* y la inmunogenicidad de los tratamientos, se desarrolló un experimento antitumoral con vacunación. Los lisados de células B16F10 derivados de los tratamientos previos con ICRP, OXP y la combinación de ICRP + OXP fueron administrados a los ratones antes de la inoculación de las células viables. Los resultados demostraron que el ICRP y la combinación de ICRP + OXP previnieron el desarrollo de melanoma. El tratamiento con OXP no protegió del desarrollo del melanoma, pero retrasó la aparición del tumor (30 días) en comparación con el grupo control el cual murió en promedio a los 20 días post inoculación del tumor. El tumor fue palpable al día 10 (**Figura 16A y 16B**).



**Figura 16. Efecto de los lisados tumorales ricos en DAMPs derivados del tratamiento de la línea celular B16F10 tratada con ICRP, OXP e ICRP + OXP en la prevención de melanoma.** Los lisados tumorales ricos en DAMPs derivados de los tratamientos de la línea celular B16F10 fueron inoculados de forma subcutánea en el flanco izquierdo de los ratones C57BL/6. Después de 7 días, los ratones fueron retados con células viables B16F10 inoculadas en el flanco derecho. (A) Imágenes representativas de los ratones tratados. (B) El desarrollo de melanoma fue evaluado. El análisis estadístico fue realizado por medio de ANOVA y la prueba de Dunnett.  $*P < 0.05$  comparado con el control.

## 8. DISCUSIÓN

Durante la última década, resurge el interés en el descubrimiento de antiguos y novedosos agentes terapéuticos con la capacidad de generar inmunidad anticáncer. La muerte inmunogénica generada por los tratamientos antitumorales es uno de los mecanismos a través de los cuales se puede generar una respuesta inmune específica del tumor (Zitvogel L et al., 2010). El presente estudio tuvo como objetivo determinar el potencial del IMMUNEPOTENT CRP usado en combinación con quimioterapia para incrementar la citotoxicidad contra las células tumorales e inducir moléculas relacionadas con la muerte inmunogénica, debido a que novedosos regímenes terapéuticos se están enfocando en utilizar estrategias terapéuticas combinatorias para activar este mecanismo.

Los resultados muestran que el IMMUNEPOTENT CRP fue citotóxico en las células de melanoma murino B16F10, y la combinación con oxaliplatino incrementó la muerte celular, resultados similares acerca de los efectos citotóxicos del IMMUNEPOTENT CRP sobre células tumorales han sido reportados por nuestro grupo de investigación (Franco Molina et al., 2010). Es importante destacar que en el presente estudio los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP o la combinación de IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino, indujeron la liberación y exposición de moléculas inmunogénicas (calreticulina, ATP, HSP70, HSP90, y HMGB1) *in vitro*. La presencia de estas moléculas, cuando son inducidas por tratamiento con antraciclinas en células de cáncer de colon CT26, melanoma B16F10 o fibrosarcoma MCA205 se han relacionado con la prevención del desarrollo tumoral (Cao C et al., 2009; Tongu M et al., 2009; Perez C et al., 2009). La proteína HMGB1 no fue detectada en los sobrenadantes de las células tratadas por la técnica de Western blot, probablemente por la sensibilidad del anticuerpo empleado; sin embargo, por medio de un kit de ELISA de mayor sensibilidad, la liberación de la proteína HMGB1 fue detectada. Resultados similares fueron encontrados en estudios de la proteína en humanos (Nowak et al., 2012), donde concentraciones de 150 ng/ml fueron detectadas por Western blot y ELISA, pero



menores concentraciones (1 ó 15 ng/ml) no fueron detectadas por Western blot, solamente por la técnica de ELISA.

Se ha reportado que el tratamiento con oxaliplatino induce la liberación de DAMPs (calreticulina, ATP, HMGB1 e IFN tipo 1) en diferentes líneas celulares de cáncer, y es considerado un inductor de muerte inmunogénica (Tesniere A et al., 2010; Bezu L et al., 2015). Estudios relacionados con el efecto del oxaliplatino como inductor de muerte inmunogénica en la línea celular B16F10, la cual es pobremente inmunogénica, no se han llevado a cabo. Nuestros resultados indican que el oxaliplatino induce en la línea celular B16F10 la exposición de calreticulina, la liberación de ATP y HMGB1, pero no indujo la liberación de HSP70 y HSP90. Se ha demostrado que compuestos con la capacidad de inducir la liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1 previenen el desarrollo tumoral (Dudek A et al., 2013; Bezu L et al., 2015; Garg A et al., 2015; Pol J et al., 2015; Inoue H et al., 2014).

Por otra parte, Chen y colaboradores reportaron que el tratamiento con el extracto de planta llamado Shikonin en las células B16F10 indujo la exposición de calreticulina y la liberación de HSP70, HSP90, GRP78 y HMGB1 *in vitro*, permitiendo la maduración de células dendríticas; el lisado celular tumoral tratado con shikonin se puso en contacto con células dendríticas, las cuales posteriormente se utilizaron como vacuna e indujeron retraso en el desarrollo tumoral e incremento la sobrevivencia de los ratones (Chen H et al., 2012). Resultados similares fueron obtenidos por nuestro grupo de investigación cuando se utilizó lisado tumoral de células B16F10 tratadas con IMMUNEPOTENT CRP o con IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino y fueron administradas a los ratones, previniendo el desarrollo de melanoma cuando se retaron con células viables B16F10; corroborando el potencial de los tratamientos de inducir muerte inmunogénica.

Se ha reportado que el oxaliplatino induce muerte inmunogénica en líneas celulares de cáncer de colon en humano y murino previniendo la formación de tumores (Obeid M et al., 2007; Tesniere A et al., 2010), contrario a lo encontrado por nosotros; sugiriendo que probablemente es necesario que el oxaliplatino induzca la liberación adicional de HSP70

y HSP90 en las células B16F10, para generar inmunogenicidad, como los tratamientos arriba mencionados. Porque dependiendo del inductor de muerte, las células tumorales pueden exponer o liberar factores que afectan su reconocimiento (CRT), maduración (HSP90) o la presentación de antígenos a las células dendríticas (HMGB1) (Zitvogel L et al., 2008). La inducción de muerte inmunogénica por antraciclinas, oxaliplatino, o por radiación ionizante, sugiere que adicionalmente a la presencia de DAMPs, también es importante la expresión de los receptores de reconocimiento sobre las células presentadoras de antígenos para una terapia exitosa (Zitvogel L et al., 2008).

Se ha demostrado que al tratar células tumorales *in vitro* o a pacientes con quimioterapéuticos como el oxaliplatino o doxorubicina (Dudek A et al., 2013; Bezu L et al., 2015; Garg A et al., 2015; Pol J et al., 2015; Inoue H et al., 2014) u otros procedimientos físicos (Skitzki J et al., 2009; Shi H et al., 2006; Chiang C et al., 2006; Chiang C et al., 2008), pueden inducir una respuesta inmune específica, por los antígenos tumorales que son expuestos a las células dendríticas en conjunto con los DAMPs , activando células T vírgenes que atacan el tumor (Chiang C et al., 2015).

Nosotros corroboramos que el IMMUNEPOTENT CRP, que es usado en México como adyuvante del sistema inmune puede ser usado en combinación con quimioterapia y probablemente como un agente potencializador para incrementar la acción de las drogas antitumorales, induciendo muerte inmunogénica para eliminar el cáncer residual en pacientes y generar vacunas de células tumorales. Además, se demostró la capacidad del IMMUNEPOTENT CRP, de inducir al oxaliplatino en inmunogénico considerando que puede mejorar el perfil clínico en los regímenes terapéuticos convencionales.

## 9. CONCLUSIONES

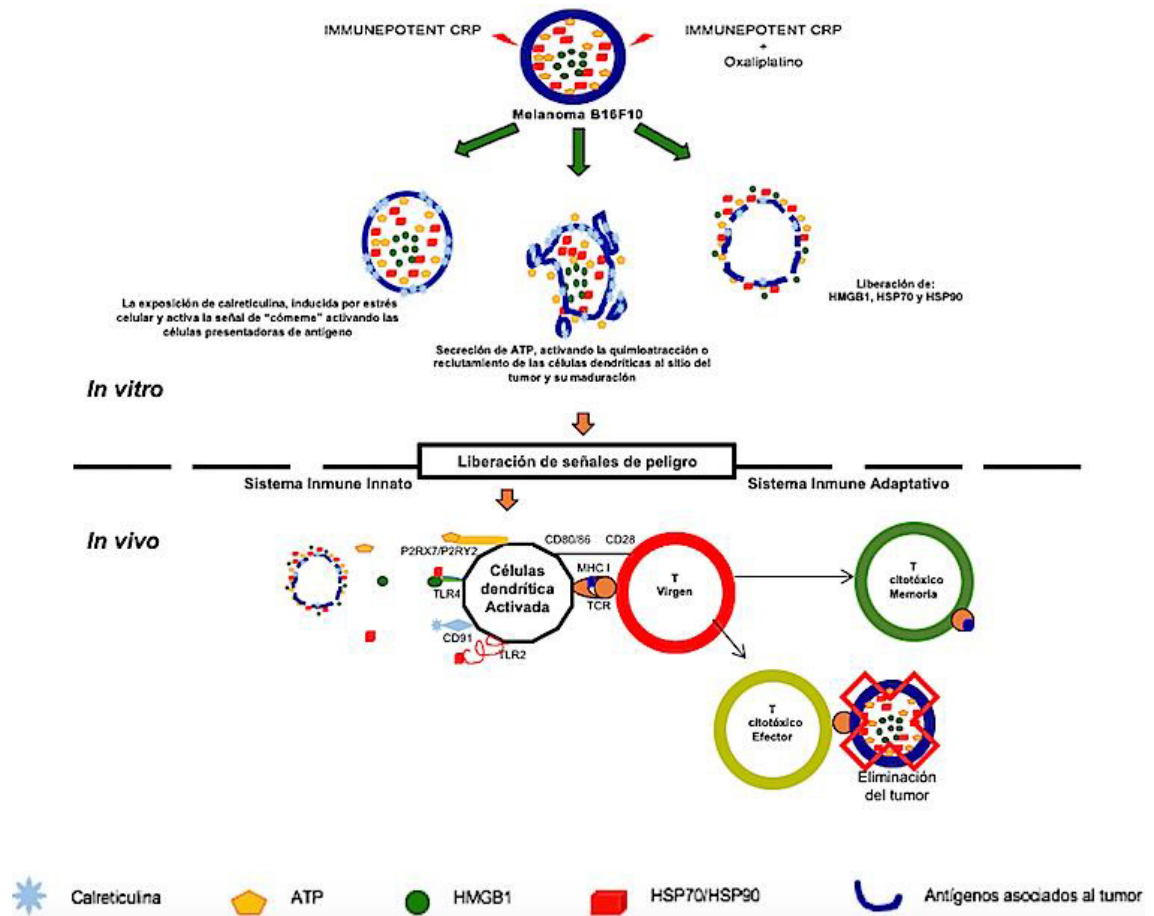
- El tratamiento individual con IMMUNEPOTENT CRP y oxaliplatino tiene un efecto citotóxico dependiente de dosis y tiempo sobre la línea celular de melanoma murino B16F10.
- La combinación de IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino induce un mayor porcentaje de muerte y desde tiempos tempranos sobre la línea celular B16F10 en comparación de los tratamientos individuales.
- El tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP induce la exposición de calreticulina por las células de melanoma murino B16F10, sin embargo, el tratamiento combinado de IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino indujo una mayor exposición desde tiempos tempranos (6h).
- El tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP y oxaliplatino inducen la liberación de ATP, HMGB1, HSP70 y HSP90, sin embargo, la combinación de ICRP+ OXP indujo mayor liberación de estos DAMPs desde tiempos tempranos.
- La administración *in vivo* del lisado tumoral tratado con ICRP y la combinación de ICRP+OXP, previo a la inoculación de células B16F10 viables, previno la aparición de melanoma en ratones C57BL/6. Sin embargo, la administración de lisado tumoral tratado con oxaliplatino, no previno la aparición del tumor.

## 10.PERSPECTIVAS

- Determinar la capacidad de reducción tumoral *in vivo* de los lisados tumorales de la línea B16F10 previamente tratados con IMMUNEPOTENT CRP, oxaliplatino y la combinación de IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino.
- Determinar la respuesta inmunológica *in vivo* (activación de respuesta celular de linfocitos T específica del tumor) a la administración de los lisados tumorales de la línea B16F10 previamente tratados con IMMUNEPOTENT CRP, oxaliplatino y la combinación de IMMUNEPOTENT CRP + oxaliplatino en la disminución o erradicación del melanoma.

## **Mecanismo hipotético de la muerte inmunogénica inducida por el IMMUNEPOTENT CRP y su combinación con oxaliplatino en melanoma.**

El ICRP induce muerte de tipo inmunogénica en la célula tumoral B16F10 probablemente mediante mecanismos que producen estrés a nivel de retículo endoplásmico, provocando traslocación de calreticulina a la superficie de la membrana desde horas tempranas siendo la primera señal “cómeme” que emite la célula, casi al mismo tiempo que la exposición de fosfatidilserina. Posteriormente al inducirse daño celular y permeabilidad de la membrana se produce la liberación de ATP, de proteínas de choque térmico HSP70 y HSP90, además de la liberación de la proteína HMGB1. Estas moléculas actúan como adyuvantes potenciando la capacidad antigénica de los antígenos asociados a tumor para ser reconocidos por células presentadoras de antígeno, induciendo su maduración y activación de una respuesta celular de linfocitos T específicos del tumor los cuales se encargarían de la erradicación del cáncer; además ante esta respuesta pueden generarse células de memoria que prevendrían la recidiva del tumor (**Figura 17**).



**Figura 17. Mecanismo hipotético de la muerte inmunogénica inducida por el IMMUNEPOTENT CRP y su combinación con oxaliplatino en melanoma.** El tratamiento con ICRP ó ICRP+OXP en la línea celular B16F10 inducen exposición de calreticulina y liberación de HSP70, HSP90 y HMGB1 desde tiempos tempranos, con mayor efecto en la inducción de alarminas en el tratamiento combinado, generando una respuesta de células T específica de antígenos que conduce a la eliminación del tumor.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. American Cancer Society, Inc (2016). Disponible en: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/cancerdepieltipomelanoma/guiadetallada/cancer-de-piel-tipo-melanoma-what-is-what-is-melanoma>
2. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Criollo A, Ortiz C, Lidereau R, Mariette C, Chaput N, Mira J.-P, Delaloge S, André F, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. 2007b. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunological Reviews*. 220: 47–59.
3. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri M.C, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat F.J, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J.-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. 2007a. Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 13: 1050–1059.
4. Bezu L, Gomes-da-Silva L.C, Dewitte H, Breckpot K, Fucikova J, Spisek R, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. 2015. Combinatorial Strategies for the Induction of Immunogenic Cell Death. *Front. Immunol*. 6.
5. Cao C, Han Y, Ren Y, Wang Y. 2009. Mitoxantrone-Mediated Apoptotic B16-F1 Cells Induce Specific Anti-tumor Immune Response. *Cell Mol Immunol* 6: 469–475.
6. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2015). [Online]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/international/statistics.htm>

7. Chen H.-M, Wang P.-H, Chen S.-S, Wen C.-C, Chen Y.-H, Yang W.-C, Yang N.-S. 2012. Shikonin induces immunogenic cell death in tumor cells and enhances dendritic cell-based cancer vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 61: 1989–2002.
8. Chiang C.L.-L, Coukos G, Kandalaft L.E. 2015. Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We? *Vaccines.* 3: 344–372.
9. Chiang C.L.-L, Ledermann J.A, Aitkens E, Benjamin E, Katz D.R, Chain B.M. 2008. Oxidation of Ovarian Epithelial Cancer Cells by Hypochlorous Acid Enhances Immunogenicity and Stimulates T Cells that Recognize Autologous Primary Tumor. *Clin Cancer Res.* 14: 4898–4907.
10. Chiang C.L.-L, Ledermann J.A, Rad A.N, Katz D.R, Chain B.M. 2006. Hypochlorous acid enhances immunogenicity and uptake of allogeneic ovarian tumor cells by dendritic cells to cross-prime tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 55: 1384–1395.
11. Coronado-Cerda E.E, Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Prado-Garcia AH, Rivera-Morales L.G, Zapata-Benavides P, Rodriguez-Salazar MC, A.D Caballero-Hernandez, Tamez-Guerra R.S, Rodriguez-Padilla C. 2016. In Vivo Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research.* 2016. e6942321.
12. Dudek A.M, Garg A.D, Krysko D.V, De Ruyscher D, Agostinis P. 2013. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 24: 319–333.



13. Dummer R., Hauschild A, Guggenheim M, Jost L, Pentheroudakis G, Group O. behalf of the E.G.W. 2010. Melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 21: 194–197.
14. Ferrari D, McNamee E.N, Idzko M, Gambari R, Eltzschig H.K. 2016. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends in Immunology*. 37: 399–411.
15. Fong Z.V, Tanabe K.K. 2014. Comparison of melanoma guidelines in the U.S.A., Canada, Europe, Australia and New Zealand: a critical appraisal and comprehensive review. *Br. J. Dermatol*. 170: 20–30.
16. Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2006. In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract (bDLE) in cancer cells. *Cytotherapy*. 8: 408–414.
17. Franco-Molina M, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García M, Castillo-Tello P, Fuente A.G. de la Mendoza R, Garza R, Támez-Guerra R, Rodríguez-Padilla C. 2008. IMMUNEPOTENT CRP (bovine dialyzable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non-small cell lung cancer patients. *Cytotherapy*. 10: 490–496.
18. Franco-Molina M.A, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando C.E, Zamora-Avila D, Rivera-Morales L.G, Miranda-Hernández D.F, Sierra-Rivera C.A, Vera-García M.E, Tamez-Guerra R.S, Rodríguez-Padilla C. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 32: 637–646.
19. Garg A.D, Galluzzi L, Apetoh L, Baert T, Birge R.B, Bravo-San Pedro J.M, Breckpot K, Brough D, Chaurio R, Cirone M, Coosemans A, Coulie P.G, De

Ruyscher D, Dini L, de Witte P, Dudek-Peric A.M, Faggioni A, Fucikova J, Gaip U.S, Golab J, Gougeon M.-L, Hamblin M.R, Hemminki A, Herrmann M, Hodge J.W, Kepp O, Kroemer G, Krysko D.V, Land W.G, Madeo F, Manfredi A.A, Mattarollo S.R, Maueroeder C, Merendino N, Multhoff G, Pabst T, Ricci J.-E, Riganti C, Romano E, Rufo N, Smyth M.J, Sonnemann J, Spisek R, Stagg J, Vacchelli E, Vandenabeele P, Vandenberg L, Van den Eynde B.J, Van Gool S, Velotti F, Zitvogel L, Agostinis P. 2015. Molecular and Translational Classifications of DAMPs in Immunogenic Cell Death. *Front Immunol.* 6.

20. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini J.-L, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin N.M, Haynes N.M, Smyth M.J, Kroemer G, Zitvogel L. 2009. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 15: 1170–1178.
21. Hato S.V, Khong A, Vries I.J.M. de Lesterhuis W.J. 2014. Molecular Pathways: The Immunogenic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutics. *Clin Cancer Res.* 20: 2831–2837.
22. Inoue H, Tani K. 2014. Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments. *Cell Death Differ.* 21: 39–49.
23. Instituto Nacional del Cancer (NIH). (2016). [Online]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/piel/paciente/tratamiento-melanoma-pdq>
24. Jurado-Santa Cruz F, Medina-Bojorquez A, Gutierrez-Vidrio RM, Ruiz-Rosillo JM. 2011. Prevalencia del cáncer de piel. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 3: 253-258.

25. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan X, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar T.R, Zeh III H.J, Lotze M.T, Tang D. 2014. HMGB1 in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine, Special IssueI: HMGB1 in Health & Disease*. 40: 1–116.
26. Kepp O, Galluzzi L, Giordanetto F, Tesniere A, Vitale I, Martins I, Schlemmer F, Adjemian S, Zitvogel L, Kroemer G. 2009b. Disruption of the PP1/GADD34 complex induces calreticulin exposure. *Cell Cycle*. 8: 3971–3977.
27. Kepp O, Tesniere A, Schlemmer F, Michaud M, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. 2009a. Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis*. 14: 364–375.
28. Kono H, Rock K.L. 2008. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*. 8: 279–289.
29. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. 2013. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annual Review of Immunology*. 31: 51–72.
30. Krysko D.V, Garg A.D, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 12: 860–875.
31. Matzinger P. 1994. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annual Review of Immunology*. 12: 991–1045.
32. Matzinger P. 2002. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* 296: 301–305.
33. Mehmood R.K. 2014. Review of cisplatin and oxaliplatin in current immunogenic and monoclonal antibody treatments. *Oncology Reviews*. 8.

34. Melcher, A., Todryk, S., Hardwick, N., Ford, M., Jacobson, M., Vile, R.G., 1998. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med* 4, 581–587.
35. Ménoret A, Patry Y, Burg C, Pendu J.L. 1995. Co-segregation of tumor immunogenicity with expression of inducible but not constitutive hsp70 in rat colon carcinomas. *J Immunol.* 155: 740–747.
36. Michalak M, Corbett E.F, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal.* 344: 281–292.
37. Michaud M, Martins I, Sukkurwala A.Q, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, Virgilio F di, Zitvogel L, Kroemer G. 2011. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science.* 334: 1573–1577.
38. National Library of Medicine. Pub Med Health. (2016). [Online]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0015630/>
39. Neckers L. 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends in Molecular Medicine* 8: S55–S61.
40. Nowak P, Abdurahman S, Lindkvist A, Troseid M, Nnerborg A. 2012. Impact of HMGB1/TLR Ligand Complexes on HIV-1 Replication: Possible Role for Flagellin during HIV-1 Infection. *International Journal of Microbiology.* e263836.
41. Nylandsted, J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jäättelä M. 2000. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 7871–7876.

42. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of  $\gamma$ -irradiation and UVC light-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 14: 1848–1850.
43. Obeid M, Panaretakis T, Tesniere A, Joza N, Tufi R, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Leveraging the Immune System during Chemotherapy: Moving Calreticulin to the Cell Surface Converts Apoptotic Death from “Silent” to Immunogenic. *Cancer Res.* 67: 7941–7944.
44. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia G.M, Apetoh L, Perfettini J.-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 13: 54–61.
45. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, Fimia G.M, Kepp O, Piacentini M, Froehlich K.-U, van Endert P, Zitvogel L, Madeo F, Kroemer G. 2008. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ* 15: 1499–1509.
46. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund A.-C, Chapman D.C, Durchschlag M, Joza N, Pierron G, Endert P. van, Yuan J, Zitvogel L, Madeo F, Williams D.B, Kroemer G. 2009. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO Journal.* 28: 578–590.
47. Perez C.A, Fu A, Onishko H, Hallahan D.E, Geng L. 2009. Radiation induces an antitumour immune response to mouse melanoma. *International Journal of Radiation Biology.* 85: 1126–1136.
48. Pol, J., Vacchelli, E., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., Sautès-Fridman, C., Fucikova, J., Galon, J., Spisek, R., Tartour, E., Zitvogel, L.,

- Kroemer, G., Galluzzi, L. 2015. Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *OncoImmunology*. 4: e1008866.
49. Secretaria de Salud. Cáncer de piel duplica su incidencia cada 10 años (2015). [Online]. Disponible en: <http://www.gob.mx/salud/prensa/cancer-de-piel-duplica-su-incidencia-cada-10-anos>
50. Seigneuric R, Mjahed H, Gobbo J, Joly A.-L, Berthenet K, Shirley S, Garrido C. 2011. Heat shock proteins as danger signals for cancer detection. *Front Oncol*. 1: 37.
51. Shi H, Cao T, Connolly J.E, Monnet L, Bennett L, Chapel S, Bagnis C, Mannoni P, Davoust J, Palucka A.K, Banchereau J. 2006. Hyperthermia Enhances CTL Cross-Priming. *J Immunol*. 176: 2134–2141.
52. Skitzki J.J, Repasky E.A, Evans S.S. 2009. Hyperthermia as an immunotherapy strategy for cancer. *Curr Opin Investig Drugs*. 10: 550–558.
53. Sociedad Mexicana de Oncología, A.C. (2015). [Online]. Disponible en: <http://www.smeo.org.mx/index.php/informacion-para-cancer-de-piel>
54. Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-Like Receptors. *Annual Review of Immunology*. 21: 335–376.
55. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, Schlemmer F, Zitvogel L, Kroemer G. 2008. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol*. 20: 504–511.
56. Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, Kroemer G. 2007. Molecular characteristics of immunogenic cancer cell death. *Cell Death Differ*. 15: 3–12.

57. Tongu M, Harashima N, Yamada T, Harada T, Harada M. 2010. Immunogenic chemotherapy with cyclophosphamide and doxorubicin against established murine carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 59: 769–777.
58. Wells A.D, Malkovsky M. 2000. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunology Today.* 21: 129–132.
59. World Health Organization. (2015). [Online]. Disponible en: (<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>)
60. World Health Organization. (2015). [Online]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
61. Yamazaki T, Hannani D, Poirier-Colame V, Ladoire S, Locher C, Sistigu A, Prada N, Adjemian S, Catani J.P, Freudenberg M, Galanos C, André F, Kroemer G, Zitvogel L. 2014. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ.* 21: 69–78.
62. Yang G, Zhang S, Zhang Y, Zhou Q, Peng S, Zhang T, Yang C, Zhu Z, Zhang F. 2014. The inhibitory effects of extracellular ATP on the growth of nasopharyngeal carcinoma cells via P2Y2 receptor and osteopontin. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 33: 53.
63. Yang H, Antoine D.J, Andersson U, Tracey K.J. 2013. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol.* 93: 865–873.
64. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. 2008. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* 8: 59–73.

65. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. 2010. Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. *Cell*. 140: 798–804.
66. Zitvogel L, Kepp O, Senovilla L, Menger L, Chaput N, Kroemer G. 2010. Immunogenic Tumor Cell Death for Optimal Anticancer Therapy: The Calreticulin Exposure Pathway. *Clin Cancer Res*. 16: 3100–3104.



## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

María del Carmen Rodríguez Salazar

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Tesis:** Inducción de muerte inmunogénica mediante el tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP en un modelo de melanoma murino B16F10.

**Campo de estudios:** Ciencias de la Salud

**Datos personales:** Nacida en Reynosa, Tamaulipas, el 26 de Julio de 1987, hija de Ma. del Carmen Salazar Hurtado

**Educación:** Egresada de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2009.

Egresada de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán, grado obtenido de Maestro en Análisis Clínicos en 2012.

**Experiencia profesional:** Responsable del Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán del 2008-2013.

Profesor de horario libre en la Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa Aztlán del 2010-2013