



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**

**Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV como nuevas señales de peligro (DAMPs) y su rol en la maduración *in vitro* de células dendríticas de uso terapéutico**

**Francisca Dayane Lavín Flores**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Fermín González B.**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mauricio Budini**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 11130607  
Santiago – Chile  
2016**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA CONSERVADORA**

**Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV como nuevas señales de peligro (DAMPs) y  
su rol en la maduración *in vitro* de células dendríticas de uso terapéutico**

**Francisca Dayane Lavín Flores**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN  
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Fermín González B.**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mauricio Budini**

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 11130607  
Santiago - Chile  
2016**

## **AGRADECIMIENTOS**

En principio quisiera agradecer a todas las personas involucradas en el proceso de realización de esta tesis, comenzando por mi tutor Dr. Fermín González por confiar en mis capacidades para desarrollar un trabajo que va mucho más allá de las competencias habituales que se generan en esta carrera, a mi cotutor Dr. Mauricio Budini por su disposición y aporte constante, a Camila por todas sus enseñanzas y paciencia, a mi compañera Sheila quien me acompañó en este arduo trabajo de desarrollar nuevas habilidades en áreas desconocidas para los dos, a Marjorie por su buena voluntad y compromiso con este proyecto, así como también a todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología Antitumoral comandado por el Dr. Flavio Salazar y Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer de la Dra. Mercedes López, por abrir las puertas de sus respectivos laboratorios y permitirme desarrollar esta tesis.

Agradecer a mi familia por su inagotable apoyo y amor durante toda mi vida, los valores que me inculcaron que se reflejan en parte, en el logro de llegar al final de mi formación.

Agradecer por los grandes amigos que obtuve durante esta carrera y que me han acompañado por estos 7 años de carrera.

Hacer una mención especial a mi esposo y mis suegros por su apoyo en estos últimos meses, por su contención en estos tiempos de mucha expectación y nerviosismo para mí.

Y finalmente, el más importante, agradecer a Dios por sostenerme en mis momentos de ansiedad, por haber puesto en mi camino a cada persona precisa para hacer más amena esta difícil pero no menos enriquecedora experiencia de realizar una tesis experimental.

## INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	11
Cáncer como problema de salud.....	11
Cáncer y sistema inmune.....	12
Células dendríticas: origen, fenotipo y plasticidad funcional .....	12
Células dendríticas y presentación antigénica .....	15
Señales de peligro: Rol de patrones moleculares asociados a daño endógenos. .....	16
Inmunoterapia Antitumoral .....	17
Inmunoterapia basada en TAPCells.....	18
Análisis Proteómico del lisado TRIMEL.....	18
Proteínas candidatas: Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV .....	19
Propuesta de investigación .....	21
HIPÓTESIS.....	23
OBJETIVO GENERAL.....	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Separación de PBMC a partir de muestras de sangre periférica.....	24
Lisado celular de líneas tumorales TRIMEL.....	25
Proteínas candidatas.....	25
Estimulación con Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV.....	26
Estimulación con TRIMEL sin <i>heat shock</i> enriquecido en proteínas candidatas	27
Citometría de flujo .....	28
Análisis estadístico.....	28
RESULTADOS.....	29
Generación células dendríticas <i>in vitro</i> .....	29
Haptoglobina aumenta la expresión <i>in vitro</i> CD80, CD83, CD86 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos .....	31
EIF4e incrementa la expresión <i>in vitro</i> de MHC-I, CD80, CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos .....	33
TRIMEL sin <i>heat shock</i> enriquecido con Haptoglobina incrementa la expresión <i>in</i> <i>vitro</i> de MHC-I, CD80, CD83, CD86 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos..	35
TRIMEL sin <i>heat shock</i> enriquecido con EIF4e induce la expresión <i>in vitro</i> de	

CD80, CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos .....	38
TRIMEL sin <i>heat shock</i> enriquecido con Anexina IV aumenta la expresión <i>in vitro</i> de CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos .....	40
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIONES .....	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS .....	58
I. Figuras suplementarias.....	58
II. Consentimiento informado .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANX4: Anexina IV

APC: Célula presentadora de antígeno

CCR: Receptor de quimioquinas

CD11c: Integrina  $\alpha x$

CD4: Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-II

CD40: Integrina de membrana, molécula de activación de linfocitos T

CD54: Molécula de adhesión intercelular-1

CD58: Molécula de adhesión asociada a linfocitos

CD8: Correceptor de señalización y adhesión de linfocitos T restringido a MHC-I

CD80: Molécula coestimuladora B7.1, ligando de CD28

CD83: Molécula de adhesión asociada a maduración en células dendríticas

CD86: Molécula coestimuladora B7.2, ligando de CD28

CpG: Regiones del DNA altamente ricas en citosina y guanina

CRT: Calreticulina

DAMPs: Patrones moleculares asociado a daño (del Inglés *Damage Associated Molecular Patterns*)

DC: Célula dendrítica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EIF4e: *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

FBS: Suero fetal bovino

GM-CSF: Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos

HLA-ABC: Antígeno humano de leucocitos (MHC-I)

HLA-DR: Antígeno humano de leucocitos (MHC-II)

HMGB1: Proteína de alta movilidad del grupo de caja 1

HP: Haptoglobina

HSP: Proteína de *shock* térmico

ICD: Muerte celular inmunogénica

iDC: Célula dendrítica inmadura (no estimulada)

IL-10: Interleuquina 10

IL-12: Interleuquina 12

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

LB: Linfocito B

LIAT: Laboratorio de Inmunología Antitumoral

LT CD4<sup>+</sup>: Linfocitos T *helper* CD4

LT CD8<sup>+</sup>: Linfocitos T *helper* CD8

LT: Linfocito T

LTC: Linfocitos T citotóxicos

mDC: Célula dendrítica madura

MFI: Intensidad media de fluorescencia

MHC: Complejo de histocompatibilidad mayor

MM: Melanoma maligno

NK: Células *natural killer*

NKT: Células *natural killer* T

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer salino fosfato

RNA: Ácido ribonucleico

SEM: Error estándar de la media

TAA: Antígenos asociados a tumor

TAPCells: Células presentadoras de antígenos tumorales

Th1: Linfocitos T *helper* tipo 1

Th2: Linfocitos T *helper* tipo 2

TLR: Receptor tipo *Toll*

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

TRIMEL sin HS: TRIMEL sin *heat shock*

TRIMEL: Lisado celular derivado de tres líneas tumorales de melanoma alogénicas

## RESUMEN

Las vacunas basadas en células dendríticas (DCs) han surgido como una herramienta prometedora en la inmunoterapia contra el cáncer debido a su capacidad para estimular la respuesta inmune antitumoral. Recientemente, se ha mostrado que DCs estimuladas con un lisado celular derivado de tres líneas tumorales de melanoma alogénicas (TRIMEL) sometidas a *heat shock*, inducen una potente respuesta inmunológica en pacientes con melanoma. El lisado TRIMEL funciona tanto como una fuente de antígenos asociados a tumor (TAA), así como induciendo la maduración de las DCs mediante patrones moleculares asociados a daño, del inglés *damage-associated molecular patterns molecules* (DAMPs). Dada las características de este lisado, se identificó el perfil proteómico de TRIMEL con y sin *heat shock* (HS), dando como resultado 71 proteínas diferencialmente sobreexpresadas por efecto del HS. Luego de aplicar criterios adicionales, se seleccionaron las proteínas Haptoglobina (HP), EIF4e y Anexina IV (ANX4), como candidatas a DAMPs desconocidos que puedan explicar, al menos en parte, la capacidad del lisado TRIMEL en la activación de DCs. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estas proteínas sobre distintos marcadores de maduración en DCs humanas.

Se generaron DCs a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de ocho donantes sanos. HP, EIF4e y ANX4 se utilizaron como estímulo de maduración por si solas o en combinación con TRIMEL sin HS. Mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de diversas moléculas de superficie asociadas a DCs maduras: MHC-I, MHC-II, CD80, CD83, CD86 y CCR-7.

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que al estimular DCs con EIF4e y HP se produce un incremento significativo en la expresión de los marcadores de superficie MHC-I, CD80, CD83, CD86 y CCR7, sugiriendo que estas proteínas podrían actuar como DAMPs de manera independiente. Sin embargo, es necesario evaluar otros parámetros de funcionalidad celular como el perfil de citoquinas secretado por las DCs estimuladas, capacidad

migratoria y la interacción con linfocitos T (LT), los cuales podrían demostrar de forma más concluyente la actividad de estas proteínas como DAMPs.

## INTRODUCCIÓN

### **Cáncer como problema de salud**

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, siendo un problema epidemiológico sin resolver y en crecimiento, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En Chile, este grupo de enfermedades es la segunda causa de muerte en la población, con más de 24.000 muertes durante el año 2013 (DEIS-Minsal, 2013), generando además un gasto cercano a los 2.100 millones de dólares (1% PIB) asociados a su cuidado y tratamiento (Jiménez & cols., 2015).

Si bien los tratamientos basadas en quimio y radioterapia han mostrado mejoras significativas en un grupo selecto de cánceres como los hematológicos, su eficacia se encuentra limitada en tumores sólidos como el melanoma maligno (MM), cánceres de cabeza y cuello, y cáncer prostático (Nieboer & cols., 2005), entre otros.

Adicionalmente, es importante mencionar que estas terapias, generan una serie de complicaciones dado que su mecanismo de acción se centra solo en células en división y de forma inespecífica, esto se refleja en efectos secundarios como mucositis, alopecia, osteorradionecrosis y cardiotoxicidad (Sonis, 2009; Benasso, 2013; Sridharan & cols., 2013; Lipshultz & cols., 2014). Por otro lado, es muy frecuente el desarrollo de resistencia a los fármacos quimioterapéuticos por parte de las células neoplásicas (Nichols & Han Bae, 2012). Estos efectos no deseados hacen necesario el desarrollo de enfoques terapéuticos nuevos, mejor tolerados, de menor costo y más efectivos que, particularmente, puedan ayudar a pacientes con enfermedades metastásicas avanzadas. Una de estas innovadoras estrategias es la inmunoterapia, que consiste en la modulación y estimulación del sistema inmune del propio paciente contra las células neoplásicas.

## **Cáncer y sistema inmune**

Producto del fenómeno de inmunovigilancia antitumoral, durante la transformación maligna inicial de las células, el sistema inmune ejerce una fuerte presión selectiva sobre las nuevas células neoplásicas transformadas (Burnet, 1957; Zigler & cols., 2013). En ese contexto, se ha descrito que la mayoría de las lesiones neoplásicas iniciales, formadas por células tumorales inmunosusceptibles, serán eliminadas por el sistema inmune antes de que pueda formar una masa tumoral clínicamente relevante (Krysko, 2012). A pesar de ello, en algunos casos los mecanismos inmunoelusivos desarrollados por las células malignas puede volverlas resistentes y evitar la inmunovigilancia antitumoral, proceso tras el cual las células malignas se multiplican iniciando el desarrollo de la masa tumoral (Zitvogel & cols., 2006; Garg & cols., 2010).

Consecuentemente, para generar una respuesta antitumoral efectiva y específica es fundamental una apropiada presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígenos (APC). En ese sentido, las DCs son consideradas APCs profesionales, ya que luego de encontrarse con un antígeno, pueden generar una respuesta inmune adaptativa contra patógenos y tumores de forma eficiente (Schuler & cols., 2003; Banchereau & cols., 2003; Schmitt & cols., 2009; Palucka & Banchereau, 2012). Esto se debe, principalmente, a sus habilidades para capturar, procesar y presentar antígenos de manera óptima a los linfocitos T en los linfonodos secundarios, formando una sinapsis inmunológica y, consecutivamente gatillando su activación, proliferación y migración a tejidos periféricos para realizar su función efectora (Sallusto & cols., 1998; Escobar & cols., 2005; Cheong & cols., 2010; Steinman & Idoyaga, 2010).

### **Células dendríticas: origen, fenotipo y plasticidad funcional**

Las DCs se originan a partir de células progenitoras de la médula ósea por medio de dos vías de diferenciación: la línea mieloide y linfoide (Dauer & cols., 2003).

Se ha demostrado que las DCs humanas pueden diferenciarse *in vitro* desde varias fuentes celulares, incluyendo médula ósea, sangre de cordón umbilical, y

células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante la utilización de una variedad de citoquinas y factores de activación como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interleuquina-4 (IL-4) e interleuquina-10 (IL-10) (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Lin & cols., 1998; Bonasio & Von Andrian, 2006; Aguirre, 2008). Estos factores se utilizan selectivamente dependiendo del perfil de DCs que se desee estudiar.

Respecto al fenotipo de las DCs, estas experimentan varios cambios durante el proceso de maduración reconociéndose tres estados: precursores de DCs, DCs inmaduras (iDCs) y DCs maduras (mDCs) (Vázquez & cols., 2012)(Tabla 1).

Los precursores de DCs migran desde la médula ósea y circulan por la sangre hasta lugares específicos del organismo donde maduran y actúan como centinelas del sistema inmune. Este tráfico hacia los tejidos periféricos está dirigido por la expresión de los receptores de quimioquinas tipo C-C, como CCR1, CCR5 y CCR6, y por moléculas de adhesión como el ligando de CD62P. (Robert & cols., 1999; Greaves & cols., 1997; Sozzani & cols., 1998).

En su estado inmaduro, las iDCs exponen receptores de quimioquinas como CCR1 y CCR3, cuyos ligandos se expresan en los endotelios activados y en células inflamatorias, promoviendo su migración hacia piel, bazo, hígado, pulmón, corazón, riñón y mucosas, constituyendo una red de DCs intersticiales en todos los órganos excepto en sistema nervioso central y testículo (Hart, 1997). La función principal de las iDCs es la captura antigénica, presentando un fenotipo que se caracteriza por una alta expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias, los cuales les permiten extravasarse a los tejidos inflamados (Banchereau & cols., 2000; Rossi & Young, 2005) y por una baja expresión de moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión, moléculas MHC así como de marcadores específicos de maduración.

Además de la captura de antígenos, las iDCs deben recibir las llamadas señales de peligro originadas por patógenos (PAMPs), o de inflamación o daño tisular (DAMPs) (Matzinger, 2002; Skoberne & cols., 2004) para incurrir en el proceso de maduración que les permitirá desplazarse a los órganos linfoides secundarios y estimular de forma eficiente los linfocitos T vírgenes.

Con la maduración, las mDCs adquieren una gran motilidad y pierden su capacidad de capturar antígenos al disminuir la expresión de receptores de fagocitosis y endocitosis. Las mDCs optimizan el procesamiento de antígenos aumentando la expresión de los componentes de la maquinaria enzimática responsable del proceso (Trombetta & cols., 2003; Chow & cols., 2002), y adquieren la capacidad de presentar antígenos y estimular a los linfocitos T tras el incremento en la expresión de moléculas del MHC (I y II) y de moléculas de adhesión y coestimulación (CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86). La mayoría de estos marcadores ya están presentes en las iDCs en bajos niveles; en particular CD83 esta aumentado principalmente en mDC sirviendo como marcador para distinguir el estado maduro. Algunas de estas moléculas están implicadas en la señalización bidireccional entre las DCs y los linfocitos T, modulando tanto la activación del linfocito como las funciones de la DC (Vázquez & cols., 2012). También durante la maduración, las DCs disminuyen la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR5, y aumentan la de CCR7 que es un receptor reconocido como crítico en la migración de DCs hacia los linfonodos (Sallusto & cols., 1998; Stein & cols., 2003).

	iDC	mDC
Función	Captación de antígenos	Presentación de antígenos a LT
MHC-I y MHC-II	+	+++
CD80/86	+	++++
CD83	-	++
CCR7	-	+

**Tabla 1. Comparación fenotípica de células dendríticas inmaduras (iDC ) y maduras (mDC).** (Modificado de Corado, 2005)

Finalmente, la gran plasticidad funcional de las DCs se observa en la capacidad de dirigir la respuesta inmune después del encuentro con un antígeno (Hart, 1997)

y la capacidad de establecer el vínculo entre el sistema inmune innato y el adaptativo (Hoebe & cols., 2004), además de su capacidad de interactuar con otros tipos de células del sistema inmune como las células *natural killer* (NK), linfocitos T células *natural killer T* (NKT) y linfocitos B (LB) (Vázquez & cols., 2012).

### **Células dendríticas y presentación antigénica**

Para que las DCs activen de forma eficaz a los LTs se necesitan varias señales consecutivas. Primero, LT CD4+ son activados por presentación antigénica vía MHC-II, mientras que los LT CD8+ realizan la presentación antigénica vía MHC I, lo que constituye la señal inicial. La segunda señal está constituida por la interacción de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 presentes en la mDC, con el receptor CD28 en la superficie del LT, para finalmente recibir una tercera señal constituida por las interleuquinas secretadas por las DCs. En caso de una coestimulación insuficiente los LT pueden volverse anérgicos o tolerogénicos.

La respuesta final de los LT depende de muchos factores, tales como la concentración del antígeno en la DC, la afinidad del receptor de linfocito T (TCR) por el complejo péptido-MHC, la duración de la interacción entre la DC y el LT, el fenotipo de la DC, y el estímulo que causó la maduración de la DC (Gett & cols., 2003). Por otro lado, la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T y su diferenciación a células de memoria y efectoras requiere la interacción con mDCs (Vázquez & cols., 2012).

Las DCs exhiben péptidos exógenos cargados en moléculas de MHC-I y presentan a LT CD8+ vírgenes, este es un tipo de presentación antigénica especial, llamada presentación cruzada (Melief, 2008). Este es el único modo natural relevante de presentación de antígenos asociados a tumores, siendo ésta la característica clave de las DCs maduras y activadas que integra la respuesta inmune adaptativa contra las células tumorales (Melief, 2003).

Esto explica el interés en el desarrollo de nuevas técnicas para obtener grandes números de DCs *in vitro* a partir de monocitos aislados (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) y la búsqueda de nuevas estrategias basadas en vacunas de DCs.

La eficacia de los protocolos de vacunación que utilizan DCs generadas *ex vivo* depende de varios factores, incluyendo el patrón de expresión y propiedades biológicas del receptor específico de la DC al que se dirige y, por otra parte, el estado de maduración o activación de esta. Así, el desarrollo de DCs maduras capaces de polarizar la respuesta inmune hacia perfiles Th1, Th2 o tolerogénicos, entre otros, está determinada por la adecuada interpretación, por parte de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), de las distintas señales del microambiente (Lin & cols., 1998).

### **Señales de peligro: Rol de patrones moleculares asociados a daño endógenos.**

Los DAMPs son factores endógenos secretados, liberados o expuestos en superficie por células apoptóticas, estresadas o dañadas, que pueden funcionar como adyuvante o señal de daño frente al sistema inmune (Krysko & cols., 2012). Estas señales consisten en un grupo heterogéneo de moléculas de distinta naturaleza que incluyen ATP, ácido úrico, proteínas de *shock* térmico (HSPs), ácidos nucleicos celulares (DNA y RNA), proteínas de asociación a cromatina (HMGB1) y proteínas con sitios de unión a calcio (proteínas de la familia S100), entre otros. Los DAMPs son reconocidos por casi todos los tipos celulares del sistema inmune, y principalmente por las DCs, a través de PRRs de la superficie celular como los receptores tipo *Toll* (TLRs), los cuales constituyen una familia de proteínas transmembrana que reconocen moléculas de una estructura conservada, ya sea propias o relacionadas a patógenos (Tsan & Gao, 2004). La característica fundamental de los DAMPs es que en condiciones fisiológicas poseen funciones completamente distintas, encontrándose en muy bajas concentraciones o ausentes fuera de la matriz extracelular de cualquier tejido sano. Sin embargo, en tejidos alterados estas moléculas son expuestas o secretadas, teniendo la capacidad de interactuar con distintas células del sistema inmune (Matzinger, 1994).

La muerte de las células cancerígenas a través de células del sistema inmune que fueron detectadas por medio de DAMPs originadas a partir de las células neoplásicas, se conoce como muerte celular inmunogénica (ICD) (Krysko & cols.,

2013). En este fenómeno, los DAMPs colaboran en el reconocimiento de los antígenos tumorales y en la inducción de esta respuesta inmunológica antitumoral (Rojo & cols., 2012). DAMPs específicos, como calreticulina (CRT, señal “cómeme”), ATP secretado y HMGB1; y su subsecuente interacción con receptores de fagocitosis, receptores purinérgicos y PRRs, respectivamente, son requeridos por la ICD para finalmente llevar a la activación de una potente inmunidad anticáncer (Rock & Kono, 2008; Palm & Medzhitov, 2009; Garg & cols., 2010; Zitvogel & cols., 2010; Krysko & cols., 2011; Ladoire & cols., 2014). Lo anterior fundamenta el interés en el estudio de la capacidad de distintos agentes, como las drogas quimioterapéuticas o el *heat shock*, de inducir la ICD.

### **Inmunoterapia Antitumoral**

La inmunoterapia contra el cáncer resulta una alternativa llamativa puesto que las respuestas inmunitarias generadas por este tipo de tratamiento pueden ser específicas al reconocer antígenos tumorales definidos. En la actualidad se han identificado nuevos blancos terapéuticos en MM y células inmunes, que han permitido el desarrollo de un amplio rango de anticuerpos monoclonales destinados a modular la respuesta inmune antitumoral y erradicar los tumores (Amaria & cols., 2011; Guida & cols., 2012). Además, el desarrollo de vacunas basadas en DCs, con el propósito de estimular la respuesta inmune antitumoral adaptativa endógena del paciente, está siendo ampliamente estudiada (Palucka & Banchereau, 2012).

Es importante destacar que las estrategias de vacunación basadas en DCs son seguras, poco costosas y, más importante aún, proveen inmunidad protectora a largo plazo, por lo cual esta estrategia terapéutica se ha utilizado para el tratamiento de MM, un ejemplo de ello, es una inmunoterapia que se ha desarrollado basada en células presentadoras de antígenos tumorales (TAPCells), que incluye la inducción de una respuesta inmune mediada por células T, llevando a mejorar la supervivencia a largo plazo de cerca del 60% de pacientes con MM en etapa IV (González & cols., 2014 (a), González & cols., 2014 (b)). Estos estudios han contado con más de 100 pacientes (Escobar & cols., 2005; Duran-Aniotz &

cols., 2013), de los cuales cerca del 60% de los pacientes tratados respondieron a la terapia (López & cols., 2009; Aguilera & cols., 2011; Tittarelli & cols., 2012).

### **Inmunoterapia basada en TAPCells**

La generación de TAPCells se logra a través de la estimulación *ex vivo* de DCs originadas de monocitos de sangre periférica de pacientes con MM. Estas DCs son estimuladas con un lisado alogénico generado a partir de tres tipos de líneas celulares de melanoma tratados con *heat shock*, y que logra inducir un fenotipo maduro y activo en las DCs que posteriormente son inyectadas en el paciente (Mendoza-Naranjo & cols., 2007; Aguilera & cols., 2011).

La explicación a la eficiente presentación cruzada por DCs generadas *ex vivo*, es producto de la gran fuente de antígenos en conjunto con DAMPs contenidos en TRIMEL (Aguilera & cols., 2011). Ahora bien, la menor respuesta mostrada por un porcentaje de pacientes puede explicarse por la inducción de tolerancia por péptidos tumorales inmunodominantes, insuficiente cantidad de patrones moleculares asociadas a daño durante la generación *ex vivo* de DCs o durante la inmunización, o deficiencias de procesamiento y presentación antigénica de las DCs utilizadas como vacunas (López & cols., 2006; Joffre & cols., 2009). Considerando las causales de esta menor respuesta, se realizó el análisis proteómico de TRIMEL con la finalidad de identificar nuevas proteínas para considerarlas como señales de daño implicadas en el proceso de maduración de DCs.

### **Análisis Proteómico del lisado TRIMEL**

Considerando la mayor capacidad del lisado TRIMEL sometido a *heat shock* en la maduración de las DC, se planteó realizar un análisis proteómico comparándolo con su homólogo sin *heat shock*. Posteriormente, se buscó proteínas sobreexpresadas dentro de este lisado, que pudieran explicar la mayor efectividad en la generación de TAPcells. Para identificar las proteínas candidatas a ser calificadas como nuevas DAMPs, las líneas que componen TRIMEL fueron analizadas mediante herramientas de análisis proteómicos de alto rendimiento

basadas en técnicas de espectrometría de masas (MS/MS) y con una profundidad mínima de detección y cuantificación de 3000 proteínas. Las proteínas que fueron exclusivas, o aquellas que se encontraban sobre o subreguladas en las muestras de TRIMEL con *heat shock* en comparación a aquella muestra sin dicho tratamiento por al menos un factor de dos (2), fueron consideradas como candidatos iniciales. Se encontraron 71 proteínas significativamente sobrerreguladas en los lisados con *heat shock*. Algunas de estas fueron: haptoglobina, vinculina, proteínas de la familia EIF y anexina IV. A partir de estos datos, se seleccionaron proteínas que pudieran corresponder a DAMPs mediante los siguientes criterios de selección:

- Se excluyeron proteínas ya conocidas como moléculas DAMPs.
- Se incluyeron proteínas que fueran:
  - ✓ filogenéticamente antiguas y conservadas.
  - ✓ producto de genes *housekeeping* o factores de transcripción.
  - ✓ asociadas al DNA.
  - ✓ asociadas a estrés del retículo endoplásmico.

Además de estos criterios, se buscó evidencia que relacionara la expresión de estas proteínas con cáncer, además de la posibilidad comercial de adquirirlas. Es así como las proteínas finalmente seleccionadas para este estudio fueron: Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV.

### **Proteínas candidatas: Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV**

Haptoglobina (HP), es una glicoproteína plasmática de aproximadamente 38 kDa de peso molecular con una estructura tetramérica de polipéptidos 2 alfa y 2 beta que se asocian covalentemente mediante enlaces disulfuros. En la población humana existen dos alelos de HP, Hp1 y Hp2, con dos genotipos homocigotos para cada alelo y un fenotipo heterocigoto Hp2-1, lo que refleja las variaciones heredadas en los polipéptidos de HP (Yang & cols., 1981). La función principal de HP es unir hemoglobina (Hb) para formar un complejo de HP-Hb estable y por lo

tanto prevenir el daño tisular oxidativo inducido por la hemoglobina (Asleh & cols., 2003). Por otra parte, se ha descrito que HP posee un rol como factor preventivo de enfermedades inflamatorias de piel mediadas por LT (Xie & cols., 2000). Además, en estudios relacionados a cáncer se ha sugerido como biomarcador para diagnóstico precoz de cáncer de ovario (Ye & cols., 2003; Ahmed & cols., 2004), mientras que en cáncer pancreático y colorrectal su forma fucosilada funcionaria como biomarcador de diagnóstico y pronóstico post quirúrgico respectivamente (Okuyama & cols., 2006; Takeda & cols., 2012). Finalmente, en los últimos años se mostró la capacidad de HP para activar DCs en un modelo de trasplante de piel murino (Shen & cols., 2012) y, recientemente, estos mismos autores mostraron un rol amplificador en la inflamación por parte de HP, esto en un modelo de trasplante cardíaco murino, demostrando una interacción potente entre esta proteína y el sistema inmune (Shen & cols., 2015).

EIF4e del inglés *eukaryotic translation initiation factor 4E*, es un polipéptido de 24 kDa que se encuentra formando cuerpos nucleares, así como también siendo parte de un complejo multiproteico denominado EIF4F (Dostie & cols., 2000), su estructura se compone de ocho hebras  $\beta$  antiparalelas y tres hélices (Gross J. & cols., 2003). Esta proteína, al estar a cargo del control de la traducción, desempeña un papel crítico en la regulación de la expresión génica en eucariotas y afecta a muchos procesos celulares esenciales, incluyendo proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Esta proteína se encuentra sobreexpresada en múltiples neoplasias, y está muy relacionada con la progresión del cáncer, tumorigénesis y metástasis a distancia, por lo que se ha propuesto en algunos estudios como un potencial blanco terapéutico (Graff & cols., 2008; Bhat & cols., 2015). Del mismo modo, un estudio *in vitro* donde se bloqueó EIF4e se observó una supresión en la proliferación e invasión de las células tumorales ováricas (Wan & cols. 2015).

Anexina IV (ANX4), también conocida como lipocortina IV, endonexina I, y proteína de unión a carbohidratos P33/P41, pertenece a la superfamilia de

anexinas que son proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio y posee un peso molecular de 35,9 kDa (Mussunoor & Murray, 2008). La estructura cristalina de ANX4 está compuesta por cuatro anexinas repetidas y cada dominio de anexina está compuesto por cinco alfa hélices con un motivo de unión a calcio característico (Zanotti & cols., 1998; Butsushita & cols., 2009). Entre sus funciones esta promover la agregación de vesículas *in vitro*, jugando un rol importante en la exocitosis sináptica y reparación de las membranas (Kaetzel & cols., 2001; Willshaw & cols., 2004); cambia las propiedades físicas de la membrana para regular la permeabilidad pasiva (Kaetzel & cols., 1994; Chan & cols., 1994; Hill & cols., 2003) e induce la señalización de calcio, anticoagulación y resistencia a la apoptosis (Lin & cols., 2012). ANX4 se ha asociado con progresión, invasión, migración, adhesión, y resistencia a drogas de una variedad de canceres. ANX4 regula proteínas asociadas a cáncer gástrico y moléculas relacionadas a adhesión en cáncer hepatocelular; potencialmente mejora la resistencia a quimioterapéuticos en cáncer de pulmón y resistencia al platino en carcinoma endometrial (Wei & cols., 2015). Además, esta proteína se ha encontrado sobrerregulada en cáncer renal de células claras con función en la migración celular y sugiriendo un rol en la diversificación morfológica y diseminación del cáncer (Zimmermann & cols., 2004).

### **Propuesta de investigación**

Durante este proyecto proponemos investigar la actividad de Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV, que no poseen funciones previamente descritas como señales de daño en humanos. Analizaremos su habilidad para inducir características de DCs maduras como por ejemplo, la inducción de la expresión de moléculas asociadas a la presentación antigénica, receptores de quimioquinas y moléculas coestimuladoras.

La principal relevancia de esta propuesta es descubrir la función de estas proteínas candidatas como señales de daño y aumentar el conocimiento acerca de su papel en el proceso de activación/maduración y fenotipo final de las DCs. Esto es relevante para la generación de DCs más efectivas con propósitos

inmunoterapéuticos.

En el futuro este conocimiento puede ser aplicado de distintas formas, dependiendo de las características deseadas en las DCs a ser generadas y/o en las enfermedades que se pretenda tratar. Esto nos permitirá obtener DCs terapéuticas no sólo para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como el de cabeza y cuello, sino también para enfermedades autoinmunes e infecciosas que afectan el territorio bucomaxilofacial.

Finalmente, este proyecto dejará importantes preguntas para establecer la posibilidad de beneficios clínicos del uso de nuevas y previamente descritas DAMPs en combinaciones específicas en inmunoterapia basada en DCs, entregando nuevas luces en el diseño de vacunas basadas en DCs menos costosas, más potentes y clínicamente efectivas para pacientes con cáncer y otras patologías.

## **HIPÓTESIS**

Las proteínas Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV son capaces de inducir la maduración *in vitro* de células dendríticas humanas de uso terapéutico.

## **OBJETIVO GENERAL**

Describir el efecto de Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV sobre la maduración *in vitro* de células dendríticas humanas.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

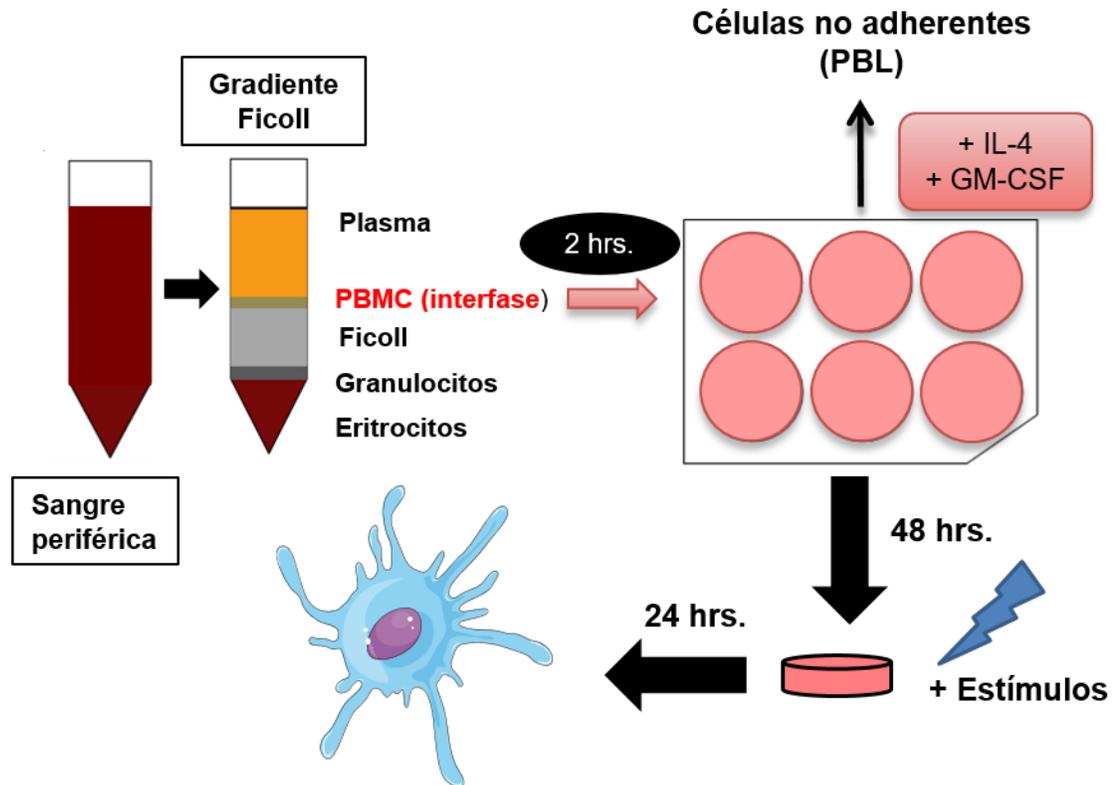
1. Generar células dendríticas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica humana.
2. Evaluar la expresión de MHC I, MHC II, CD83, CD80, CD86 y CCR-7 post estimulación con Anexina IV, Haptoglobina y EIF4e en DCs humanas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio es de tipo experimental *in vitro* aprobado por el Comité de Ética Científico para la investigación Biomédica (CECel) en seres humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

### Separación de PBMC a partir de muestras de sangre periférica

Concentrados leucocitarios (“*buffy coats*”) provenientes de donantes sanos, proporcionadas por el Servicio de Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, fueron utilizados para la extracción de PBMC mediante la generación de un gradiente de densidad por centrifugación. Cada concentrado de sangre (50-80 ml por muestra) fue diluido en una razón 1:3 con una solución de PBS 1x (Corning) y centrifugada a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante fue eliminado y las células de cada tubo fueron resuspendidas en 30 ml de PBS 1x. En la parte inferior de cada tubo, fueron añadidos lentamente 10 ml de Ficoll-Paque® (GE Healthcare) y posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1250 rpm por 25 minutos a 18°C, con aceleración 1 y freno en 0. Luego de la centrifugación, se recuperó el PBMC, anillo ubicado entre el plasma y los eritrocitos. Estas células se traspasaron a un tubo nuevo, se lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 1450 rpm por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se les agregó 10 ml de buffer de lisis ACK (Amonio-Cloruro-Potasio) 1x estéril. Las células con la solución de lisis de eritrocitos fueron incubadas durante 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para luego ser centrifugadas a 1250 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas a la concentración deseada según los experimentos. La viabilidad celular fue comprobada mediante azul de tripán. Las células fueron incubadas en placas de 6 pocillos (Falcon) a una concentración de 35-40 x 10<sup>6</sup> células por pozo en medio de cultivo libre de suero fetal bovino, AIM-V (Gibco, Invitrogen Corporation) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas. Las células no adherentes fueron removidas, en tanto las adherentes (monocitos) se mantuvieron en cultivo en presencia de 500 UI/ml de rhIL-4 (Miltenyi) y 800 UI/ml de rhGM-CSF (Miltenyi) por 48 horas (Fig. 1).



**Figura 1. Esquema de protocolo de generación de células dendríticas a partir de sangre periférica, utilizando distintos estímulos.**

### Lisado celular de líneas tumorales TRIMEL

Los lisados tumorales TRIMEL y TRIMEL sin *heat shock* fueron gentilmente proporcionados por el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT) del Dr. Flavio Salazar, estas líneas provenían de metástasis de pacientes con MM. Estos lisados fueron preparados según lo descrito en trabajos previos de este laboratorio (Escobar & cols., 2005).

### Proteínas candidatas

Las proteínas fueron adquiridas comercialmente en las siguientes presentaciones:

- Haptoglobina (Sigma, #H3536) liofilizada purificada a partir de plasma humano.

- EIF4e (ITSIBioscience, #RPR-530) recombinante humana líquida, purificada de E. Coli, obtenida con una pureza mayor al 90% medida por SDS-PAGE.
- Anexina IV (Abcam, #ab92815) recombinante humana líquida, purificada a partir de células HEK 293, con una pureza mayor al 90% medida por SDS-PAGE.

### Estimulación con Haptoglobina, EIF4e y Anexina IV

Las células generadas a partir de monocitos de sangre periférica de distintos donantes, se estimularon con TRIMEL 50  $\mu$ g/ml, Haptoglobina (Sigma), EIF4e (Biosciences) y Anexina IV (Abcam), por 24 horas. Las proteínas se adicionaron en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml cada una por separado, para su dilución se utilizó AIM-V. A la condición monocito activado (AM) no se le agregó estímulo de maduración (Tabla 2).

Estímulos de maduración 48 horas post siembra			
Sin estímulo (NT)	Haptoglobina 100 ng/ml	EIF4e 100 ng/ml	Anexina IV 100 ng/ml
TRIMEL 50 $\mu$ g/ml	Haptoglobina 10 ng/ml	EIF4e 10 ng/ml	Anexina IV 10 ng/ml
	Haptoglobina 1 ng/ml	EIF4e 1 ng/ml	Anexina IV 1 ng/ml

**Tabla 2. Estímulos de maduración adicionados a iDCs para evaluar el efecto de las proteínas candidatas.** Luego de la activación de las células por 48 horas con IL-4 (500 UI/ml) y GM-CSF (800 UI/ml) se adicionaron los estímulos descritos en la tabla por 24 horas más.

### Estimulación con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en proteínas candidatas

Las células generadas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes diferentes, se estimularon con TRIMEL 50  $\mu\text{g/ml}$ , TRIMEL sin HS 50  $\mu\text{g/ml}$  y TRIMEL sin HS 50  $\mu\text{g/ml}$  enriquecido en cada una de las 3 proteínas en concentración de 0,1 y 10  $\text{ng/ml}$ , cada una por separado. Para utilizar TRIMEL sin HS como andamiaje, se mezcló 0,1 o 10  $\text{ng/ml}$  de las proteínas con el lisado, para finalmente adicionar la mezcla en forma conjunta a cada pocillo por 24 horas (Tabla 3).

Estímulos de maduración 48 horas post siembra			
Sin estímulo (NT)	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + Haptoglobina 0,1 $\text{ng/ml}$	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + EIF4e 0,1 $\text{ng/ml}$	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + Anexina IV 0,1 $\text{ng/ml}$
TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + Haptoglobina 10 $\text{ng/ml}$	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + EIF4e 10 $\text{ng/ml}$	TRIMEL sin <i>heat shock</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + Anexina IV 10 $\text{ng/ml}$
TRIMEL 50 $\mu\text{g/ml}$			

**Tabla 3. Estímulos de maduración adicionados a iDCs para evaluar de efecto de las proteínas adicionadas al lisado TRIMEL sin *heat shock*.** Luego de la activación de las células por 48 horas con IL-4 (500 UI/ml) y GM-CSF (800 UI/ml), se adicionaron los estímulos detallados en la tabla por 24 horas más.

## Citometría de flujo

Las DCs, luego de ser activadas por 24 horas con los distintos estímulos, fueron caracterizadas fenotípicamente mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron cosechadas por medio de rastrillos de células, resuspendidas en una solución de PBS 1x + 2% FBS (Corning Inc.) e incubadas por 20 minutos a 4°C (en oscuridad), con los respectivos anticuerpos monoclonales para analizar su correcta diferenciación y maduración:  $\alpha$ -hCD11c (APC) (Biolegend; clon BU15),  $\alpha$ -hHLA-DR (APC-eFluor780) (EBiosciences; clon LN3),  $\alpha$ -hCD86 (Alexa Fluor 488) (Biolegend; clon IT2.2),  $\alpha$ -hCD80 (PE) (Biolegend; clon 2D10),  $\alpha$ -CD197(CCR7) (PE) (Biolegend; clon G043H7),  $\alpha$ -hCD83 (PECy7) (Ebiosciences; clon HB15e),  $\alpha$ -HLAABC (FITC) (Ebiosciences; clon W6/32). Luego, las células fueron lavadas con 700  $\mu$ l de PBS 1x + 2% FBS, y resuspendidas en 200  $\mu$ l de buffer FACS (BD Biosciences) para finalmente ser analizadas en un citómetro de flujo FACSVersé (BD Biosciences).

Para el análisis de las muestras se utilizó el software Flowjo 7.6.1 donde se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MFI) y el porcentaje de células positivas para cada marcador.

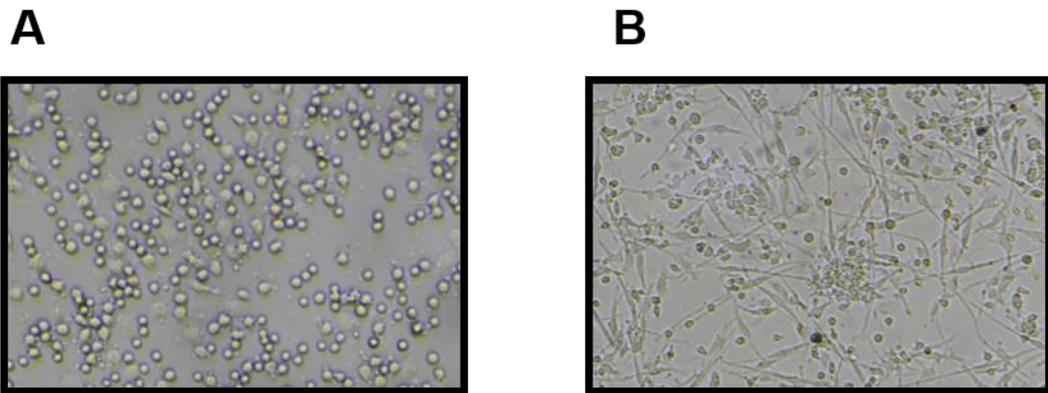
## Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de cuatro experimentos independientes con donantes distintos. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos obtenidos. Para comparar variables continuas entre dos grupos se utilizó *t-student* para muestras pareadas paramétricas y el test de Wilcoxon para variables no paramétricas. Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTADOS

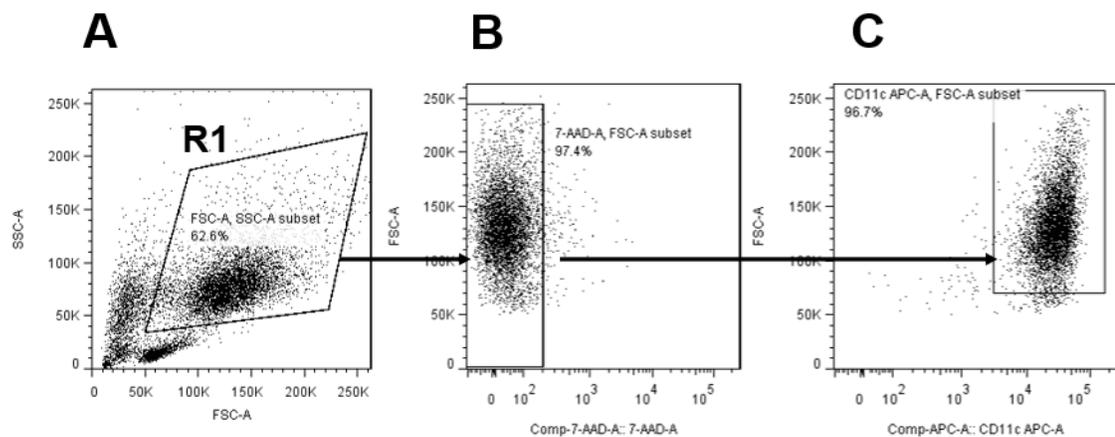
### Generación células dendríticas *in vitro*

Mediante microscopio de contraste de fase se analizó la morfología de las células sin estímulo de maduración (AM) e iDCs activadas con TRIMEL por 24 horas (usado como control interno). Se observó una mayor cantidad de células con morfología alargada o fusiforme en la condición estimulada con TRIMEL, mientras que en AM se observó un mayor número de células con morfología circunferencial (Fig. 2).



**Figura 2. Microscopía de contraste de DCs generadas *in vitro*.** Imágenes representativas con microscopio de campo claro con aumento 40x, de DCs después de 24 horas de cultivo con estímulos de maduración **A** Monocitos activados (AM) y **B** TRIMEL (control interno positivo).

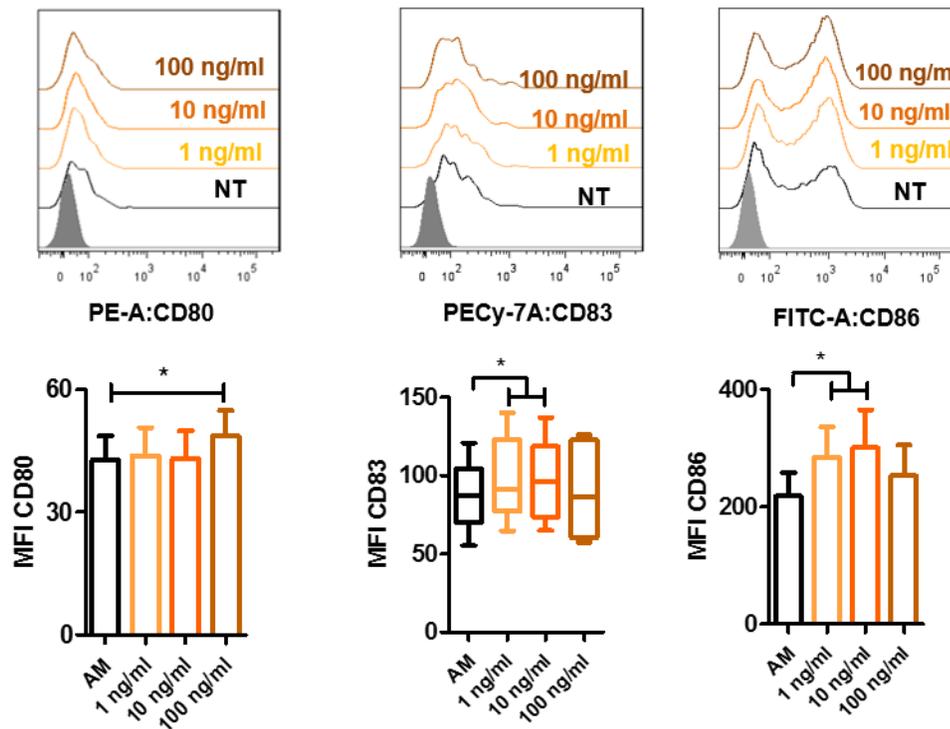
Para la estrategia de análisis por citometría de flujo, se seleccionó primero la población que según tamaño y granulosidad correspondería a DCs humanas (Fig. 3A) y posteriormente se descartó, por medio de un marcador de viabilidad, las células muertas (Fig. 3B). Finalmente, se identificaron las células positivas para el marcador CD11c, lo que mostró la presencia de un alto porcentaje de células positivas para este marcador (Fig. 3C).



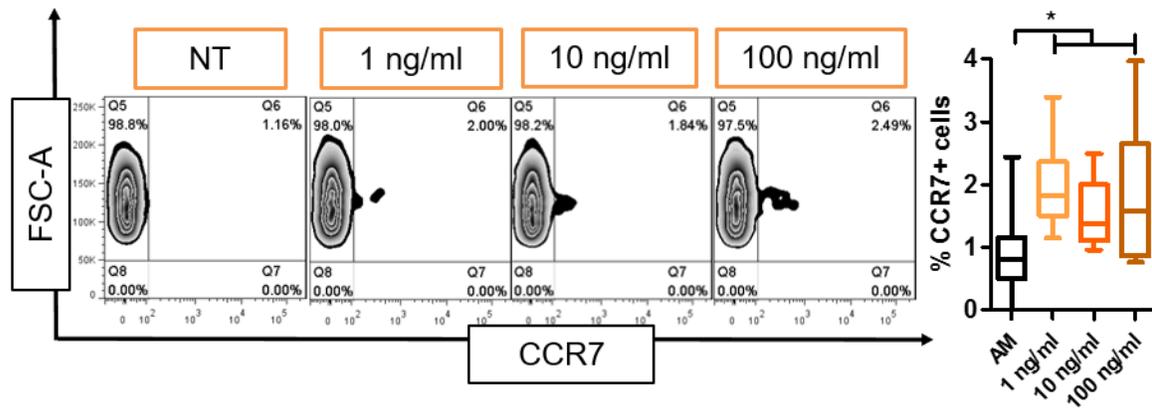
**Figura 3. Dot plots representativos de estrategia para analizar DCs generadas a partir de PBMC por citometría de flujo. A** R1 muestra población de DCs seleccionadas según tamaño (FSC-A) y granulosidad (SSC-A). **B** Dot plot representativo de células vivas escogidas según FSC-A y marcaje con 7-AAD. **C** Dot plot representativo de DCs positivas para marcador CD11c.

## Haptoglobina aumenta la expresión *in vitro* CD80, CD83, CD86 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos

Se evaluó por citometría de flujo el fenotipo de las células CD11c+ estimuladas con HP en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Respecto al grupo AM, se evidenciaron diferencias significativas como el aumento de la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los marcadores CD80 (100 ng/ml), CD83 (1 y 10 ng/ml) y CD86 (1 y 10 ng/ml) (Fig. 4). Además, HP en todas las concentraciones ensayadas, elevó el porcentaje de células positivas para el marcador CCR7 respecto al grupo no estimulado (Fig. 5). No se observaron diferencias significativas para los marcadores MHC-I y MHC-II (Fig. suplementaria 1).



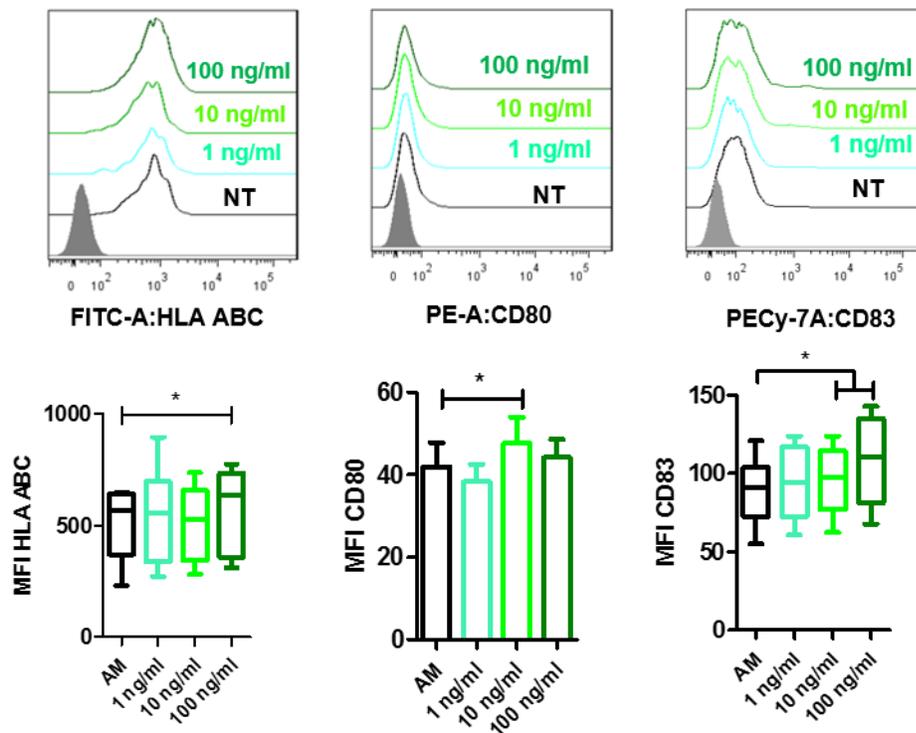
**Figura 4. Expresión de marcadores de maduración CD80, CD83 y CD86 en iDCs estimuladas con distintas concentraciones de Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con HP en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestran histogramas representativos del incremento de la MFI de CD80, CD83 y CD86 en la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de diferentes donantes. \* $p < 0,05$ .



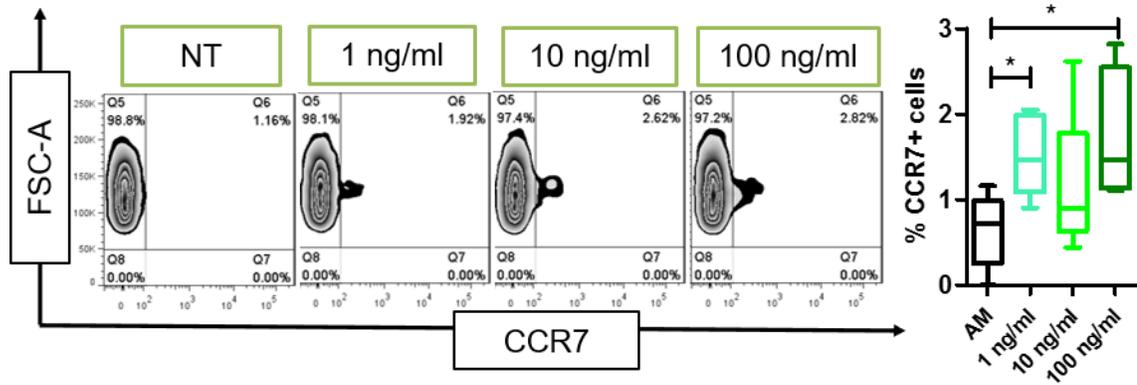
**Figura 5. Expresión del receptor de quimioquinas CCR7 en iDCs estimuladas con Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con HP en concentración de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestra *zebra plots* representativos del porcentaje de células positivas para CCR7 en la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Se muestra un aumento significativo en todas las condiciones estimuladas con HP. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de diferentes donantes. \* $p < 0,05$ .

## EIF4e incrementa la expresión *in vitro* de MHC-I, CD80, CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos

Al analizar la segunda proteína candidata, se observaron efectos significativos sobre distintos marcadores de maduración: se encontró un incremento en la MFI de MHC-I (100 ng/ml), CD80 (10 ng/ml), CD83 (10 y 100 ng/ml) (Fig. 6), y un aumento del porcentaje de células positivas para CCR7 (1 y 100 ng/ml), todo esto respecto al grupo AM (Fig. 7). Respecto a los marcadores MHC-II y CD86, no se observaron diferencias significativas (Fig. suplementaria 2).



**Figura 6. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I, molécula coestimuladora CD80 y molécula de adhesión CD83 en iDCs estimuladas con distintas concentraciones de EIF4e.** Monocitos activados fueron estimulados con EIF4e en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se presenta histogramas representativos que muestran el aumento en la MFI de MHC-I, CD80 y CD83 dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes distintos. \* $p < 0,05$ .



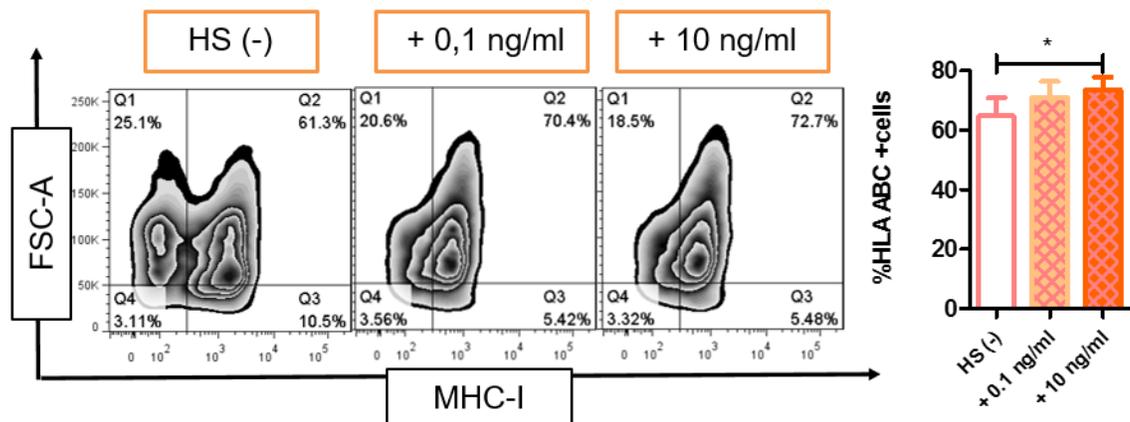
**Figura 7. Expresión de receptor de quimioquinas CCR7 en iDCs estimuladas con distintas concentraciones de EIF4e.** Monocitos activados fueron estimulados con EIF4e en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestran *zebra plots* representativos del análisis por citometría del porcentaje de células positivas para CCR7 dentro de la población CD11c+. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes diferentes. \* $p < 0,05$ .

**TRIMEL sin *heat shock* enriquecido con Haptoglobina incrementa la expresión *in vitro* de MHC-I, CD80, CD83, CD86 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos**

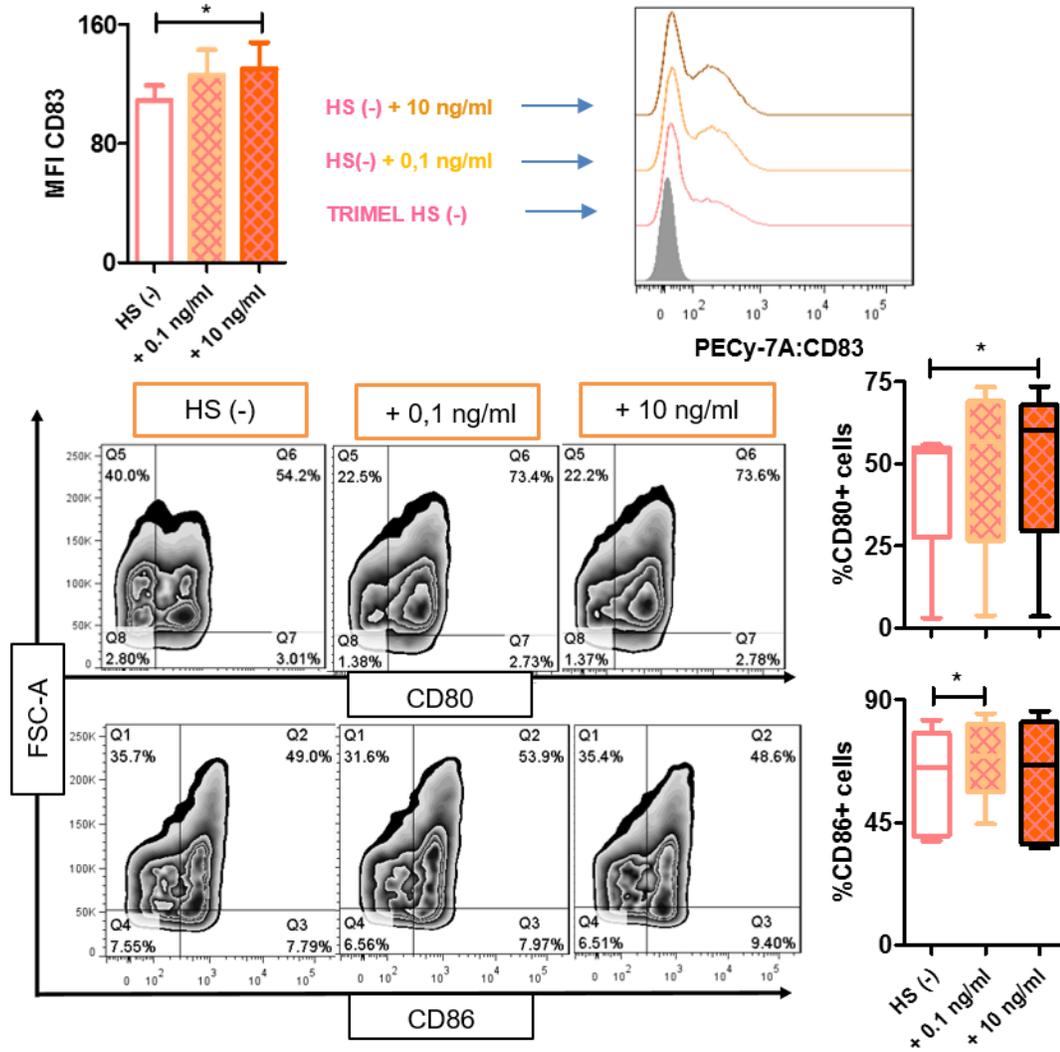
Luego de estudiar el efecto de las proteínas como estímulo sobre las DCs, se empleó el mismo protocolo experimental, utilizando el lisado TRIMEL sin el tratamiento por *heat shock* suplementado con las distintas proteínas candidatas en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml, empleando de esta manera, el lisado como un andamiaje. Como control, en todos los ensayos se utilizó TRIMEL sin HS por sí solo. El pool de marcadores de maduración fue el mismo que el ensayado para los experimentos solo con proteínas.

Al suplementar el TRIMEL sin HS con HP se observaron diferencias estadísticamente significativas en: incremento del porcentaje de células positivas para MHC-I (+ 10 ng/ml) (Fig. 8), MFI de CD83 (+ 10 ng/ml), porcentaje de células positivas para CD80 (+ 10 ng/ml) y CD86 (+ 0,1 ng/ml) (Fig. 9).

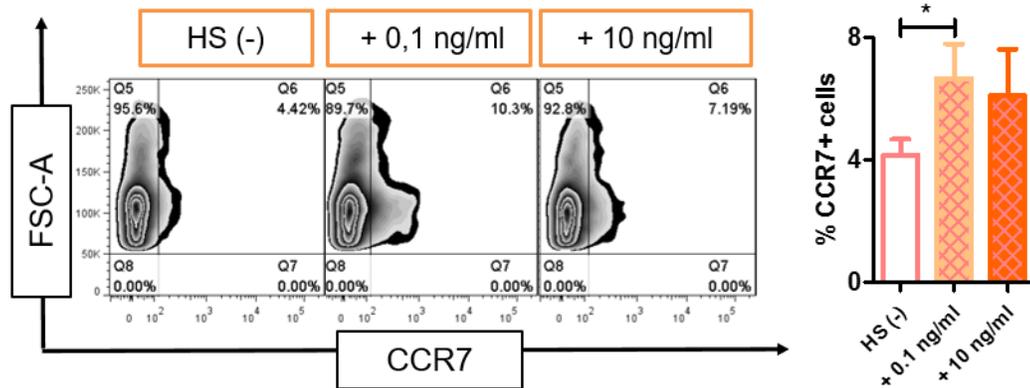
También se detectó un aumento significativo en el porcentaje de células positivas al receptor de quimioquinas CCR7 (+ 0,1 ng/ml) (Fig. 10). No se observaron diferencias significativas para el marcador MHC-II (Fig. suplementaria 4).



**Figura 8. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50 µg/ml mezclado con HP en concentración de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestra *zebra plots* representativos del porcentaje de células MHC-I+, dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Las barras corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes diferentes. \*p< 0,05.



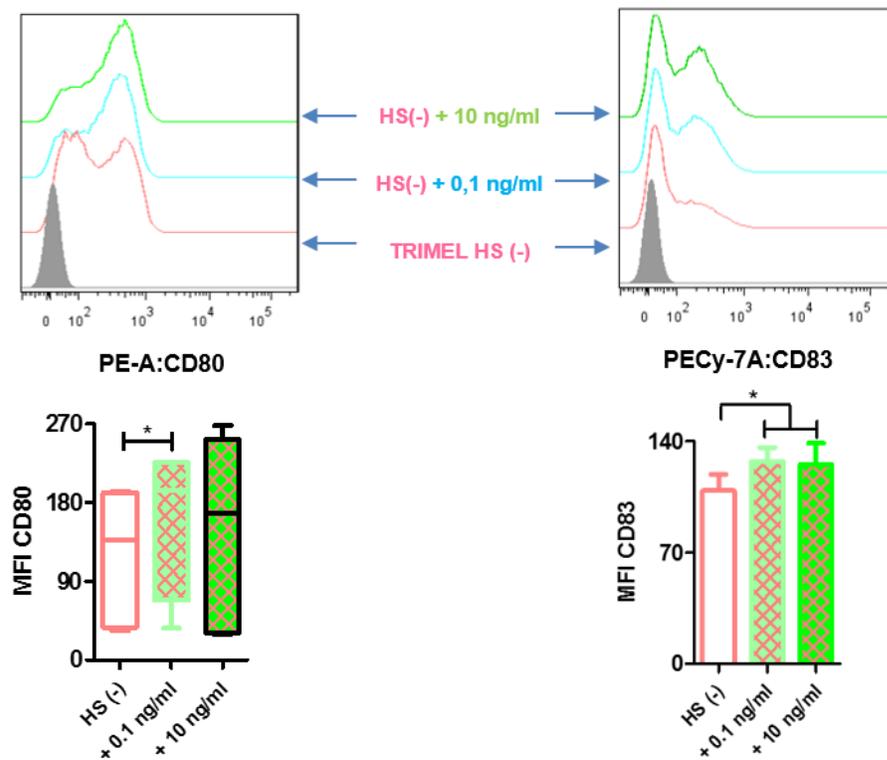
**Figura 9. Expresión marcadores de maduración CD80, CD83 y CD86 en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml adicionando HP en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestra histograma representativo de la MFI de CD83 y *zebra plots* representativos del porcentaje de células positivas para CD80 y CD86 dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Las barras corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes diferentes. \* $p < 0,05$ .



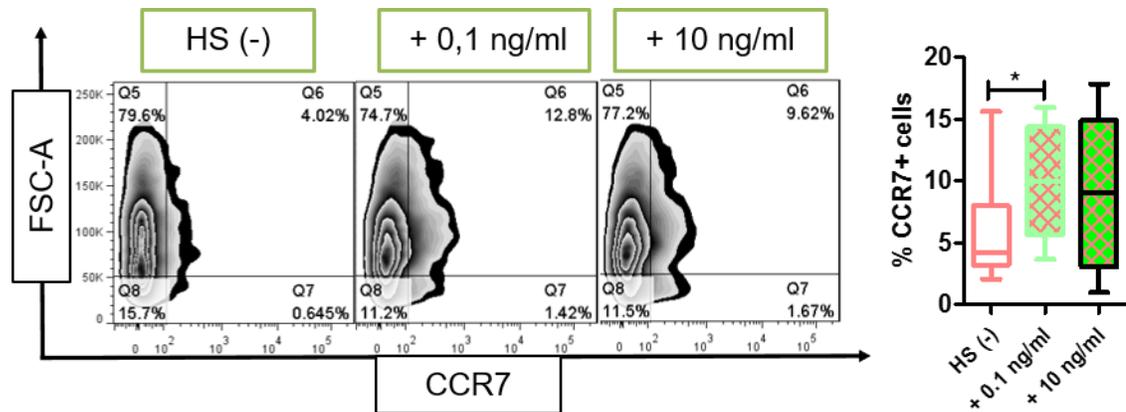
**Figura 10. Expresión de receptor de quimioquinas CCR7 en células estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con HP en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se analizó por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para CCR7 expuesto en los *zebra plots* representativos, esto en la población CD11c+. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes, de donantes distintos. \*p < 0,05.

## TRIMEL sin *heat shock* enriquecido con EIF4e induce la expresión *in vitro* de CD80, CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos

Al adicionar EIF4e al lisado se detectó un aumento de la MFI de CD80 (+ 0,1 ng/ml) y CD83 (+ 0,1 y + 10 ng/ml) (Fig. 11), así como también un incremento del porcentaje de células positivas para CCR7 (+ 0,1 ng/ml), respecto al estímulo de TRIMEL sin HS por sí solo (Fig. 12). No se encontraron efectos significativos sobre MHC-I, MHC-II ni CD86 (Fig. suplementaria 5).



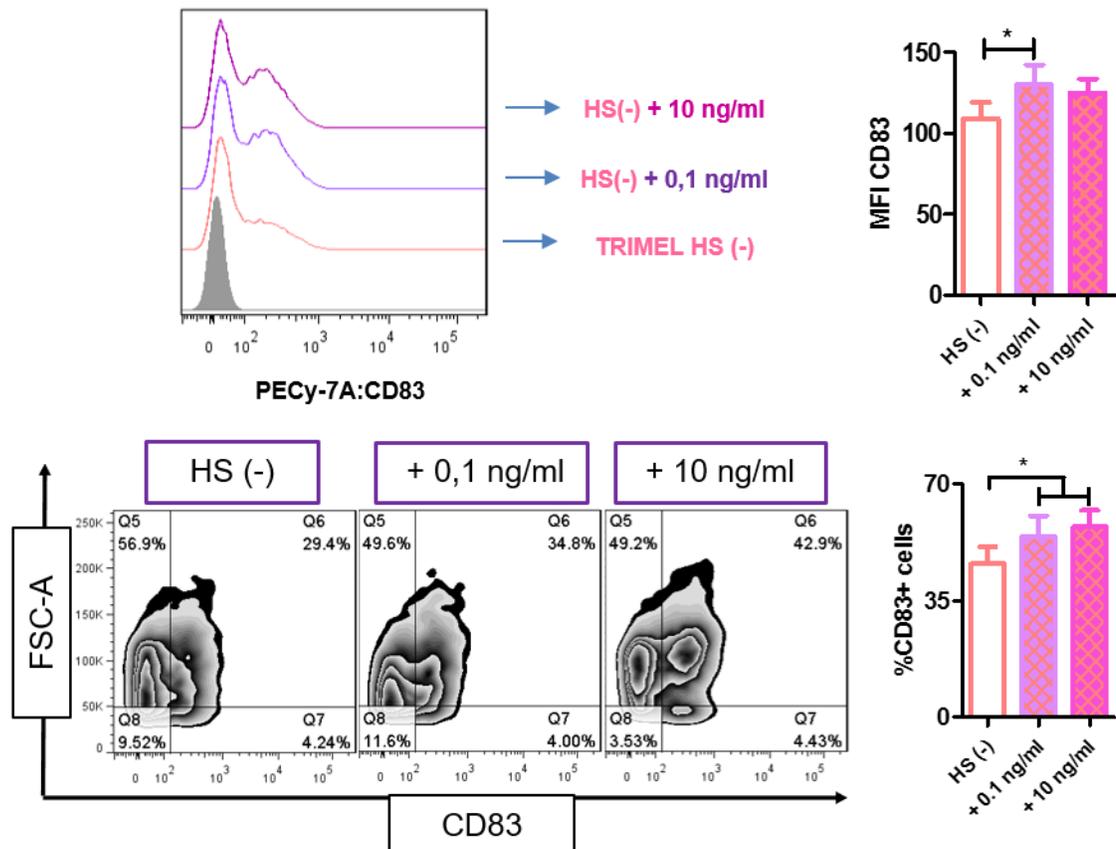
**Figura 11. Expresión de molécula coestimuladora CD80 y molécula de adhesión CD83 en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en EIF4e.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con EIF4e en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestra histogramas representativos de la MFI de CD80 y CD83 de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes diferentes. \* $p < 0,05$ .



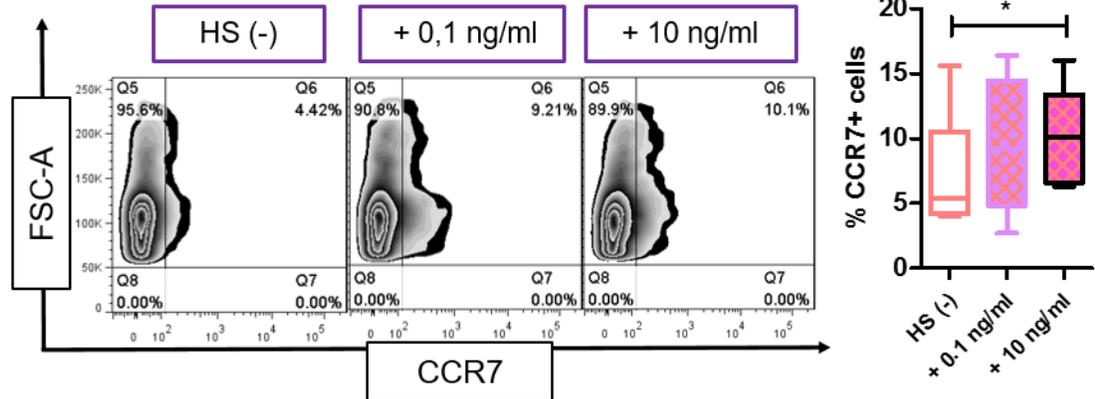
**Figura 12.** TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en EIF4e eleva la expresión del receptor de quimioquinas CCR7. Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con EIF4e en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml, luego de 24 horas se evaluó la expresión de CCR7. Se muestra *zebra plots* representativos de células CCR7+, dentro de la población CD11c+, evaluado por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de donantes diferentes. \* $p < 0,05$ .

**TRIMEL sin *heat shock* enriquecido con Anexina IV aumenta la expresión *in vitro* de CD83 y CCR7 en DCs derivadas de monocitos**

La incubación con Anexina IV, no indujo ningún cambio significativo en el fenotipo de las DCs respecto al grupo AM (Fig. suplementaria 3). Sin embargo, al utilizarla en conjunto con TRIMEL sin HS se observó un aumento significativo en el porcentaje de células positivas (+ 0,1 y + 10 ng/ml) y de la MFI (+ 0,1 ng/ml) de CD83 (Fig. 13), así como también un incremento en el porcentaje de células positivas para CCR7 (+ 10 ng/ml) (Fig. 14). No se observaron diferencias significativas sobre los marcadores CD80, CD86, MHC-I ni MHC-II (Fig. suplementaria 6).



**Figura 13. Expresión de molécula de adhesión CD83 en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Anexina IV.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con ANX4 en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se analizó por citometría de flujo la MFI y el porcentaje de células positivas para CD83, expuesto en un histograma y *zebra plots* representativos respectivamente, en la población CD11c+, medido por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes de diferentes donantes. \* $p < 0,05$ .



**Figura 14. TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Anexina IV aumenta la expresión del receptor de quimioquinas CCR7.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con ANX4 en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se exhibe *zebra plots* representativos del porcentaje de células CCR7+, cuantificado por citometría de flujo. Los resultados corresponden a cuatro experimentos independientes, provenientes de donantes distintos. \*p < 0,05.

## DISCUSIÓN

En la actualidad existe gran interés en la terapia antitumoral basada en DCs, ya que ha demostrado inducir inmunidad antitumoral en humanos. Sin embargo, existe un porcentaje de pacientes que no responden a esta terapia (Caux & cols., 1996; Hoebe & cols., 2004) lo que se puede explicar por diversos mecanismos: i) por la inducción de tolerancia por péptidos inmunodominantes derivados de tumores, ii) por la ausencia o cantidad insuficiente de DAMPs durante la generación *ex vivo* de DCs, iii) por deficiencias en el procesamiento y presentación antigénica de las DCs utilizadas como vacuna (López & cols., 2006; Joffre & cols., 2009).

Basado en esto, se buscaron proteínas que actuaran sobre las DCs de forma independiente o asociadas a TRIMEL sin HS, para así inducir la maduración de DCs.

Para el desarrollo de esta tesis, se utilizaron DCs derivadas de monocitos aislados de sangre periférica humana. Para ello, se optó por un protocolo de 72 horas totales (48 horas de diferenciación y 24 horas de activación), descrito en múltiples publicaciones (López & cols., 2009; Aguilera & cols. 2011; Tittarelli & cols., 2012). Este protocolo ha demostrado generar TAPCells de forma eficiente (González, 2011) y aún más importante, este método concilia con el proceso de diferenciación fisiológica que ocurriría *in vivo* desde monocitos que infiltran los tejidos afectados por una injuria específica (Randolph & cols., 1999; Ginhoux & cols., 2006).

En este estudio *in vitro* se evidenció que Haptoglobina (HP) induce el aumento de la expresión de marcadores asociados a maduración como CD80, CD83 y CD86, mientras que EIF4e produjo un aumento de CD80 y CD83. Estas moléculas están asociadas al fenotipo de mDCs, este resultado fue similar al observado en un estudio *in vitro* donde se utilizó las proteínas HSP72 y HSP60, como estímulo de maduración las cuales son DAMPs conocidas (Bethke & cols., 2002).

Respecto a los resultados obtenidos para HP y EIF4e, es importante tomar en consideración que la magnitud de sus efectos sobre los distintos marcadores fueron discretos, pero significativos. Diversos trabajos que han utilizado otras

proteínas reconocidas como DAMPs, para realizar experimentos de características similares a las descritas en este trabajo, muestran que la inducción de los marcadores aquí estudiados es de tres a cinco veces mayor que la observada con HP y EIF4e, sin embargo, la concentración utilizada de DAMPs en esos estudios fue entre 5 a 200 veces mayor que la usada para HP y EIF4e (Singh-Jasuja & cols., 2000; Somersan & cols., 2001; Wang & cols., 2002), con este protocolo se pretendió encontrar efectos utilizando concentraciones cercanas a las fisiológicas y así develar la potencialidad de la proteína en cuestión.

Respecto al rol de distintos DAMPs en la maduración *in vitro* de DCs humanas, se ha descrito en múltiples estudios el aumento en los marcadores de maduración sin realizar hincapié en las magnitudes o significancia estadística de estas diferencias respecto al control no tratado, siendo el perfil de citoquinas y la capacidad de estimular LT en conjunto con este aumento relativo en los marcadores de maduración, los que finalmente tipificaran a una DC como funcional y madura por medio de un estímulo en particular (Kuppner & cols., 2001; Messmer & cols., 2004; Yang & cols., 2006).

Por otra parte, si bien las proteínas estudiadas tuvieron efecto sobre algunos de los marcadores de maduración planteados en este trabajo, este efecto no se evidenció para MHC-II, el cual es uno de los marcadores reconocidos en mDC. Sin embargo, en un estudio *in vitro* donde se utilizó el reconocido DAMP calreticulina (CRT), no se observó un aumento significativo de MHC-II, ni de CCR7. Aun así, se logró establecer una respuesta inmune, al elevar el perfil de citoquinas y estimular a los LT durante su cocultivo con DCs y CRT (Bajor & cols., 2011), mostrando de esta manera que los niveles de MHC-II no condicionarían de forma absoluta la funcionalidad de la DC.

Respecto a Anexina IV (ANX4), esta no tuvo efectos significativos sobre las DCs, indicando que este tipo particular de DCs no son susceptibles al estímulo de esta proteína en las condiciones experimentales aplicadas en este estudio. Sin embargo, este resultado indicaría que los efectos observados para EIF4e y HP no son replicables con cualquier proteína, sino más bien específicos. Ahora, al añadir ANX4 al lisado TRIMEL sin HS, se indujo CD83 y CCR7. Esto puede deberse a la necesidad de un andamiaje o a un microambiente específico para su función, algo

que sucede con la proteína HMGB1, una conocida DAMP, que dependiendo de su estado de oxidación en el medio extracelular puede alterar su actividad biológica (Venereau & cols., 2012; Liu & cols., 2012; Yu & cols., 2015).

Interesantemente, los efectos sobre las moléculas coestimuladoras y de adhesión observados en las DCs al incubar con HP y EIF4e de manera independiente, se mantuvieron al añadir estas proteínas al lisado TRIMEL sin *heat shock*. Incluso, se observaron efectos con las proteínas en concentraciones menores, reafirmando así su contribución.

Por otro lado, el aumento del porcentaje de células positivas para CCR7 es de gran importancia porque es el receptor que direcciona las DCs hacia los linfonodos secundarios para realizar la presentación antigénica a LT. Es así como en este estudio se evidenció el aumento de este marcador tanto para las proteínas EIF4e y HP como para las diferentes presentaciones de TRIMEL sin HS enriquecido con las distintas proteínas candidatas.

Para completar este estudio, se espera confirmar estos resultados con ensayos de migración por medio de cámaras transwell.

Finalmente, estos resultados dan fundamento para seguir investigando respecto a los posibles efectos de estas proteínas sobre las DCs, ya sea utilizando en combinación estas proteínas, mayores concentraciones de las mismas, inducir la sobreexpresión de estas en algún tipo celular o bloquearlas del lisado TRIMEL. Además, este estudio es el primer paso para seguir investigando los efectos de estas proteínas sobre otros aspectos relevantes que tienen relación con una DC funcionalmente madura, como la inducción de citoquinas específicas, su capacidad de migración hacia tejido linfoide y su interacción con LT, entre otros ensayos.

## CONCLUSIONES

- 1) Haptoglobina es capaz de inducir de forma significativa la expresión de los marcadores de maduración CD80, CD83 y CD86 en DCs humanas respecto a monocitos activados.
- 2) EIF4e aumentó de manera significativa la expresión de MHC-I, CD80 y CD83 en DCs humanas respecto a monocitos activados.
- 3) Haptoglobina y EIF4e indujeron la expresión del receptor de quimioquinas CCR7 en comparación con monocitos activados.
- 4) Haptoglobina y EIF4e generaron un aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras, de adhesión y CCR7, al utilizarlas en combinación con el lisado TRIMEL sin HS, manteniendo el efecto observado al emplearlas por sí solas.
- 5) Anexina IV fue capaz de inducir de forma significativa la expresión de CD83 y CCR7 al agregarla al lisado TRIMEL sin HS comparado con el lisado por sí solo.
- 6) Es necesario realizar otros estudios que evalúen el efecto de la inducción de los marcadores de maduración generada sobre las DCs evidenciada en este trabajo y así verificar la funcionalidad de este efecto. Esto último, por medio de la medición del perfil de citoquinas, migración de DCs y proliferación de LT, entre otros ensayos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera R, Saffie C, Tittarelli A, González FE, Ramírez M, Reyes D, *et al* (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American association for cancer research* **17**:2474-2483.
- Aguirre A (2008). Generación y caracterización de células dendríticas tolerogénicas en pacientes con artritis reumatoide (Tesis de magister). Universidad de Chile.
- Ahmed N, Barker G, Oliva KT, Hoffmann P, Riley C, Reeve S, *et al* (2004). Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *British journal of cancer* **91**:129-140.
- Amaria RN, Lewis KD, González R (2011). Therapeutic options in cutaneous melanoma: latest developments. *Therapeutic advances in medical oncology* **3**:245-251.
- Asleh R, Marsh S, Shilkrut M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, *et al* (2003). Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circulation research* **92**:1193-1200.
- Bajor A, Tischer S, Figueredo C, Wittman M, Immenschuh S, Blasczyk R, *et al* (2011). Modulatory role of calreticulin as chaperokine for dendritic cell-based immunotherapy. *Clinical and experimental immunology* **165**:220-234.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, *et al* (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. **18**:767-811.
- Banchereau J, Paczesny S, Blanco P, Bennett L, Pascual V, Fay J, *et al* (2003). Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy. *Annals of the New York academy of sciences* **987**:180-187.

- Banchereau J, Palucka AK (2002). Rapid one-step method for generation of antigen loaded dendritic cells vaccine from precursors. *World intellectual property organization*. WO2004/050855 A2
- Benasso M (2013). Induction chemotherapy for squamous cell head and neck cancer: A never ending story?. *Oral oncology* **49**:747-752.
- Bethke K, Staib F, Distler M, Schmitt U, Jonuleit H, Enk A *et al* (2002). Different efficiency of heat shock proteins (hsp) to activate human monocytes and dendritic cells: superiority of hsp60. *The journal of immunology* **169**:6141-6148.
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews* **14**: 261-278.
- Bonasio R, von Andrian UH (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Current opinion in immunology*, **18**:503-511.
- Burnet M (1957). Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British medical journal* **1**:841-847.
- Butsushita K, Fukuoka S, Ida K, Arai Y (2009). Crystal structures of sodium-bound annexin A4. *Bioscience, biotechnology and biochemistry* **73**:2274–2280.
- Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant, de Saint-Vis B, Jacquet C, *et al* (1996). CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF $\alpha$ . *Journal of experimental medicine* **184**: 695.
- Chan HC, Kaetzel MA, Gotter AL, Dedman JR, Nelson DJ (1994). Annexin IV inhibits calmodulin-dependent protein kinase II-activated chloride conductance. A novel mechanism for ion channel regulation. *Journal of biological chemistry* **269**:32464–32468.
- Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, *et al* (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209 (+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* **143**:416-429.

- Chow A, Toomre D, Garrett W, Mellman I (2002). Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**:988-994.
- Corado J. (2005). Células dendríticas, respuesta inmunitaria y señales de peligro. *Gaceta Médica de Caracas*, **113**:474-484.
- Dauer M, Obermaier B, Hertzen J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, *et al* (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *Journal of immunology* **170**:4069-4076.
- Dostie J, Lejbkiewicz F, Sonenberg N (2000). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factor in speckles. *The journal of cell biology* **148**:239-247.
- Duran-Aniotz C, Segal G, Salazar L, Pereda C, Falcon C, Tempio F, *et al* (2013). The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **62**:761-772.
- Escobar A, López M, Serrano A, Ramírez M, Pérez C, Aguirre A, *et al* (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical and experimental immunology* **142**:555-568.
- Garg AD, Nowis D, Golab J, Vandenabeele P, Krysko DV, Agostinis P (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et biophysica acta* **1805**:53-71.
- Gett AV, Sallusto F, Lanzavecchia A, Geginat J (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nature of immunology* **4**:355-360.
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, *et al* (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature immunology* **7**:265–273.

- González F (2011). Efecto del lisado trimel en la maduración y migración de células presentadoras de antígenos tumorales (TAPCells) para uso terapéutico (Tesis doctoral). Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- González F, Gleisner A, Falcón-Beas F, Osorio F, López MN, Salazar-Onfray F (2014). Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics* **10**:3261-3269.
- González F, Ortiz Z, Reyes M, Dutzan N, Patel V, Pereda C, *et al* (2014). Melanoma cell lysate induces CCR7 expression and in vivo migration to draining lymph nodes of therapeutic human dendritic cells. *Immunology* **142**:396-405.
- Graff J, Konicek B, Carter J, Marcusson E (2008). Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer research* **68**:631-634.
- Greaves D, Wang W, Dairaghi D, Dieu M, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, *et al* (1997). CCR6, a cc chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  and is highly expressed in human dendritic cells. *The journal of experimental medicine* **186**:837-844.
- Gross J, Moerke N, Von der Haar T, Lugoyskov A, Sachs A, McCarthy J, Wagner G, *et al* (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* **115**:739–750.
- Guida M, Pisconte S, Colucci G (2012). Metastatic melanoma: the new era of targeted therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* **16 Suppl 2**:S61-70.
- Hart DN (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**:3245-3287.
- Hill WG, Kaetzel MA, Kishore BK, Dedman JR, Zeidel ML (2003). Annexin A4 reduces water and proton permeability of model membranes but does not alter aquaporin 2-mediated water transport in isolated endosomes. *Journal of general physiology* **121**:413–425.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology* **5**:971-974.

- Jiménez J, Bastias G, Ferreccio C, Moscoso C, Sagues S, Cid C, *et al* (2015). A snapshot of cancer in Chile: analytical frameworks for developing a cancer policy. *Biological research* **48**:10.
- Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological reviews* **227**:234–247.
- Kaetzel MA, Chan HC, Dubinsky WP, Dedman JR, Nelson DJ (1994). A role for annexin IV in epithelial cell function: Inhibition of calcium-activated chloride conductance. *Journal biological chemistry* **269**:5297–5302.
- Kaetzel MA, Mo YD, Mealy TR, Campos B, Bergsma-Schutter W, Brisson A, *et al* (2001). Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry* **40**:4192–4199.
- Krysko DV, Agostinis P, Krysko O, Garg AD, Bachert C, Lambrecht BN, *et al* (2011). Emerging role of damage associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trends in immunology* **32**:157-164.
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **12**:860-875.
- Krysko O, Love Aaes T, Bachert C, Vandenabeele, Krysko DV (2013). Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell death and disease* **4**:e631.
- Kuppner M, Gastpar R, Gelwer S, Nössner E, Ochmann O, Scharner, *et al* (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: Hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *European journal of immunology* **31**:1602-1609.
- Ladoire S, Hannani D, Vetizou M, Locher C, Aymeric L, Apetoh L, *et al* (2014). Cell-death-associated molecular patterns as determinants of cancer immunogenicity. *Antioxidants & redox signaling* **20**:1098-1116.
- Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct

chemokines and are regulated on maturation. *European journal of immunology* **28**:4114-4122.

- Lin L, Huang H, Juan H (2012). Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays. *PLoS One* **7**:e44615.
- Lipshultz S.E., Diamond M., Franco V., Aggarwal S., Leger K., Santos M.V., *et al* (2014). Managing chemotherapy-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancers. *Pediatric drugs* **16**:373-389.
- Liu A, Fang H, Dirsch O, Jin H, Dahmen U (2012). Oxidation of HMGB1 causes attenuation of its pro-inflammatory activity and occurs during liver ischemia and reperfusion. *PLoS One* **7**:e35379.
- López M, Aguilera R, Pérez C, Mendoza-Naranjo A, Pereda C, Ramírez M, *et al* (2006). The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. *Immunobiology* **211**:127–136.
- López MN, Pereda C, Segal G, Munoz L, Aguilera R, Gonzalez FE, *et al* (2009). Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *Journal of clinical oncology: official journal of the American society of clinical oncology* **27**:945-952.
- Matzinger P (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* **12**:991-1045.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*. **296**:301-305.
- Melief CJ (2003). Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming? *European journal of immunology* **33**:2645- 2654.
- Melief CJ (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* **29**:372-383.
- Mendoza-Naranjo A, Saez PJ, Johansson CC, Ramirez M, Mandakovic D, Pereda C, *et al* (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen

transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *Journal of immunology* **178**:6949-6957.

- Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B *et al* (2004). High mobility group box protein 1: An endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *The journal of immunology* **173**:307-313.
- Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Departamento de estadística e información de salud. En <http://www.deis.cl/?p=2541>; (2015).
- Mussunoor S, Murray GI (2008). The role of annexins in tumour development and progression. *Journal of pathology* **216**:131–140.
- Nichols J, Han Bae Y (2012). Odyssey of a cancer nanoparticle: from injection site to site of action. *Nano today* **7**:606-618.
- Nieboer P, de Vries EG, Mulder NH, van der Graaf WT (2005). Relevance of high-dose chemotherapy in solid tumours. *Cancer treatment reviews* **31**:210-225.
- Okuyama N, Ide Y, Nakano M, Nakagawa T, Yamanaka K, Moriwaki K, *et al* (2005). Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation. *International journal of cancer* **118**: 2803-2808.
- Palm NW, Medzhitov R (2009). Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* **227**:221-233.
- Palucka K, Banchereau J (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews: Cancer* **12**:265-277.
- Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA (1999). Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* **11**:753–761.
- Robert C, Fuhlbrigge R, Kieffer J, Ayehunie S, Hynes R, Cheng G, *et al* (1999). Interaction of dendritic cells with skin endothelium: a new perspective on immunosurveillance. *The journal of experimental medicine* **189**:627-636.
- Rock KL, Kono H (2008). The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology* **3**:99-126.

- Rojo V, Aguilar D, Prado H, Carlos A, Lopez J (2012). Participación de los patrones moleculares asociados al daño en tratamiento convencional del cáncer. *Revista de investigación clínica* **64**:284-293
- Rossi M, Young JW (2005). Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptative immunity. *Journal of immunology* **175**:1373-1381.
- Sallusto F, Lanzavecchia A (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down regulated by tumor necrosis factor alpha. *The journal of experimental medicine* **179**:1109-1118.
- Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Scharniel C, Lenig D, Mackay CR, *et al* (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* **28**:2760-2769.
- Schmitt N, Morita R, Bourdery L, Bentebibel SE, Zurawski SM, Banchereau J, *et al* (2009). Human dendritic cells induce the differentiation of interleukin-21-producing T follicular helper-like cells through interleukin-12. *Immunity* **31**:158-169.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Current opinion in immunology* **15**:138-147.
- Shen H, Heuzey E, Mori DN, Wong CK, Colangelo CM, Chung LM, *et al* (2015). Haptoglobin enhances cardiac transplant rejection. *Circulation research* **116**:1670-1679.
- Shen H, Song Y, Colangelo CM, Wu T, Bruce C, Scabia G, *et al* (2012). Haptoglobin activates innate immunity to enhance acute transplant rejection in mice. *The journal of clinical investigation* **122**:383-387.
- Singh-Jasuja H, Scherer H, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee H, Toes R, *et al* (2000). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *European journal of immunology* **30**:2211.

- Skoberne M, Beignon AS, Bhardwaj N (2004). Danger signals: a time and space continuum. *Trends in molecular medicine* **10**:251-257.
- Somersan S, Larsson M, Fonteneau J, Basu S, Srivastava P, Bhardwaj N (2001). Primary tumor tissue lysates are enriched in heat shock proteins and induce the maturation of human dendritic cells. *The journal of immunology* **167**:4844-4852.
- Sonis ST (2009). Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral oncology* **45**:1015-1020.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, *et al* (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *Journal of immunology* **161**:1083-1086.
- Sridharan S, Dal Pra A, Catton C, Bristow RG, Warde P (2013). Locally advanced prostate cancer: current controversies and optimization opportunities. *Clinical oncology* **25**:499-505
- Stein JV, Soriano SF, M'Rini C, Nombela-Arrieta C, de Buitrago GG, Rodríguez-Frade JM, *et al* (2003). CCR7- mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* **101**:38-44.
- Steinman RM, Idoyaga J (2010). Features of the dendritic cell lineage. *Immunological reviews* **234**:5-17.
- Takeda Y, Shinzaki S, Okudo, Moriwaki K, Murata K, Miyoshi E (2012). Fucosylated haptoglobin is a novel type of cancer biomarker linked to the prognosis after an operation in colorectal cancer. *Cancer* **118**: 3036-3043.
- Tittarelli A, González FE, Pereda C, Mora G, Muñoz L, Saffie C, *et al* (2012). Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer immunology, immunotherapy: CII* **61**:2067-2077.
- Trombetta ES, Ebersold M, Garrett W, Pypaert M, Mellman I (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science* **299**:1400-1403.

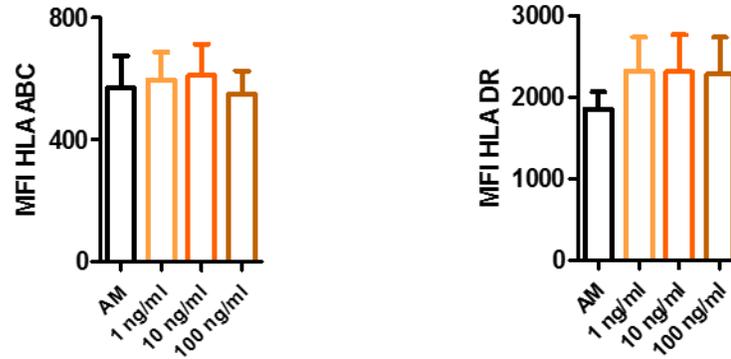
- Tsan MF, Gao B (2004). Endogenous ligands of Toll-like receptors. *Journal of leukocyte biology* **76**:514-519.
- Vázquez MB, Sureda M, Rebollo J (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología* **31**:21-30.
- Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, *et al* (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *Journal of experimental medicine* **209**:1519–1528.
- Wan J, Shi F, Xu Z, Zhao M (2015). Knockdown of eIF4E suppresses cell proliferation, invasion and enhances cisplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cells. *Journal of oncology* **47**:2217-2225.
- Wang Y, Kelly C, Singh M, McGowan E, Carrara A, Bergmeier L, *et al* (2002). Stimulation of th1-polarizing cytokines, c-c chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70. *The journal of immunology* **169**:2422-2429.
- Wei B, Guo C, Liu S, Sun MZ (2015). Annexin A4 and cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **447**:72-78.
- Willshaw A, Grant K, Yan J, Rockliffe N, Ambavarapu S, Burdyga G, *et al* (2004). Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS Letters* **559**:13–21.
- Xie Y, Li Y, Zhang Q, Stiller M, Wang A, Sreilein W (2000). Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *Journal of dermatological science* **24**:25-37.
- Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey K, Bustin M, Oppenheim J (2006). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of leukocyte biology* **81**:59-66.
- Yang F, Brune J, Baldwin D, Barnett D, Bowman B (1981). Identification and characterization of human haptoglobin cDNA. *The journal of biological chemistry* **256**:1055-1057.
- Ye B, Cramer D, Skates S, Gygi S, Pratomo V, Fu L, *et al* (2003). Haptoglobin- $\alpha$  subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer:

Identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clinical cancer research* **9**:2904-2911.

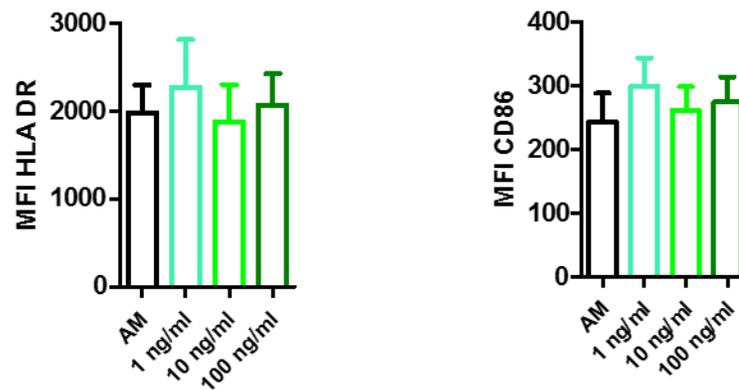
- Yu Y, Tang D, Kang R (2015). Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Frontiers in physiology* **6**:93.
- Zanotti G, Malpeli G, Gliubich F, Folli C, Stoppini M, Olivi L, *et al* (1998). Structure of the trigonal crystal form of bovine annexin IV. *Biochemical journal* **329**:101–106.
- Zigler M, Shir A, Levitzki A (2013). Targeted cancer immunotherapy. *Current opinion in pharmacology* **13**:504-510.
- Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J, Teller S, Junker H, Schmoll D, *et al* (2004). Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumor dissemination. *Cancer letters* **209**:111-118
- Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell* **140**:798-804.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews. Immunology* **6**:715-727.

## ANEXOS

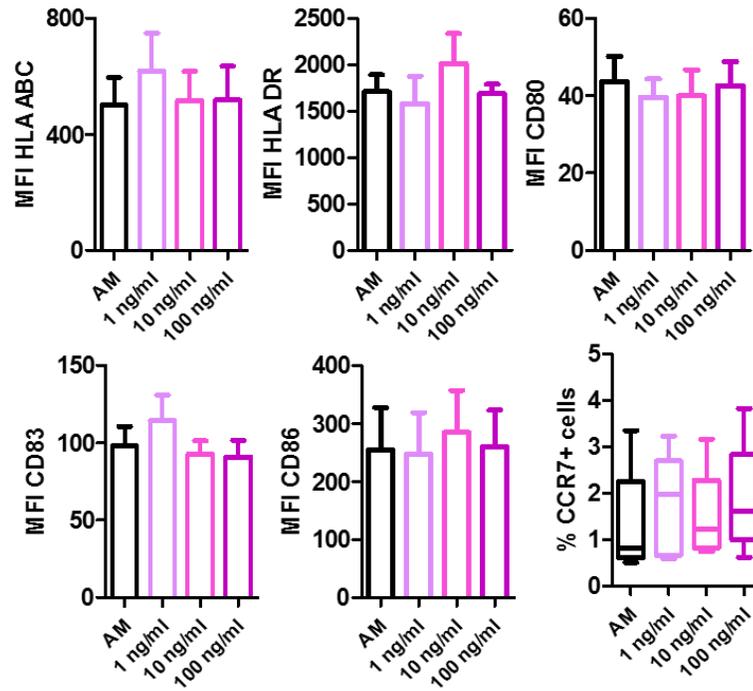
## I. Figuras suplementarias



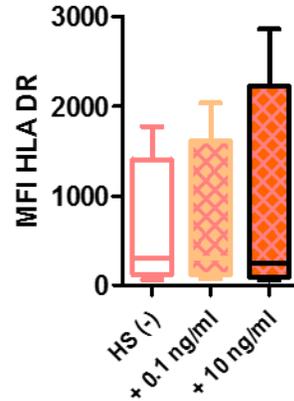
**Figura suplementaria 1. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I y II en iDCs estimuladas con distintas concentraciones de Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con HP en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestran resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes, donde se evaluó la MFI de MHC-I y MHC-II, dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .



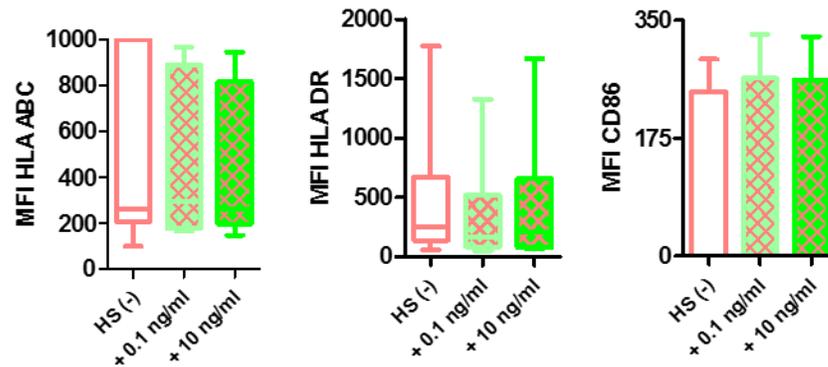
**Figura suplementaria 2. Expresión de molécula de histocompatibilidad clase II y molécula coestimuladora CD86 en iDCs estimuladas con distintas concentraciones de EIF4e.** Monocitos activados fueron estimulados con EIF4e en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestran resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes donde se evaluó la MFI de MHC-II y CD86 dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .



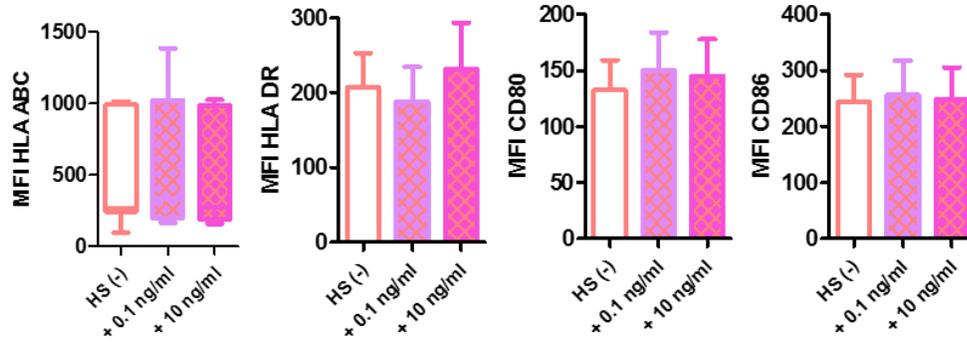
**Figura suplementaria 3. Expresión de marcadores de maduración MHC I, MHC-II, CD80, CD83, CD86 y CCR7 en iDCs estimuladas con Anexina IV.** Monocitos activados fueron estimulados con ANX4 en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml. Se muestra resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes donde se evaluó la MFI de MHC-I, MHC-II, CD80, CD83, CD86, y el porcentaje de células positivas para CCR7, en la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .



**Figura suplementaria 4. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Haptoglobina.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml adicionando HP en concentración de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestran resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes donde se evaluó la MFI de MHC-II dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .



**Figura suplementaria 5. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I, II y molécula coestimuladora CD86 en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en EIF4e .** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con EIF4e en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestran resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes donde se evaluó la MFI de MHC-I, MHC-II y CD86 dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .



**Figura suplementaria 6. Expresión de moléculas de histocompatibilidad clase I, II, y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en iDCs estimuladas con TRIMEL sin *heat shock* enriquecido en Anexina IV.** Monocitos activados fueron estimulados con TRIMEL sin HS (HS(-)) 50  $\mu$ g/ml enriquecido con ANX4 en concentraciones de 0,1 y 10 ng/ml. Se muestran resultados de cuatro experimentos independientes de diferentes donantes donde se evaluó la MFI de MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 dentro de la población CD11c+, medido por citometría de flujo. \* $p < 0,05$ .

## II. Consentimiento informado



### CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Proyecto: Análisis proteómico e inmunológico de lisados de células tumorales: Identificación de nuevas señales de peligro para la activación de células dendríticas.**

**Investigador responsable: Dr. Fermín González**  
**Lugar de la Investigación: Laboratorio de Inmunología Experimental & Cáncer, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Dirección: Sergio Livingstone Polhammer 943, Independencia, Santiago.**

#### 1. INFORMACION SOBRE EL ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

##### 1.1. ¿Cuál es el propósito del estudio?

Este estudio pretende identificar nuevas proteínas, desde células cancerígenas, que permitan aumentar la activación de un tipo especial de células del sistema inmune, llamadas células dendríticas y mejorar así las respuestas clínicas de los pacientes vacunados con este tipo de células. En última instancia, este conocimiento ayudará a mejorar los tratamientos contra diversos tipos de cáncer que utilizan este tipo de células del propio paciente.

##### 1.2. ¿Quién puede participar en este estudio?

Cualquier individuo sano que cumpla con los requisitos del Banco de Sangre para ser donante.

##### 1.3 ¿Por qué debiera yo considerar mi participación como sujeto de investigación en este estudio?

Porque con su participación usted contribuirá al conocimiento de nuevas formas de activar células del sistema inmune del propio individuo para que destruyan las células tumorales. Este conocimiento ayudará a entender mejor la relación que existe entre las células dendríticas y las células cancerígenas durante el desarrollo del cáncer. Los datos obtenidos



en este estudio podrían mejorar significativamente los tratamientos inmunológicos actuales para pacientes con cáncer.

**1.4. ¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme?**

Usted no tiene ninguna obligación de participar en este estudio. Además, si acepta participar puede retirarse en cualquier momento y solicitar que su muestra de sangre sea eliminada del estudio.

**1.5. ¿Si decido participar en el estudio, en que consisten precisamente las evaluaciones, y que tipo de tratamientos o procedimientos me van a practicar?**

De la sangre donada por usted se obtendrá un concentrado de glóbulos rojos que serán utilizados para experimentos de análisis inmunológicos en un laboratorio. La muestra será destinada para la obtención de células mononucleares con las que se generarán células dendríticas con distintos estímulos de maduración y se evaluará su capacidad de generar una respuesta inmune anti-tumoral. Si decide participar, el único procedimiento al que será sometido es la extracción, por una sola vez y en aproximadamente 10 minutos, de 450 ml de sangre desde uno de sus brazos.

**1.6. ¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que éstos se presenten?**

Los riesgos son mínimos y de presentarse alguna complicación, éstas están relacionadas a la toma de muestra y pueden ser una pequeña molestia al momento de punción y la formación de un hematoma en el sitio de punción. Esta toma de muestra es un procedimiento habitual para el Banco de Sangre que cuenta con personal altamente calificado y con extensa experiencia.

**1.7. ¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mí, no caerá en manos equivocadas?**

Cada muestra será almacenada con un código único de ingreso al estudio al cual solo tendrá acceso el investigador responsable del proyecto.

**1.8. ¿Qué beneficios personales puedo yo esperar al participar en este estudio?**

Al participar en este estudio usted no recibirá ningún tipo de beneficio personal, tanto financiero como de servicios. De este modo, estará solo contribuyendo a un proyecto científico orientado a poder mejorar en el futuro los tratamientos contra el cáncer.



**1.9. ¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?**

Este estudio permitirá comprender de mejor forma los mecanismos y factores que influyen en la maduración y activación de células dendríticas. Eventualmente, el conocimiento generado en este proyecto podría ayudar en el futuro a mejorar las vacunas celulares contra el cáncer, beneficiando así a pacientes con cáncer avanzado que actualmente no responden a este tipo de tratamientos y no tienen otras alternativas terapéuticas.

**1.10. ¿Qué harán los investigadores si sufro algún daño durante el estudio?**

Usted no sufrirá ningún daño durante este procedimiento, solo las molestias mencionadas en el punto 1.6.

**1.11. ¿Recibiré algún pago por participar en este estudio?**

Su participación en este estudio es voluntaria y no percibirá ninguna remuneración por ello.

**1.12. ¿Se cobrará a mí, a mi Isapre o compañía de seguros de salud el costo de algunos de estos estudios?**

Este estudio no tiene costo alguno para usted o su sistema de salud.

**1.13. ¿Una vez que yo haya ingresado como sujeto de estudio, a quien tendría que dirigirme para averiguar más acerca del estudio o para hacer llegar algún reclamo respecto al trato que hubiese recibido?**

Para averiguar más acerca de este proyecto, usted puede dirigirse al responsable del estudio Dr. Fermín González, al teléfono 29781839.

**1.14. ¿Si decido no participar en este estudio, que me puede suceder, o que otras opciones tengo si necesito tratamiento?**

El no participar de este estudio no tiene ningún efecto directo para usted.

**1.15. En caso de no ser usada completamente, ¿qué destino final tendrá la muestra de sangre remanente?**

De quedar parte de la muestra después de este estudio, ésta quedará almacenada en contenedores en el Laboratorio de Inmunología Experimental & Cáncer de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, donde eventualmente podrá ser usada en estudios futuros sobre la relación entre sistema inmune y cáncer. Las muestra estarán a cargo del responsable del estudio Dr. Fermín González quien será su custodio. No obstante, usted



**2. DOCUMENTACIÓN DEL CONSENTIMIENTO**

**2.1. ¿Después que firme el documento, quien lo guardará?**

Este documento será guardado y custodiado por el investigador responsable del proyecto.

**2.2. Consentimiento del participante con el estudio como sujeto de experimentación.**

Yo .....RUT:....., **estoy dispuesto y acepto participar en este proyecto de investigación.** He leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar este documento, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto y que recibiré una copia del mismo.

Firma:.....Fecha:.....

**2.3. Consentimiento del investigador o delegado del Director/Ministro de fe.**

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna. He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre del Investigador: .....RUT.....

Firma del Investigador: ..... Fecha:.....

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe.....

RUT..... Firma.....Fecha.....



puede elegir que este material sea eliminado una vez terminado el estudio, para lo cual le solicitamos completar una de las dos opciones que se le presentan a continuación:

- o Almacenada en forma anónima para su uso posterior en otros estudios.
- o Eliminada una vez finalizado el proyecto.

Versión 3.

Edición 5 de Agosto 2016



## ACTA DE EXTENSION DE APROBACION N° 012/16

Santiago, 17 agosto de 2016.

El Comité Ético Científico o de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Antonio Morales Barría. Médico Gastroenterólogo. Presidente  
 Dra. Ana María Madrid S. Médico Gastroenterólogo. Vicepresidente  
 Prof. Verónica Anguita Mackay. Académico. Secretaria de Acta  
 Dr. Sergio Valenzuela P. Médico Gineco-Obstetra  
 Dr. Juan Carlos Prieto D. Médico Farmacología Clínica  
 Srta. Rina Sepúlveda A. Abogado.  
 Dra. Gloria López Stewart. Médico Endocrinóloga.  
 Dra. Teresa Massardo Vega. Médico Cirujano.  
 Dr. Juan Jorge Silva. Médico Cirujano.

Ha analizado su solicitud de extensión de aprobación del proyecto "**Análisis proteómico e inmunológico de lisados de células tumorales: Identificación de nuevas señales de peligro para la activación de células dendríticas**", cuyo investigador principal es El **Dr. Fermín González** de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Participa como co-investigador de proyecto el Dr. Milton Larrondo del Servicio Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para estos efectos se tuvo a la vista el documento:

- Informe semestral de proyecto, fechado 05 de agosto de 2016.
- Consentimiento Informado Versión 3, Edición 05 de agosto de 2016.

**No encontrándose objeciones, el Comité otorga la Aprobación Ética para la continuación del Estudio propuesto, en sesión del día 17 de agosto de 2016, la que se extiende por un plazo de 12 meses a contar de esta fecha.**

Saluda atentamente a Ud.



*Antonio Morales Barría*  
**DR. ANTONIO MORALES BARRIA**  
**PRÉSIDENTE**  
**COMITÉ ETICO CIENTIFICO**  
**HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE.**