



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

**EFFECTO DE LAS PROTEÍNAS HAPTOGLOBINA, EIF4E Y ANEXINA A4 SOBRE  
LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN *IN VITRO* DE CÉLULAS DENDRÍTICAS  
HUMANAS**

**Sheilah Karol Vivanco Coke**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Fermín González Bergas**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mauricio Budini**

**Adscrito al Proyecto Fondecyt 11130607  
Santiago - Chile  
2017**

## DEDICATORIA

*A mi familia, por su apoyo pleno e incondicional.  
A mis amigos Daniel Bautista y Natalia Loyola, por creer en mi potencial, uno que  
yo misma desconozco.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco enormemente a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, en primer lugar, a mi tutor Dr. Fermín González, por sus múltiples enseñanzas y eterna paciencia y apoyo, y sobre todo, por confiar en que podía desarrollar las habilidades que requieren el trabajo de laboratorio. A mi cotutor, Dr. Mauricio Budini, por acogerme, responder mis dudas con la mejor disposición y por su preocupación constante de aportar al desarrollo de este trabajo. A Camila, por enseñarme el camino, sin sus enseñanzas hubiese estado eternamente perdida. A Marjorie, por su apoyo, contención y por enseñarme a valorar el método científico, su aporte en este trabajo hizo la diferencia. A Francisca, mi compañera de tesis, su apoyo y palabras fueron luz, con este trabajo terminamos esta etapa. A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología Antitumoral, del Dr. Flavio Salazar y Laboratorio de Regulación e Inmunología del Cáncer, de la Dra. Mercedes López, por sus contribuciones y por abrirme las puertas de sus laboratorios, pero además, por haberme hecho parte del grupo humano. En especial quiero agradecer a Ignacio y a Daniel, por su inmensa disposición a responder todas mis preguntas y ayudarme en lo que necesitase; y a Fabián, por su excelente gestión y disposición. Me llevo el más profundo respeto por el riguroso trabajo que día a día se desarrolla en estos pequeños lugares. A todos, muchísimas gracias.

Agradezco también a mi familia, pilar de mi vida, por levantarme cada vez que he caído, porque sé que siempre estarán ahí; ustedes me han enseñado que con esfuerzo y sacrificio, todo en la vida se logra.

Por último, agradezco a mis amigos Marta, María Fernanda, Alexis, Daniel, Natalia, Romina, Sebastián, Rubén; en general a todas las personas que hicieron de mi paso por la universidad una hermosa experiencia, sin ustedes, no hubiese mantenido la poca cordura que me queda. Gracias por acompañarme en este arduo proceso. Los llevo por siempre en mi corazón.

## ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Cáncer	9
Sistema Inmune y su rol en el desarrollo del cáncer	11
Inmunoterapia contra el cáncer	13
Células Dendríticas: presentadoras de antígenos profesionales	16
Migración y tráfico celular de células dendríticas	19
Patrones moleculares asociados a daño y muerte celular inmunogénica	22
TRIMEL como fuente de moléculas inmunogénicas	24
Análisis proteómico del lisado TRIMEL	25
Hatoglobina, EIF4E y Anexina A4	26

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 29

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración ética	30
Generación <i>in vitro</i> de DCs a partir de monocitos de sangre periférica	30
Lisado de células tumorales TRIMEL y proteínas de estudio	32
Estimulación	32
Fenotipificación de células estimuladas	33
Ensayos de trans migración <i>in vitro</i>	34
Análisis estadístico	35

RESULTADOS

DCs pueden ser generadas <i>in vitro</i> a partir de PBMC a través de un protocolo de 48 horas	37
HP no induce la expresión de marcadores de maduración en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	40



EIF4E aumenta discretamente la expresión de CD86 respecto del control INS en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	41
ANXA4 no induce la expresión de marcadores de maduración en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	43
La combinación de las proteínas HP y EIF4E (HE) aumenta la expresión de las moléculas CD83 y CD86 en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	44
La combinación de las proteínas HP y ANXA4 (HA) no genera cambios en el patrón fenotípico de DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	46
La combinación de las proteínas EIF4E y ANXA4 (EA) aumenta la expresión de CD83 cuando se compara con AM en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	47
La combinación de las tres proteínas en conjunto aumenta la expresión de CD83 y CD86 en DCs humanas generadas <i>in vitro</i>	48
DCs humanas generadas <i>in vitro</i> aumentan su expresión de CCR7 cuando son estimuladas con HP, EIF4E, HE; y especialmente, HEA	50
Las proteínas HP, EIF4E y las combinaciones HE, EA y HEA inducen la trans migración <i>in vitro</i> de DCs hacia la quimioquina CCL19	54
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXOS	
Figuras suplementarias	75
Consentimiento informado	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ab: Anticuerpo

Ag: Antígeno

AM: Monocito activado

ANXA4: Anexina A4

CCL: Quimioquina ligando

CCR: Receptor de quimioquinas

CD11c: Integrina  $\alpha X$

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

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

CRT: Calreticulina

CTL-4: *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

DAMPs: *Damage Associated Molecular Patterns*

DC: Célula dendrítica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECNT: Enfermedades crónicas no transmisibles

EIF4E: *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

FBS: Suero fetal bovino

FPRL2: *Formyl peptide receptor-like 2*

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

ICAM: *Intercellular Adhesion Molecule*

ICD: Muerte celular inmunogénica

iDC: Célula dendrítica inmadura (no estimulada)

IL-4: Interleuquina 4

KO: *Knock-out*

LB: Linfocito B

LB: Linfocito B

LT: Linfocito T

MFI: Intensidad media de fluorescencia

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MM: Melanoma maligno

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer salino fosfato

PRR: Receptor de reconocimiento de patrones

RNA: Ácido ribonucleico

SEM: Error estándar de la media

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: Lisado celular derivado de tres líneas tumorales de melanoma alogénicas

VCAM: *Vascular cell adhesion molecule*

## 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 *shock* térmico, inducen una potente respuesta inmunológica en pacientes con melanoma. El lisado TRIMEL funciona tanto como una fuente de antígenos tumorales, así como induciendo la maduración de las DCs mediante patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Dada las características de este lisado, se identificó el perfil proteómico de TRIMEL, dando como resultado 71 proteínas diferencialmente sobre-expresadas. Así, se seleccionaron las proteínas Haptoglobina (HP), EIF4E y Anexina A4 (ANXA4), como candidatas a nuevos DAMPs. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de estas proteínas y sus combinaciones para inducir la maduración de DCs humanas y su consecuente migración. Mediante técnicas *in vitro* se generaron DCs para ser estimuladas con las proteínas de estudio y sus combinaciones. Los resultados obtenidos indican que las proteínas por sí solas no son capaces de generar cambios en el fenotipo de las DCs; sin embargo, sus combinaciones sí logran algunos resultados. Además, la migración se vio favorecida por HP, EIF4E y las combinaciones de HP+EIF4E, EIF4E+ANXA4 y HP+EIF4E+ANXA4. A pesar de los resultados, es necesario realizar más estudios que permitan validar o descartar que las proteínas estudiadas tengan funciones como DAMPs.

## INTRODUCCIÓN

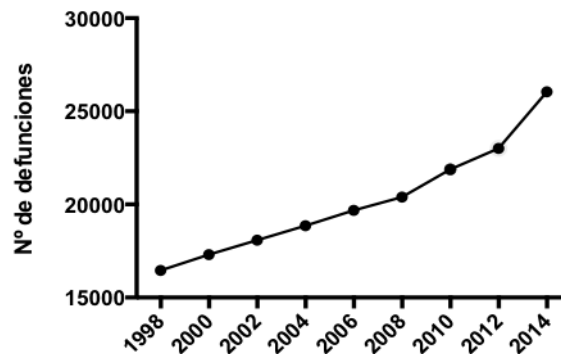
### Cáncer

Cáncer es el nombre común que se le da a un conjunto de enfermedades producidas por la proliferación descontrolada de células anormales con la capacidad de invadir y destruir tejidos. La carcinogénesis es el proceso mediante el cual una célula normal se convierte en una célula cancerígena; comprende varias etapas a través de las cuales las células adquieren características especiales producto de fallas en la regulación de la división celular, disfunción de los mecanismos de control de errores en la reproducción y muerte celular, y pérdida de especialización. Sin embargo, se han descrito recientemente otras alteraciones de las funciones celulares, tales como la reprogramación del metabolismo y el desarrollo de la capacidad de evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011). Existen más de 100 tipos distintos de enfermedades neoplásicas malignas o cáncer, con variadas características en relación a su agresividad, progresión, sobrevida, tratamiento y pronóstico.

En Chile, desde la segunda mitad del siglo XX, se comienza a experimentar el fenómeno de Transición Demográfica, que consiste, básicamente, en la modificación de la pirámide de población, aumentando progresivamente los segmentos mayores. En este sentido, el perfil de las principales enfermedades y causas de muerte también ha experimentado un proceso de transición que ha marchado de forma paralela con los cambios demográficos: desde las enfermedades infecto-contagiosas como principal causa de muerte hacia las denominadas Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT) (Omran, 1971).

El cáncer es una de las ECNT que más ha aumentado su prevalencia en las últimas décadas (Figura 1) (66% entre 1998 y 2014 en Chile (Ministerio de Salud, 2014)); posicionándose como la segunda causa de muerte y constituyendo, por tanto, un problema de salud pública propio de nuestro tiempo. A nivel mundial se observan las mismas tendencias, estimándose un drástico aumento de la cantidad

de casos nuevos, que evolucionará desde los 14 millones en 2014, para llegar al orden de los 24 millones de nuevos casos para 2030. (Bray et al., 2015).



**Figura 1. Aumento de muertes registradas por cáncer en los últimos 16 años.** Número de defunciones registradas por neoplasias malignas desde 1998 al 2014. Consolidado de datos disponibles en el Departamento de Estadísticas e Información de Salud. Minsal, 2014.

Los tratamientos convencionales para el cáncer consisten, desde hace décadas, en cirugía, radioterapia y quimioterapia. Si bien estos han tenido grandes avances con el desarrollo de nuevas drogas y tecnologías en salud, sus costos asociados han aumentado progresivamente, mientras que sus efectos adversos asociados no han disminuido en forma considerable (Nieboer, de Vries, Mulder, & van der Graaf, 2005). Además, su eficacia aún es controversial frente a tumores sólidos y metástasis. Tal es el caso del Melanoma Maligno (MM), Carcinoma de Células Escamosas de Cabeza y Cuello y Cáncer de Próstata; que responden de buena manera cuando son detectados precozmente, pero una vez que presentan diseminación a distancia (cáncer de etapas III y IV), se resisten a tratamientos convencionales con un pronóstico desfavorable y una sobrevida que no supera un año (Marzuka, Huang, Theodosakis, & Bosenberg, 2015; Murphy et al., 2015). El tratamiento convencional de estos cánceres conlleva enormes costos de mantención, alteraciones físicas y problemas psicológicos que afectan muy negativamente la calidad de vida de los pacientes; se estima que en Chile actualmente se gastan US\$2.100 millones en cuidados y tratamientos del cáncer,

sumado a la productividad laboral perdida a causa de estas enfermedades, que llega a los US\$3.5 billones (de la Jara et al., 2015).

Lo anteriormente expuesto, ha impulsado la investigación en distintas áreas con el fin de desarrollar terapias nuevas mejor toleradas, menos costosas y más efectivas que pudieran ayudar a pacientes con enfermedades metastásicas avanzadas. Una de las estrategias con mayor potencial es la inmunoterapia, que consiste en la modulación y estimulación del sistema inmune del paciente contra las células neoplásicas.

### **Sistema inmune y su rol en el desarrollo del cáncer**

El sistema inmune comprende una serie de órganos, estructuras, células y procesos biológicos que trabajan coordinadamente con la finalidad de proteger al individuo contra enfermedades y mantener la homeostasis, lo que constituye la respuesta inmune, la que puede dividirse en innata y adaptativa, según la especialización de cada una. La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa del hospedero, en ella participan células y moléculas que actúan de manera rápida contra agentes extraños, y que además desempeñan un rol controlador de la respuesta inmune adaptativa. Dicho control comienza con el reconocimiento de patógenos a través de receptores presentes en células presentadoras de antígenos, lo que dispara una respuesta inflamatoria que desencadena finalmente la activación de la respuesta adaptativa (Iwasaki & Medzhitov, 2015). En la respuesta inmunitaria adaptativa, en cambio, participan principalmente Linfocitos T (LT) y Linfocitos B (LB) y que, entre otras funciones de importancia, son corresponsables de una característica fundamental de esta inmunidad, la denominada “memoria inmunológica”. Esta consiste en el desarrollo de la capacidad de generar una respuesta inmune contundente y rápida ante la exposición de agentes patógenos que habían sido identificados en eventos anteriores. Esto es posible gracias a que luego de un primer encuentro con un agente extraño, parte de las células inmunitarias se convierten en células de memoria y pueden mantenerse circulando en estado inactivo hasta el

reconocimiento de un agente patógeno familiar, lo que dispara una rápida respuesta, en comparación con una respuesta clásica del sistema (Ahmed & Gray, 1996).

Se ha demostrado que la capacidad de reconocimiento del sistema inmune no se limita al clásico modelo de lo propio versus lo patógeno y lo propio versus lo no propio, sino que, además, es capaz de diferenciar entre agentes propios normales y alterados. Este es, en efecto, el punto de intersección entre las enfermedades neoplásicas y la acción del sistema inmune.

Ya en la década de 1970, se propuso una descripción de este proceso mediante la denominada hipótesis de la Inmunovigilancia (Burnet, 1970), entendida como aquella función fisiológica consistente en la capacidad del sistema inmune de reconocer y destruir células neoplásicas. Más recientemente, se ha acuñado el concepto de Inmunoedición del cáncer para hacer referencia a un proceso de tres etapas: inmunovigilancia, inmunoselección e inmunosubversión (Reiman, Kmiecik, Manjili, & Knutson, 2007).

La etapa de inmunovigilancia se basa en el reconocimiento de antígenos expuestos por las células neoplásicas y que el sistema inmune puede reconocer como agentes patógenos, lo que posibilita una respuesta inmune antitumoral tendiente a eliminar dichas células alteradas (Zitvogel, Tesniere, & Kroemer, 2006). A medida que el mecanismo de inmunovigilancia opera, se evidencia la sobrevivencia de células neoplásicas que han desarrollado mecanismos de resistencia a la acción de agentes antitumorales, por efecto de su exposición a las presiones de selección propias del microambiente tumoral, caracterizado por baja tensión de oxígeno, pobre irrigación, carencia de nutrientes, acidosis y privación de agentes reguladores como, por ejemplo, factores de crecimiento. El desarrollo de estas capacidades celulares para evadir la acción de los agentes del sistema inmune se denomina como Inmunosubversión (Hegmans & Aerts, 2014).

Los procesos de inmunoselección e inmunosubversión determinan la sobrevivencia de células neoplásicas con un elevado potencial maligno, que



promueven la aparición de un fenotipo tumoral caracterizado por la progresivamente menor capacidad de ser reconocido por agentes inmunológicos como un agente susceptible de ser eliminado, lo que se produce conjuntamente con el aumento de la capacidad de inhibición de los mecanismos de acción antitumoral (Dunn, Old, & Schreiber, 2004). La expresión de este fenotipo tumoral se condice con etapas de la enfermedad de cáncer en la cual se presentan ya masas tumorales clínicamente identificables y con plena capacidad de metástasis, razón por la cual resulta relevante el conocimiento de los mecanismos inmunitarios intervinientes en el desarrollo de enfermedades malignas, para así descubrir o diseñar agentes capaces de modular dicha respuesta para aumentar su efectividad y eficacia. Lo anterior, en especial atención al hecho de que nos enfrentamos a un perfil epidemiológico caracterizado por el aumento de la prevalencia e incidencia de este tipo de enfermedades.

### **Inmunoterapia contra el cáncer**

La posibilidad de tratar a los pacientes con cáncer mediante métodos inmunológicos ha resultado de mucho interés, principalmente debido a que las respuestas inmunitarias, a diferencia del uso de quimioterapia y radioterapia, por ejemplo, son específicas, en tanto tienen la capacidad de reconocimiento de antígenos tumorales para la eliminación selectiva de células alteradas sin lesionar a la mayoría de las células normales, vecinas o no; por tanto, la inmunoterapia podría ser uno de los tratamientos antitumorales con menor ocurrencia de efectos adversos asociados a la terapia. La inmunoterapia antitumoral tiene por finalidad la modulación y estimulación del sistema inmune propio del paciente contra células neoplásicas, ya sea fortaleciendo la respuesta inmunitaria débil del anfitrión, o bien proveyendo directamente de agentes químicos y celulares al organismo, como, por ejemplo, anticuerpos o LT específicos para el tumor a tratar. Estos esquemas de tratamiento se denominan Inmunoterapia activa y pasiva, respectivamente.

En este ámbito, los avances en investigación han permitido identificar nuevos blancos terapéuticos en distintas células tumorales e inmunes, que han permitido el desarrollo de un amplio rango de anticuerpos monoclonales destinados a modular la respuesta inmune antitumoral y erradicar los tumores. Entre estos avances, algunos se han orientado a la inducción de respuestas antitumorales *in vivo*, mediante la modulación de agentes inmunitarios (Eggermont & Robert, 2011). Se han divulgado experiencias exitosas en el uso de sustancias moduladoras de la respuesta inmune, acompañadas o no por quimioterapia, que han reportado disminuciones significativas en la ocurrencia de metástasis. Sin embargo, no han logrado demostrar un impacto apreciable en el mejoramiento de la calidad de vida de los pacientes o en el aumento de sus tasas de sobrevivencia a la enfermedad (Agarwala et al., 2002).

Los principales estudios clínicos en este campo, han empleado la administración de sustancias, como interleuquinas (Keilholz et al., 2005); como así han empleado la transferencia de células, como LT CD8+ tumor-específicos en esquemas de tratamiento con y sin inmunosupresión, que si bien mostraron cierto grado de efectividad en la reducción de masas tumorales, han sido probados en un pequeño número de pacientes y con el reporte de frecuentes reacciones adversas (Rosenberg, Restifo, Yang, Morgan, & Dudley, 2008). Recién en 2011, la Administración Federal de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos aprobó la administración del anticuerpo monoclonal humano anti-CTL4, Ipilimumab®, a pacientes con MM metastásico, cuyo mecanismo de acción consiste en el bloqueo de un fuerte inhibidor de la activación de LT citotóxicos, mostrando resultados alentadores (Hodi et al., 2010). Experiencias similares se han obtenido con pruebas clínicas en pacientes con cáncer en fase I y II de la administración de anticuerpos monoclonales que inactivan moléculas co-inhibitorias de linfocitos T activados (Ascierto et al., 2012).

En razón de lo anterior, una de las técnicas que más interés ha despertado en el último tiempo son las vacunas basadas en Células Dendríticas (DCs), que permitirían estimular la respuesta inmune adaptativa antitumoral endógena del paciente y proveer de protección inmunitaria en el largo plazo (Palucka &

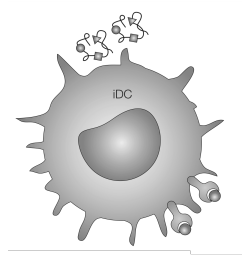
Banchereau, 2012). La obtención de estas vacunas, se realiza más frecuentemente mediante el cultivo *ex vivo* de DCs del paciente en exposición a antígenos tumorales específicos, para luego reinyectar estas células en el paciente. En Chile, Salazar-Onfray y colaboradores han reportado mejorías de la sobrevida a largo plazo en cerca del 60% de un grupo de más de 100 pacientes con MM en etapa IV gracias a la administración de una vacuna contra MM basada en células presentadoras de antígenos tumorales (TAPCells), obtenidas por la estimulación de monocitos activados (AM) que, al ser expuestos al lisado TRIMEL, experimentaron una rápida maduración (Aguilera et al., 2011). Sin embargo, en estos estudios cerca del 40% de los pacientes tratados no presentaron una sobrevida significativamente mayor (López y cols., 2009). Esta limitación se debe, probablemente, a la inducción de tolerancia por péptidos derivados de tumores dominantes únicos, la ausencia de cantidades suficientes de señales de daño inmunogénicas, tanto en la obtención *ex vivo* de DCs como en la inmunización, o bien por deficiencias en el procesamiento y presentación de antígenos en las DCs inyectadas (Aguilera et al., 2011). Para mejorar el uso terapéutico de las estrategias basadas en vacunas de DCs es importante entender su biología y como ejercen su importante rol orquestador en ambos brazos de la respuesta inmune, particularmente en el contexto del microambiente tumoral.

A pesar de los enormes avances en este campo, las estrategias inmunoterapéuticas aún están lejos de ser totalmente confiables en la mayoría de los casos y tipos de cánceres. La generación de respuestas antitumorales clínicamente efectivas es un proceso complejo y requiere de la participación coordinada y exitosa de múltiples agentes y mecanismos. En este contexto, se perspectiva que la combinación de terapias que apunten a distintas etapas de la respuesta inmunitaria antitumoral, actúen como sinergistas para generar respuestas más fuertes, prolongadas y efectivas en la destrucción tumoral durable (Vanneman & Dranoff, 2012).

## **Células Dendríticas: presentadoras de antígenos profesionales**

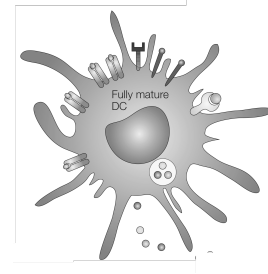
Las DCs son un grupo de leucocitos migratorios, finamente distribuidos que se especializan en la captura, transporte, procesamiento y presentación de Antígenos (Ag) a LT (Hart, 1997). Se caracterizan por una gran plasticidad funcional, iniciando y regulando inmunidad y tolerancia, constituyen el nexo entre los brazos innato y adaptativo de la respuesta inmune (Hoebe, Janssen, & Beutler, 2004). Se originan a partir de células progenitoras de la médula ósea por dos vías de diferenciación: la línea mieloide, con dos subtipos; y la linfoide (Dauer et al., 2003).

Los progenitores hematopoyéticos de médula ósea dan origen a precursores de DCs que circulan hasta asentarse en sangre y tejidos linfáticos y no linfáticos, donde residirán como Células Dendríticas Inmaduras (iDCs). Las iDCs se caracterizan por poseer alta capacidad fagocítica y endocítica mediada por receptores (Robson, Hoves, Maraskovsky, & Schnurr, 2010), que facilitan la captura de Antígenos (Ag) previamente reconocidos por Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs), expresados principalmente por las células presentadoras de antígenos; alta sensibilidad a quimioquinas inflamatorias y baja sensibilidad a quimioquinas homeostáticas, bajos niveles de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clases I y II (MHC-I y MHC-II) y de moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD86 y CD83, este último conocido marcador de maduración de DCs; en su membrana plasmática (e Sousa, 2006). Posteriormente al encuentro con un patógeno, las DCs adquieren un fenotipo maduro, mediante un proceso que comprende una serie de eventos coordinados, tales como la pérdida de los receptores endocíticos y fagocíticos, el aumento de la producción y expresión de moléculas MHC I y II y coestimuladoras, cambios en la maquinaria de procesamiento antigénico, en el perfil de respuesta a quimioquinas y aumento de expresión del receptor de quimioquina C-C tipo 7 (CCR7), además de cambios en la morfología celular y secreción de citoquinas (Sato & Fujita, 2007) (Figura 2).



### **iDC**

- Alta capacidad fagocítica y endocítica
- Sensibilidad a quimioquinas inflamatorias
- Baja expresión de MHC I y II
- Baja expresión de moléculas coestimuladoras



### **DC madura**

- Baja capacidad endocítica y fagocítica
- Sensibilidad a quimioquinas de *homing* a linfonodos
- Alta expresión de MHC I y II
- Alta expresión de moléculas coestimuladoras
- Secreción de citoquinas inflamatorias

**Figura 2. Esquema de características principales entre DCs inmaduras y maduras.** Modificado de Hackstein y Thomson, 2004.

La principal labor de una DC madura consiste en la presentación de Ags. En efecto, la presentación de Ags intra y extracelulares por DCs es capaz de inducir una respuesta inmune mediada por LTs CD4+ y CD8+. Más aún, se ha descrito que las DCs son las únicas células capaces de presentar péptidos exógenos cargados en moléculas del MHC-I a LT CD8+ vírgenes (*naive*), en un mecanismo conocido como presentación cruzada (Melief, 2003), la cual juega un rol importante en la respuesta inmune antitumoral. La presentación cruzada mediada por DCs es la única forma natural y relevante descrita para la presentación de antígenos asociados a tumores, lo que la convierte en una de las características clave de las DCs maduras (Melief, 2008).

El reconocimiento de que las DCs son importantes reguladoras de las respuestas inmunes, junto al gran desarrollo en el área de la inmunoterapia del

cáncer, han llevado al desarrollo de nuevas técnicas para obtener grandes números de DCs *in vitro* (Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Se ha visto que las DCs residentes en tejidos periféricos pueden también originarse a partir de monocitos de sangre periférica cuando son reclutados hacia los tejidos por señales pro-inflamatorias (Steinman, 2003). De hecho, se ha demostrado que DCs humanas pueden diferenciarse *in vitro* desde varias fuentes celulares, incluyendo médula ósea, sangre de cordón umbilical, y Células Mononucleares de Sangre Periférica (PBMC) usando una variedad de citoquinas y factores de activación como el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF) e Interleuquina 4 (IL-4) (Bonasio & von Andrian, 2006).

La eficacia de los protocolos de vacunación que utilizan DCs generadas *ex vivo* depende de varios factores, incluyendo el patrón de receptores expresados por la célula y sus propiedades biológicas, además del estado de maduración o activación de las DCs. En este contexto, las estrategias vacunatorias dirigidas a inducir inmunidad contra el cáncer necesitan incluir una estrategia para producir DCs maduras *ex vivo* de forma eficiente (Tacken, de Vries, Torensma, & Figdor, 2007). Así, el desarrollo de DCs maduras capaces de polarizarse a respuestas ya sea Th1 –asociada a inmunidad celular-, Th2 –asociada a inmunidad humoral- o de perfil tolerogénico, está influenciada por diferentes estímulos que provocan la maduración cualitativa a diferentes estados, sugiriendo que, a través de distintos receptores, por ejemplo los PRRs, las DCs interpretan señales desde el microambiente dependiendo de la naturaleza del estímulo (Lin, Suri, Rahdon, Austyn, & Roake, 1998). Adicionalmente, podría ser ventajoso el uso de combinaciones específicas de estímulos para la maduración, con el fin de producir fenotipos de DCs activadoras antitumorales específicas. Hasta el momento, esta particular combinación de estímulos que conduzca a una inmunidad celular de perfil Th1 no se ha establecido, especialmente para aplicaciones de DCs *in vivo*.

## Migración y tráfico celular de DCs

La migración celular es un proceso importante en el desarrollo y mantenimiento de los organismos pluricelulares. La formación de tejido durante el desarrollo embrionario, la cicatrización y la respuesta inmune, entre otros, requieren de movimientos celulares sincronizados en una dirección particular y hacia sitios específicos (Reig, Pulgar, & Concha, 2014).

El fenómeno de tráfico celular tejido específico o “*homing*” es regulado por moléculas denominadas quimioattractantes o quimioquinas, las que son secretadas por múltiples células del organismo y constituyen la familia más grande de citoquinas, con al menos 50 moléculas identificadas hasta el momento (Bromley, Mempel, & Luster, 2008). Estas proteínas son homólogas entre sí y poseen pesos moleculares de entre 8 y 10 kDa. Las quimioquinas regulan la motilidad y adhesión celular, angiogénesis y génesis de órganos linfoides mediante su unión a receptores ubicados en la superficie celular, denominados receptores de quimioquinas. Existen dieciocho receptores funcionales de quimioquinas pertenecientes a una familia de receptores con siete dominios transmembrana tipo rodopsina (Charo & Ransohoff, 2006). Estos receptores pueden dividirse en dos grupos: los acoplados a proteína G, encargados de modular la cascada de señalización que afecta la movilidad celular por procesos dependientes de actina; y los receptores atípicos, sin capacidad de señalización, encargados de mantener altas concentraciones de quimioquinas en sitios específicos, extrayéndolas de la circulación (Luster, 1998). Entre los receptores reconocidos se incluyen diez CCRs, seis CXCR, uno CX3CR y uno XCR, expresados diferencialmente en todas las células del sistema inmune (Griffith, Sokol, & Luster, 2014). Las DCs expresan constitutivamente once de los dieciocho receptores, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1: Especificidad de ligandos para receptores de quimioquinas expresados en células dendríticas.** Modificado de Griffith, 2014.

Receptor	Quimioquina
CCR1	CCL3, CCL5, CCL7
CCR2	CCL2, CCL8, CCL13
CCR4	CCL17, CCL22
CCR5	CCL3, CCL4, CCL5
CCR6	CCL20
CCR7	CCL19, CCL21
CCR8	CCL1
CCR9	CCL25
CXCR3	CXCL9, CXCL10, CXCL11
CXCR4	CXCL12
CX3CR1	CX3CL1
XCR1	XCL1, XCL2

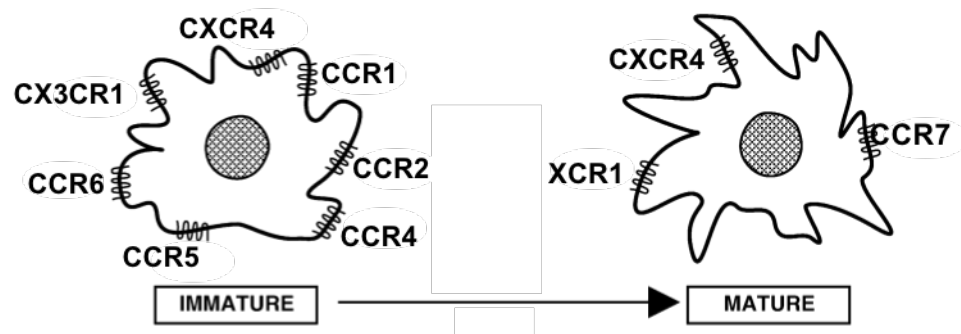
La migración de las DCs es un aspecto crítico para la iniciación de respuestas inmunológicas, tanto protectoras, proinflamatorias como tolerogénicas; y se puede describir como un proceso de varias fases, a saber: 1) el alejamiento del sitio de formación, tanto de DCs nuevas, como de sus progenitores; 2) el reclutamiento de células circulantes, como monocitos periféricos, por ejemplo, hacia tejidos blanco; 3) el alojamiento extravascular y su movimiento intersticial, necesario para el procesamiento de antígenos; 4) y la capacidad de llegar a los vasos linfáticos para viajar, ya sea a órganos linfáticos secundarios, o bien de vuelta a la sangre (Randolph, Angeli, & Swartz, 2005). Durante estos viajes entre tejidos, las DCs deben adaptar su capacidad migratoria para realizar de forma eficiente sus funciones en respuesta a los cambios en el microambiente (Alvarez, Vollmann, & von Andrian, 2008; Heuzé et al., 2013).

Los precursores de las DCs migran desde la médula ósea hacia lugares específicos mediante la circulación sanguínea, 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 CCR1, CCR5 y CCR6 y por moléculas de adhesión, como el ligando CD62P (Sozzani et al., 1998), entre otros. Estos receptores promueven la migración a distintos órganos,



constituyéndose una red de DCs intersticiales en todos los órganos, a excepción de los del sistema nervioso central y los testículos. En su estado inmaduro, las DCs expresan un repertorio de receptores que incluye CCR1, CCR2, CCR5 y CCR6, que se unen a un patrón inflamatorio de quimioquinas que normalmente se expresa por células inflamatorias en endotelios activados. En el sitio inflamatorio, además, las células endoteliales aumentan la expresión de moléculas de adhesión, como E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, involucradas en el reclutamiento de otros leucocitos (Sozzani, 2005).

Con su maduración, las DCs sufren un dramático cambio en el repertorio de receptores de quimioquina que exhiben, disminuyendo la expresión de todos los receptores asociados a inflamación y aumentando la expresión de CCR7 (Figura 3) (Vázquez, Sureda, & Rebollo, 2012), receptor que ha sido reconocido como un participante crítico para la migración de DCs hacia los linfonodos (González, Ortiz, et al., 2014; Sallusto et al., 1998; Stein et al., 2003), dado que posee la capacidad de unirse a los ligandos de quimioquina CCL19 y CCL21, los cuales son expresados en la pared de vasos linfáticos y en linfonodos por células del estroma en el área de los LT para dirigir la migración (Willmann et al., 1998). La importancia de CCR7 en la migración de DCs ha sido demostrada en ratones knock-out (KO) deficientes para CCR7, en los que los linfonodos mostraron estar casi completamente desprovistos de LT vírgenes, mientras que se registraban poblaciones abundantes en sangre, bazo y médula ósea. Además, estos ratones KO mostraron niveles alterados de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad retardada disminuidas (Gunn et al., 1999; Krautwald et al., 2004).



**Figura 3. Receptores de quimioquinas expresados por células dendríticas.**

Cambios en el perfil de expresión de receptores de quimioquinas de una célula dendrítica inmadura versus una madura. Modificado de Sozzani, 2005.

### Patrones moleculares asociados a daño y muerte celular inmunogénica

Los Patrones Moleculares Asociados a Daño (DAMPs) son moléculas endógenas que bajo condiciones normales se encuentran confinadas al ambiente intracelular. Sin embargo, cuando las células sufren estrés, injurias, o están muriendo, estas moléculas son secretadas, liberadas, o expuestas en superficie, con potencial de unirse a receptores de células inmunes, desempeñando un rol de señalización de daño e induciendo, por tanto, una respuesta inflamatoria (Krysko et al., 2012).

Los DAMPs son un conjunto heterogéneo de moléculas de distinta naturaleza, entre las que se incluyen ATP, ácido úrico, Proteínas de Shock Térmico (HSPs), ácidos nucleicos celulares (DNA y RNA), proteínas del grupo de alta movilidad asociadas a cromatina (HMGB1) y factores ligadores de calcio (proteínas de la familia S100), entre otros. Estas moléculas son reconocidas por casi todos los tipos celulares del sistema inmune, principalmente por DCs a través de PRRs en su superficie, como los Receptores Tipo Toll (TLRs), especializados en el reconocimiento de moléculas de estructura conservada, propias y asociadas a patógenos (Tsan & Gao, 2004). Cabe recalcar entonces, que los DAMPs son en su mayoría, moléculas siempre presentes y que bajo condiciones fisiológicas normales desempeñan funciones no inmunológicas (Matzinger, 1994).

La muerte celular inmunogénica (ICD) es un concepto que ha emergido durante las últimas décadas, y que se refiere a aquel proceso de muerte celular, cualquiera de ellos, que conduce a la liberación de DAMPs y que, por lo tanto, dispara una respuesta inmune e inflamación (Garg et al., 2010). Diversos estudios han reportado que líneas de células cancerígenas tratadas *ex vivo* con drogas quimioterapéuticas, terapia fotodinámica o radiación gamma y luego implantadas en ratones singénicos inmunocompetentes, funcionan como vacunas de cáncer, incluso en la ausencia de adyuvantes (Garg et al., 2012), al desencadenar, en efecto la muerte celular inmunogénica de las células neoplásicas. En humanos, se han descrito cinco DAMPs con funciones esenciales y no redundantes: Calreticulina (CRT), HSPs, Interferones de tipo I, ATP y HMGB1, en estudios de inducción de ICD por antraciclinas (Fucikova et al., 2015).

La mayoría de los inductores de ICD estudiados son agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, existen otros estímulos, entre los que se destaca el *shock* térmico, que presentan una notable capacidad de inducir muerte celular inmunogénica. En efecto, se ha demostrado en estudios *in vitro*, que DCs humanas cargadas con células de melanoma tratadas con calor a 42°C, antes de ser lisadas, son más eficientes presentando antígenos a LT CD8+ vírgenes humanos, en comparación a células no tratadas con calor (Shi et al., 2006); lo que podría explicarse por el aumento en la expresión de la proteína de *shock* térmico HSP 70 en las células de melanoma, aumentando la eficacia de la presentación antigénica de DCs.

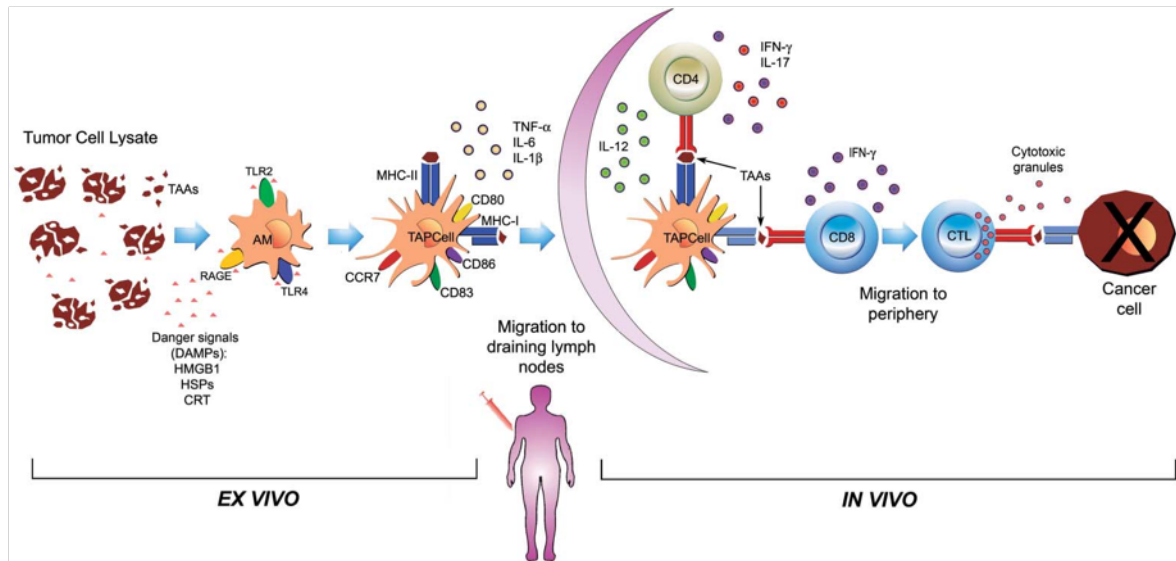
A pesar de la evidencia anterior, el rol de los DAMPs en la inmunidad antitumoral aún no es totalmente claro. De hecho, algunos estudios han mostrado que, por ejemplo, la molécula identificada como DAMP, HMGB1, pareciera ser de vital importancia para la ICD; pero también se ha descrito como asociada a procesos de progresión tumoral en varios modelos (Jube et al., 2012). Además, existe evidencia que indica que las múltiples funciones que puede desempeñar HMGB1 al ser liberada al medio extracelular, podrían atribuirse a su estado de óxido-reducción, dependiendo del microambiente en que se encuentre (Venereau et al., 2012). Actualmente, y a pesar de la alta actividad en este campo de

investigación, no hay consenso sobre los efectos inmunomoduladores de los DAMPs que promueven ya sea inmunidad antitumoral o progresión del cáncer, como también si pueden ser clasificados de acuerdo a la temporalidad de sus funciones.

### **TRIMEL como fuente de moléculas inmunogénicas**

TRIMEL es un lisado obtenido a partir de tres líneas celulares alogénicas de metástasis de melanoma tratadas con *shock* térmico. Se ha demostrado que este lisado puede inducir rápidamente a DCs de fenotipo maduro y activo a partir de AM por citoquinas. La estimulación con TRIMEL de DCs generadas *ex vivo*, ha sido asociada al aumento en la expresión de moléculas de presentación antigénica y coestimuladoras; al aumento en la expresión del receptor CCR7, funcional incluso en ensayos *in vivo* (González, Ortiz, et al., 2014); al aumento de la secreción de citoquinas, y a una potente respuesta de LT contra melanoma (Aguilera et al., 2011).

Respecto a esto, se ha propuesto que los DAMPs presentes en TRIMEL son los responsables de las notables características exhibidas por las DCs producidas *ex vivo* (González, Gleisner, et al., 2014), mediante mecanismos como el aumento de la translocación de CRT desde plasma a la membrana y aumento de la liberación de HMGB1 (Figura 4). Esto se puede asociar con una mejor maduración de las DCs y una eficiente capacidad de presentación antigénica cruzada, respectivamente (Aguilera et al., 2011). Además, se ha estudiado que HMGB1 de TRIMEL co-localiza con el TLR4 de monocitos; cuando este receptor es bloqueado, se inhibe la expresión de marcadores asociados a maduración, citoquinas pro-inflamatorias y del receptor de quimioquina CCR7 (Tittarelli et al., 2012).



**Figura 4. Efectos de lisados derivados de células tumorales bajo estrés en las características fenotípicas y funcionales de DCs de uso terapéutico.** Tomado de (González, Gleisner, et al., 2014).

### Análisis proteómico del lisado TRIMEL

Considerando la mayor capacidad del lisado TRIMEL sometido a *shock* térmico en la maduración de las DCs, se planteó realizar un análisis proteómico comparándolo con su homólogo sin tratamiento para la búsqueda de proteínas sobre-expresadas en el lisado, que pudieran explicar la mayor efectividad en la generación de TAPcells. Para identificar las proteínas candidatas a ser calificadas como nuevos 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) con una profundidad mínima de detección y cuantificación de 3000 proteínas. Las proteínas que fueron exclusivas, o aquellas que se encontraban sobre o sub-reguladas en las muestras de TRIMEL con *shock* térmico, en comparación a aquella muestra sin dicho tratamiento, por al menos un factor de dos (2), fueron consideradas como candidatos iniciales. Se identificaron 71 proteínas significativamente sobre-reguladas en los lisados con *shock* térmico, tales como haptoglobina, vinculina, superóxido dismutasa,

proteínas de la familia EIF y Anexina A4, entre otras. A partir de estos datos, se seleccionaron proteínas que pudieran corresponder a DAMPs mediante los siguientes cuatro criterios de selección: a) se incluyeron proteínas que fueran: 1) filogenéticamente antiguas y conservadas, 2) producto de la expresión de genes *housekeeping* o factores de transcripción, 3) Asociadas a DNA y 4) asociadas a estrés del retículo endoplásmico; b) se excluyeron proteínas ya identificadas como moléculas DAMPs.

Además de estos criterios, se buscó evidencia que relacionara la expresión de estas proteínas con cáncer, así como la posibilidad comercial de adquirirlas. Es así como las proteínas finalmente seleccionadas para este estudio fueron Haptoglobina (HP), EIF4E y Anexina A4 (ANXA4).

### **Haptoglobina, EIF4E y Anexina A4**

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 disulfuro. En la población humana existen dos alelos de HP, Hp1 y Hp2, resultando en dos fenotipos homocigotos, Hp1-1 y Hp2-2, y uno heterocigoto Hp2-1, lo que refleja las variaciones heredadas en sus polipéptidos (Yang, Brune, Baldwin, Barnett, & Bowman, 1983). La función principal de HP es unirse a hemoglobina para formar un complejo estable, y con ello prevenir el daño tisular oxidativo inducido por hemoglobina (Asleh et al., 2003). Asimismo, se han descrito para HP el desempeño de roles como factor protector preventivo en enfermedades inflamatorias de piel asociadas a LT (Xie et al., 2000), biomarcador para el diagnóstico precoz de cáncer de ovario (Ahmed et al., 2004; Ye et al., 2003) y para el diagnóstico y progresión cáncer pancreático y colorrectal (Okuyama et al., 2006; Takeda et al., 2012). Finalmente, en los últimos años se mostró la capacidad de HP para activar DCs en un modelo de trasplante de piel murino (Shen et al., 2012) y, recientemente, estos mismos autores la han asociado a un rol amplificador en la inflamación y consecuente rechazo, en un modelo murino de trasplante cardiaco;

confirmando la existencia de interacciones entre esta proteína y agentes del sistema inmune (Shen et al., 2015).

EIF4E, del inglés *eukaryotic translation initiation factor 4E*, es un polipéptido de 24 kDa que se encuentra formando cuerpos nucleares, así como también un complejo multiproteico denominado EIF4F (Dostie, Lejbkowitz, & Sonenberg, 2000). Su estructura se compone de ocho hebras  $\beta$  antiparalelas y tres hélices (Gross et al., 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 diversos procesos celulares, incluyendo proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Esta proteína se encuentra sobre-expresada en múltiples neoplasias y se ha relacionado a la progresión del cáncer, tumorigénesis y metástasis a distancia, por lo que se ha propuesto en algunos estudios como un potencial blanco terapéutico (Bhat et al., 2015). Respecto a esto, en un estudio *in vitro* en el que se bloqueó EIF4E, se observó una supresión en la proliferación e invasión de células tumorales ováricas (Wan, Shi, Xu, & Zhao, 2015).

Anexina A4 (ANXA4), pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a fosfolípidos dependientes de calcio o anexinas. Presenta un peso molecular de 35,9 kDa (Mussunoor & Murray, 2008) y, su estructura está compuesta por cuatro dominios de anexinas repetidas, cada uno formado por cinco alfa hélices con un motivo de unión a calcio característico (Butsushita, Fukuoka, Ida, & Arii, 2009). En estudios *in vitro* se ha visto que promueve la agregación de vesículas, jugando un rol importante en la exocitosis sináptica y reparación de membranas (Kaetzel et al., 2001; Willshaw et al., 2004); además de modificar las propiedades físicas de la membrana para regular la permeabilidad pasiva (Kaetzel, Chan, Dubinsky, Dedman, & Nelson, 1994) e inducir la señalización de calcio, anticoagulación y resistencia a la apoptosis (Lin, Huang & Juan, 2012). ANXA4 se ha asociado con progresión, invasión, migración, adhesión y resistencia a drogas de una variedad de cánceres, en relación a fenómenos como la regulación de proteínas en cáncer gástrico y de moléculas relacionadas a adhesión en cáncer hepatocelular, y a la resistencia a quimioterapéuticos en cáncer de pulmón (Wei, Guo, Liu, & Sun, 2015). Asimismo, esta proteína se ha encontrado sobre-regulada en cáncer renal

de células claras con función en la migración celular, sugiriendo un rol en la diversificación morfológica y diseminación del cáncer (Zimmermann et al., 2004).



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Las proteínas Haptoglobina, EIF4E y Anexina A4, presentes en el lisado tumoral TRIMEL, y sus combinaciones, inducen la expresión de marcadores de maduración y estimulan la migración *in vitro* de células dendríticas humanas.

### Objetivos

#### Objetivo General

Analizar la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir *in vitro* la expresión de marcadores de maduración y la migración, en células dendríticas humanas.

#### Objetivos Específicos

1. Medir la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir *in vitro* la maduración fenotípica de células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo.
2. Determinar la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir *in vitro* la expresión del receptor CCR7 en células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo.
3. Medir la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir la migración de células dendríticas humanas, mediante ensayos de trans migración *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio de tipo experimental *in vitro*, de análisis cuantitativo.

### Declaración ética

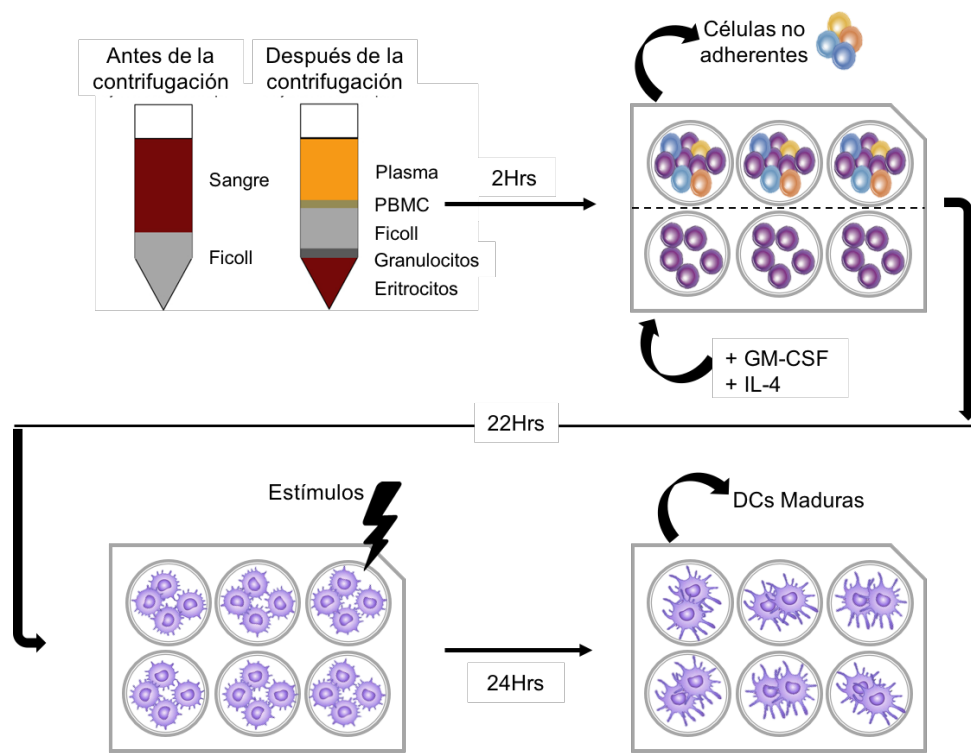
Aprobado por el Comité de Ética Científico para la investigación Biomédica (CECel) en seres humanos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Las muestras utilizadas en este estudio se obtuvieron a partir de donantes sanos que acudieron al Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Todos los donantes firmaron un consentimiento informado previo a la donación.

### Generación *in vitro* de DCs a partir de monocitos de sangre periférica

Concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de donantes sanos fueron utilizados para la extracción de PBMC mediante la generación de un gradiente de densidad por centrifugación. Cada *buffy coat* (20-40 mL por muestra) fue diluido a razón de 1:3 con una solución de PBS 1x (Corning) hasta alcanzar un volumen final de 30 mL por tubo. Posteriormente, se añadieron 10 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare) en el fondo del tubo y estos fueron centrifugados a 1250 rpm por 25 min a 18°C, con aceleración y freno al mínimo. Luego de la centrifugación, se obtuvo el PBMC, anillo ubicado entre el plasma y el Ficoll. Estas células fueron traspasadas a un tubo nuevo, lavadas con PBS 1x y centrifugadas a 1450 rpm por 5 minutos a 4°C. Una vez obtenido el *pellet* de células se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis ACK (Amonio-Cloruro-Potasio) 1x estéril; las células se mantuvieron incubadas en ACK por 10 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con la finalidad de lisar eritrocitos. Una vez completado el tiempo de incubación se centrifugó a 1400 rpm por 5 minutos a 4°C, se eliminó el

sobrenadante y se volvió a lavar con PBS 1X; esta vez se centrifugó a 900 rpm por 10 minutos a 4°C para eliminar plaquetas de la muestra. Las células obtenidas fueron contadas y su viabilidad estimada mediante azul tripán; finalmente se resuspendieron en medio libre de suero fetal bovino, AIM-V (Gibco, Invitrogen Corporation), a una concentración de  $20 \times 10^6$  de células por mL. Las células fueron incubadas en placas de 6 y 12 pocillos (Falcon, con tratamiento para cultivo celular estándar) a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> por 2 horas para lograr la adherencia de monocitos. Las células no adherentes fueron removidas, mientras que las adherentes o monocitos se mantuvieron en cultivo por 22 horas en medio AIM-V suplementado con las citoquinas rhGMCSF (Miltenyi) y rhIL-4 (Miltenyi) a concentración de 800 U/mL y 500 U/mL respectivamente para su diferenciación a iDCs (Sallusto & Lanzavecchia, 1994).



**Figura 5. Esquema de protocolo de generación de DCs.** Generación de DCs humanas *in vitro* a partir de células de sangre periférica.

## Lisado de células tumorales TRIMEL y proteínas de estudio

El lisado tumoral TRIMEL fue gentilmente proporcionado por el Laboratorio de Inmunología Antitumoral (LIAT) del Dr. Flavio Salazar. Este lisado es generado a partir de 3 líneas celulares alogénicas de metástasis de melanoma según protocolo descrito en trabajos previos del laboratorio (Escobar et al., 2005) y fue usado como control positivo.

Las proteínas de estudio como candidatas a señales de peligro fueron adquiridas comercialmente en las siguientes presentaciones: Haptoglobina (HP) (Sigma) liofilizada purificada a partir de plasma humano, EIF4E (ITSIBioscience) recombinante humana líquida purificada a partir de *E. coli* y Anexina A4 (ANXA4) (Abcam) recombinante humana líquida purificada a partir de células HEK293.

Adicionalmente se utilizó la proteína Insulina (INS) (Sigma) liofilizada recombinante humana a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, como control negativo de proteína o de especificidad de respuesta.

## Estimulación

Completadas las 24 horas de cultivo, se establecieron las condiciones de estudio y las células fueron o no estimuladas, como se muestra en la Tabla 2. Los estímulos consistieron en TRIMEL 50 µg/mL (control positivo), INS 100 ng/mL (control de especificidad de respuesta), HP 100 ng/mL, EIF4E 100 ng/mL, ANXA4 100 ng/mL y todas las combinaciones posibles para las proteínas de estudio a la misma concentración que cuando fueron agregada solas, a saber, HP+EIF4E (HE), HP+ANXA4 (HA), ANXA4+EIF4E (EA) y HP+EIF4E+ANXA4 (HEA). Las células fueron estimuladas durante 24 horas. La condición Monocitos Activados (AM) –control negativo-, corresponde a células no estimuladas, mantenidas en el mismo medio en que fueron sembradas por un total de 48 horas.

**Tabla 2. Condiciones de estudio.** Estímulos de maduración adicionados a iDCs, equivalente a AM, para evaluar el efecto de las proteínas candidatas. Las células se mantuvieron en cultivo por 24 horas posteriores a la estimulación.

	AM Sin estímulo	TRIMEL 50 ug/mL	INS 100 ng/mL
HP 100 ng/mL	EIF4E 100 ng/mL	ANX4A 100 ng/mL	HE HP 100 ng/mL + EIF4E 100 ng/mL
HA HP 100 ng/mL + ANX4A 100 ng/mL	EA EIF4E 100 ng/mL + ANX4A 100 ng/mL	HEA HP 100 ng/mL + EIF4E 100 ng/mL + ANX4A 100 ng/mL	

### Fenotipificación de células estimuladas

Luego de mantener las células en cultivo por 48 horas totales, se procedió a realizar la caracterización fenotípica mediante citometría de flujo. Para esto, las células fueron levantadas de cultivo de forma mecánica utilizando rastrillos de células (Corning), se recolectó el medio, traspasándolo a tubos Eppendorf de 1.5 mL debidamente rotulados y se centrifugó a 500 G por 5 min a 4°C. Obtenido el *pellet* de células, se resuspendió en 500 µL de solución PBS1x+FBS2% (Corning) para luego ser contadas. Un total de  $2 \times 10^5$  células fueron utilizadas para el análisis de la correcta diferenciación y maduración. Las células fueron incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente con un bloqueador de receptores Fc (Human TruStain FcX, BioLegend) para evitar la unión inespecífica de los Anticuerpos (Abs). Luego, fueron agregados 50 µL de mix de Abs según diseño experimental: el primer mix contenía los controles de marcaje para isotipo FITC mouse IgG2a κ (Clon MOPC-173, BioLegend), PE mouse IgG2a κ (Clon MOPC-173, BioLegend), PECy7 mouse IgG1 κ (Clon MOPC-21), APC mouse IgG1 κ (Clon MOPC-21, BioLegend), APCeFluor780 mouse IgG2b κ (Clon eBMG2b, eBioscience), AlexaFluor 488 mouse IgG2b κ (Clon MPC-11, BioLegend); el

segundo mix contenía los Abs para las moléculas de estudio a-hCD11c (APC, Clon Bu15; BioLegend), a-hHLA ABC (FITC, Clon W6/32, eBioscience), a-hHLA DR (APC-eFluor780, Clon LN3, eBioscience), a-hCD197 (CCR7) (PE, Clon G043H7, BioLegend), a-hCD80 (BV421, Clon 2D10, BioLegend), a-hCD83 (PECy7, Clon HB15e, eBioscience) y a-hCD86 (BV510, Clon IT2.2, BioLegend). Las células se dejaron incubar con los Ab por 25 minutos a 4°C y en oscuridad. Finalmente, fueron lavadas en PBS1x+FBS2%, centrifugadas a 500 G por 5 min a 4°C y resuspendidas en 200 µL de buffer FACS (BD Biosciences) con 0.1% 7AAD (Viability Staining Solution, BioLegend) para evaluar viabilidad celular.

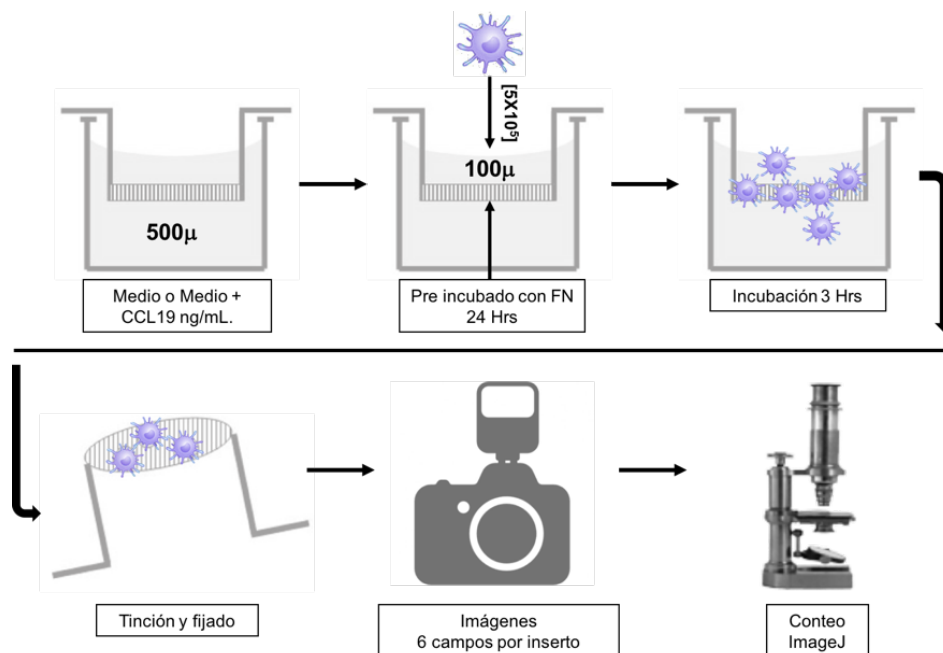
La adquisición de las muestras se realizó en el equipo para citometría de flujo FACSVerse (BD Biosciences). Para el análisis se utilizó el software Flowjo 7.6.1 donde se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MFI) y el porcentaje de células positivas para cada marcador.

### **Ensayos de trans migración *in vitro***

Para evaluar la capacidad migratoria de las células obtenidas, se realizaron ensayos de trans migración en placas Transwell (Corning) de 24 pocillos. Similar al experimento anterior, las células fueron cosechadas de forma mecánica, para ser traspasadas a tubos Eppendorf, centrifugadas, resuspendidas en 500 µL de medio AIM-V y contadas; se arregló la solución para que éstas estuvieran a una concentración final de  $5 \times 10^5$  células por mL. Los insertos fueron preincubados durante 24 horas con una solución de fibronectina a concentración de 2 µg/mL. Se prepararon las placas Transwell de forma tal que en el pocillo inferior se colocaron 500 µL de medio AIM-V solo –control negativo, migración basal-, o suplementado con CCL19 10 ng/mL –quimioquina de homing a linfonodo, ligando del receptor CCR7 expresado en células dendríticas maduras-. En el pocillo superior o inserto se cargaron 100 µL de la solución con células estimuladas con las distintas condiciones de estudio. Las placas se dejaron incubar durante 3 horas a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Cumplido el tiempo de incubación, los insertos fueron trasladados a otra placa que contenía en el pocillo inferior 500 µL de una solución de tinción y fijación

celular a base de cristal violeta y etanol, la membrana se dejó teñir por al menos 45 minutos antes de proceder a lavar.

Para el análisis de la migración, se procedió a tomar fotografías de seis (6) campos por cada inserto, a través de un microscopio invertido de campo claro con un aumento de 40x. Las células en las fotografías fueron contadas utilizando el programa ImageJ 1.51h. Los resultados fueron expresados como índices de transmigración calculados como el número de células migradas hacia la condición experimental (medio suplementado con CCL19) dividido por el número de células migradas en el control negativo (migración basal).



**Figura 6. Esquema de experimentos de migración.** DCs estimuladas fueron usadas para realizar ensayos de migración *in vitro*.

### Análisis estadístico

Para los distintos análisis se utilizó el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Los datos fueron primero analizados para la identificación de *outliers* a través del test de Grubb. Una vez

eliminados los datos identificados como *outlier*, se procedió a realizar el test de Kolmogórov-Smirnov para evaluar la distribución de datos. A partir de este resultado, para comparar la significancia entre las diferencias de dos grupos se utilizó *t-student*, para muestras paramétricas y el test de Mann-Whitney como alternativa para variables no paramétricas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor  $p < 0.05$ .

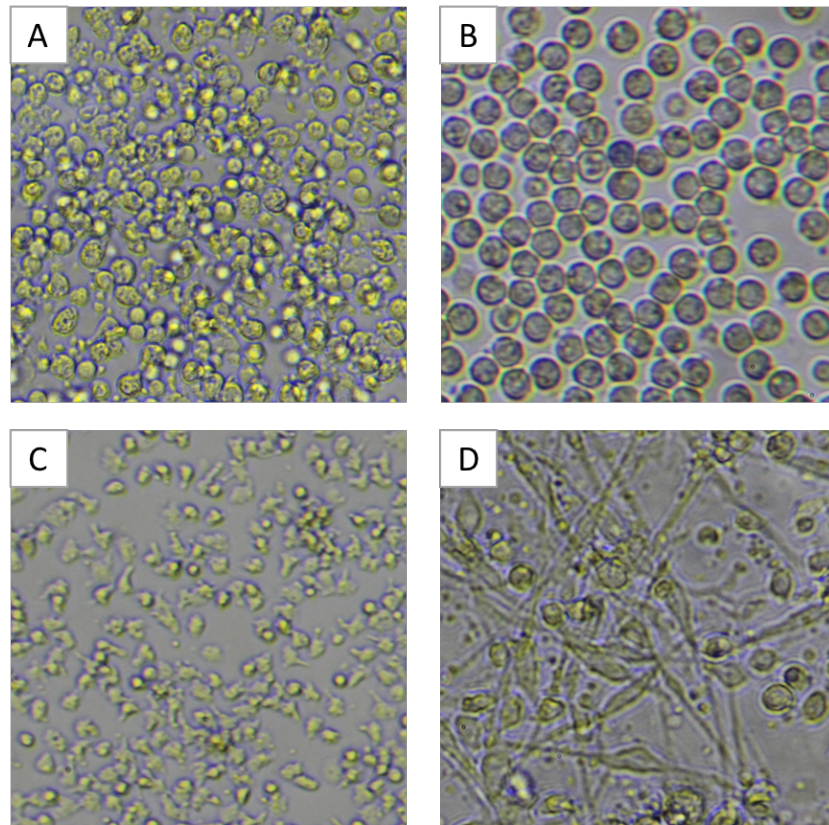


## RESULTADOS

- 1. Medir la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir *in vitro* la maduración fenotípica de células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo**

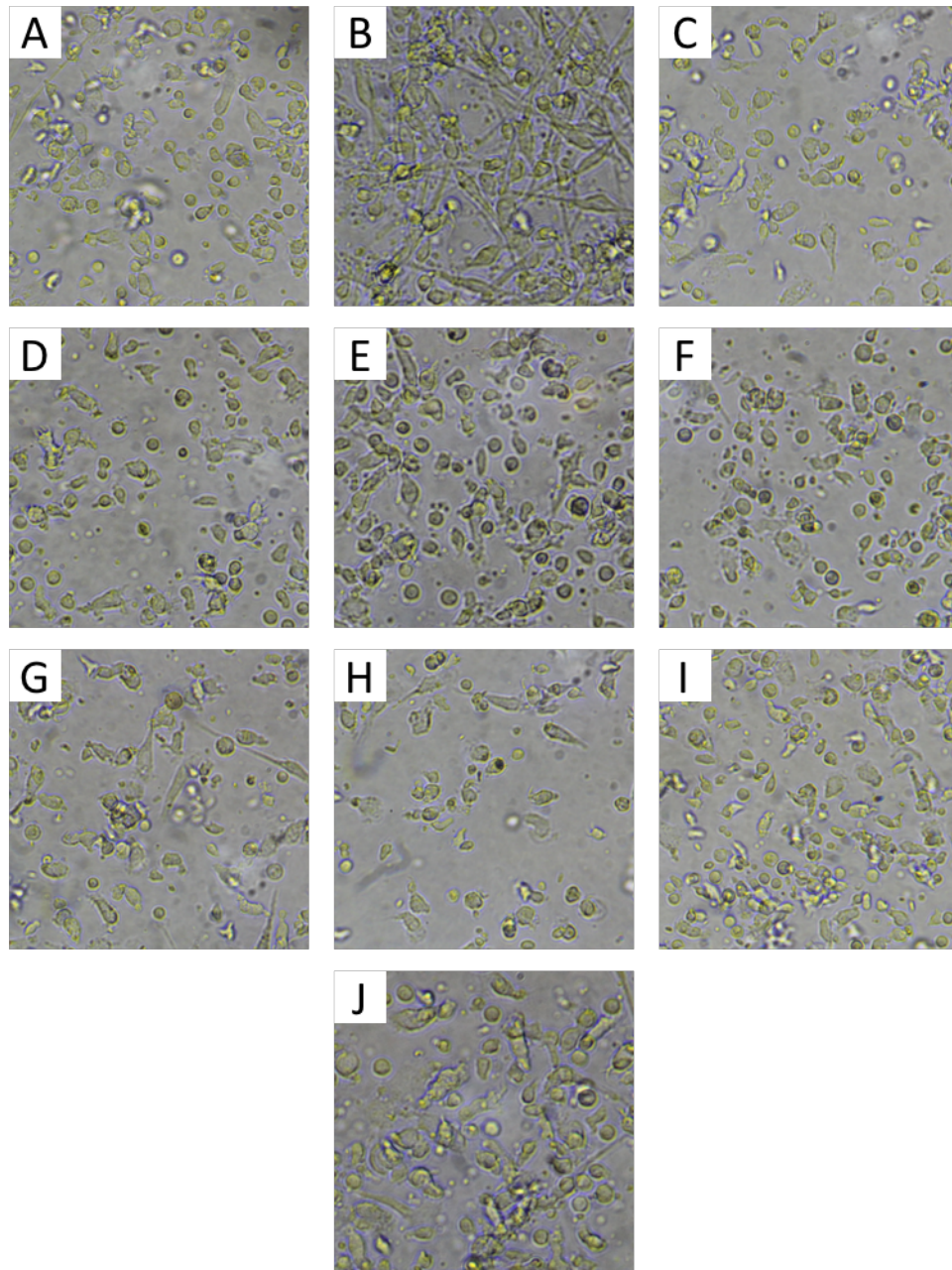
### ***1.1 DCs pueden ser generadas in vitro a partir de PBMC a través de un protocolo de 48 horas***

El primer paso para la realización de este estudio consistió en generar DCs a partir de PBMC. Para ello, desde esta población celular se seleccionaron monocitos por su capacidad de adherencia y se indujo su diferenciación con un coctel de citoquinas (Figura 7B y 7C) (ver materiales y métodos). A las 48 horas de cultivo se observó que las células estimuladas con TRIMEL (control de maduración) adquirieron la morfología estrellada característica de una DC madura (Figura 7D).



**Figura 7. Generación de DCs.** Microscopia de contraste, aumento de 40x. (A) PBMC sembrado en placa de cultivo a una concentración de  $20 \times 10^6$  células por mL, (B) Monocitos adheridos a placa, fueron cultivados en medio suplementado con las citoquinas GM-CSF e IL-4. (C) AM (Monocitos Activados), (D) Las células estimuladas con el lisado TRIMEL se diferencian morfológicamente adquiriendo la característica forma estrellada de una DC madura.

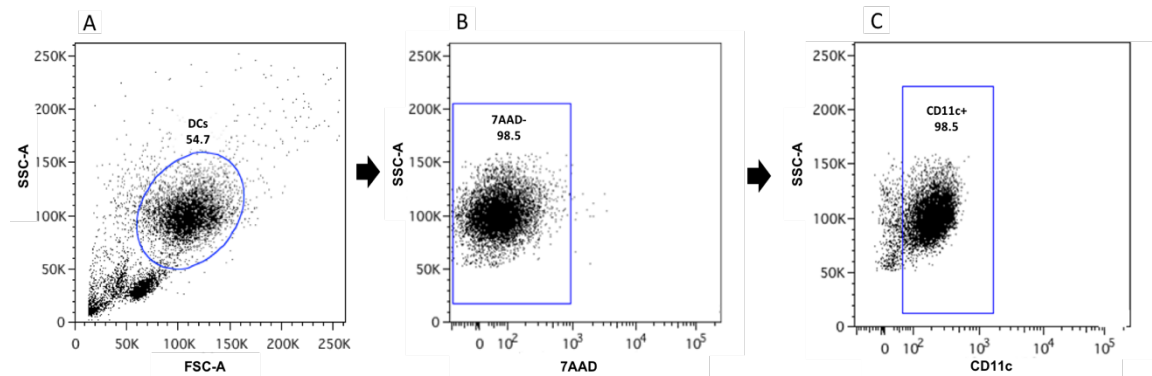
Se procedió a analizar la morfología de las células estimuladas con las distintas proteínas o sus combinaciones, sin embargo, no se observaron cambios, presentando morfología similar a la de AM (Figura 8).



**Figura 8. DCs estimuladas con las proteínas de estudio.** Morfología presentada por DCs estimuladas con (A) AM, (B) TRIMEL, (C) INS, (D) HP, (E) EIF4E, (F) ANXA4, (G) HE, (H) HA, (I) EA, (J) HEA; en concentración de 100 ng/mL durante de 24 horas. Microscopía de contraste, aumento de 40x.

Finalmente, para evaluar el éxito de la generación de DCs, se observó el marcador CD11c a través de citometría de flujo. La estrategia de análisis consistió en la selección de la población correspondiente a DCs según tamaño y

complejidad (Figura 9A), posteriormente usando el marcador de viabilidad 7AAD, se seleccionó la población negativa, es decir, aquellas células vivas (Figura 9B), desde ahí se rescataron aquellas células positivas para el marcador CD11c. Para todas las muestras analizadas, al menos un 60% correspondía a células CD11c+ (Figura 9C).



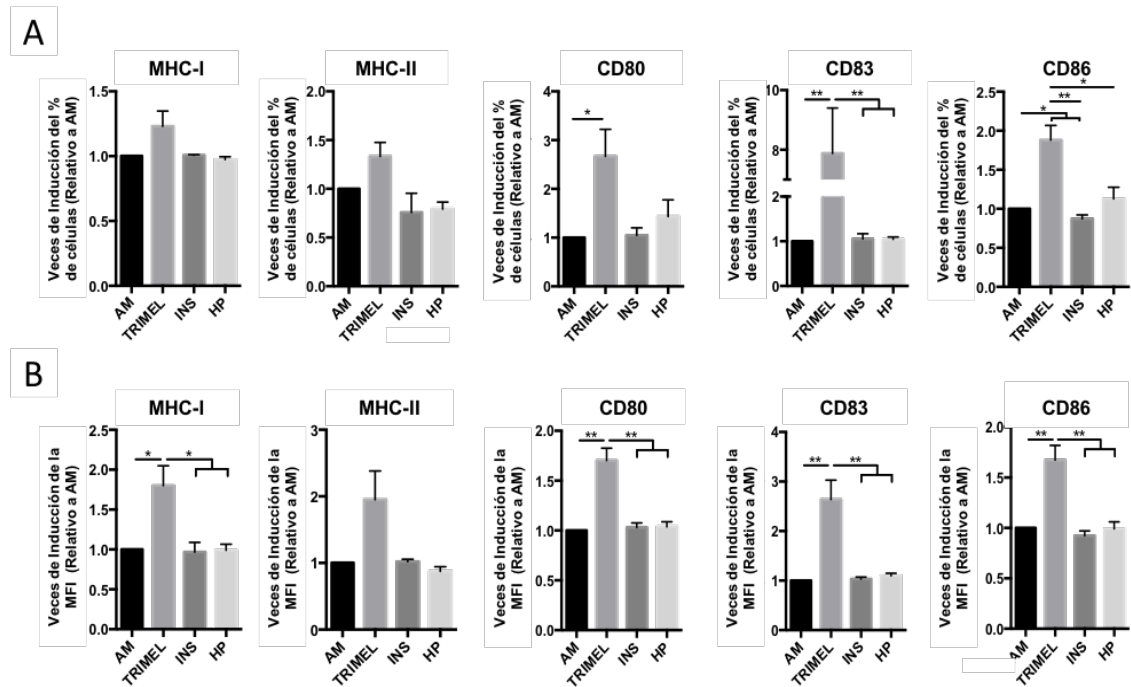
**Figura 9. Estrategia de análisis de poblaciones de DCs por citometría de flujo.** (A) Selección de población de DCs a partir de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A). (B) Población de células vivas, selección a través de marcador de viabilidad 7AAD. (C) Células CD11c+. Dot plots representativos.

Entonces, todos los análisis para evaluar marcadores de maduración bajo el estímulo de las distintas condiciones fueron realizados sobre poblaciones de células vivas y CD11c+.

### ***1.2 Haptoglobina no induce la expresión de marcadores de maduración en DCs humanas generadas in vitro***

Haptoglobina, proteína candidata a DAMP, fue usada para estimular las DCs generadas a partir de monocitos, y evaluar su capacidad de generar cambios en el patrón de expresión de marcadores de maduración. Si bien se observó un crecimiento en las barras de porcentaje de células para los marcadores CD80 y CD86 respecto de los controles AM (control negativo, células sin estímulo) e INS

(control de especificidad de respuesta a proteína), esto no puede ser interpretado como un real aumento, dado que no alcanza la significancia estadística. Asimismo, HP no tuvo la capacidad de inducir la expresión del resto de los marcadores estudiados. Además, se vio que disminuyó el porcentaje de células que expresaban MHC-II respecto de AM.



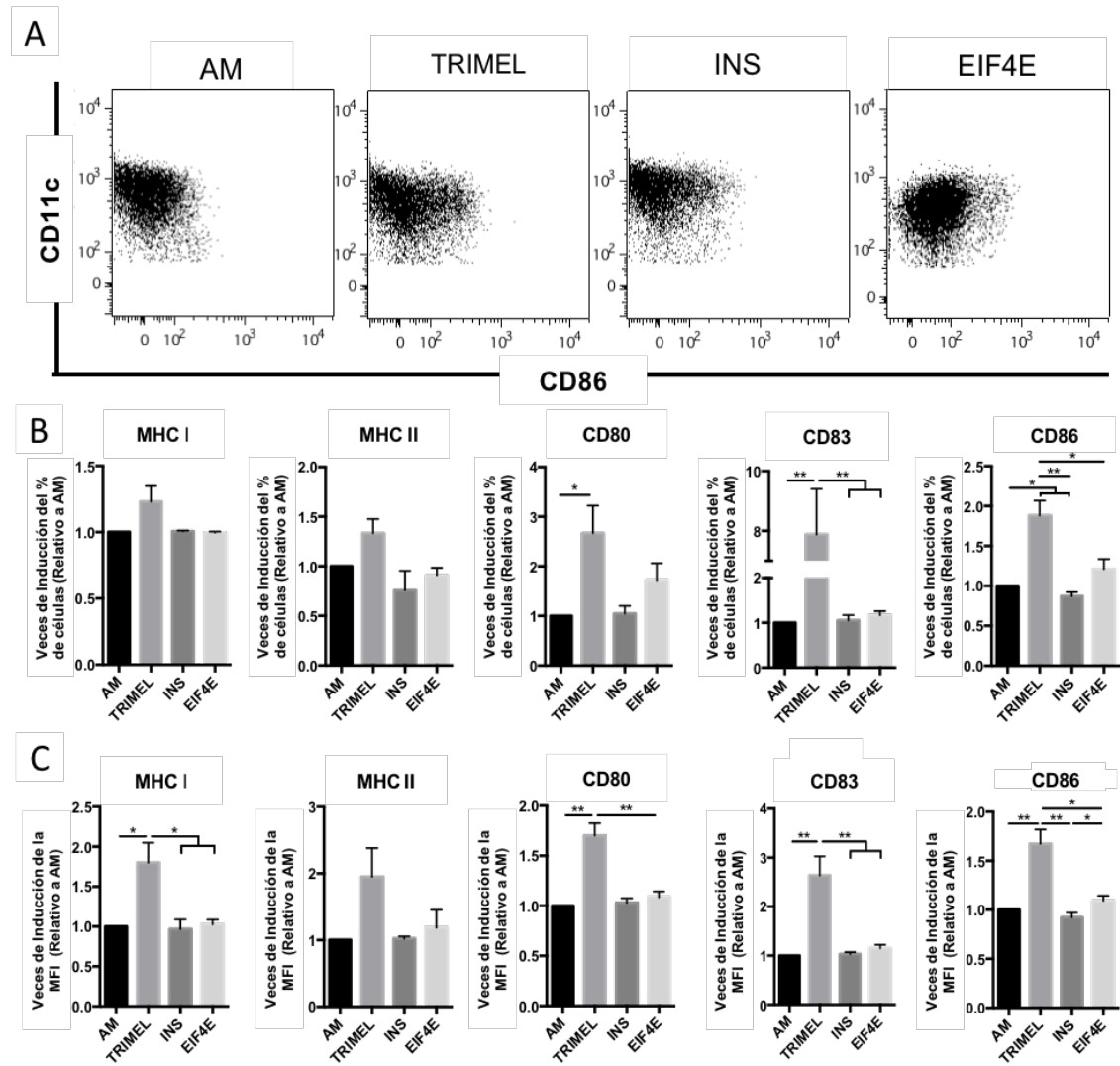
**Figura 10. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HP.** AM fueron estimulados durante 24 horas con la proteína HP a concentración de 100 ng/mL. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. (A) Porcentaje de células. (B) MFI de las distintas moléculas estudiadas. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.3 EIF4E aumenta la expresión de CD86 respecto del control INS en DCs humanas generadas *in vitro*

EIF4E fue la siguiente proteína seleccionada como candidata a DAMP, al evaluar su capacidad para inducir la expresión de moléculas asociadas a



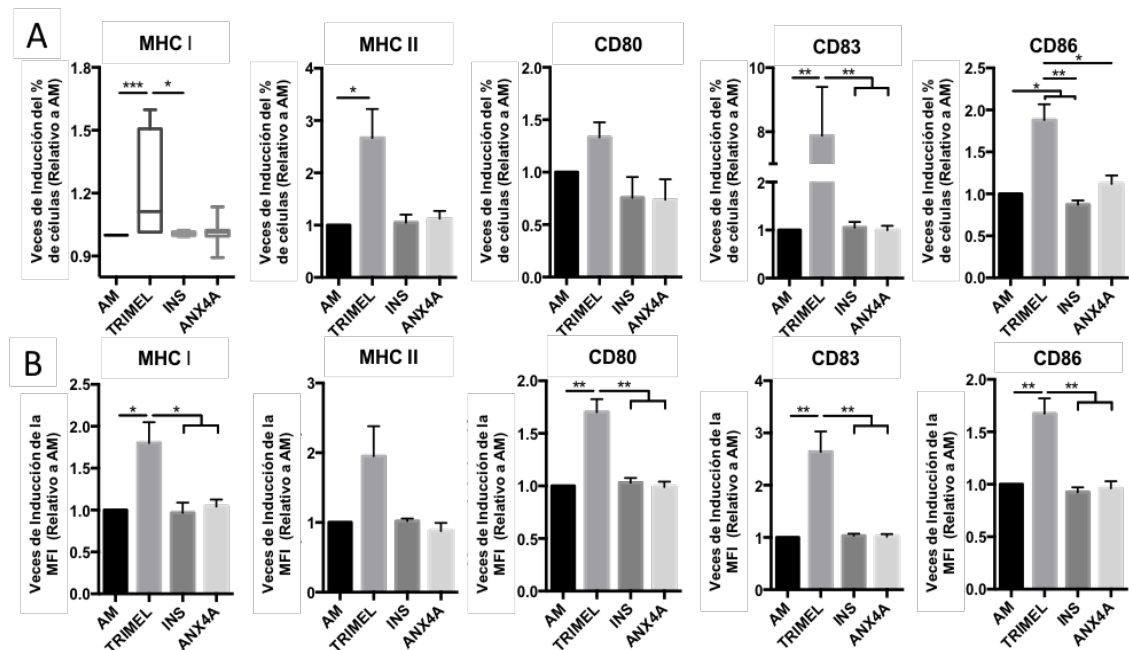
maduración se encontró que generó una mayor expresión de CD86 respecto al control INS (Figuras 11A y 11C). No se encontraron cambios para el resto de los marcadores que pudieran interpretarse como aumentos.



**Figura 11. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con EIF4E.** AM estimulados con la proteína fueron analizados por citometría de flujo, los análisis fueron realizados en células CD11c+. (A) Dot Plot representativo para CD86, (B) Gráficos para porcentaje de células y (C) MFI expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

### 1.4 ANXA4 no induce la expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*

De todas las condiciones estudiadas, ANXA4 es la proteína que menos cambios genera en el patrón de expresión de moléculas asociadas a maduración de DCs. De los datos obtenidos, no se observaron cambios para ninguna de las moléculas estudiadas (Figura 12), manteniéndose en valores similares a los encontrados en las condiciones AM e INS.

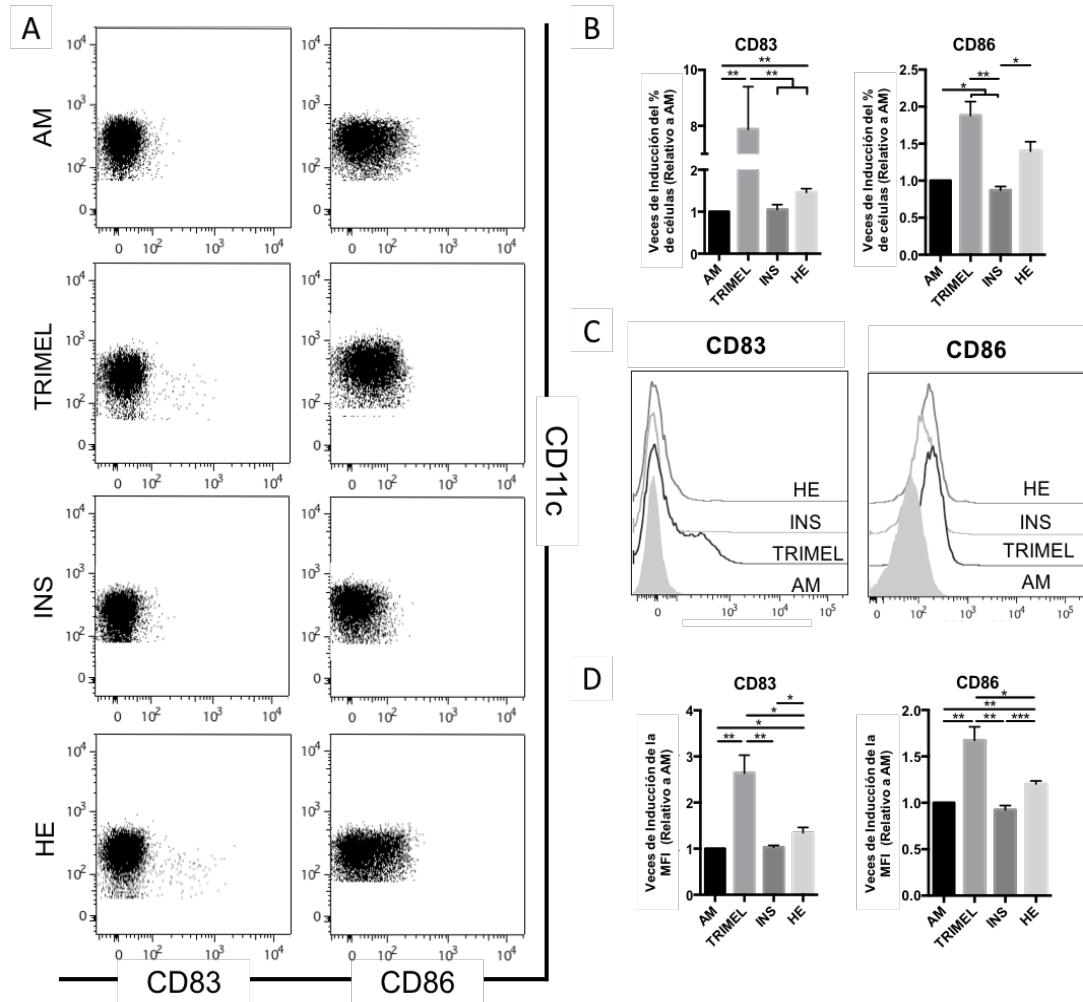


**Figura 12. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con ANXA4.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas con la proteína ANXA4 a concentración de 100 ng/mL durante 24 horas. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo sobre una población CD11c+. (A) porcentaje de células y (B) MFI, expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

**1.5 La combinación de las proteínas HP y EIF4E (HE) aumenta la expresión de las moléculas CD83 y CD86 en DCs humanas generadas in vitro.**

La siguiente condición de estudio consistió en la mezcla de las proteínas HP y EIF4E, agregadas a concentración de 100 ng/mL cada una. Al analizar la respuesta de las DCs a esta combinación, se observó que generó un aumento significativo del porcentaje de células que expresan la molécula CD83 (Figuras 13A y 13B) respecto del control AM, al mismo tiempo que aumenta su MFI respecto de ambos controles (Figuras 13C y 13D). Además, se pudo observar un aumento significativo del porcentaje de células positivas para CD86 respecto del control INS, consecuente con un aumento de su MFI (Figura 13) respecto de ambos controles. No se observaron cambios en el resto de las moléculas estudiadas (Figura Suplementaria 1).

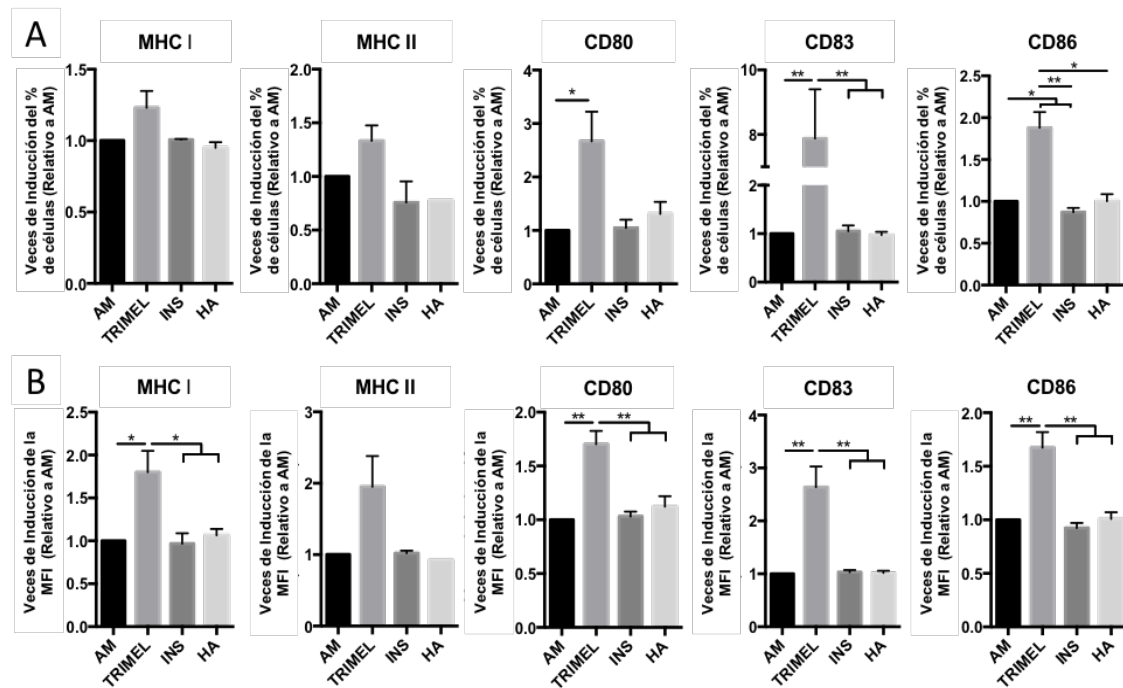




**Figura 13. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HE.** Células estimuladas durante 24 horas con la combinación HE. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. (A) Dot Plots representativos de los marcadores CD83 y CD86. (B) Porcentaje de células. (C) Histogramas representativos para CD83 y CD86. (D) MFI. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.6 La combinación de las proteínas HP y ANXA4 (HA) no genera cambios en el patrón fenotípico de DCs humanas generadas *in vitro*

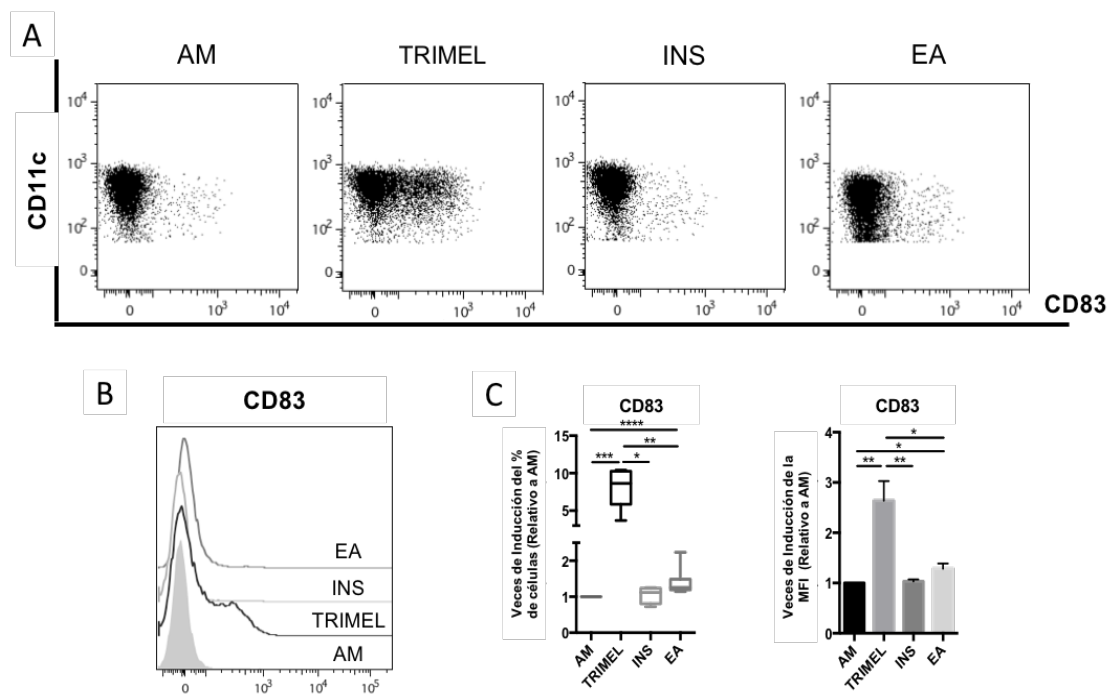
Las proteínas HP y ANXA4 fueron usadas en combinación y a la misma concentración (100 ng/mL) para estimular DCs humanas generadas *in vitro*. No se observaron cambios al analizar la expresión de las moléculas estudiadas (Figura 14). Respecto del marcador MHC-II, este no se expresó en 5 de los 6 experimentos realizados, arrojando poblaciones celulares equivalentes a 0.



**Figura 14. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HA.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas durante 24 horas con la combinación de proteínas HP y ANXA4 a igual concentración. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo. (A) Porcentaje de células y (B) MFI expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### 1.7 La combinación de proteínas EIF4E y ANXA4 (EA) aumenta la expresión de CD83 cuando se compara con AM en DCs humanas generadas *in vitro*

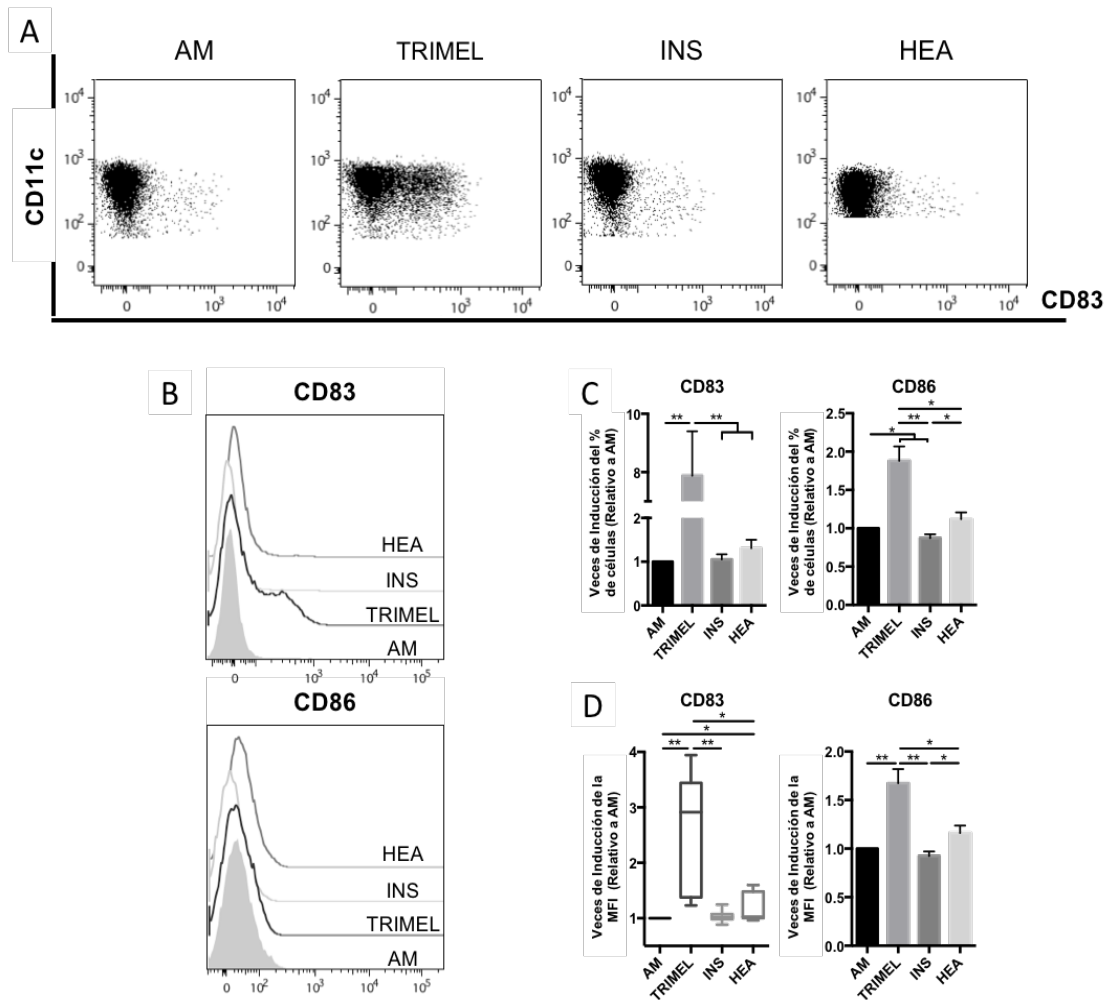
Siguiendo con el análisis de las proteínas, se estudió la capacidad de EIF4E y ANXA4 en combinación, para estimular el cambio fenotípico de DCs generadas *in vitro*. Se pudo observar que EA tiene la capacidad de aumentar tanto el porcentaje de células como la MFI de la molécula CD83, cuando se la compara con AM (Figura 15). No se observaron cambios en el perfil de expresión del resto de las moléculas estudiadas (Figura Suplementaria 2).



**Figura 15. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con EA.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas durante 24 horas con la combinación de proteínas EIF4E y ANXA4 a igual concentración. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en una población CD11c<sup>+</sup> (A) Dot Plot e (B) Histograma representativo para CD83. (C) Porcentaje de células y MFI expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0,001.

### ***1.8 La combinación de las tres proteínas en conjunto aumenta la expresión de CD83 y CD86 en DCs humanas generadas in vitro***

La última condición estudiada consistió en la combinación de las 3 proteínas; HP, EIF4E y ANXA4 (HEA), aplicadas en conjunto y a la misma concentración. Así, se observó que HEA tiene la capacidad de aumentar significativamente más la MFI de CD83 (Figura 16B y 16D) cuando se compara con el control AM. Por su parte, CD86 muestra un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de células y la MFI cuando se les compara con la condición INS (Figura 16). Cabe destacar, que al igual que en la condición HA, HEA no mostró células positivas para el marcador MHC-II en 4 de los 5 experimentos realizados, por lo que se obtuvo solo un resultado (Figura Suplementaria 3).



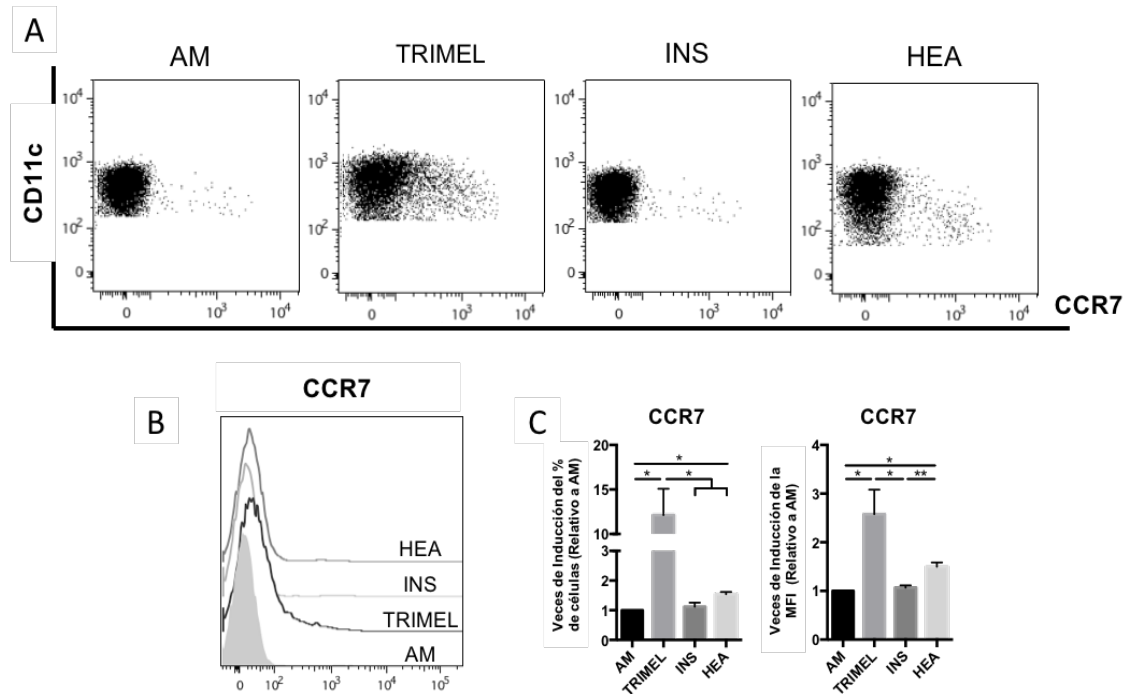
**Figura 16. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HEA.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas durante 24 horas con la combinación de proteínas HP, EIF4E y ANXA4 a igual concentración. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en una población CD11c+. (A) Dot Plot representativo para CD83 y (B) Histogramas representativos para CD83 y CD86. (C) Porcentaje de células y (D) MFI expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**2. Determinar la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir *in vitro* la expresión del receptor CCR7 en células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo**

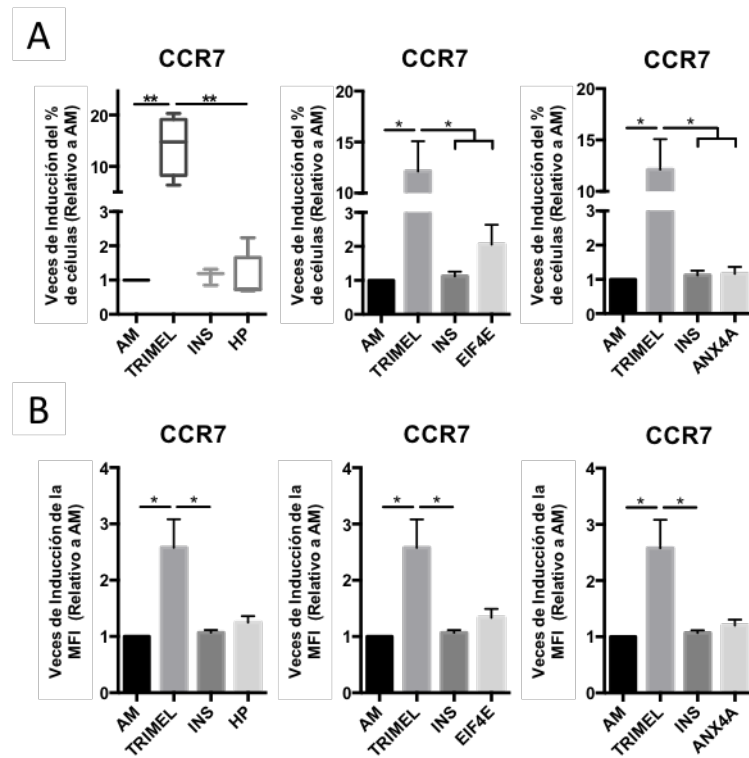
***2.1 DCs humanas generadas in vitro aumentan su expresión de CCR7 cuando son estimuladas con HEA***

CCR7 es un receptor crítico en la migración de DCs desde el sitio de captura de antígenos hacia el linfonodo, donde realizarán la presentación antigénica. Su expresión, por lo tanto, aumenta cuando la DC madura. Por esta razón se propuso estudiar si su expresión se veía modificada por alguna de las proteínas o sus combinaciones.

De las condiciones estudiadas solo HEA tuvo la capacidad de aumentar la expresión de CCR7 de forma significativa, se observó un aumento del porcentaje de células respecto de AM (Figuras 17A y 17C), mientras que la MFI aumenta al compararlo con ambos controles (Figuras 17B y 17C). No se obtuvieron diferencias significativas en relación a la expresión del receptor al analizar las otras condiciones (Figuras 18 y 19).

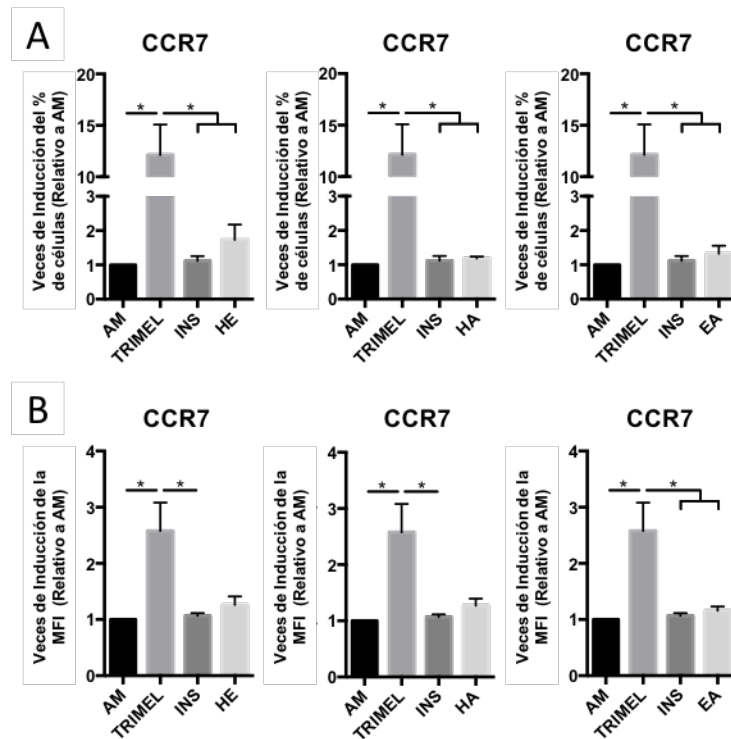


**Figura 17. Expresión del receptor CCR7 en DCs humanas generadas *in vitro* estimuladas con HEA.** DCs humanas generadas *in vitro* fueron estimuladas con las proteínas HP, EIF4E y ANXA4 en conjunto a una concentración de 100 ng/mL cada una. Se analizó la expresión del receptor CCR7 mediante citometría de flujo sobre una población CD11c+. (A) Dot Plots e (B) histograma representativo para CCR7. (C) Porcentaje de células positivas y MFI para las condiciones, expresadas como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura 18. Expresión del receptor CCR7 en DCs humanas generadas *in vitro* estimuladas con HP, EIF4E y ANXA4.** DCs humanas generadas *in vitro* fueron estimuladas con las proteínas HP, EIF4E y ANXA4 por separado a una concentración de 100 ng/mL. Se analizó la expresión del receptor CCR7 mediante citometría de flujo sobre una población CD11c+. (A) Porcentaje de células positivas y (B) MFI para las condiciones, expresadas como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .





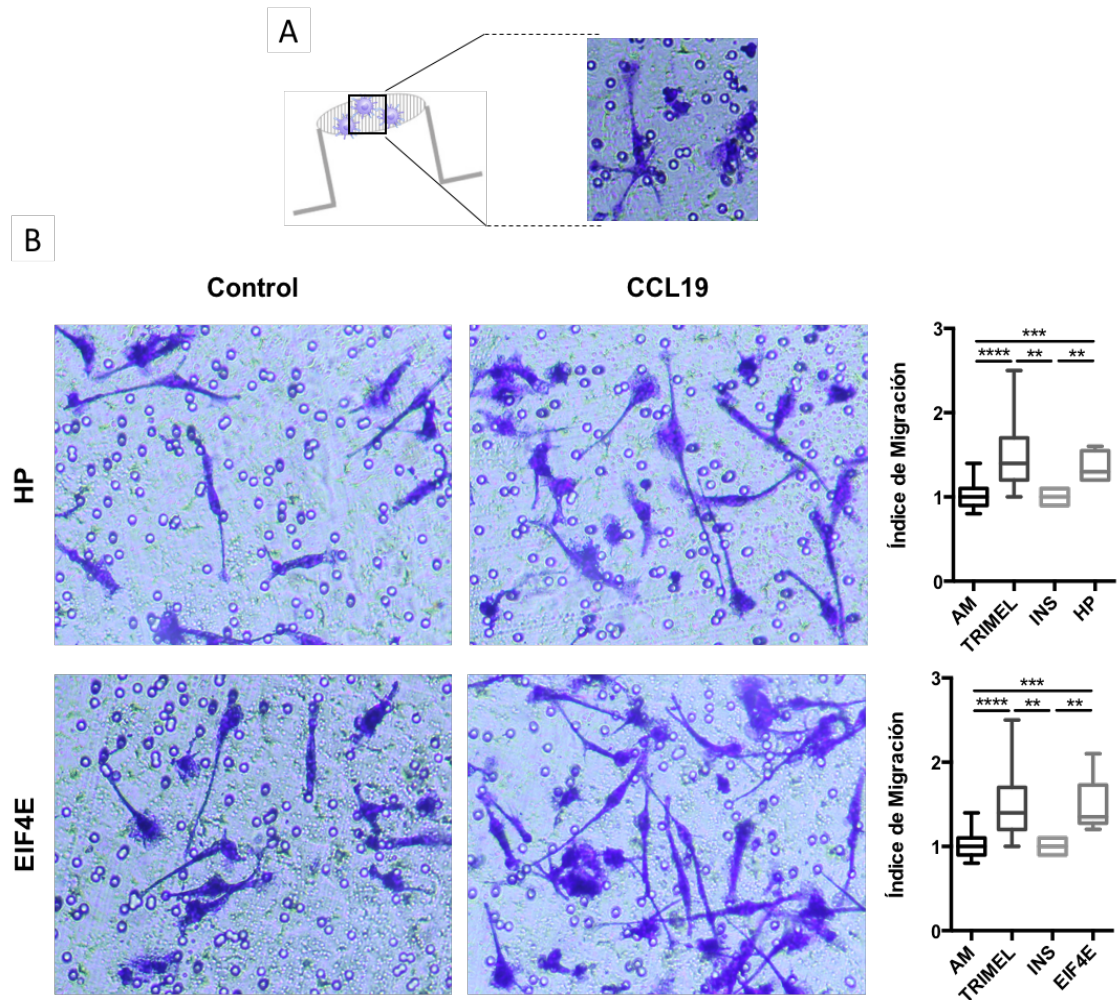
**Figura 19. Expresión del receptor CCR7 en DCs humanas generadas *in vitro* estimuladas con HE, HA y EA.** DCs humanas generadas *in vitro* fueron estimuladas con las proteínas HP, EIF4E y ANXA4 en distintas combinaciones a concentración de 100 ng/mL. Se analizó la expresión del receptor CCR7 mediante citometría de flujo sobre una población CD11c+. (A) Porcentaje de células positivas y (B) MFI para las condiciones, expresadas como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

### **3. Medir la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E, Anexina A4 y sus combinaciones, para inducir la migración de células dendríticas humanas, mediante ensayos de transmigración *in vitro***

#### **3.1 Las proteínas HP, EIF4E y las combinaciones HE, EA y HEA inducen la transmigración *in vitro* de DCs hacia la quimioquina CCL19**

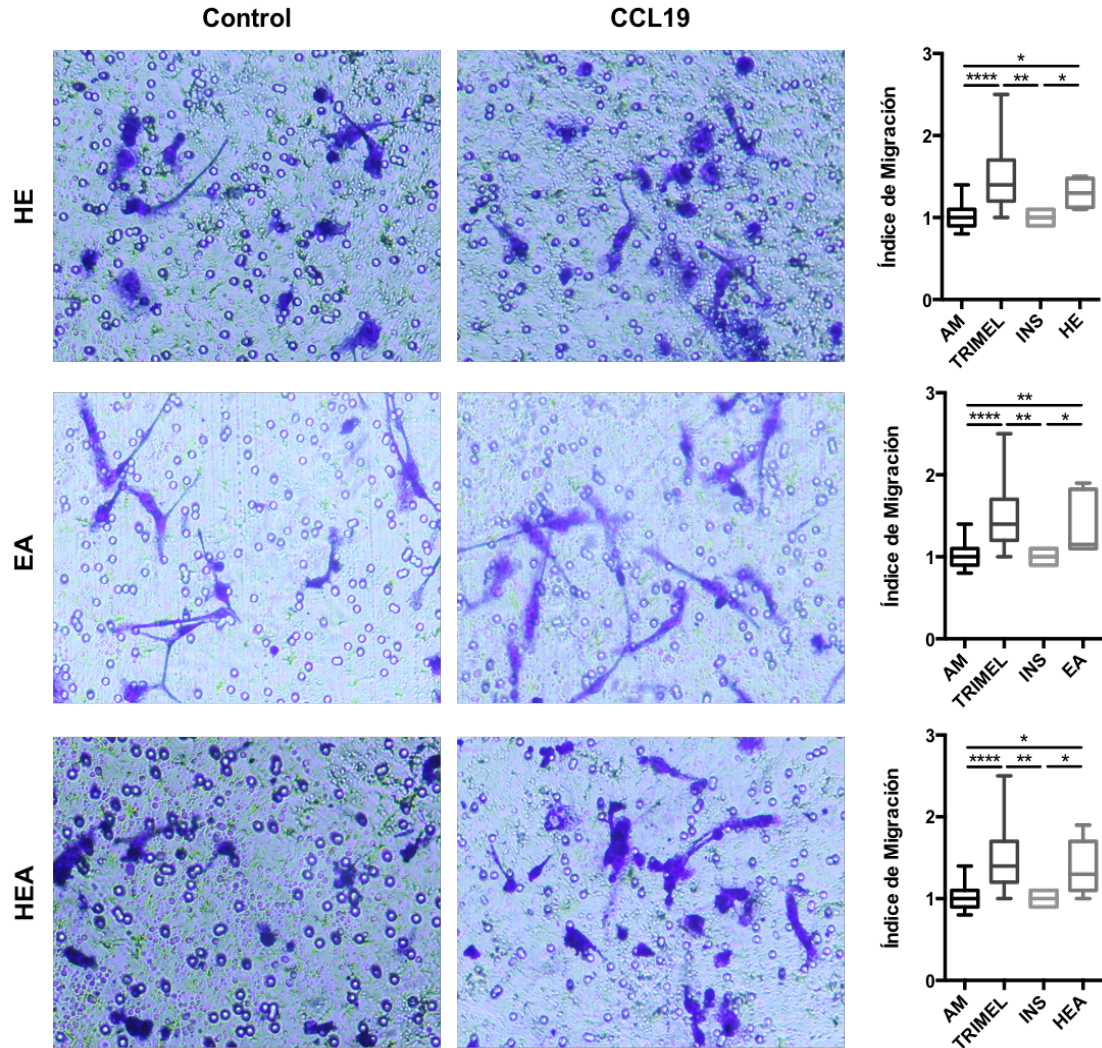
El siguiente paso en este estudio, fue analizar la capacidad funcional de las DCs generadas y estimuladas con las proteínas, de migrar en respuesta a la quimioquina de *homing* a linfonodos CCL19, ligando de CCR7. Para esto, se utilizó un modelo de transmigración *in vitro* en base a cámaras Transwell. En este sistema, se tienen dos pocillos que se acoplan de forma tal que las células quedan separadas por una delgada membrana con poros (5  $\mu\text{m}$ ) del medio que contiene la quimioquina, por lo tanto, generándose un gradiente de concentración que estimula la migración celular a través de la membrana, y hacia el pocillo inferior.

Se pudo observar que, las DCs estimuladas con TRIMEL migraron significativamente más que las otras condiciones, mientras que las células estimuladas con INS no responden a la presencia de CCL19 en el medio. Al analizar las proteínas HP y EIF4E (Figura 20B), cuando son utilizadas por si solas como estímulo, se observó un aumento de la migración cuando se comparan tanto con el control AM como INS.



**Figura 20. Ensayos de trans migración *in vitro* de DCs estimuladas con las proteínas HP y EIF4E.** Las células estimuladas con las distintas condiciones fueron sometidas a ensayos de migración *in vitro* para evaluar su capacidad de migración en respuesta a la quimioquina CCL19. Luego de tres horas de incubación, las membranas fueron depositadas en una solución de cristal violeta y etanol para fijar y teñir durante 45 minutos. Posteriormente las membranas fueron fotografiadas en 6 campos aleatorios a través de microscopio con un aumento de 40x. (A) Esquema de membrana de inserto Transwell. (B) Imágenes representativas y resultados de las condiciones de estudio. El índice de migración simboliza el aumento de la migración en relación a la observada en el medio control. Resultados expresados como mínimo y máximo de al menos tres experimentos independientes para cada condición. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Asimismo, las combinaciones HE, EA y HEA (Figura 21) también son capaces de aumentar la migración en respuesta a la quimioquina, datos significativos al comparar con AM e INS.



**Figura 21. Ensayos de transmigración *in vitro* de DCs estimuladas con las condiciones combinaciones HE, EA y HEA.** Las células fueron sometidas a ensayos de transmigración para evaluar capacidad de migración en respuesta a la quimioquina CCL19. Imágenes representativas tomadas con aumento 40x y resultados de las condiciones de estudio. El índice de migración simboliza el aumento de la migración en relación a la observada en el medio control. Resultados expresados como mínimo y máximo de al menos tres experimentos independientes para cada condición. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Las células estimuladas con la proteína ANXA4 o la combinación HA, no presentaron cambios en su habilidad para migrar en respuesta a CCL19 (Figura Suplementaria 4), con igual cantidad de células migradas hacia el medio control que hacia el medio con la quimioquina.

## DISCUSIÓN

El cáncer es un problema de salud pública debido a sus repercusiones tanto en la calidad de vida de los pacientes que lo padecen, como en el manejo por parte de los Estados, que deben destinar enormes recursos y gestión para enfrentar el perfil epidemiológico actual, en el que las enfermedades neoplásicas constituyen la segunda causa de muerte.

Es por esto que actualmente existe un gran interés por el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer que mejoren los resultados clínicos y ayuden en la supervivencia de los pacientes. Se ha demostrado que existe una relación bidireccional entre cáncer y sistema inmune, donde este último, a medida que las células neoplásicas adquieren malignidad, pierde capacidad de reconocer estas células y, por lo tanto, de eliminarlas (Zitvogel et al., 2006). Este conocimiento, impulsa una de las estrategias más vanguardistas, consistente en la inmunoterapia, y específicamente la vacunación en base a DCs, que permitiría mejorar la respuesta inmune del hospedero frente a las células cancerígenas, además de generar memoria inmunológica frente a posibles recidivas de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, un porcentaje importante de los pacientes tratados no responden a este tratamiento (Escobar et al., 2005; López et al., 2009). Entonces nace la pregunta ¿cómo mejorar estas terapias de forma que sean más potentes y efectivas en la mayoría de los pacientes? Una de las opciones sería aumentar la cantidad de señales de daño o peligro (DAMPs) presentes en los lisados tumorales con que son cargadas estas células. El rol de los DAMPs en la inducción de una respuesta inmune ha sido estudiado y es ampliamente aceptado, sin embargo, las moléculas reconocidas hasta ahora son pocas, entonces, el estudio y reconocimiento de nuevas moléculas podría mejorar la potencia de este tratamiento, mejorando, por lo tanto, su resultado clínico. Es así que en este trabajo se propuso estudiar la capacidad de las proteínas Haptoglobina, EIF4E y Anexina A4, que no han sido descritas previamente para actuar como señales de peligro en relación a su capacidad de inducir la migración *in vitro* de células dendríticas humanas.

Como primera aproximación, este estudio utilizó un protocolo de generación de DCs maduras a partir de AM en un tiempo total de 48 horas, que se aproxima de mejor manera a los tiempos de respuesta fisiológicos del sistema inmune, a diferencia de otros protocolos, donde las DCs son generadas en periodos de cinco a siete días (Lothar et al., 2014). Las células generadas bajo este protocolo han sido validadas previamente e, incluso, se ha demostrado su habilidad de generar una respuesta inmune mediada por LT (Aguilera et al., 2011).

En este estudio, se pudo observar que la estimulación con TRIMEL aumenta la expresión de marcadores de maduración, tales como CD83, CD86 y CCR7, significativamente más que las otras condiciones. Respecto a las moléculas MHC-I, MHC-II y CD80, sus resultados no fueron estadísticamente significativos, lo que podría explicarse por la variabilidad de la respuesta entre los donantes que constituyeron la muestra estudiada. Sobre lo último, se postula que la maduración de las DCs es un evento que, entre otras variables, tendría que ver con las vías de señalización a través de las cuales actúan los distintos estímulos. Por ejemplo, los DAMPs señalizan a través de receptores específicos en las DCs, entre los que se encuentran los TLRs. En estudios previos se ha demostrado que el bloqueo del receptor TLR4 genera cambios en la expresión de moléculas de superficie asociadas a maduración de DCs, con disminución de MHC-I, CD80, CD83, CD86 y CCR7 medidos por citometría de flujo. Aún más importante, fue que en este mismo estudio se observó que los pacientes portadores de un polimorfismo genético en este receptor, tenían una menor sobrevida post-tratamiento que aquellos que no presentaban este polimorfismo, mostrando que existirían variables individuales en la respuesta de las DCs a los distintos estímulos de maduración (Tittarelli et al., 2012). Por otro lado, otro estudio señaló que estas mismas DCs tuvieron mayor capacidad para migrar en respuesta a la quimioquina CCL19 al compararlo con las otras condiciones, hablando de la expresión de un receptor funcional y ampliamente asociado a maduración (González, Ortiz, et al., 2014). Queda entonces demostrada la validez del modelo utilizado, donde las DCs generadas *in vitro* en este trabajo tienen efectivamente la



capacidad de madurar, al sobre-expresar algunas de las moléculas estudiadas, y migrar hacia CCL19.

Por otra parte, se utilizó la proteína INS como control de especificidad de respuesta, esta proteína está ampliamente distribuida en el cuerpo y no se ha reportado que, por si misma, tenga capacidad de iniciar una respuesta inmune. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que INS no induce el aumento de la expresión de los distintos marcadores de maduración estudiados cuando es agregada al medio, manteniéndose en valores similares a los de AM. Lo mismo puede observarse al analizar la capacidad de migración de las células estimuladas con INS, donde no existe respuesta a la presencia de la quimioquina en el medio. De esta forma se puede inferir que no todas las moléculas pueden funcionar como señales de peligro e inducir una respuesta inmune.

HP, se ha propuesto como proteína de fase aguda (Huntoon et al., 2008) y recientemente se ha visto que juega un rol importante en la génesis de la respuesta inmune que genera el rechazo de trasplantes (Shen et al., 2015; Shen et al., 2012). Sin embargo, estos estudios fueron realizados en modelos murinos y no se han reportado experiencias en modelos humanos. Por otro lado, EIF4E ha sido ampliamente estudiada desde su rol regulador como factor transcripcional, donde se ha visto que interviene en la producción de TNF- $\alpha$  de macrófagos a través de modificaciones post-transduccionales (Andersson & Sundler, 2006). Por otra parte, también ha sido estudiada por su rol en la activación de mecanismos que aumentan la malignidad de células cancerígenas, asociando su sobreexpresión a la activación de vías que aumentan el crecimiento tumoral, la angiogénesis y la capacidad de invasión, por lo que se ha propuesto como un blanco terapéutico (Graff et al., 2009; Wan et al., 2015); sin embargo, no ha sido estudiado el papel que juega desde el punto de vista del sistema inmune.

En este estudio, se observó que las proteínas HP y EIF4E, cuando fueron utilizadas como estímulos de maduración de DCs por si solas, no lograron generar cambios que significaran diferencias estadísticas en la expresión de las moléculas asociadas a maduración evaluadas al compararlas a los controles AM e INS. Sin



embargo, en los ensayos de trans migración *in vitro*, que evalúan capacidad funcional de la célula, se constata que estas proteínas si son capaces de inducir la migración. Estos resultados serían los primeros en constatar su posible rol en la maduración *in vitro* de DCs humanas y, eventualmente, en el desencadenamiento de una respuesta inmune. Estas proteínas cumplen además con la característica de los DAMPs en relación a que son moléculas que en contextos fisiológicos cumplen funciones no inmunológicas totalmente distintas (Matzinger, 1994). Dado lo anterior, la falta de respuesta por parte de las células para aumentar la expresión de moléculas asociadas a maduración, podría explicarse en tres aspectos: 1) los receptores por los cuales actúan y sus posibles polimorfismos, 2) el tamaño de la muestra y 3) la concentración a la que fueron utilizadas. Sobre este último punto, se reportan experiencias en la literatura donde se han utilizado otras proteínas DAMPs, como HMGB1, CRT y HSPs (Singh-Jasuja & cols., 2000; Somersan & cols., 2001; Wang & cols., 2002) para estimular DCs; efectivamente, se observa la inducción de los marcadores estudiados, sin embargo, la concentración utilizada es de 5 a 200 veces superior a la de este trabajo.

Por su parte ANXA4, al igual que EIF4E, ha sido estudiada como biomarcador de cáncer y se ha asociado a proliferación celular, resistencia a drogas quimioterapéuticas e invasión metastásica aumentada (Han, Tahir, Cherian, Collins, & Ng, 2000; Mogami et al., 2013), pero no se han reportado experiencias en cuanto a su función en la respuesta inmune. En este estudio, donde fue utilizada para estimular DCs generadas *in vitro*, no logró inducir cambios significativos en el patrón de expresión de moléculas asociadas a maduración, como tampoco se observó un aumento en la capacidad de estas células de estimular la migración hacia la quimioquina CCL19. Este resultado vuelve a dejar en evidencia que solo algunas moléculas poseen la capacidad de inducir o participar en la activación y/o maduración de las DCs.

Durante la realización de este estudio, se optó también por utilizar las proteínas en combinaciones, proponiéndose que pudiesen poseer efectos sinérgicos. Respecto a esto, se vio que la combinación de las proteínas HP y EIF4E (HE), logró aumentar significativamente la expresión de las moléculas

CD83 y CD86, este hecho podría indicar lo expuesto anteriormente, dado que las proteínas por sí solas no logran aumentar la expresión de estas moléculas. La combinación de HP y ANXA4 (HA), logró resultados similares a los obtenidos con las proteínas solas; esto podría interpretarse como que no existe una interacción entre ellas que genere una respuesta mejorada. Por otra parte, la combinación de EIF4E con ANXA4 (EA), generó un aumento de CD83 que no se observó cuando EIF4E fue utilizada por separado. Respecto a esto, se podría suponer que entre estas proteínas existe una interacción que genera que las DCs respondan de mejor manera. Una observación similar a la anterior se hace al analizar la combinación de las tres proteínas (HEA), donde HEA obtiene resultados similares a la combinación HE, pero con un mayor aumento de la expresión de CD83. Con lo anterior, se podría deducir que, HP y EIF4E poseen efectos sinérgicos, mientras que, si bien ANXA4 por sí sola no tiene efectos sobre el fenotipo de las DCs, esta podría formar complejos con EIF4E que si generan una respuesta por parte de las células. En este contexto, sería interesante estudiar si el mejoramiento en la respuesta respondería a una interacción entre proteínas, o a que estas proteínas señalizan a través de distintos receptores. Sobre la interacción entre DAMPs resultante en respuestas más potentes, es sabido que distintas moléculas descritas como DAMPs señalizan a través de diferentes receptores (Schaefer, 2014), entre las moléculas conocidas podemos encontrar CRT, que señalizan a través de CD91 (Obeid et al., 2007), las HSPs que se unen a distintos TLR y a CD91 (Lehnardt et al., 2008; Wheeler et al., 2009), mientras que HMGB1 se une a receptores como TLR2, TLR4, TLR9 y RAGE (Thorburn et al., 2009); respecto a esto, por ejemplo, se ha visto que la translocación de CRT a la membrana y la liberación de HMGB1 de células tumorales tratadas con *shock* térmico, aumentan la efectividad de vacunas basadas en DCs al aumentar la expresión de marcadores de maduración y la presentación cruzada realizada por estas células (Aguilera et al., 2011).

Como se ha mencionado anteriormente, no existe en la literatura experiencia previa sobre el rol que cumplen estas proteínas en la respuesta inmune, al menos en modelos humanos. En este trabajo también se evaluó la capacidad funcional de las células estimuladas de migrar en ensayos *in vitro* en

respuesta a la quimioquina CCL19. Esta migración está dirigida por la presencia del receptor CCR7, expresado por DCs maduras (González, Ortiz, et al., 2014). Respecto a esto, se encontró que las células estimuladas tanto con las proteínas HP y EIF4E, así como con las combinaciones HE, EA y HEA, fueron capaces de aumentar significativamente su índice de migración en respuesta a la quimioquina CCL19. En el caso de la combinación HEA, esto puede explicarse, al menos en parte, en los aumentos observados en la expresión del receptor CCR7. Sin embargo, este no es el caso de HP, EIF4E y las combinaciones HE y EA donde no se observó dicho aumento. Respecto a esto, es sabido que la migración celular consiste en una serie de eventos que, en conjunto, generan la motilidad celular. Entre otros, estos eventos incluyen la regulación de receptores quimiotácticos no asociados a quimioquinas, como FPRL2, expresado en DCs y cuya activación se traduce en un flujo de calcio que induce migración (Devosse et al., 2009; Sozzani, 2005) o cambios en la regulación de la producción de enzimas proteolíticas como metaloproteasas que permiten a la célula despegarse de sus uniones a la matriz extracelular (Heuzé et al., 2013). Además, se ha reportado que ciertos DAMPs pueden regular la migración de DCs a través de interacciones directas con las quimioquinas o el receptor de quimioquinas, tal es el caso de HMGB1, que se ha encontrado formando heterocomplejos que mejoran la función de CXCL12, ligando del receptor CXCR4 (Proudfoot & Ugucioni, 2016; Venereau et al., 2012). Entonces, el aumento en la migración de células estimuladas con estas proteínas o sus combinaciones, podría deberse a la intervención en algún evento no asociado a receptores de quimioquina o a una interacción entre proteínas que mejorara el funcionamiento de CCR7.

Finalmente, los resultados de este trabajo sustentan el continuar con la investigación de estas moléculas con relación a establecer si poseen capacidad de mejorar aspectos como la presentación antigénica o si estimulan una mayor secreción de citoquinas.

## CONCLUSIONES

- 1) Las proteínas Haptoglobina, EIF4E y ANXA4, por sí solas no inducen una mayor expresión de moléculas asociadas a maduración en DCs humanas generadas *in vitro*.
- 2) Las combinaciones HE y HEA son capaces de inducir una mayor expresión de las moléculas CD83 y CD86 en DCs humanas generadas *in vitro*.
- 3) La combinación HEA es capaz de inducir una mayor expresión del receptor CCR7 en DCs humanas generadas *in vitro*.
- 4) Las proteínas Haptoglobina y EIF4E por sí solas, y las combinaciones HE, EA y HEA, tienen la capacidad de estimular la migración *in vitro* de DCs humanas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwala, S. S., Glaspy, J., O'Day, S. J., Mitchell, M., Gutheil, J., Whitman, E., . . . Belt, R. (2002). Results from a randomized phase III study comparing combined treatment with histamine dihydrochloride plus interleukin-2 versus interleukin-2 alone in patients with metastatic melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, *20*(1), 125-133.
- Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., González, F. E., Ramírez, M., Reyes, D., . . . Salazar, L. (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clinical Cancer Research*, *17*(8), 2474-2483.
- Ahmed, N., Barker, G., Oliva, K., Hoffmann, P., Riley, C., Reeve, S., . . . Rice, G. (2004). Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *British journal of cancer*, *91*(1), 129-140.
- Ahmed, R., & Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, *272*(5258), 54.
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., & von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*, *29*(3), 325-342.
- Andersson, K., & Sundler, R. (2006). Posttranscriptional regulation of TNFalpha expression via eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation in mouse macrophages. *Cytokine*, *33*(1), 52-57. doi:10.1016/j.cyto.2005.11.017
- Ascierto, P. A., Simeone, E., Giannarelli, D., Grimaldi, A. M., Romano, A., & Mozzillo, N. (2012). Sequencing of BRAF inhibitors and ipilimumab in patients with metastatic melanoma: a possible algorithm for clinical use. *Journal of translational medicine*, *10*(1), 1.
- Asleh, R., Marsh, S., Shilkrut, M., Binah, O., Guetta, J., Lejbkowitz, F., . . . Lache, O. (2003). Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circulation research*, *92*(11), 1193-1200.

- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., & Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 14(4), 261-278.
- Bonasio, R., & von Andrian, U. H. (2006). Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Current opinion in immunology*, 18(4), 503-511.
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., . . . Antoni, S. (2015). Cancer incidence in five continents: inclusion criteria, highlights from volume X and the global status of cancer registration. *International Journal of Cancer*, 137(9), 2060-2071.
- Bromley, S. K., Mempel, T. R., & Luster, A. D. (2008). Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nature immunology*, 9(9), 970-980.
- Burnet, F. (1970). The concept of immunological surveillance *Immunological Aspects of Neoplasia* (pp. 1-27): Karger Publishers.
- Butsushita, K., Fukuoka, S.-I., Ida, K., & Arij, Y. (2009). Crystal structures of sodium-bound annexin A4. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(10), 2274-2280.
- Charo, I. F., & Ransohoff, R. M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine*, 354(6), 610-621.
- Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., . . . Eigler, A. (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *The Journal of Immunology*, 170(8), 4069-4076.
- de la Jara, J. J., Bastias, G., Ferreccio, C., Moscoso, C., Sagues, S., Cid, C., . . . Corvalan, A. (2015). A snapshot of cancer in Chile: analytical frameworks for developing a cancer policy. *Biological research*, 48(1), 1.
- Devosse, T., Guillabert, A., D'Haene, N., Berton, A., De Nadai, P., Noel, S., . . . Salmon, I. (2009). Formyl peptide receptor-like 2 is expressed and functional in plasmacytoid dendritic cells, tissue-specific macrophage subpopulations, and eosinophils. *The Journal of Immunology*, 182(8), 4974-4984.

- Dostie, J., Lejbkowicz, F., & Sonenberg, N. (2000). Nuclear eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) colocalizes with splicing factors in speckles. *The Journal of cell biology*, 148(2), 239-246.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148.
- e Sousa, C. R. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*, 6(6), 476-483.
- Eggermont, A. M., & Robert, C. (2011). New drugs in melanoma: it's a whole new world. *European Journal of Cancer*, 47(14), 2150-2157.
- Escobar, A., Lopez, M., Serrano, A., Ramirez, M., Perez, C., Aguirre, A., . . . Fodor, M. (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clinical & Experimental Immunology*, 142(3), 555-568.
- Fucikova, J., Moserova, I., Urbanova, L., Bezu, L., Kepp, O., Cremer, I., . . . Galluzzi, L. (2015). Prognostic and predictive value of DAMPs and DAMP-associated processes in cancer. *Frontiers in immunology*, 6.
- Garg, A. D., Krysko, D. V., Verfaillie, T., Kaczmarek, A., Ferreira, G. B., Marysael, T., . . . Roebroek, A. J. (2012). A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *The EMBO journal*, 31(5), 1062-1079.
- Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., & Agostinis, P. (2010). Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics: an emerging amalgamation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1805(1), 53-71.
- González, F. E., Gleisner, A., Falcón-Beas, F., Osorio, F., López, M. N., & Salazar-Onfray, F. (2014). Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 10(11), 3261-3269.
- González, F. E., Ortiz, C., Reyes, M., Dutzan, N., Patel, V., Pereda, C., . . . Salazar-Onfray, F. (2014). Melanoma cell lysate induces CCR7 expression and in vivo migration to draining lymph nodes of therapeutic human dendritic cells. *Immunology*, 142(3), 396-405.

- Griffith, J. W., Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*, 32, 659-702.
- Gross, J. D., Moerke, N. J., von der Haar, T., Lugovskoy, A. A., Sachs, A. B., McCarthy, J. E., & Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, 115(6), 739-750.
- Guadagnolo, B. A., Huo, J., Liao, K. P., Buchholz, T. A., & Das, P. (2013). Changing trends in radiation therapy technologies in the last year of life for patients diagnosed with metastatic cancer in the United States. *Cancer*, 119(5), 1089-1097.
- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., & Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *The Journal of experimental medicine*, 189(3), 451-460.
- Han, E. K.-H., Tahir, S., Cherian, S., Collins, N., & Ng, S. (2000). Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines. *British journal of cancer*, 83(1), 83.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hart, D. N. (1997). Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*, 90(9), 3245-3287.
- Hegmans, J. P., & Aerts, J. G. (2014). Immunomodulation in cancer. *Current opinion in pharmacology*, 17, 17-21.
- Heuzé, M. L., Vargas, P., Chabaud, M., Berre, M., Liu, Y. J., Collin, O., . . . Lennon-Duménil, A. M. (2013). Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunological reviews*, 256(1), 240-254.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., . . . Hassel, J. C. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*, 363(8), 711-723.



- Hoebe, K., Janssen, E., & Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology*, *5*(10), 971-974.
- Huntoon, K. M., Wang, Y., Eppolito, C. A., Barbour, K. W., Berger, F. G., Shrikant, P. A., & Baumann, H. (2008). The acute phase protein haptoglobin regulates host immunity. *J Leukoc Biol*, *84*(1), 170-181. doi:10.1189/jlb.0208100
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology*, *16*(4), 343-353.
- Jube, S., Rivera, Z. S., Bianchi, M. E., Powers, A., Wang, E., Pagano, I., . . . Yang, H. (2012). Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer research*, *72*(13), 3290-3301.
- Kaetzel, M., Mo, Y., Mealy, T., Campos, B., Bergsma-Schutter, W., Brisson, A., . . . Seaton, B. (2001). Phosphorylation mutants elucidate the mechanism of annexin IV-mediated membrane aggregation. *Biochemistry*, *40*(13), 4192-4199.
- Kaetzel, M. A., Chan, H. C., Dubinsky, W. P., Dedman, J. R., & Nelson, D. J. (1994). A role for annexin IV in epithelial cell function. Inhibition of calcium-activated chloride conductance. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(7), 5297-5302.
- Keilholz, U., Punt, C. J., Gore, M., Kruit, W., Patel, P., Lienard, D., . . . Schadendorf, D. (2005). Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(27), 6747-6755.
- Krautwald, S., Ziegler, E., Förster, R., Ohl, L., Amann, K., & Kunzendorf, U. (2004). Ectopic expression of CCL19 impairs alloimmune response in mice. *Immunology*, *112*(2), 301-309.
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. (2012). Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(12), 860-875.
- Lehnardt, S., Schott, E., Trimbuch, T., Laubisch, D., Krueger, C., Wulczyn, G., . . . Weber, J. R. (2008). A vicious cycle involving release of heat shock protein

60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *The Journal of Neuroscience*, 28(10), 2320-2331.

- Lin, C. L., Suri, R. M., Rahdon, R. A., Austyn, J. M., & Roake, J. A. (1998). Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *European journal of immunology*, 28(12), 4114-4122.
- Lin, L.-L., Huang, H.-C., & Juan, H.-F. (2012). Revealing the molecular mechanism of gastric cancer marker annexin A4 in cancer cell proliferation using exon arrays. *PLoS One*, 7(9), e44615.
- López, M. N., Pereda, C., Segal, G., Muñoz, L., Aguilera, R., González, F. E., . . . González, R. (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*, 27(6), 945-952.
- Lothar, J., Breitschopf, T., Krappmann, S., Morton, C. O., Bouzani, M., Kurzai, O., . . . Loeffler, J. (2014). Human dendritic cell subsets display distinct interactions with the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(8), 1160-1168.
- Luster, A. D. (1998). Chemokines—chemotactic cytokines that mediate inflammation. *New England Journal of Medicine*, 338(7), 436-445.
- Marzuka, A., Huang, L., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. (2015). Melanoma treatments: advances and mechanisms. *Journal of cellular physiology*, 230(11), 2626-2633.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology*, 12(1), 991-1045.
- Melief, C. J. (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(10), 2645-2654.
- Melief, C. J. (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*, 29(3), 372-383.

- Mogami, T., Yokota, N., Asai-Sato, M., Yamada, R., Koizume, S., Sakuma, Y., . . . Hirahara, F. (2013). Annexin A4 is involved in proliferation, chemoresistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *PLoS One*, *8*(11), e80359.
- Murphy, C. T., Galloway, T. J., Handorf, E. A., Wang, L., Mehra, R., Flieder, D. B., & Ridge, J. A. (2015). Increasing time to treatment initiation for head and neck cancer: An analysis of the National Cancer Database. *Cancer*, *121*(8), 1204-1213.
- Mussunoor, S., & Murray, G. (2008). The role of annexins in tumour development and progression. *The Journal of pathology*, *216*(2), 131-140.
- Nieboer, P., de Vries, E., Mulder, N., & van der Graaf, W. (2005). Relevance of high-dose chemotherapy in solid tumours. *Cancer treatment reviews*, *31*(3), 210-225.
- Okuyama, N., Ide, Y., Nakano, M., Nakagawa, T., Yamanaka, K., Moriwaki, K., . . . Eguchi, H. (2006). 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*(11), 2803-2808.
- Omran, A. R. (1971). The epidemiologic transition: a theory of the epidemiology of population change. *The Milbank Memorial Fund Quarterly*, 509-538.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 265-277.
- Proudfoot, A. E., & Ugucioni, M. (2016). Modulation of Chemokine Responses: Synergy and Cooperativity. *Frontiers in immunology*, *7*.
- Randolph, G. J., Angeli, V., & Swartz, M. A. (2005). Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews Immunology*, *5*(8), 617-628.
- Reig, G., Pulgar, E., & Concha, M. L. (2014). Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development*, *141*(10), 1999-2013. doi:10.1242/dev.101451
- Reiman, J. M., Kmiecik, M., Manjili, M. H., & Knutson, K. L. (2007). *Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

- Robson, N. C., Hoves, S., Maraskovsky, E., & Schnurr, M. (2010). Presentation of tumour antigens by dendritic cells and challenges faced. *Current opinion in immunology*, 22(1), 137-144.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 299-308.
- 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 downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179(4), 1109-1118.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., . . . Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European journal of immunology*, 28(9), 2760-2769.
- Sato, K., & Fujita, S. (2007). Dendritic cells-nature and classification. *Allergology International*, 56(3), 183-191.
- Schaefer, L. (2014). Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns. *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35237-35245.
- Shen, H., Heuzey, E., Mori, D. N., Wong, C. K., Colangelo, C. M., Chung, L. M., . . . Kreisel, D. (2015). Haptoglobin enhances cardiac transplant rejection. *Circulation research*, 116(10), 1670-1679.
- Shen, H., Song, Y., Colangelo, C. M., Wu, T., Bruce, C., Scabia, G., . . . Goldstein, D. R. (2012). Haptoglobin activates innate immunity to enhance acute transplant rejection in mice. *The Journal of clinical investigation*, 122(1), 383-387.
- Shi, H., Cao, T., Connolly, J. E., Monnet, L., Bennett, L., Chapel, S., . . . Palucka, A. K. (2006). Hyperthermia enhances CTL cross-priming. *The Journal of Immunology*, 176(4), 2134-2141.
- Sozzani, S. (2005). Dendritic cell trafficking: more than just chemokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 16(6), 581-592.

- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., . . . Mantovani, A. (1998). Cutting edge: differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *The Journal of Immunology*, *161*(3), 1083-1086.
- Stein, J. V., Soriano, S. F., M'rini, C., Nombela-Arrieta, C., de Buitrago, G. G., Rodríguez-Frade, J. M., . . . Martínez-A, C. (2003). CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood*, *101*(1), 38-44.
- Steinman, R. (2003). The control of immunity and tolerance by dendritic cells. *Pathologie Biologie*, *51*(2), 59-60.
- Tacke, P. J., de Vries, I. J. M., Torensma, R., & Figdor, C. G. (2007). Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nature Reviews Immunology*, *7*(10), 790-802.
- Takeda, Y., Shinzaki, S., Okudo, K., 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*(12), 3036-3043.
- Thorburn, J., Horita, H., Redzic, J., Hansen, K., Frankel, A. E., & Thorburn, A. (2009). Autophagy regulates selective HMGB1 release in tumor cells that are destined to die. *Cell Death & Differentiation*, *16*(1), 175-183.
- Tittarelli, A., González, F. E., Pereda, C., Mora, G., Muñoz, L., Saffie, C., . . . Hermoso, M. (2012). Toll-like receptor 4 gene polymorphism influences dendritic cell in vitro function and clinical outcomes in vaccinated melanoma patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *61*(11), 2067-2077.
- Tsan, M.-F., & Gao, B. (2004). Cytokine function of heat shock proteins. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *286*(4), C739-C744.
- Vanneman, M., & Dranoff, G. (2012). Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 237-251.
- Vázquez, M. B., Sureda, M., & Rebollo, J. (2012). Células dendríticas I: aspectos básicos de su biología y funciones. *Inmunología*, *31*(1), 21-30.
- Venereau, E., Casalgrandi, M., Schiraldi, M., Antoine, D. J., Cattaneo, A., De Marchis, F., . . . Raeli, L. (2012). Mutually exclusive redox forms of HMGB1

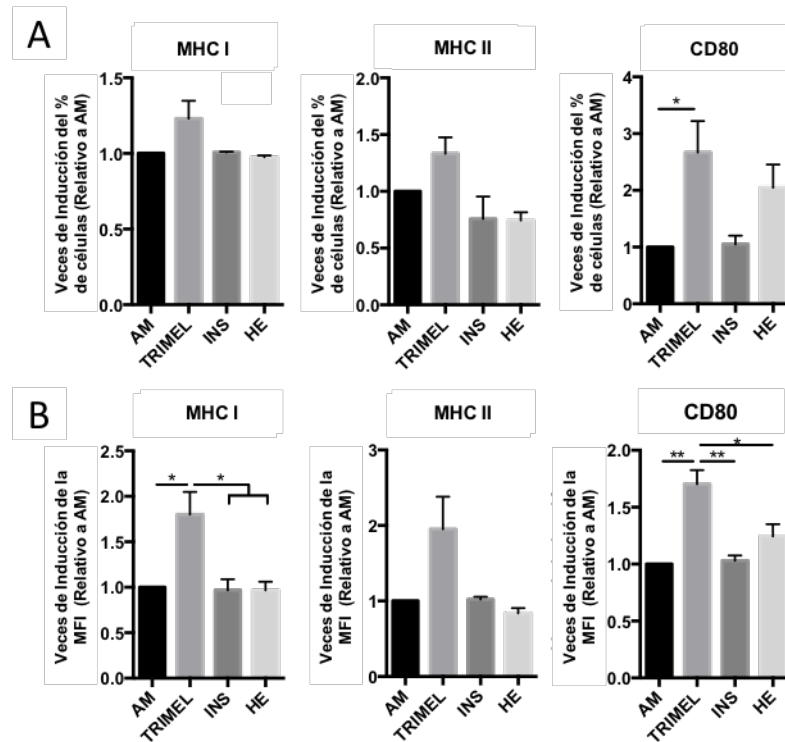
- promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *The Journal of experimental medicine*, 209(9), 1519-1528.
- Wan, J., Shi, F., Xu, Z., & Zhao, M. (2015). Knockdown of eIF4E suppresses cell proliferation, invasion and enhances cisplatin cytotoxicity in human ovarian cancer cells. *International journal of oncology*, 47(6), 2217-2225.
- Wei, B., Guo, C., Liu, S., & Sun, M.-Z. (2015). Annexin A4 and cancer. *Clinica Chimica Acta*, 447, 72-78.
- Wheeler, D. S., Chase, M. A., Senft, A. P., Poynter, S. E., Wong, H. R., & Page, K. (2009). Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respiratory research*, 10(1), 1.
- Willmann, K., Legler, D. F., Loetscher, M., Stuber Roos, R., Belen Delgado, M., Clark-Lewis, I., . . . Moser, B. (1998). The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *European journal of immunology*, 28(6), 2025-2034.
- Willshaw, A., Grant, K., Yan, J., Rockliffe, N., Ambavarapu, S., Burdyga, G., . . . Gawler, D. (2004). Identification of a novel protein complex containing annexin A4, rabphilin and synaptotagmin. *FEBS letters*, 559(1-3), 13-21.
- Xie, Y., Li, Y., Zhang, Q., Stiller, M. J., Wang, C.-L. A., & Streilein, J. W. (2000). Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *Journal of dermatological science*, 24(1), 25-37.
- Yang, F., Brune, J. L., Baldwin, W. D., Barnett, D. R., & Bowman, B. H. (1983). Identification and characterization of human haptoglobin cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(19), 5875-5879.
- Ye, B., Cramer, D. W., Skates, S. J., Gygi, S. P., Pratomo, V., Fu, L., . . . Berkowitz, R. S. (2003). Haptoglobin- $\alpha$  Subunit As Potential Serum Biomarker in Ovarian Cancer Identification and Characterization Using Proteomic Profiling and Mass Spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 9(8), 2904-2911.
- Zimmermann, U., Balabanov, S., Giebel, J., Teller, S., Junker, H., Schmoll, D., . . . Walther, R. (2004). Increased expression and altered location of annexin IV

in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination. *Cancer letters*, 209(1), 111-118.

Zitvogel, L., Tesniere, A., & Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 715-727.

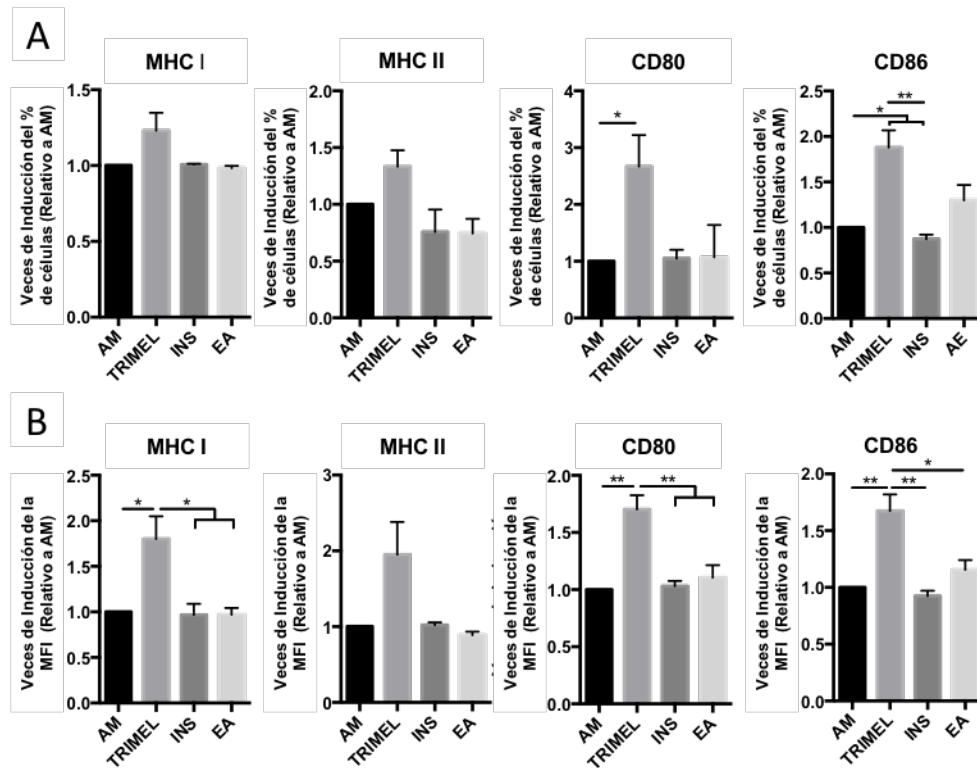
## ANEXOS

## 1. Figuras Suplementarias

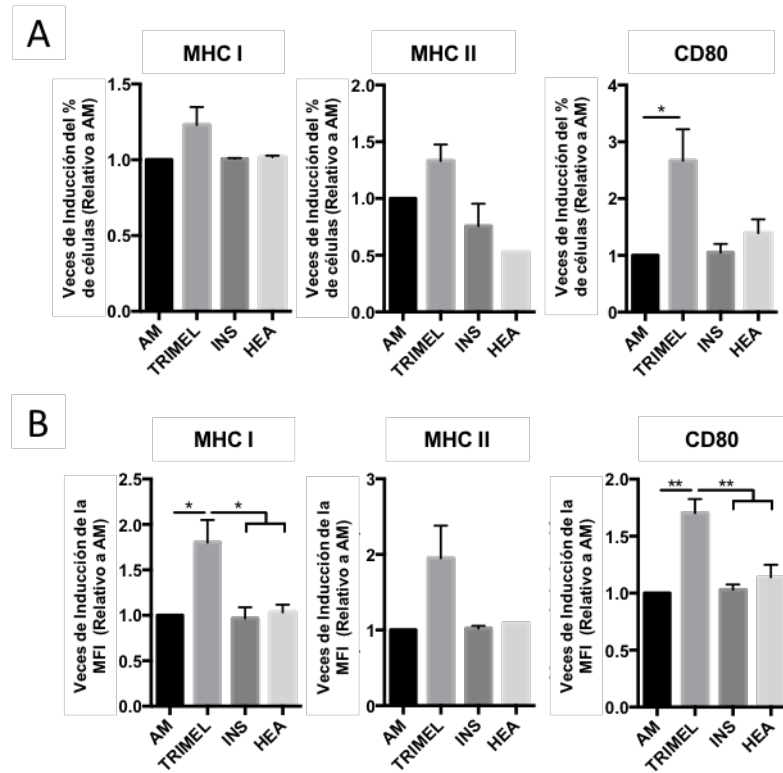


**Figura Suplementaria 1. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HE.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas con la combinación de proteínas HP y EIF4E a igual concentración durante 24 horas. (A) Gráficos para porcentaje de células y (B) MFI de los distintos marcadores expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

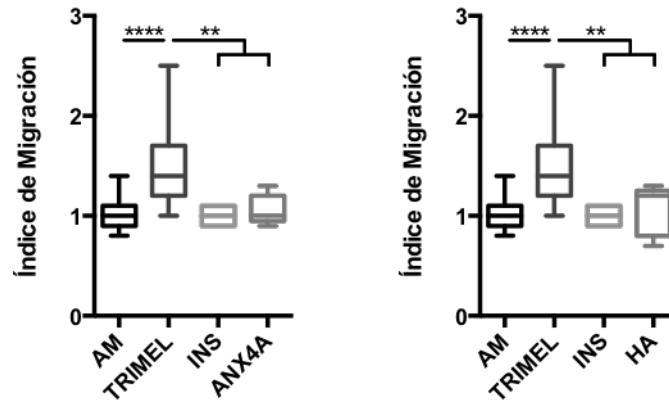




**Figura Suplementaria 4. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con EA.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas con la combinación de proteínas EIF4E y ANXA4 a igual concentración durante 24 horas. (A) Gráficos para porcentaje de células y (B) MFI de los distintos marcadores expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura Suplementaria 3. Expresión de marcadores de maduración en DCs generadas *in vitro*, y estimuladas con HEA.** DCs generadas *in vitro* fueron estimuladas con la combinación de proteínas HP, EIF4E y ANXA4 a igual concentración durante 24 horas. (A) Gráficos para porcentaje de células y (B) MFI de los distintos marcadores expresados como veces de inducción relativo a AM. Resultados expresados como SEM de al menos tres experimentos independientes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figura Suplementaria 4. Ensayos de trans migración *in vitro* de DCs estimuladas con la proteína ANXA4 o la combinación HA.** Para analizar la capacidad de migración en respuesta a CCL19, las células fueron cargadas en cámaras Transwell y se les permitió migrar durante 3 horas. El índice de migración simboliza el aumento de la migración en relación a la observada en el medio control. Resultados expresados como mínimo y máximo de al menos tres experimentos independientes para cada condición. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## 2. Consentimiento Informado y aprobación Comité de Ética



### 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

Versión 3.

Edición 5 de Agosto 2016



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



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:

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

Versión 3.

Edición 5 de Agosto 2016





**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.....





### 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.



*(Firma)*  
**DR. ANTONIO MORALES BARRIA**  
**PRÉSIDENTE**  
**COMITÉ ÉTICO CIENTIFICO**  
**HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE.**