



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA CONSERVADORA**

**EFFECTO DE LA PROTEÍNA TDP-43 EN LA MADURACIÓN *in vitro* DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS DE USO TERAPÉUTICO**

Paula Andrea Canales Guerrero

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fermín González Bergas

TUTOR ASOCIADO

Dr. Mauricio Budini

Adscrito a Proyectos

Fondecyt 11130607

Fondecyt 1161123

Santiago-Chile

2019

DEDICATORIA

*A Myriam Espinosa Inostroza,
mi primera profesora de ciencias naturales*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi tutor Dr. Fermín González y mi cotutor Dr. Mauricio Budini. A los integrantes del Laboratorio de Inmunología Antitumoral del Dr. Flavio Salazar, por abrirme las puertas de su laboratorio.

En especial, quisiera agradecer profundamente a Catalina, Nicolás, Susana y Victoria por su contención incondicional que me mantuvo en pie en los momentos más difíciles y me acompañaron durante todo este proceso.

A mis compañeras, Francisca y Lynn con quienes sorteamos los obstáculos estos 7 años de carrera. A Cristián Solís, por su infinita paciencia como docente. A mis hermanos Cristian e Ignacio, porque la vida nos juntó para no separarnos nunca más.

También agradecer a mi madrina y abuela, que me acogieron cuando a los 18 años decidí irme de la casa de mis padres y contribuyeron a mi formación como mujer libre, valiente y empoderada. A mi madre y hermanas, que no me dieron la espalda, a pesar de nuestras diferencias. Por último a María Isabel Alexandra y Amira Victoria, mis compañeras incondicionales de estudio.

Agradezco a todos los funcionarios, de la Facultad de Odontología, su entrega día a día y empatía es parte de lo que soy hoy como profesional.

Por último, quisiera agradecer a todos los voluntarios que participan en los Trabajos Comunitarios de Odontología, que creen en la odontología por y para el pueblo y a mi equipo de fútbol femenino con quienes fuimos bicampeonas el año 2017 y líderes indiscutibles del campeonato el 2019, llenaron de alegría mis años universitarios.

ÍNDICE

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
MARCO TEÓRICO	11
<i>Cáncer como problema de salud</i>	11
<i>Componentes del sistema inmunitario y su rol en la detección de neoplasias</i> ...	12
<i>Inmunoterapia contra el cáncer: nuevos desafíos y blancos terapéuticos</i>	15
<i>Células dendríticas: origen, maduración y función en el organismo</i>	17
<i>Migración y tráfico celular de células dendríticas</i>	20
<i>Danger model: Señales de peligro y muerte celular inmunogénica</i>	21
<i>TRIMEL como fuente de moléculas inmunogénicas</i>	24
<i>Análisis proteómico del TRIMEL</i>	25
<i>Proteína candidata: TDP-43</i>	26
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	28
<i>Objetivo general</i>	28
<i>Objetivos específicos</i>	28
METODOLOGÍA	29
<i>Declaración de ética</i>	29
<i>Generación in vitro de CDs a partir de monocitos de sangre periférica</i>	29
<i>Lisado de células tumorales TRIMEL y proteínas de estudio</i>	30
<i>Estimulación con hTDP-43</i>	31
<i>Fenotipificación: citometría de flujo</i>	31
<i>Purificación de proteína hTDP-43 (rTDP-43)</i>	32
<i>Generación de células HEK293wt y HEK293flp</i>	32
<i>Estimulación</i>	32
<i>Ensayos de trans migración in vitro</i>	33
<i>Análisis estadístico</i>	34
RESULTADOS	35
<i>Capacidad de la proteína hTDP-43, en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL, de inducir in vitro la maduración fenotípica de células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo</i>	35
<i>Capacidad de hTDP-43, TDP-43 purificada (rTDP-43), HEK293flp y HEK293wt de inducir la migración de células dendríticas humanas mediante ensayos de trans migración in vitro</i>	42
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

ANEXOS.....59
Consentimiento informado y aprobación comité de ética59

LISTA DE ABREVIATURAS

AM: Monocitos activados

APC: Células presentadoras de antígenos

ARNm: ARN mensajero

CCR: Receptor de quimioquinas

CCR7: Receptor de Quimioquina C-C Tipo 7

CD: Células dendríticas

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 CD28

CD83 Molécula de adhesión asociada a maduración de células dendríticas

CD86: Molécula coestimuladora B7.2, ligando CD28

CDc: CD convencionales

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

DAMP: patrones moleculares asociados a daño

FBS: Suero fetal bovino

FDA: *Food and Drugs Administration*

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

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

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

iCD: células dendríticas inmaduras

ICD: *Immunogenic cell death*

IFN- α/β : Interferón alfa/beta

IFN- γ : Interferón gamma

IL-12: Interleuquina 12

IL-4: Interleuquina 4

LB: Linfocitos B

LT: Linfocitos T

MFI: Intensidad media de fluorescencia

MHC-I: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I

MHC-II: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II

MM: Melanoma maligno

NK: *Natural killer*

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PAP: Antígeno tumoral-fosfatasa ácida prostática

PBMC: Células mononucleares de sangre periférica

PBS: Buffer salino fosfato

PPRs: Receptores de reconocimiento de patrones

SEM: Error estándar de la media

TAPCells: Células presentadoras de antígenos tumorales

TDP-43: *TAR-DNA-binding protein*

TLRs: Receptores tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

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

RESUMEN

Las vacunas basadas en células dendríticas (CD) han surgido como una herramienta prometedora en la inmunoterapia contra el cáncer debido a su capacidad para estimular la respuesta inmune antitumoral. Se ha demostrado que las células dendríticas con un lisado celular derivado de tres líneas tumorales de melanoma alogénicas (TRIMEL) sometidas a *shock* térmico, inducen una respuesta inmunológica en pacientes con melanoma. El lisado TRIMEL funciona como una fuente de antígenos asociados a tumores (TAAs), así como induciendo la maduración de CDs mediante patrones moleculares asociados a daño/peligro (DAMPs). Se identificó el perfil proteómico de TRIMEL y se encontraron 91 proteínas en los lisados tratados con *shock* térmico: 18 de ellas se encontraban sobre-reguladas y 73 sub-reguladas. Además, se identificaron 32 proteínas que solo se expresaron en los lisados tratados con *shock* térmico y 26 proteínas que estaban solo presentes en las muestras no tratadas con *shock* térmico. Se seleccionó la proteína TDP-43 como candidata a nuevo DAMP para poder explicar en parte la capacidad del lisado TRIMEL para activar CDs. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de esta proteína en distintas concentraciones para inducir la maduración y consecuente migración de células dendríticas humanas. Se generaron células dendríticas *in vitro* para ser estimuladas con las distintas concentraciones de hTDP-43. Los resultados obtenidos indican que la proteína no es capaz de generar cambios en el fenotipo de las CDs de forma significativa y se vio favorecida la migración cuando se utilizó el lisado de HEK293wt que sobreexpresa TDP-43. Es necesario realizar más estudios que permitan validar o descartar que las proteínas estudiadas tengan funciones como DAMPs.

MARCO TEÓRICO

Cáncer como problema de salud

La Organización Mundial de la Salud, se refiere a cáncer como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Una de sus principales características es que las células afectadas comienzan a multiplicarse y propagarse rápidamente a los tejidos circundantes; proceso conocido como metástasis. La oncogénesis es aquel proceso en el cual una célula normal se transforma en una célula cancerígena y es el resultado de la adquisición de características específicas. Dentro de estas se incluye: señalización de proliferación sostenida en el tiempo, resistencia a la muerte celular programada, inductores de angiogénesis y activadores de invasión y metástasis; la razón de estas fallas en las funciones celulares la encontramos en la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética. Se han identificado más de 100 tipos distintos de enfermedades neoplásicas malignas con diferentes características en relación con su agresividad, progresión, sobrevida, tratamiento y pronóstico.

A nivel mundial, el cáncer ha incrementado su incidencia con los años debido al crecimiento y envejecimiento de la población, así como la creciente prevalencia de factores de riesgo como tabaquismo, sobrepeso y falta de actividad física. Según las estimaciones de *Global Cancer Observatory*, existen aproximadamente 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes ocurrieron en 2012 en todo el mundo (Torre & cols., 2015). En Chile, nos enfrentamos a un fenómeno de transición demográfica en la que aumenta de manera progresiva y considerable aquellos grupos de mayor edad. En paralelo a los cambios demográficos, las principales enfermedades que afectan a la población también han sufrido una variación: desde las enfermedades infectocontagiosas hacia las denominadas enfermedades crónicas no transmisibles.

El cáncer corresponde a una de las cuatro enfermedades no transmisibles que causan el mayor número de muertes a nivel mundial, convirtiéndose en un problema epidemiológico en crecimiento y sin resolver (OMS, 2018). En Chile se

posiciona como la segunda causa de muerte en la población con más de 24.000 muertes durante el año 2013 (DEIS-MINSAL, 2013). La tendencia a nivel mundial proyecta un drástico aumento en la cantidad de nuevos casos, que bordearán los 24 millones para el 2030 (Bray *et al.*, 2015).

Dentro de los tratamientos convencionales contra el cáncer encontramos cirugía, radioterapia y quimioterapia. Estos han mostrado mejoras significativas en lo que respecta al desarrollo de nuevas drogas quimioterapéuticas y tecnologías en salud, sin embargo, sus costos asociados han aumentado en forma progresiva. Mientras que los efectos adversos reportados no han disminuido en forma considerable. Si bien se lograron mejoras significativas en el tratamiento de neoplasias de origen hematológico, se mantiene un efecto limitado en neoplasias de tumores sólidos (Nieboer *et al.*, 2005), como el carcinoma espino celular de cabeza y cuello, melanoma maligno (MM) y cáncer de próstata. Adicionalmente, la quimio y radioterapia presentan efectos secundarios no deseados como mucositis, alopecia, osteorradionecrosis y cardiotoxicidad debido a que actúan de forma inespecífica sobre células en división, además del desarrollo de resistencia a los fármacos quimioterapéuticos (Sonis, 2009; Benasso, 2013; Sridharan & cols. 2013; Lipshultz & cols., 2014; Joseph W. Nichols, 2013). El tratamiento convencional de estos cánceres conlleva un enorme costo monetario para los gobiernos. En Chile, anualmente se invierten más de 2.100 millones de pesos de forma directa en cuidados y tratamientos del cáncer, sin considerar los costos indirectos asociados a ausentismo laboral por pérdida de productividad (De Jimenez La Jara *et al.* 2015).

El escenario de salud en la actualidad, nos obliga a explorar nuevos enfoques terapéuticos mejor tolerados, menos costosos y más efectivos, lo que nos lleva a la búsqueda de una herramienta que permita la modulación y estimulación del propio sistema inmune del paciente.

Componentes del sistema inmunitario y su rol en la detección de neoplasias

El sistema inmunológico es una red interactiva de órganos linfoides, células, factores humorales y citoquinas que tiene por función esencial la defensa del

huésped para mantener la homeostasis frente a agresiones de naturaleza biológica, físico-químicas e internas. La respuesta inmune se divide en innata y adaptativa, determinadas por la velocidad y especificidad de la reacción. El término inmunidad innata incluye: 1) barreras anatómicas y fisiológicas físicas, químicas y microbiológicas, 2) elementos celulares como neutrófilos, monocitos y macrófagos y 3) moléculas del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y citoquinas que proporcionan una defensa inmediata y rápida constituyendo la respuesta inicial del huésped. La comunicación entre la respuesta inmune innata y adaptativa se da a través de las células presentadoras de antígenos (APC), que inician la respuesta inflamatoria activando la respuesta inmune adaptativa, dando paso a reacciones específicas de antígeno a través de linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) (Chaplin D., 2010; Parkin *et al.*, 2005).

Una de las características más importantes de la respuesta adaptativa, es su capacidad de retener información de la exposición a antígenos lo que se denomina memoria inmunológica. Consiste en la producción de LB y LT de memoria, que persisten en un estado aparentemente inactivo, donde pueden re-expresar funciones efectoras cuantitativa y cualitativamente superiores después de otro encuentro con su antígeno específico, proporcionando una respuesta más efectiva del huésped contra patógenos o toxinas específicas cuando se encuentran por segunda vez. (Chaplin D., 2010; Nicholson L., 2016; Peter J. Delves, 2000).

Se ha demostrado, que el sistema inmune no limita su capacidad de reconocimiento al modelo clásico de “defensa contra agentes externos”, sino que es capaz de diferenciar, entre los agentes propios los ‘normales’ y alterados. En efecto, esto corresponde a la confluencia entre enfermedades neoplásicas y la acción del sistema inmune. En 1970 se propone la teoría de la Inmunovigilancia; comprendida como aquella selección fisiológica que realiza el sistema inmune sobre las nuevas células neoplásicas (Burnet, 1957). El sistema inmunológico humano exhibe un doble rol en el desarrollo del cáncer, aunque su función principal es suprimir el crecimiento tumoral, también da forma a la inmunogenidicidad y promueve la progresión tumoral a través de un intercambio dinámico conocido actualmente como inmunoedición, proceso que consta de tres etapas:

inmunovigilancia, inmunoselección e inmunosubversión (eliminación, equilibrio y escape) (Reiman, Kmiecik, Manjili, & Knutson, 2007).

Durante la fase de inmunovigilancia, el desafío es reconocer las diferencias sutiles entre lo propio y lo propio transformado, que se presentan como precursores de células neoplásicas y, en la mayoría de los casos, destruirlos (Zitvogel, Tesniere, & Kroemer, 2006; Krysko *et al.*, 2012). Las células tumorales expresan varias señales de peligro y producen alteraciones menores en el tejido circundante, lo que resulta en la liberación de señales inflamatorias como IFN- γ , IFN- α / β , TNF e IL-12, que reclutan células *natural killer* (NK), células dendríticas (CD) y macrófagos en el sitio del tumor. Esto resulta en la apoptosis y muerte de células tumorales. Los antígenos tumorales liberados son presentados por APC iniciando una respuesta inmune adaptativa específica del tumor.

En el transcurso, se observa que existen células neoplásicas que son capaces de escapar al sistema de inmunovigilancia por la acción de mecanismos que permiten modificar el microambiente tumoral, para facilitar el desarrollo del fenotipo maligno (Zigler, Shir, *and* Levitzki 2013). En la fase de inmunoselección, la interacción continua entre las células inmunes y las células tumorales que han escapado de la fase de inmunovigilancia impidiendo la expansión de las células tumorales. Sin embargo, esta presión inmune continua promueve la formación de nuevas variantes de células tumorales con inmunogenicidad reducida que escapan al reconocimiento por parte del sistema inmune. Esta es la fase más larga en el proceso de inmunosedición, cuando las variantes de células tumorales residen en una forma latente antes de escapar eventualmente del proceso. Durante la fase de inmunosubversión las células tumorales adoptan varios mecanismos para evadir la vigilancia: evitan la activación de LT, expresan factores de crecimiento pro-supervivencia, desarrollan mecanismos de defensa inmunosupresores para escapar de la vigilancia inmunitaria a través de un proceso llamado tolerancia inmunitaria, promoviendo la angiogénesis y crecimiento tumoral. Como resultado final, se obtienen células tumorales con resistencia inmunológica incrementada lo que resulta en un crecimiento descontrolado del tumor y su posterior manifestación

como masas tumorales clínicamente identificables con capacidad de metástasis (Stephen & Hajjar., 2017).

Los distintos tipos de cáncer tienen marcadores únicos que le otorgan la capacidad de escapar del sistema inmunológico. Por lo tanto, en los esfuerzos para tratarlo, se han realizado avances científicos hacia el desarrollo de terapias que exploten las capacidades del sistema inmunológico, logrando mayor comprensión de los procesos inmunorreguladores del microambiente tumoral. De esta forma, la idea es diseñar agentes específicos y capaces de modular y aumentar la eficacia y efectividad de la respuesta inmune propia.

Inmunoterapia contra el cáncer: nuevos desafíos y blancos terapéuticos

La inmunoterapia antitumoral tiene por finalidad la modulación y estimulación del sistema inmune propio del paciente contra las células cancerígenas, ya sea fortaleciendo la respuesta inmune del hospedero o bien, aportando directamente con agentes químicos o celulares al organismo. Se pueden clasificar en distintas categorías: vacunas, anticuerpos monoclonales, citoquinas recombinantes, moléculas de bajo peso molecular y células T autólogas; dependiendo del tipo de cáncer y la etapa en la que se encuentre se dicta el tipo de terapia más adecuada para el paciente.

El desarrollo de la inmunoterapia para tratar a los pacientes con cáncer resulta de gran interés debido a que la respuesta montada por el sistema inmune es específica para los antígenos tumorales, logrando así, la eliminación casi exclusiva de células alteradas, a diferencia de las terapias tradicionales, además tiene la capacidad de producir respuestas duraderas en pacientes en etapas más avanzadas de la enfermedad (Pandya, Murray, Pollok & Ranberger, 2016; Stephen & Hajjar., 2017).

A la fecha, ya se han desarrollado ensayos clínicos y tratamientos para el cáncer con inmunoterapia aprobadas por la *US Food and Drugs Administration* (FDA). A pesar del éxito inicial obtenido, la gran mayoría de los pacientes

presentaba recaída en algún punto del tratamiento debido a factores individuales como edad, sexo, régimen de quimioterapia y sitio/tipo de cáncer que desempeñan un papel fundamental en la definición de la genómica de la enfermedad y son elementos primordiales para el desarrollo de la inmunoterapia específica para ese paciente. El enfoque para la creación de nuevas terapias, está en identificar este subconjunto de mutaciones genéticas que pueden resultar en patrones moleculares distintivos y predictivos para potenciales blancos terapéuticos (Stephen & Hajjar., 2017).

Una comprensión más profunda del mecanismo de las respuestas inmunitarias en el microambiente tumoral es lo que condujo a un gran avance en la inmunoterapia contra el cáncer: el descubrimiento del *check-point* inmunitario CTLA4 y las estrategias para utilizar el potencial inmune de las células T. En 2010 la FDA aprobó *Provenge* como vacuna terapéutica celular autóloga contra el cáncer de próstata avanzado resistente a hormonas. En 2011 *Ipilimumab* fue aprobado por la FDA para el tratamiento de melanoma metastásico, se describe como un anticuerpo monoclonal dirigido a inhibir los efectos supresores de CTLA4 sobre células T, permitiendo su activación para dar paso a la respuesta inmune. En los últimos años, se han realizado esfuerzos para desarrollar posibles anticuerpos monoclonales contra el ligando para PD-1 y PD-L1, como otro mecanismo para activar las respuestas inmunitarias mediadas por células T e inhibir los mecanismos inmunosupresores de la PD-1 en ciertos cánceres (Pandya, Murray, Pollok & Ranberger, 2016; Stephen & Hajjar., 2017; Tao *et al.*, 2017).

En vista de lo anterior, una de las técnicas que ha despertado mayor interés en el último tiempo son las vacunas basadas en CDs que son capaces de captar un conjunto de señales liberadas por células estresadas, como las células tumorales, promoviendo de forma activa la inmunogenicidad del tumor y otorgando protección inmunitaria a largo plazo al huésped (Palucka & Banchereau, 2012). La obtención es mediante cultivo *ex vivo* de CDs del paciente en exposición de antígenos tumorales específicos, para luego re-inyectar estas células en el paciente. En Chile, Salazar-Onfray y colaboradores reportaron mejorías en la sobrevida a largo plazo de cerca del 60% de pacientes con MM en etapa IV gracias a la administración de

una vacuna 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) Por lo tanto, para maximizar las capacidades y el alcance terapéutico de las estrategias basadas en vacunas de CDs es importante entender su biología y participación en la respuesta inmune innata y adaptativa particularmente en el contexto del microambiente tumoral.

Cada vez es más evidente que incluso si dos individuos del mismo grupo de edad son diagnosticados con la misma forma de cáncer, el tipo de respuestas podría variar entre ellos. Debido a la patogenia del cáncer que se atribuye a factores como polimorfismos genéticos que pueden regular de manera diferencial el proceso de inmunoección. Las nuevas estrategias apuntan a la combinación de terapias en las distintas etapas de la respuesta inmune, actuando de forma sinérgica para generar respuestas más fuertes, prolongadas y efectivas. En efecto, la próxima frontera se centrará en el desarrollo de inmunoterapias personalizadas contra el cáncer adaptadas a cada paciente en particular (Pandya, Murray, Pollok & Ranberger, 2016; Tao *et al.*, 2017).

Células dendríticas: origen, maduración y función en el organismo

Para lograr una respuesta anti-tumoral efectiva y específica, es fundamental que exista comunicación entre las células que componen el sistema inmune. Las CDs son consideradas como APC profesionales ya que son capaces de activar LT antígeno-específico vírgenes (Schmitt *et al.*, 2010; Palucka & Banchereau, 2012). En los tejidos, pueden ser activadas por citoquinas pro-inflamatorias y gracias a su capacidad de capturar y procesar antígenos en tejidos periféricos logran madurar y luego migrar para presentarlos en los órganos linfáticos secundarios a LT vírgenes CD4+ y CD8+ gatillando la activación, proliferación y migración a los tejidos periféricos para realizar su función efectora (Sallusto *et al.*, 1998; Escobar *et al.*, 2005; Cheong & cols., 2010; Steinman and Idoyaga 2010).

Las CD se desarrollan en la médula ósea a partir de: un precursor mieloide común que finalmente se diferenciará en monocitos y que bajo ciertas circunstancias pueden transformarse en CD en los tejidos, un precursor común de células dendríticas que generará células dendríticas plasmocitoides especialistas en la secreción de IFN y en CD convencionales (CDc). Según los factores transcripcionales involucrados, se pueden encontrar dos sub-grupos de células dendríticas convencionales: CDc Xcr1⁺ y CDc CD11b⁺ (Dalod *et al.*, 2014; Veglia & Gabrilovich, 2017). Estas caracterizan por su capacidad migratoria y ser especialistas en la presentación antigénica, orquestando la respuesta inmune y estableciendo el nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Hart, 1997; Hoebe & cols., 2004).

Las CDs residen en la sangre y en tejidos linfáticos y no linfáticos como células dendríticas inmaduras (iCD) que se caracterizan por una alta capacidad fagocítica y endocítica mediada por receptores que facilitan la captura de antígenos previamente reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones (PPRs), alta expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II), baja expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y CD83 en su membrana plasmática y secreción limitada de citoquinas. Estímulos como la presencia de patógenos o señales de tejido dañado inducen la activación y maduración a CDs maduras provocando cambios en su fenotipo como: pérdida de los receptores endocíticos y fagocíticos que le permiten capturar antígenos, aumento en la producción y expresión de MHC II y de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86, CD83 al mismo tiempo que aumenta la expresión del receptor de quimioquina C-C tipo 7 (CCR7) que permite la posterior migración a los linfonodos, cambios en la morfología celular y adquisición de la capacidad de secretar citoquinas para iniciar la respuesta inmune adaptativa mediada por LT (Palucka & Banchereau, 2013; Sallusto *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2003; Veglia & Gabrilovich, 2017).

El principal rol de una CD madura consiste en la presentación de antígenos. Se ha descrito que las CDs son las únicas capaces de presentar péptidos exógenos cargados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad-I (MHC-I) a LT

CD8+ vírgenes, en un mecanismo conocido como presentación cruzada (C. J M Melief, 2003). Durante la respuesta inmune anti-tumoral, las CD8 son capaces de captar y procesar material soluble proveniente de células cancerígenas apoptóticas, necróticas o incluso vivas (Cornelis J.M. Melief, 2008). La presentación cruzada mediada por CD8 es la forma descrita para la presentación de antígenos asociados a tumores, convirtiéndose en una de las claves en la respuesta inmune anti-tumoral de las CD8 maduras (C. J M Melief, 2003).

El reconocimiento del rol que cumplen las CD8 y el gran desarrollo en el área de la inmunoterapia explica el interés en nuevas técnicas para obtener grandes cantidades *in vitro* para uso terapéutico (Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Las CD8 que residen en la periferia, podrían originarse a partir de monocitos cuando son reclutados a los tejidos en respuesta a señales pro-inflamatorias (Steinman, 2003). De hecho, se pueden obtener CD8 humanas *in vitro* a partir de varias fuentes celulares como médula ósea, sangre de cordón umbilical y células mononucleares de sangre periférica (PBMC) utilizando citoquinas y factores de activación como el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL-4) (Bonasio & Von Adrian, 2006; Sallusto & Lanzavecchia, 1994).

La eficacia de los protocolos de vacunación que utilizan CD8 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 de las CD8. Las estrategias vacunatorias dirigidas a inducir inmunidad contra el cáncer necesitan incluir una estrategia para producir CD8 maduras *ex vivo* de forma eficiente (Tacken, de Vries, Torensma, & Figdor, 2007). La obtención de CD8 maduras capaces de polarizarse a respuestas de inmunidad celular y humoral está influenciada por estímulos que provocan la maduración cualitativa, que a través, de los PRRs podrían interpretar señales desde el microambiente dependiendo de la naturaleza del estímulo (Lin, Suri, Rahdon, Austyn, & Roake, 1998) como los DAMPs. Así mismo, sería interesante utilizar combinaciones específicas de estímulos para la maduración de las CD8 con el objetivo de obtener fenotipos antitumorales específicos.

Migración y tráfico celular de células dendríticas

La migración celular, es fundamental y requiere la coordinación de varios procesos celulares que operan en un ciclo (Sheetz, et al., 1999). La capacidad de migrar es crítica en el desarrollo, en condiciones fisiológicas y patológicas. Es impulsada por una organización bioquímica y biomecánica intracelular que es sensible a las señales extracelulares. El fenómeno de tráfico celular de las CDs muestra su capacidad para desencadenar una respuesta inmune adecuada y eficaz contra patógenos y tumores. En este contexto, la inmunoterapia basada en la administración de vacunas de CDs depende, entre otras cosas, de su capacidad para migrar desde el sitio de administración a los linfonodos correspondientes (González *et al.*, 2014).

El tráfico celular tejido específico o *homing* es regulado por quimioquinas, que son secretadas por las células del organismo. La migración de leucocitos depende de la expresión de selectinas e integrinas, que proporcionan la fuerza motora para su interacción con las células endoteliales. La unión de quimioquinas a la matriz extracelular y a los receptores de quimioquinas permite que las células migren a través de los gradientes quimiotácticos. La migración de CDs a los tejidos, depende de la producción de quimioquinas y regulación de la expresión de sus receptores, estas proteínas se producen en patrones con distintos perfiles de respuestas inmunes, por lo que se expresan ciertas quimioquinas dependiendo de su ubicación (Gouwy *et al.*, 2014; Schaller & cols., 2017). Corresponden a un grupo de cincuenta moléculas entre 7–15 kDa que se unen a los 19 receptores acoplados a proteínas G (GPCR) que se subdividen en grupos CCR, CXCR, XCR y CX3CR. Comparten homología estructural y se clasifican típicamente por su patrón de expresión: homeostático, constitutivo o inducible. Además, los ligandos de quimioquinas comparten receptores, lo que lleva a efectos redundantes, aditivos y competitivos (Schaller & cols., 2017).

La migración de las CDs y sus progenitores, es un aspecto crucial en su función inmunológica e invoca mecanismos celulares y moleculares. La migración de CDs implica: 1) la capacidad para ingresar a la sangre; 2) el reclutamiento de las

células circulantes hacia los tejidos; 3) el alojamiento extravascular y la motilidad intersticial necesaria para el procesamiento de antígenos; 4) la capacidad de acceder a los vasos linfáticos para viajar a linfonodos o de regreso a la sangre; y 5) la capacidad de interactuar con los linfocitos migratorios y otras células inmunes de manera que permita el intercambio de información crítica con respecto a la naturaleza y contexto de los antígenos presentados. Las CD4s deben ser capaces de adaptar su capacidad migratoria para realizar de forma óptima sus funciones en respuesta a los cambios del microambiente (Alvarez, D., Vollmann, E. H., & von Andrian, U. H, 2008). Rápidamente, su comportamiento migratorio se modifica al igual que la expresión de los receptores de quimioquinas que difieren entre los subconjuntos y ubicaciones en el tejido. Las CD4s inmaduras expresan CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 y CX3CR1, y responden a una amplia gama de quimioquinas, tras madurar las CD4s disminuyen la expresión de CCR1, CCR5 y CXCR1 mientras que expresan niveles elevados de CCR7 y adquieren capacidad de respuesta a sus ligandos: CCL19 y CCL21 que son expresados en la pared de vasos linfáticos y en linfonodos por células del estroma en el área de LT para dirigir la migración (L. A. Johnson and Jackson, 2014).

Danger model: Señales de peligro y muerte celular inmunogénica

El *danger model*, se propuso a principios de la década de los '90 cuando se creía que el sistema inmunitario solo respondía frente al daño sobre agentes externos. Este modelo propuso que el proceso de identificación inmunológico no se limitaba a la discriminación entre 'el yo y el no-yo', sino que más bien discrimina entre entidades 'peligrosas' y 'seguras', independiente de su origen. Permitiendo así, la inclusión de un espectro más amplio de moléculas y marcadores de superficie capaces de desafiar al sistema inmunológico, que pueden ser, por ejemplo: patógenos, tejidos infectados o necróticos, así como también células en proceso de muerte celular no fisiológica. Este modelo, supone que todas estas entidades alertan al sistema inmunológico emitiendo señales de peligro o alarmas como PAMPs o ligandos de PRR de derivados endógenos; posteriormente, las señales de peligro derivadas endógenamente, como consecuencia de la muerte celular, se denominaron colectivamente como DAMPs. El término 'señal de peligro' consiste

en todas las entidades, capaces de alertar al sistema inmune y permitirle unirse a sus receptores, son conocidos también como *alarmins* e incluyen a PAMPs y DAMPs. La mayoría de los DAMPs se unen a PRRs específicos como los receptores tipo Toll (TLRs). Por último, también existen ciertos DAMPs que no actúan como señales de peligro, sino que provocan inmunosupresión o permanecen neutrales en términos de inmunomodulación. Produciendo el inicio de la inmunidad adaptativa terapéuticamente persistente (Figura 1 modificado de Garg and Agostinis, 2017).

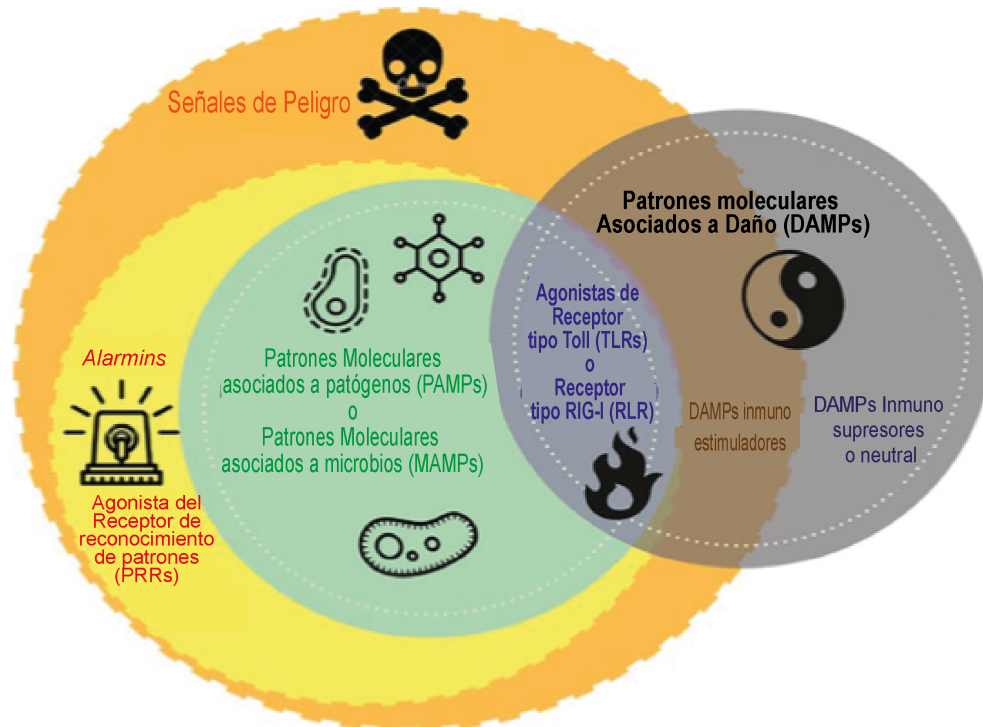


Figura 1. Representación esquemática de señales de peligro, DAMP (patrones moleculares asociados a daño) y PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos) en la biología inmune innata. Diagrama de Venn representa las diferentes relaciones entre señales de peligro y *alarmins* Danger Model. Modificado de Garg and Agostinis, 2017.

Los DAMPs, son un grupo de moléculas endógenas que en condiciones fisiológicas se encuentran principalmente en el medio intracelular. No obstante, cuando las células se encuentran bajo episodios de estrés, sufren injurias o han comenzado el proceso de muerte programada. Estos factores endógenos, son expuestos en la superficie celular con el potencial de ser captados por los receptores de células inmunes, que son capaces de distinguir entre señales endógenas de

peligro e inofensivas, induciendo la respuesta inflamatoria (Krysko *et al.*, 2012). Se pueden dividir según el momento en que modifican las funciones de las APC: DAMPs relacionados con efecto en etapa temprana: inducen quimiotaxis, fagocitosis y producción de citoquinas proinflamatorias (iDAMPs); o las DAMPs relacionadas con efecto en etapa tardía: inducen la migración y expresión de moléculas coestimuladoras y la presentación cruzada de antígenos asociados a tumores (cDAMPs) (González *et al.*, 2018). Estas moléculas, son reconocidas por casi todos los tipos celulares del sistema inmune, principalmente por CDs a través de receptores de reconocimiento de patrones en su superficie, como los TLRs, que corresponden a un grupo de proteínas transmembrana especializadas en el reconocimiento de moléculas de estructura conservada ya sean propias o asociadas a patógenos (Tsan & Gao, 2004). En su mayoría, los DAMPs son moléculas siempre presentes y que bajo condiciones fisiológicas desempeñan funciones no inmunológicas (Matzinger, 1994). Capaces de actuar como señales de peligro han ganado una posición destacada en la investigación contra el cáncer, ya que pueden estimular la inmunidad antitumoral. Las señales de peligro basadas en los DAMPs pueden llevar a cabo las siguientes funciones: 1) activar directamente las células inmunitarias innatas como CDs, macrófagos, neutrófilos, células NK y posiblemente células inmunitarias adaptativas; 2) generan maduración funcional de CDs o neutrófilos; 3) apoyan la opsonización y fagocitosis de las células cancerosas; 4) facilitan la activación de procesos inflamatorios basados en células inmunes y 5) permiten el correcto procesamiento y presentación de antígenos asociados a tumores (Garg and Agostinis, 2017).

El concepto de muerte celular inmunogénica (ICD, del Inglés *immunogenic cell death*) de células cancerígenas, se ha convertido en una piedra angular de la inmunidad antitumoral inducida. Se destaca su rol en la detección de la liberación de señales de peligro/DAMPs específicos, respuestas inflamatorias mediadas por IFN tipo I y la producción de quimioquinas similares a las liberadas ante patógenos que aumentan el potencial inmunogénico de las células cancerígenas en proceso de muerte celular logrando activar una fuerte inmunidad antitumoral por parte del sistema inmune (Krysko *et al.*, 2012; Garg *et al.*, 2010). Se han descubierto varios inductores de ICD: agentes quimioterapéuticos convencionales, radioterapia,

medicamentos dirigidos contra el cáncer y terapias biológicas y fisico-químicas (Garg and Agostinis, 2017). La ICD asociada a DAMPs y otros factores inmunoestimulantes favorecen la creación de una interfaz entre las células cancerosas moribundas y las células inmunes innatas como CDs, neutrófilos y macrófagos lo que produce el inicio de la inmunidad adaptativa terapéuticamente persistente (Garg and Agostinis, 2017).

El rol de los DAMPs en la inmunidad antitumoral no está del todo dilucidado. Actualmente, a pesar de los avances y alta actividad que presenta este campo de investigación, no existe consenso sobre los efectos inmunomoduladores de los DAMPs que promueven inmunidad antitumoral o progresión del cáncer, como también, si pueden ser clasificados de acuerdo con la temporalidad de sus funciones (Jube et al., 2012).

TRIMEL como fuente de moléculas inmunogénicas

El melanoma es responsable del 80% de las muertes relacionadas con cáncer de piel, y, en etapas avanzadas presenta un pronóstico desfavorable. Se vuelve necesario explorar su mecanismo de tumorigenicidad y descubrir nuevos marcadores biológicos para su diagnóstico temprano, vigilancia y posibles opciones terapéuticas (Zeng *et al.*, 2017).

TRIMEL, corresponde a un lisado celular obtenido a partir de tres líneas alogénicas de metástasis de melanoma tratadas con *shock* térmico. Se ha demostrado que es capaz de inducir el fenotipo maduro y activo de CDs originadas de monocitos activados por citoquinas. Al respecto, se ha propuesto que los DAMPs presentes en el TRIMEL son capaces de inducir la maduración fenotípica y aumentar la expresión de CCR7 de superficie en las CDs derivadas de pacientes con melanoma, y también en la línea celular monocítica/macrófaga THP-1 (González, Gleisner, et al., 2014). Además, los ensayos *in vitro* mostraron que las células estimuladas con TRIMEL y las células THP-1 eran capaces de migrar específicamente en presencia del ligando CCR7. Finalmente, se demostró que las

TAPcells podrían migrar *in vivo* desde el lugar de la inyección a los linfonodos de drenaje.

Este trabajo contribuye a comprender la biología de las CDs producidas *ex vivo*, lo que permite, el diseño de vacunas eficaces basadas en CDs para el tratamiento de melanomas agresivos. Ahora bien, la menor respuesta mostrada por un porcentaje de pacientes puede explicarse por la inducción de tolerancia por péptidos tumorales inmunodominantes, insuficiente cantidad de patrones moleculares asociadas a daño durante la generación *ex vivo* de CDs o durante la inmunización, o deficiencias de procesamiento y presentación antigénica de las CDs utilizadas como vacunas (López & cols., 2006; Joffre & cols., 2009). Considerando las causales de esta menor respuesta, se realizó el análisis proteómico de TRIMEL para identificar nuevas proteínas y considerarlas como señales de daño implicadas en el proceso de maduración de CDs.

Análisis proteómico del TRIMEL

En el estudio de González *et al.*, 2018 se realizó un análisis proteómico para identificar las proteínas candidatas a ser calificadas como nuevos DAMPs del TRIMEL, que pudieran explicar la mayor efectividad en la generación de TAPcells. Se encontraron 91 proteínas en los lisados tratados con *shock* térmico: 18 de ellas se encontraban sobre-reguladas y 73 sub-reguladas. Además, se identificaron 32 proteínas que solo se expresaron en los lisados tratados con *shock* térmico y 26 proteínas que estaban presentes en las muestras no tratadas con *shock* térmico. A partir de estos datos, se seleccionaron proteínas que pudieran corresponder a DAMPs: 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 ADN y 4) asociadas a estrés del retículo endoplásmico; b) se excluyeron proteínas ya identificadas como moléculas DAMPs.

En este contexto, estudios anteriores del laboratorio de inmunología celular identificó a la proteína TDP-43 en mayor abundancia, aunque no significativamente, en el lisado TRIMEL (datos no publicados). Actualmente, dentro de las señales de daño identificadas como posibles DAMPs, se considera que los agregados de

proteínas también pueden participar en fenómenos inflamatorios al ser detectados por células de la respuesta inmune (Yatim N., Cullen S. & Albert ML., 2017; Chen GY & Nunez G., 2010). En este contexto está bien descrito que TDP-43 tiene la capacidad de formar agregados.

Adicional a esto, se planteó utilizar un lisado de células HEK293wt que sobreexpresaran TDP-43 y compararlas con las células HEK293flp que no sobreexpresan TDP-43 para estudiar el efecto de este lisado en la migración de las CDs.

Proteína candidata: TDP-43

La proteína TAR-DNA-*binding protein* o TDP-43, es una proteína nuclear de aproximadamente 43 kDa de peso molecular, codificado en el gen *TARDBP* del cromosoma 1, se caracteriza por ser altamente conservada y expresada, fue identificada inicialmente por su capacidad de unirse a VIH-1 TAR-DNA actuando como un bloqueador transcripcional. TDP-43 corresponde a una proteína de unión del ADN y ARN involucrada en el procesamiento del ARN y con un parecido estructural con las ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNPs). Tiene múltiples roles en la regulación de la transcripción, *splicing* de pre-ARNm y traducción. También, se ha visto que es clave para el desarrollo embrionario gracias a su participación indirectamente en otros procesos celulares como la biogénesis y apoptosis. Además, participa en regulación del ciclo celular y el metabolismo de lípidos y glucosa (Zeng *et al.*, 2017).

Su papel en las enfermedades neurodegenerativas se ha estudiado ampliamente desde que se identificó como un componente importante en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la degeneración lobar frontotemporal (DFT). El cambio patológico clave es que TDP-43 patogénico se acumula en el citoplasma y forma agregados citoplasmáticos, sin embargo, aún no se ha investigado cómo la localización citoplasmática errónea de TDP-43 contribuye a la patogénesis de estas enfermedades (Wang *et al.*, 2015).

Estudios recientes, han mostrado una relación significativa entre TDP-43 y cáncer. La mutación del gen *TARDBP* contribuye a desarrollar susceptibilidad al sarcoma de Ewing. En el carcinoma hepatocelular, la alta expresión de TDP-43 regula el nivel de glucólisis a través del eje TDP-43/miR-520/PFKP. Mientras que en las células del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), la regulación negativa de TDP-43 suprime la proliferación, migración e invasión. Sin embargo, aún no está claro el papel funcional de TDP-43 en la progresión del melanoma y su asociación con el resultado clínico (Zeng *et al.*, 2017).

La glucosa, es la principal fuente de energía de las células tumorales y su mayor captación juega un papel importante en la supervivencia y proliferación de las células tumorales. El aumento de los transportadores de glucosa (GLUT) se asoció con un aumento en la capacidad de metástasis de tumores y su proliferación incluido el melanoma. Se encontró una disminución de GLUT1 en las células de carcinoma hepatocelular empobrecidas en TDP-43 lo que sugiere que TDP-43 estaría involucrado en la captación de glucosa. En este estudio, se encontró que un aumento en los niveles de TDP-43 se asoció con una supervivencia menor a 5 años, adicionalmente se encontraba aumentada significativamente en las diferentes líneas celulares de melanoma. El análisis funcional, mostró que el *knockdown* de TDP-43 redujo la proliferación y la metástasis de las células de melanoma, también reguló a la baja la expresión de GLUT4 con la consiguiente disminución de la captación de glucosa inhibiendo la proliferación y metástasis de las células de melanoma. El estudio *in vivo*, confirmó que la eliminación de TDP-43 limitaba la tumorigenicidad y la expresión de GLUT4. Este estudio concluye que TDP-43, corresponde a un oncogen que regula la proliferación y potencial metastásico de la enfermedad a través de la regulación del metabolismo de glucosa (Zeng *et al.*, 2017).

Con estos antecedentes, se propone que la proteína TDP-43 sea estudiada como nuevo DAMPs para explicar en parte la capacidad del lisado TRIMEL para activar las CDs. En este trabajo se busca evaluar su efecto en distintas concentraciones para inducir maduración y migración de las CDs humanas.

HIPÓTESIS

La proteína hTDP-43 es capaz de inducir la maduración *in vitro* de CD4s humanas. Este efecto se evidencia mediante el aumento de la expresión de moléculas asociadas a maduración y la capacidad de migración de las CD4s.

OBJETIVO GENERAL

Describir el efecto *in vitro* de hTDP-43 sobre la expresión de moléculas asociadas a maduración y la migración de células dendríticas humanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar células dendríticas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica humana.
1. Evaluar la expresión de MHC-I, MHC-II, CD83, CD86 y CCR7 post-estimulación con hTDP-43 en CD4s humanas.
2. Determinar la capacidad de trans migración *in vitro* de CD4s estimuladas con hTDP-43, rTDP-43 y lisados HEK293wt y HEK293flp.

METODOLOGÍA

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

Declaración de 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 pacientes del Hospital del Cáncer (CONAQ) y 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 CDs a partir de monocitos de sangre periférica

La extracción de PBMC fue a través de leucoféresis, durante este procedimiento se concentran los glóbulos blancos y se eliminan de la sangre utilizando un dispositivo de extracción de sangre de flujo continuo, (Ganzel *et al.*, 2012) realizado en 3 pacientes (2 pacientes con cáncer de próstata y 1 paciente sano) y permitió obtener un promedio de $3,34 \times 10^8$ de PBMC (Escobar *et al.*, 2005). 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 20×10^6 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%CO₂ 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 al menos dos días 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 iCDs (López *et al.*, 2009) (Figura 2).

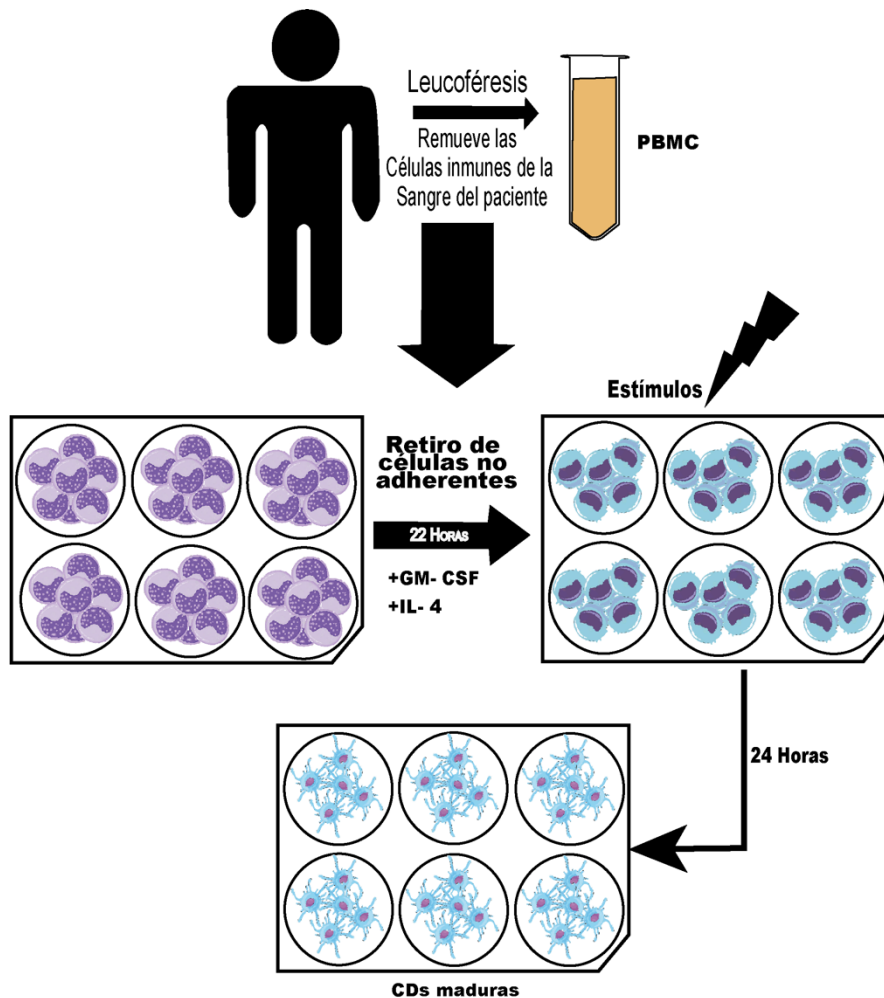


Figura 2. Generación de CD3. Generación de CD3 *in vitro* a partir de células de sangre periférica.

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 tres 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.

La proteína candidata como señal de peligro del estudio fue adquirida comercialmente en la siguiente presentación: *Recombinant human TDP-43 protein (denatured) ab156345*.

Estimulación con hTDP-43

Las células generadas a partir de monocitos de sangre periférica de distintos donantes, se estimularon con TRIMEL 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y hTDP-43 por 24 horas. Se adicionó en las concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL cada una por separado, para su dilución se utilizó AIM-V. A la condición monocito activado (AM) no se le agregó estímulo de maduración.

Fenotipificación: citometría de flujo

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

Para el análisis de las muestras se utilizó el software Flowjo 10.6.1 donde se evaluó la intensidad media de fluorescencia (MFI) y el número de células positivas para cada marcador.

Purificación de proteína hTDP-43 a partir de células eucariontes (rTDP-43)

A partir de células eucariontes que sobreexpresan hTDP-43 (HEK293Flag-TDP-43wt) se logró purificar rTDP-43. Para realizar la purificación de la proteína se utilizó el gel de afinidad ANTI-FLAG M2. Primero se ajustó el pH del extracto de la proteína entre 7-8, para luego eliminar cualquier material insoluble mediante centrifugación y filtración evitando la obstrucción de la columna. Se procedió a resuspender la resina en TBS y agregar el extracto de proteína. El extracto y la proteína con el gel se incubaron durante 1 hora para capturar las proteínas de fusión FLAG. Se recoge la resina por centrifugación y se lava la resina con TBS para eliminar las proteínas inespecíficas hasta que la diferencia de absorbancia de la solución de lavado que salió de la columna fue inferior a 0.05 versus un blanco de solución de lavado. Las proteínas FLAG fueron extraídas de la resina por competencia con el péptido FLAG (Batch Absorption of FLAG Fusion Proteins using ANTI-FLAG M2).

Generación de células HEK293wt y HEK293flp

Las células HEK293wt y HEK293flp fueron generadas siguiendo el protocolo descrito en Ayala *et al.*, 2011, para la generación de la línea celular, las células Flp-In HEK293 se transfectaron con los plásmidos de cADN de TDP-43 correspondientes.

Estimulación

Posterior a la generación de CDs y luego de completar las 24 horas de cultivo, se establecieron las condiciones de estudio y las células fueron o no estimuladas. Los estímulos consistieron en TRIMEL 50 µg/mL (control positivo), INS 100 ng/mL

que se utilizó como control de especificidad de respuesta (control negativo) y no presenta la capacidad de iniciar una respuesta inmune por sí sola, hTDP-43, 100 ng/mL, rTDP-43 100ng/mL, HEK293wt 50 ng/mL (que sobreexpresa TDP-43) y HEK293flp 50 ng/mL (que no sobreexpresa TDP-43). Las células fueron estimuladas durante 24 horas. La condición AM –control negativo-, corresponde a células no estimuladas, mantenidas en el mismo medio en que fueron sembradas por un total de 48 horas.

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. Las células fueron cosechadas de forma mecánica, para ser traspasadas a tubos Eppendorf, centrifugadas, resuspendidas en 500 μ L de medio AIM-V y contadas; se modificó la solución para que éstas estuvieran a una concentración final de 5×10^5 células por mL. Los insertos fueron pre-incubados durante 24 horas con una solución de fibronectina a concentración de 2 μ g/mL. Se prepararon las placas Transwell de forma tal que en el pocillo inferior se colocaron 500 μ L 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 CDs maduras-. En el pocillo superior o inserto se cargaron 100 μ L 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%CO₂. Cumplido el tiempo de incubación, los insertos fueron trasladados a otra placa que contenía en el pocillo inferior 500 μ L 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 trans migración 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).

Análisis estadístico

Los datos fueron ajustados para que los distintos grupos tengan una escala común. Para esto, en los tres experimentos independientes, se dividió cada condición por el valor de AM, estos resultados fueron procesados con el software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) para luego ser sometidos a un test de ANOVA para analizar las diferencias de medias entre las distintas condiciones. Se consideraron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados utilizando el software GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

1. Capacidad de la proteína hTDP-43, en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL, de inducir *in vitro* la maduración fenotípica de células dendríticas humanas, mediante citometría de flujo

1.1 A partir de PBMC es posible generar CDs *in vitro* con un protocolo de 48 horas

La realización de este estudio comienza con la generación de CDs a partir de PBMC. Para esto, desde los PBMC se seleccionaron los monocitos por su capacidad de adherencia y se indujo su diferenciación mediante citoquinas. Cumplidas las 48 horas de cultivo, se observaron con microscopio de contraste de fase y se analizó la morfología de las células sin estímulos de maduración (AM) y estimuladas con TRIMEL (utilizado como control positivo interno) que adquirieron morfología alargada o fusiforme en la condición estimulada característica de CDs maduras, mientras que en AM se observó un mayor número de células con morfología circunferencial (Figura 3).

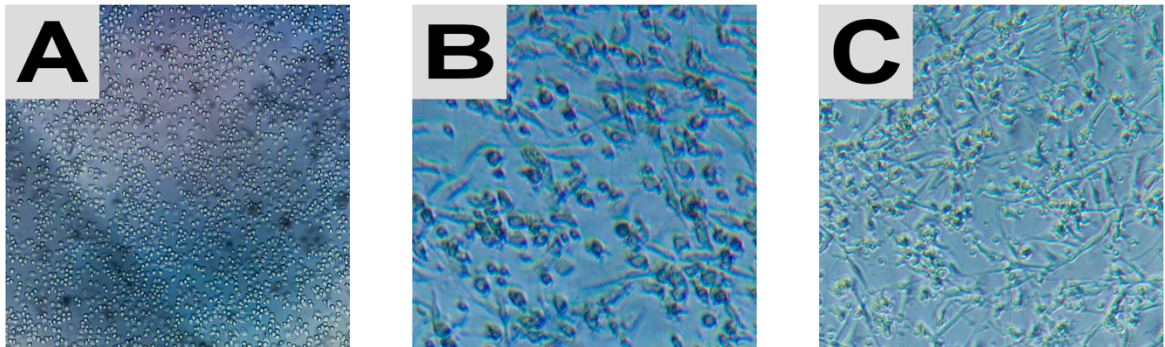


Figura 3. Generación de CDs. Microscopia de contraste. (3A) Monocitos adheridos a placa, fueron cultivados en medio suplementado con las citoquinas GM-CSF e IL-4. (3B) AM (Monocitos activados), (3C) Células estimuladas con el lisado TRIMEL se observa la adquisición de morfología estrellada característica de CD madura.

Se continuo con el análisis de las células estimuladas con las distintas concentraciones de hTDP-43, pero no se observaron cambios en la morfología presentando características similares a las de AM (Figura 4).

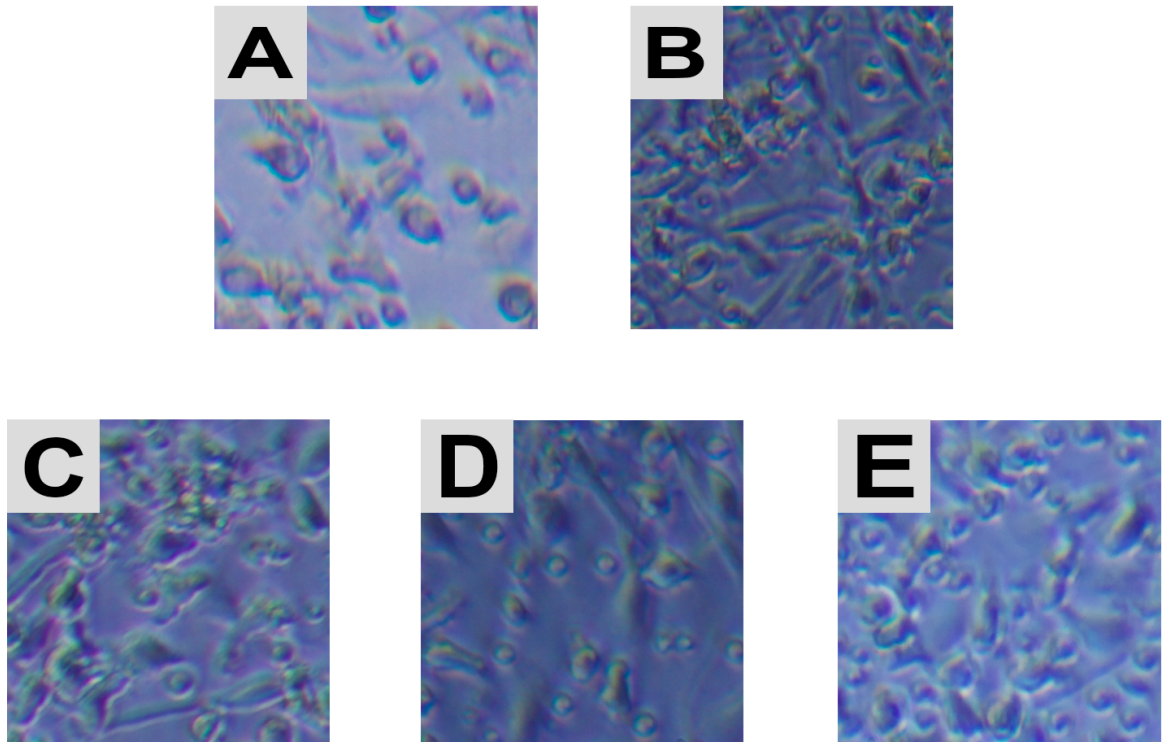


Figura 4. CDs estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. Microscopía de contraste. Morfología presentada por CDs estimuladas con (4A) AM, (4B) TRIMEL, (4C) hTDP-43 1 ng/mL, (4D) hTDP-43 10 ng/mL y (E) hTDP-43 100 ng/mL, durante de 24 horas.

La estrategia de análisis por citometría de flujo consistió en la selección de la población correspondiente a CDs según su tamaño y complejidad, posteriormente usando el marcador de viabilidad V-450 se seleccionó la población negativa, es decir, las células vivas. Finalmente, desde esta población se rescataron aquellas células positivas para el marcador CD11c (Figura 5).

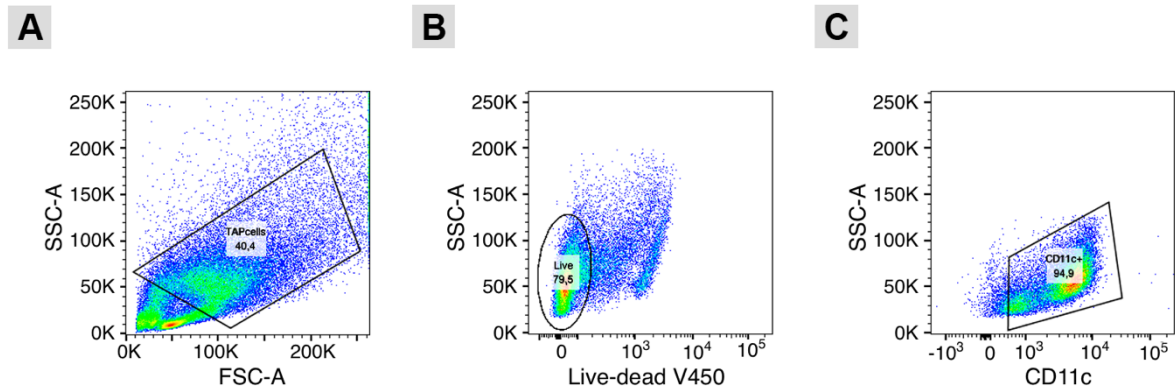


Figura 5. Estrategia de análisis de poblaciones de CDs por citometría de flujo. Dot plots representativos: (5A) Selección de población de CDs a partir de tamaño (FSC-A) y complejidad (SSC-A). (5B) Población de células vivas, selección a través de marcador de viabilidad V-500. (5C) Células CD11c+.

Todos los análisis posteriores para evaluar marcadores de maduración bajo el estímulo de distintas condiciones fueron realizados a partir de poblaciones de células vivas y CD11c+.

1.2 hTDP-43 no induce la expresión *in vitro* de las moléculas CD83, CD86, MHC-I, MHC-II y CCR7.

Mediante citometría de flujo se midió la respuesta de la proteína candidata hTDP-43 en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL, que fue empleada para estimular las CDs generadas a partir de monocitos y evaluar su capacidad de generar cambios en el patrón de expresión de marcadores de maduración, donde no se observaron diferencias significativas en el número de células estimuladas ni en la intensidad media de fluorescencia en comparación con el grupo control de AM (control negativo, células sin estímulo) para los marcadores MHC-II, CD86, CCR7, MHC-I y CD83 (Figuras 6, 7, 8, 9 y 10).

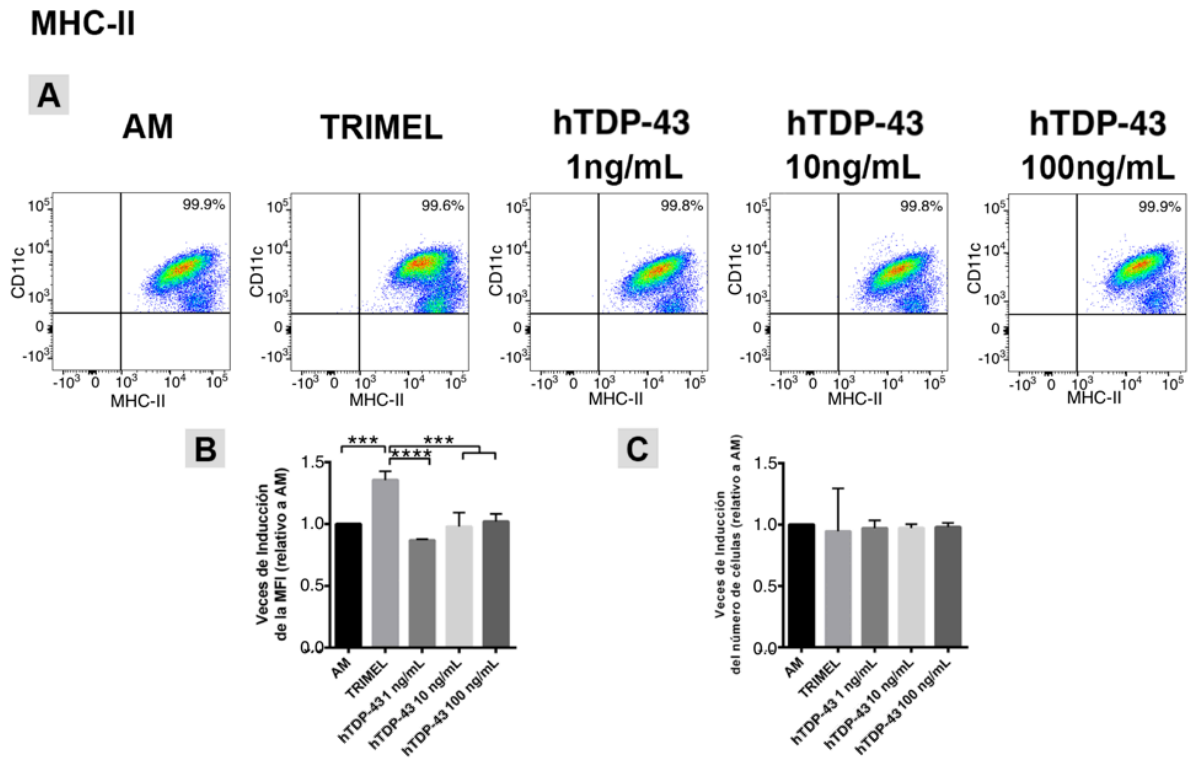


Figura 6. Expresión de marcadores de maduración en CDs generadas *in vitro*, y estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. (6A) Dot Plot representativos para MHC-II. (6B) Veces de inducción de la MFI de MHC-II. (6C) Veces de inducción del número de células relativo a AM de MHC-II. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

CD86

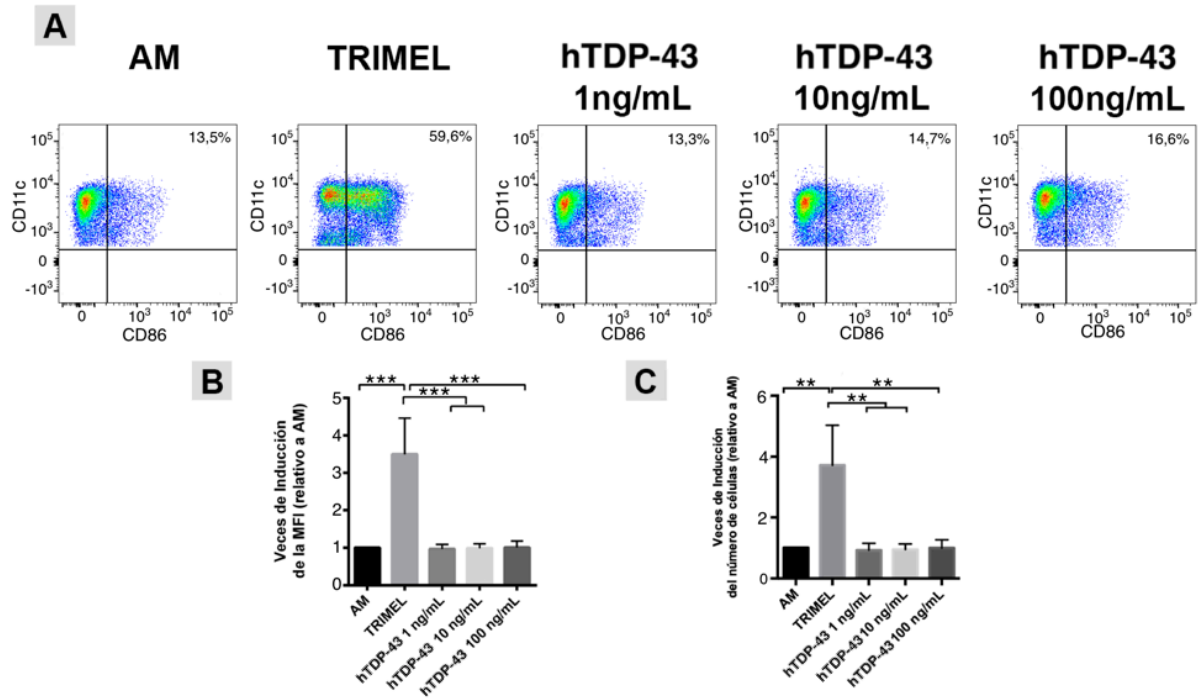


Figura 7. Expresión de marcadores de maduración en CDs generadas *in vitro*, y estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. (7A) Dot Plot representativos para CD86. (7B) Veces de inducción de la MFI de CD86. (7C) Veces de inducción del número de células relativo a AM de CD86. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

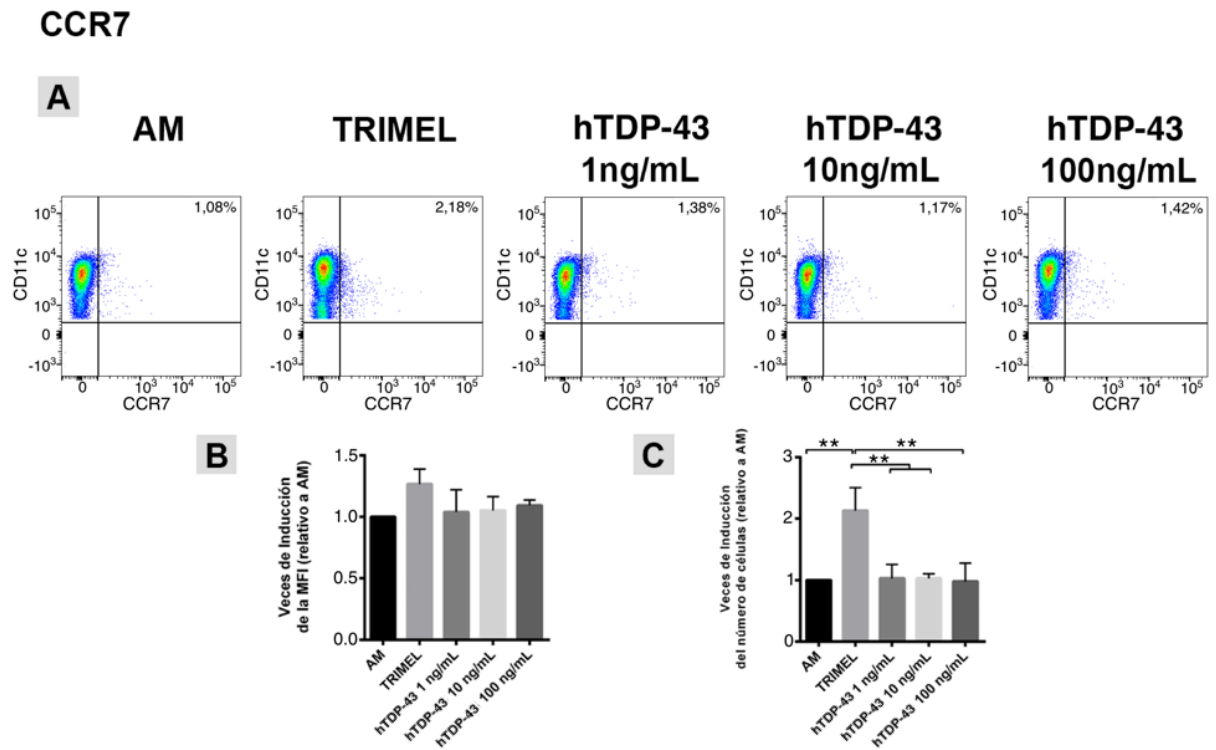


Figura 8. Expresión de marcadores de maduración en CDs generadas *in vitro*, y estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. (8A) Dot Plot representativos para CCR7. (8B) Veces de inducción de la MFI de CCR7 (8C) Veces de inducción del número de células relativo a AM de CCR7. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

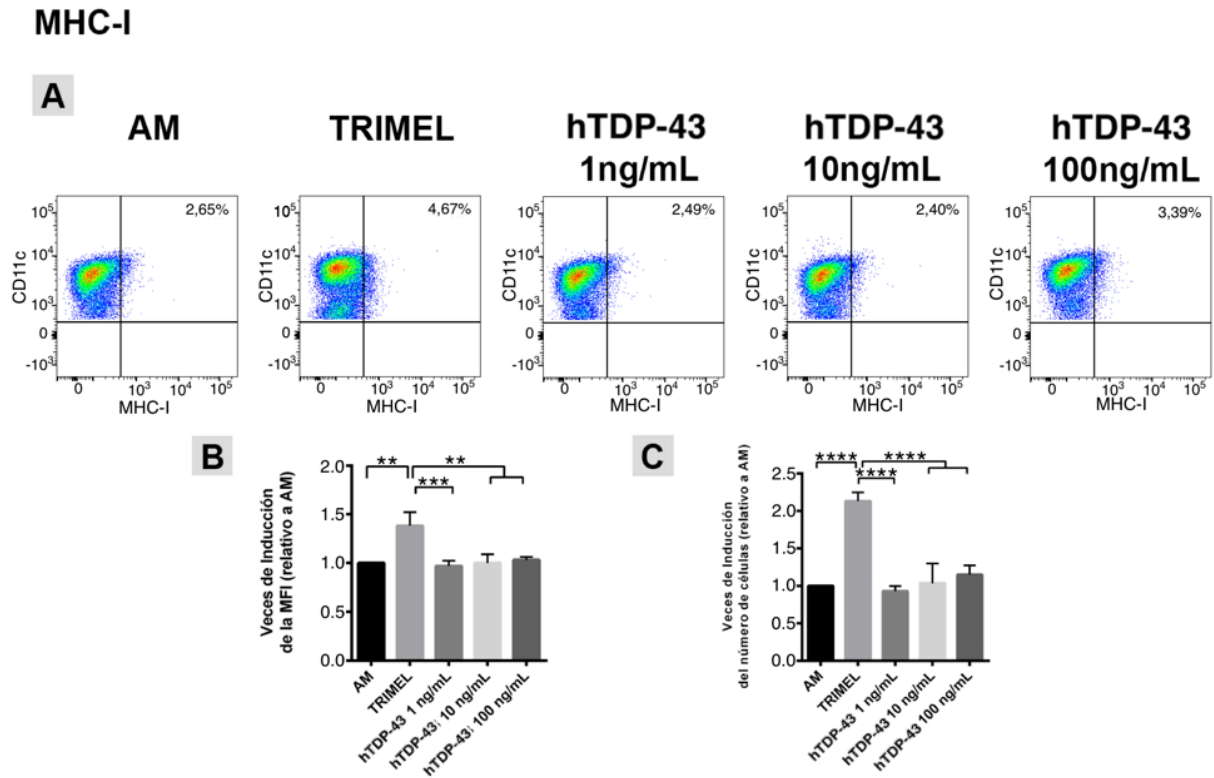


Figura 9. Expresión de marcadores de maduración en CDs generadas *in vitro*, y estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. (9A) Dot Plot representativos para MHC-I. (9B) Veces de inducción de la MFI de MHC-I. (9C) Veces de inducción del número de células relativo a AM de MHC-I. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

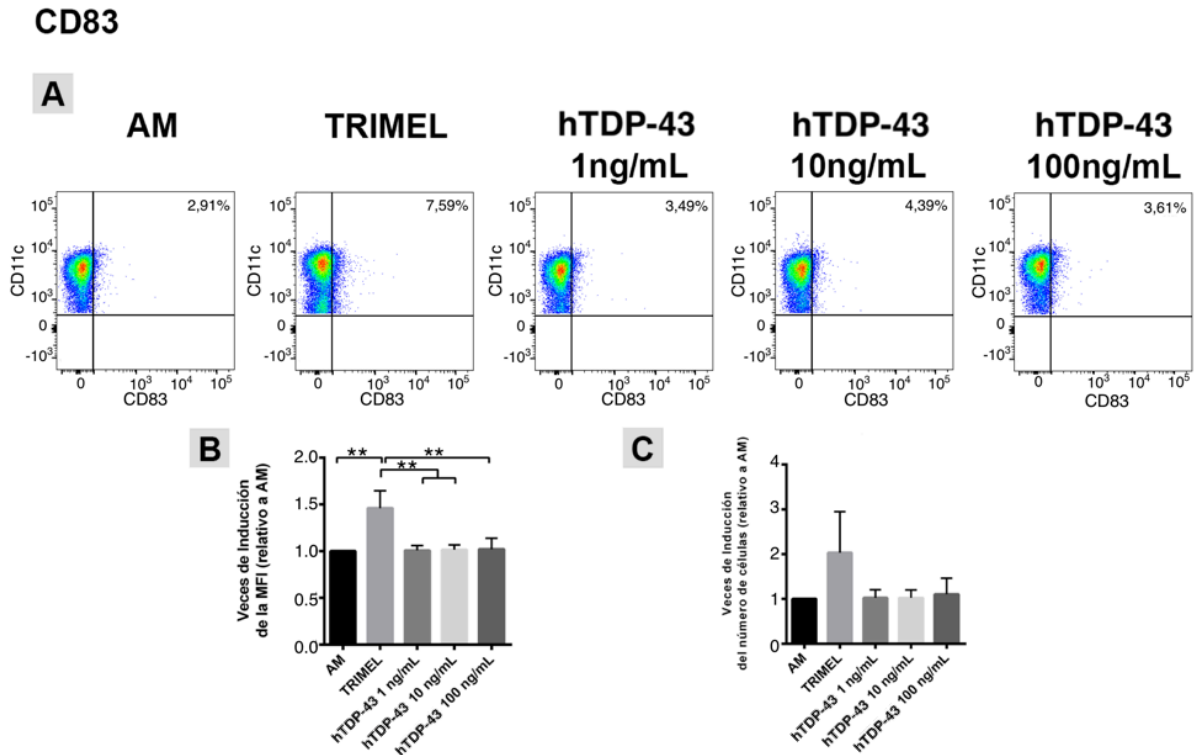


Figura 10. Expresión de marcadores de maduración en CDs generadas *in vitro*, y estimuladas con las distintas concentraciones de la proteína hTDP-43. (10A) Dot Plot representativos para CD83. (10B) Veces de inducción de la MFI de CD83. (10C) Veces de inducción del número de células relativo a AM de CD83. Resultados expresados como SEM, corresponden a al menos tres experimentos independientes

2. Capacidad de hTDP-43, rTDP-43, HEK293flp y HEK293wt de inducir la migración de células dendríticas humanas mediante ensayos de trans migración *in vitro*.

2.1 La proteína hTDP-43 y rTDP-43 no inducen trans migración *in vitro* de CDs hacia la quimioquina CCL19

El siguiente paso, fue analizar la capacidad funcional de las CDs generadas y estimuladas con proteína hTDP-43 y rTDP-43 de migrar hacia la condición

enriquecida con quimioquina de *homing* a linfonodos CCL19 ligando de CCR7. Para ello, se utilizó un modelo de trans migración *in vitro* en base a cámaras Transwell donde se tienen dos pocillos con células acoplados y separados por una membrana delgada con poros (5 μm) del medio que contiene la quimioquina generando un gradiente de concentración que estimula la migración celular a través de la membrana y hacia el pocillo inferior.

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 seis (6) campos aleatorios a través de microscopio con un aumento de 40x. 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.

Se observó que las CDs estimuladas con TRIMEL migraron significativamente más que las otras condiciones, mientras que las células estimuladas con INS (control negativo interno) no respondieron a la presencia de CCL19 en el medio. Al analizar ambas presentaciones de la proteína hTDP-43 y rTDP-43 se observó un aumento de la migración cuando se compararon con el control AM e INS, pero no es un resultado significativo cuando se compara con TRIMEL (Figura 11).

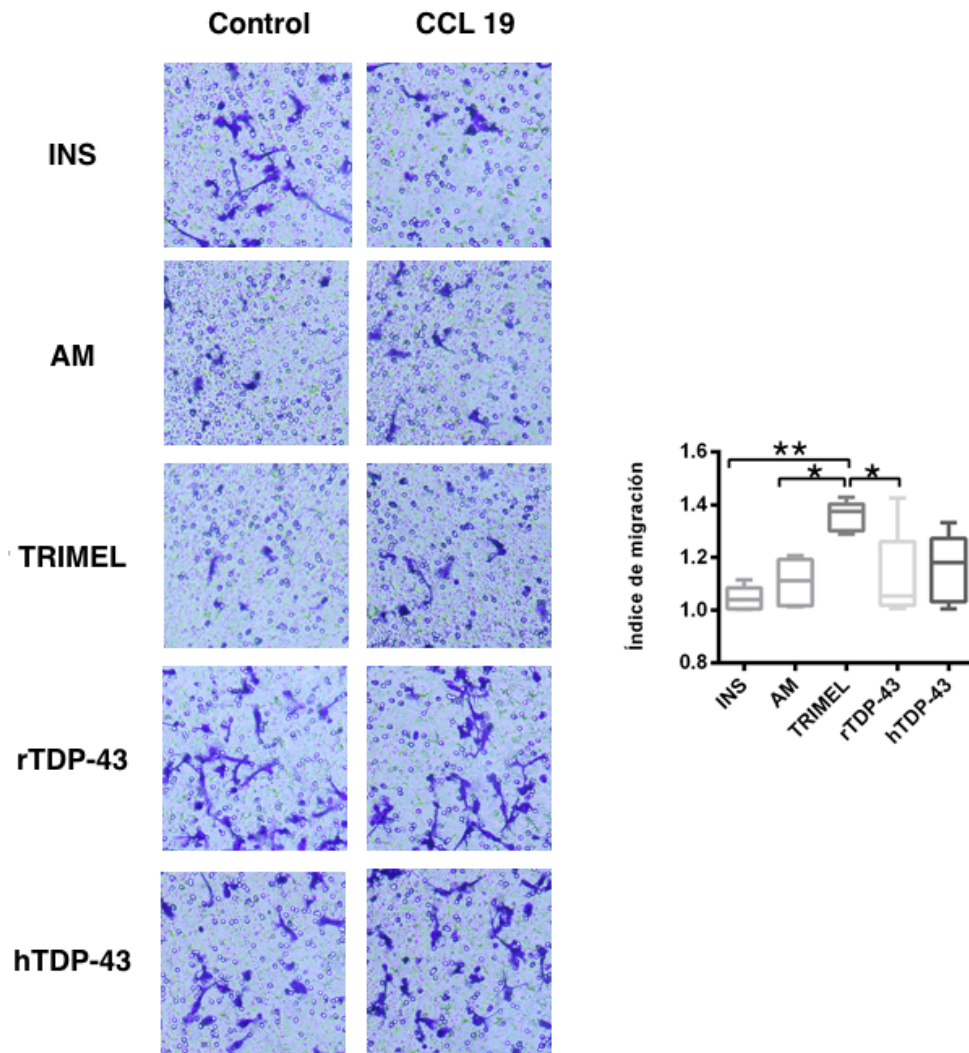


Figura 11. Ensayos de trans migración *in vitro* de CDs estimuladas con hTDP-43 y rTDP-43. Las células estimuladas con las distintas condiciones fueron sometidas a ensayos de trans migración *in vitro* para evaluar su capacidad de migración en respuesta a la quimioquina CCL19. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.2 El lisado HEK293wt induce la trans migración *in vitro* de CDs hacia la quimioquina CCL19.

El lisado HEK293wt, que sobreexpresa TDP-43, es capaz de aumentar la migración de las CDs hacia la quimioquina CCL19. Las células estimuladas con el lisado

HEK293flp, que no sobreexpresa TDP-43, no aumentan la migración de forma significativa (Figura 12).

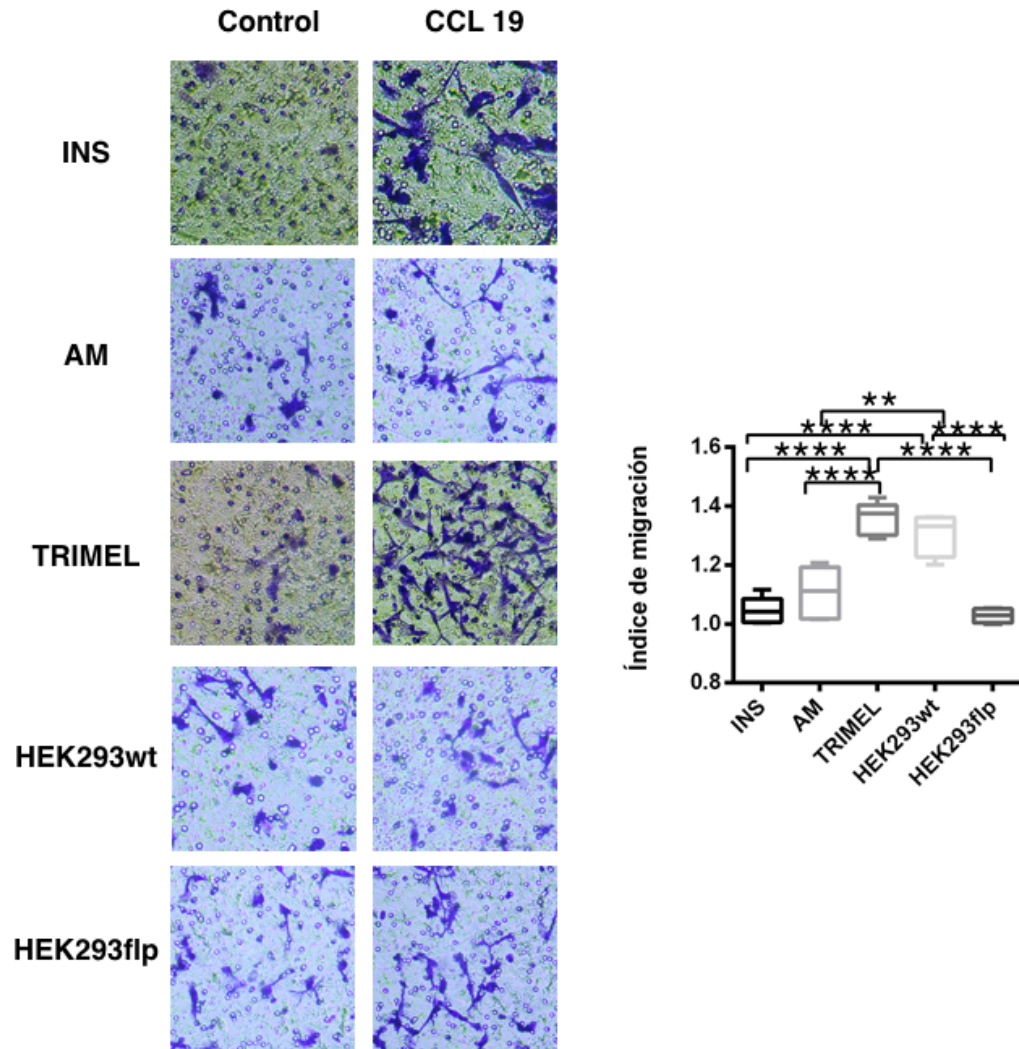


Figura 12. Ensayos de trans migración *in vitro* de DCs estimuladas con los lisados de HEK293wt y HEK293flp Las células fueron sometidas a ensayos de trans migración para evaluar capacidad de migración en respuesta a la quimioquina CCL19. Imágenes representativas de las condiciones de estudio. El índice de migración representa 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 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

Hoy en día el cáncer se ha transformado en un foco de interés para desarrollar políticas públicas por parte de los Estados debido a las repercusiones que tiene en la calidad de vida de los pacientes y en el costo de su gestión para enfrentarlo. Actualmente nos encontramos en un contexto en donde los tratamientos contra el cáncer han mejorado, pero epidemiológicamente nos enfrentamos a un aumento en su incidencia lo que crea una cohorte cada vez mayor de pacientes quienes aparentemente han sido tratados exitosamente, pero tienen necesidades continuas (Simcock and Simo, 2016).

Debido a esto es que actualmente existe un gran interés por el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer que mejoren los resultados clínicos y la sobrevivencia de los pacientes, así como también eviten el desarrollo de complicaciones post-tratamiento que afectan negativamente su calidad de vida. Aunque los primeros intentos de utilizar el sistema inmune para la terapia contra el cáncer se remontan a fines del siglo XVIII, no fue sino hasta la última década que los agentes inmunoterapéuticos contra el cáncer entraron a la práctica clínica convencional por su potencial para estimular la respuesta inmunitaria antitumoral adaptativa e innata. Dentro de las herramientas farmacológicas más vanguardistas desarrolladas se encuentran las vacunas en base a CDs.

La efectividad clínica de esta forma de inmunoterapia se basa en tres pasos esenciales: 1) Las CDs utilizadas como vehículos inmunoterapéuticos deben activar adecuadamente las células efectoras antitumorales del huésped, 2) Estas células efectoras deben ser receptivas a la estimulación por las CDs y 3) Superar los mecanismos inmuno-inhibidores utilizados por las células tumorales (Anguille *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar del avance en el reconocimiento de estos mecanismos existe un porcentaje importante de pacientes que no logran responder al tratamiento (Escobar *et al.*, 2005; López *et al.*, 2009). En este escenario nace la pregunta ¿Cómo se podría mejorar estas terapias para que alcancen mayor efectividad en un mayor número de pacientes? La alternativa presentada en este estudio sería aumentar la cantidad de DAMPs en los lisados tumorales con los que son

estimuladas estas células. Su rol ha sido ampliamente estudiado y aceptado en la inducción de la respuesta inmune, pero se mantiene en un número de moléculas acotadas por lo que el estudio y reconocimiento de nuevas moléculas podría mejorar el tratamiento y resultado clínico. En este trabajo se propuso estudiar la capacidad de la proteína TDP-43 en producir la maduración y migración *in vitro* de CDs humanas.

La mayoría de la investigación en TDP-43 se ha centrado en su participación en enfermedades neurodegenerativas, sin embargo, poco se sabe sobre su influencia sobre la patogénesis del cáncer (Yinan y cols., 2018). La evidencia reporta a la proteína TDP-43 como un importante regulador del *splicing* responsable del cáncer de mama triple negativo (TNBC), destacando que el *splicing* anómalo se identifica como un potencial sello distintivo de las enfermedades neoplásicas. Los datos clínicos indican que TDP-43 se expresa ampliamente en TNBC con mal pronóstico, su *knockdown* inhibe la progresión, metástasis y proliferación tumoral y su sobreexpresión promueve la proliferación y malignidad de las células epiteliales mamarias. Los análisis de secuencia y experimentación funcional indican que la proteína TDP-43 afecta la mayoría de los eventos del *splicing* con el factor de *splicing* rico en serina/arginina 3 en la regulación de progresión de TNBC, transformando a ambos en blancos terapéuticos para reducir la metástasis y proliferación tumoral de TNBC (Ke & cols., 2018). En esta misma línea se ha reportado que el fragmento 35kd de TDP-43 también juega un papel clave en la apoptosis de las células de cáncer de mama, por lo que también se está estudiando como potencial blanco terapéutico para la cura contra el cáncer (Yinan y cols., 2018).

Para el desarrollo experimental de esta tesis, se utilizaron CDs derivadas de monocitos aislados de sangre periférica humana. Pese a que en el proyecto original consideraba muestras de sangre provenientes de cinco donantes sanos, en el estudio mostrado solo se pudo contar con tres muestras. Una de ellas proveniente de un paciente sano y otras dos de pacientes con cáncer de próstata. No obstante, al obtener células de sangre periférica de pacientes sanos o con cáncer no se observan diferencias en el patrón de estimulación de CDs (maduración y migración).

Se optó por un protocolo de 72 horas totales (48 horas de diferenciación y 24 horas de activación) descrito anteriormente en varias publicaciones (López *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2011; Tittarelli & cols., 2012). Este protocolo ha demostrado generar TAPcells de forma eficiente (Aguilera *et al.*, 2011) conciliando el proceso de diferenciación fisiológica que ocurriría *in vivo* desde monocitos que infiltran los tejidos afectados por una injuria específica. Las células fueron estimuladas con la proteína hTDP-43 en concentraciones de 1, 10 y 100 ng/mL.

En este trabajo, se pudo observar que la estimulación con TRIMEL aumenta la expresión de marcadores de maduración, tales como CD86, CD83, MHC-II y MHC-I significativamente más que hTDP-43 en sus distintas concentraciones. En el caso MHC-II, en todas las condiciones estudiadas se observa un 100% del número de células que expresan el marcador, esto podría deberse a una sobre-maduración de la célula o que esta fue más sensible los estímulos empleados producto del tiempo de exposición utilizado. En el caso de CCR7, a pesar de que existe aumento de la expresión del marcador con TRIMEL no se observa que sea estadísticamente significativa como se espera, posiblemente por un error experimental puesto que en González, Ortiz, *et al.*, 2014 se establece claramente que las CDs dan positivo ante este estímulo.

La maduración de CDs, es un evento que se ve influenciado, entre otras cosas, por las vías de señalización que son activadas. Por ejemplo, los DAMPs pueden activar células inmunes innatas y adaptativas, incluidas las CDs a través de receptores TLRs, especialmente TLR4. Se ha logrado reconocer un mayor número de DAMPs agonistas de TLR como proteínas de *shock* térmico (HSP), HMGB1 y cristales de ácido úrico que pueden unirse a TLR4 causando respuestas inflamatorias y proporcionando señales de peligro a las CDs que pueden traducirse en la promoción de respuesta mediada por células T antitumorales (Fang H., *et al.*, 2014). Para respaldar estos hallazgos, se ha demostrado que los pacientes con cáncer de mama que han perdido la función de TLR4 recaen más rápidamente después de la quimioterapia que las pacientes con función normal de TLR4 (Fang H., *et al.*, 2014). Por otro lado, un estudio señaló que las CDs tuvieron mayor capacidad de migrar en respuesta a la quimioquina CCL19 al compararlo con otras

condiciones (González, Ortiz, *et al.*, 2014) dejando en evidencia la validez del modelo utilizado.

En este estudio se observó que la proteína hTDP-43, cuando fue utilizada en sus distintas concentraciones, logró generar efectos sobre los distintos marcadores de las CDs generadas *in vitro* de forma discreta y progresiva conforme aumentaba su concentración, más no estadísticamente significativos en la expresión de las moléculas asociadas a maduración al ser comparadas con el control negativo AM.

También se evaluó la capacidad funcional de las células estimuladas de migrar en ensayos *in vitro* en respuesta a la quimioquina CCL19. Esta respuesta es comandada por la presencia del receptor CCR7, expresado por las CDs maduras (González, Ortiz, *et al.*, 2014).

En los ensayos de trans migración *in vitro*, se constató que cuando se utilizó un lisado generado con la línea celular HEK293wt, que sobreexpresa TDP-43, se lograron diferencias significativas en la migración respecto al control AM e INS, sin embargo, este resultado no podría ser interpretado como una función propia y única de la sola acumulación de TDP-43. La mayor concentración de TDP-43 se encuentra en el núcleo celular y en condiciones fisiológicas se desplaza entre el núcleo y el citoplasma. En condiciones patológicas, se elimina del núcleo y se acumula en el citoplasma como consecuencia de un transporte nuclear deteriorado y la solubilidad propia de la proteína, esto podría generar un efecto indirecto sobre el sistema inmune que reconocería el daño en el sistema de transporte proteico. Así mismo, las funciones que se podrían adquirir producto de su rol en la transcripción, *splicing* y estabilidad del ARNm también son susceptibles de generar cambios en la fisiología celular que podrían ser detectados por el sistema inmune del hospedero. En estudios en modelos animales más recientes se ha visto que TDP-43 produce una ganancia de función tóxica en el citoplasma, además de la pérdida de la función nuclear, y que ambos están involucrados en la progresión de las proteinopatías (Kawakami & cols., 2019).

Respecto al rol de los distintos DAMP en la maduración *in vitro*, se ha descrito en publicaciones anteriores que el aumento en la expresión de los marcadores de maduración, sin hacer énfasis en las magnitudes o significancia estadística de estas diferencias respecto al control no tratado sino que en conjunto con el cambio en el perfil de citoquinas y la capacidad de estimular LT, sería lo que finalmente tipificarían a una CD como funcional y madura por medio de un estímulo en particular (Kuppner & cols., 2001; Messmer & cols., 2004; Yang & cols., 2006). En el contexto, y suponiendo que esta proteína actúe como DAMP, entendiendo que en situaciones fisiológicas cumplen funciones no inmunológicas completamente distintas, la falta de respuesta por parte de las células podría deberse: 1) receptores en los que actúa y sus posibles polimorfismos 2) tamaño de la muestra y 3) concentración en que fue utilizado, ya que en este protocolo se pretendió utilizar concentraciones cercanas a la fisiológica para lograr evaluar la potencialidad de la proteína en cuestión. Actualmente, no existe evidencia previa sobre el rol que cumple TDP-43 en la respuesta inmune, al menos en el modelo humano.

Finalmente, los resultados de este trabajo sustentan continuar el trabajo de investigación de esta proteína sobre las CDs ya sea utilizándola combinada, mayores concentraciones de las mismas, inducir la sobre-expresión o bloquearlas del lisado TRIMEL. Además, es necesario seguir investigando los efectos de esta proteína para lograr establecer si posee la capacidad de mejorar otros aspectos relevantes que tienen relación con una CD funcionalmente madura como la inducción de citoquinas específicas, capacidad de migración a tejido linfoide y su interacción con LT.

CONCLUSIONES

- 1) La proteína hTDP-43, por si sola, no produce un aumento de la expresión de moléculas asociadas a maduración así como tampoco la migración *in vitro* de CDs primarias humanas generadas a partir de PBMC.

- 2) El lisado generado a partir de la línea HEK293wt, que sobreexpresa la proteína TDP-43, es capaz de estimular la migración *in vitro* de CDs primarias humanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, Raquel et al. 2011. "Heat-Shock Induction of Tumor-Derived Danger Signals Mediates Rapid Monocyte Differentiation into Clinically Effective Dendritic Cells." *Clinical Cancer Research* 17(8): 2474–83.
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., & von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*, 29(3), 325-42.
- Anguille, Sébastien et al. 2015. "Dendritic Cells as Pharmacological Tools for Cancer Immunotherapys." *Pharmacological Reviews* 67(4): 731–53.
- Ayala, Y. M., De Conti, L., Avendaño-Vázquez, S. E., Dhir, A., Romano, M., D'Ambrogio, A., ... Baralle, F. E. (2011). TDP-43 regulates its mRNA levels through a negative feedback loop. *The EMBO journal*, 30(2), 277–288. doi:10.1038/emboj.2010.310
- Banchereau, Jacques, Sophie Paczesny, Patrick Blanco, and A Karolina Palucka. 2003. "Controllers of the Immune System and a New Promise for Immunotherapy." *Annals of the New York Academy of Sciences* 187: 180–87.
- Benasso, Marco. 2013. "Induction Chemotherapy for Squamous Cell Head and Neck Cancer: A Neverending Story?" *Oral Oncology* 49(8): 747–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.04.007>.
- Bonasio, Roberto, and Ulrich H. von Andrian. 2006. "Generation, Migration and Function of Circulating Dendritic Cells." *Current Opinion in Immunology* 18(4): 503–11.
- Bray, F. et al. 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): 2060–71.
- Burnet M. Cancer: a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *British medical journal* 1957,1:841-847.
- Chaplin, D. Overview of the immune response. (2010) *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(2 Suppl 2), S3-23.
- Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010;10(12):826-37.

- Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 2010,**143**:416-429.
- Dalod, Marc, Rabie Chelbi, Bernard Malissen, and Toby Lawrence. 2014. "Dendritic Cell Maturation: Functional Specialization through Signaling Specificity and Transcriptional Programming." *EMBO Journal* 33(10): 1104–16.
- De Jimenez La Jara, Jorge *et al.* 2015. "A Snapshot of Cancer in Chile: Analytical Frameworks for Developing a Cancer Policy." *Biological Research* 48: 1–15.
- Escobar, A. *et al.* 2005. "Dendritic Cell Immunizations Alone or Combined with Low Doses of Interleukin-2 Induce Specific Immune Responses in Melanoma Patients." *Clinical and Experimental Immunology* 142(3): 555–68.
- Fang, H., Ang, B., Xu, X., Huang, X., Wu, Y., Sun, Y., ... Wan, T. (2014). TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cellular & molecular immunology*, 11(2), 150–159. doi:10.1038/cmi.2013.59
- Ganzel, Chezi *et al.* 2012. "Hyperleukocytosis, Leukostasis and Leukapheresis: Practice Management." *Blood Reviews* 26(3): 117–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2012.01.003>.
- Garg, Abhishek D. *et al.* 2010. "Immunogenic Cell Death, DAMPs and Anticancer Therapeutics: An Emerging Amalgamation." *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1805(1): 53–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.08.003>.
- Garg, Abhishek D., and Patrizia Agostinis. 2017. "Cell Death and Immunity in Cancer: From Danger Signals to Mimicry of Pathogen Defense Responses." *Immunological Reviews* 280(1): 126–48.
- González, Fermín. E., Chernobrovkin, A., Pereda, C., García-Salum, T., Tittarelli, A., López, M. N., ... Zubarev, R. A. (2018). Proteomic Identification of Heat Shock-Induced Danger Signals in a Melanoma Cell Lysate Used in

Dendritic Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Journal of immunology research*, 2018, 3982942. doi:10.1155/2018/3982942.

- González, Fermín. 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, Fermín. 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. doi:10.1111/imm.12264
- Gouwy, Mieke et al. 2014. “Chemokines and Other GPCR Ligands Synergize in Receptor-Mediated Migration of Monocyte-Derived Immature and Mature Dendritic Cells.” *Immunobiology* 219(3): 218–29. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.10.004>.
- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997,**90**:3245-328.
- Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nature immunology* 2004,**5**:971-974
- Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009, **227**:234–47.
- Johnson, Louise A., and David G. Jackson. 2014. “Control of Dendritic Cell Trafficking in Lymphatics by Chemokines.” *Angiogenesis* 17(2): 335–45.
- Joseph W. Nichols. 2013. “Odyssey of a Cancer Nanoparticle: From Injection Site to Site of Action.” 7(6): 606–18.
- 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.
- Kawakami, I., Arai, T., & Hasegawa, M. (2019). The basis of clinicopathological heterogeneity in TDP-43 proteinopathy. *Acta neuropathologica*, 138(5), 751–770. doi:10.1007/s00401-019-02077-x

- Ke, H., Zhao, L., Zhang, H., Feng, X., Xu, H., Hao, J., ... Jiao, B. (2018). Loss of TDP43 inhibits progression of triple-negative breast cancer in coordination with SRSF3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3426–E3435. doi:10.1073/pnas.1714573115
- Krysko, Dmitri V. et al. 2012. “Immunogenic Cell Death and DAMPs in Cancer Therapy.” *Nature Reviews Cancer* 12(12): 860–75. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3380>.
- Kuppner M, Gastpar R, Gelwer S, Nössner E, Ochmann O, Scharner, *et al* (2001). The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: Hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *European journal of immunology* 31:1602-1609.
- Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA. Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. *European journal of immunology* 1998,28:4114-4122
- López M, Aguilera R, Pérez C, Mendoza-Naranjo A, Pereda C, Ramírez M, *et al*. *The role of regulatory T lymphocytes in the induced immune response mediated by biological vaccines. Immunobiology* 2006, 211:127–36.
- López, Mercedes N. et al. 2009. “Prolonged Survival of Dendritic Cell-Vaccinated Melanoma Patients Correlates with Tumor-Specific Delayed Type IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor β -Expressing T Cells.” *Journal of Clinical Oncology* 27(6): 945–52.
- MacFarlane, Burnet. 1957. “Cancer - A Biological Approach III. Viruses Associated with Neoplastic Conditions.” *British Medical Journal*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1973618/pdf/brmedj03150-0013.pdf>.
- Matzinger, Polly. 1994. “EXTENDED FAMIL y *.” *Annual Review of Immunology* 12: 991–1045.
- Melief, C. J M. 2003. “Regulation of Cytotoxic T Lymphocyte Responses by Dendritic Cells: Peaceful Coexistence of Cross-Priming and Direct Priming?” *European Journal of Immunology* 33(10): 2645–54.
- Melief, Cornelis J.M. 2008. “Cancer Immunotherapy by Dendritic Cells.”

Immunity 29(3): 372–83.

- Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B *et al* (2004). High mobility group box protein 1: An endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *The journal of immunology* **173**:307-313
- MINSAL. 2013. “Defunciones y Mortalidad Por Causas.” *Departamento de Estadística e Información de Salud*.
- Nan, Yinan, Shaoqing Wang, and William Jia. 2018. “Caspase Independent Cleavages of TDP-43 Generates 35kD Fragment That Cause Apoptosis of Breast Cancer Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 497(1): 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.190>.
- Nicholson, L. B. 2016. “The Immune System.” *Essays In Biochemistry* 60(3): 275–301. <http://essays.biochemistry.org/cgi/doi/10.1042/EBC20160017>.
- Nieboer, P., E. G.E. de Vries, N. H. Mulder, and W. T.A. van der Graaf. 2005. “Relevance of High-Dose Chemotherapy in Solid Tumours.” *Cancer Treatment Reviews* 31(3): 210–25.
- Pandya, Pankita H., Mary E. Murray, Karen E. Pollok, and Jamie L. Renbarger. 2016. “The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches.” *Journal of Immunology Research* 2016.
- Parkin, D. M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2005. “Global Cancer Statistics, 2002.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55(2): 74–108.
- Peter J. Delves. 2000. “First of Two Parts THREE LEVELS OF DEFENSE.” : 37–49.
- 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
- Sallusto, Federica *et al*. 1998. “Rapid and Coordinated Switch in Chemokine Receptor Expression during Dendritic Cell Maturation.” *European Journal of Immunology* 28(9): 2760–69.
- Sallusto, Federica, and Antonio Lanzavecchi. 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 α .” *Journal of Experimental*

Medicine 179(4): 1109–18.

- Schaller, T., Batich, K., Suryadevara, C., Desai, R., & Sampson, J. (2017). Chemokines as adjuvants for immunotherapy: Implications for immune activation with CCL3. *Expert Review Of Clinical Immunology*, (13:11), 1049-1060.
- Schmitt, Nathalie et al. 2010. "NIH Public Access." 31(1): 158–69.
- Sheetz MP., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., & Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochemical Society symposium* ;(65):233-43.
- Simcock, R., and R. Simo. 2016. "Follow-up and Survivorship in Head and Neck Cancer." *Clinical Oncology* 28(7): 451–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clon.2016.03.004>.
- Sonis ST. Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis. *Oral oncology* 2009,**45**:1015-1020.
- Sridharan S, Dal Pra A, Catton C, Bristow RG, Warde P. Locally Advanced Prostate Cancer: Current Controversies and Optimisation Opportunities. *Clinical oncology* 2013
- Stein, Jens V et al. 2003. "<Stein--CCR7-Mediated--CCL21.Pdf>." 101(1): 38–44.
- Steinman, Ralph M. 2003. "Some Interfaces of Dendritic Cell Biology." *Apmis* 111(7–8): 675–97.
- Steinman, Ralph M., and Juliana Idoyaga. 2010. "Features of the Dendritic Cell Lineage." *Immunological Reviews* 234(1): 5–17.
- Stephen, Bettzy, and Joud Hajjar. 2017. 995 *Immunotherapy*. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-53156-4>.
- Tacke, Paul J., I. Jolanda M. De Vries, Ruurd Torensma, and Carl G. Figdor. 2007. "Dendritic-Cell Immunotherapy: From Ex Vivo Loading to in Vivo Targeting." *Nature Reviews Immunology* 7(10): 790–802.
- Tao, Ziqi et al. 2017. "Cellular Immunotherapy of Cancer: An Overview and Future Directions." *Immunotherapy* 9(7): 589–606.
- 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.

- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics. *CA: CANCER JOURNAL CLINICANS*, (65), 87-108.
- Tsan, Min-fu, and Baochong Gao. 2004. "2004 J Leukocyte Biology.Pdf."
- Veglia, F., & Gabrilovich, D. I. (2017). Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Current opinion in immunology*, 45, 43-51.
- Wang, G., Yang, H., Yan, S., Wang, C. E., Liu, X., Zhao, B., ... Lai, L. (2015). Cytoplasmic mislocalization of RNA splicing factors and aberrant neuronal gene splicing in TDP-43 transgenic pig brain. *Molecular neurodegeneration*, 10, 42. doi:10.1186/s13024-015-0036-5
- Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey K, Bustin M, Oppenheim J (2006). High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *Journal of leukocyte biology* 81:59-66.
- Yatim N, Cullen S, Albert ML. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat Rev Immunol* 2017;17(4):262-75.
- Zeng, Qinghai et al. 2017. "Identification of TDP-43 as an Oncogene in Melanoma and Its Function during Melanoma Pathogenesis." *Cancer Biology and Therapy* 18(1): 8–15. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1250984>.
- Zigler, Maya, Alexei Shir, and Alexander Levitzki. 2013. "Targeted Cancer Immunotherapy." *Current Opinion in Pharmacology* 13(4): 504–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.04.003>.
- Zitvogel, Laurence, Antoine Tesniere, and Guido Kroemer. 2006. "Cancer despite Immunosurveillance: Immunoselection and Immunosubversion." *Nature Reviews Immunology* 6(10): 715–27.

ANEXOS

1. 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?

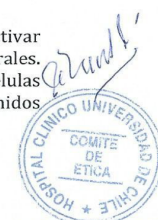
Este estudio pretende identificar nuevas proteínas, desde células cancerígenas, que permitan aumentar la activación de un tipo especial de células del sistema inmune, llamadas células dendríticas y mejorar así las respuestas clínicas de los pacientes vacunados con este tipo de células. En última instancia, 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 17 AGO. 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?

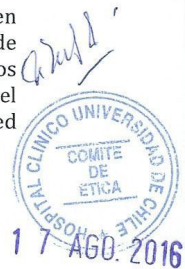
Para averiguar más acerca de este proyecto, usted puede dirigirse al responsable del estudio Dr. Fermín González, al teléfono 29781839.

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.

YoRUT:.....
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.



(Signature)
DR. ANTONIO MORALES BARRIA
PRÉSIDENTE
COMITÉ ETICO CIENTIFICO
HOSPITAL CLINICO UNIVERSIDAD DE CHILE.