

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES LECTINA TIPO C EN EL
RECONOCIMIENTO DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS POR
CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO Y
CONSECUENCIAS EN LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Proteínas y
Biotecnología y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

JAVIERA PAZ VILLAR LEAL

Directora de Tesis: Dra. María Inés Becker Contreras

**Santiago-CHILE
Mayo 2016**

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

JAVIERA PAZ VILLAR LEAL

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día miércoles 11 de mayo de 2016.

Director de Tesis:

Dra. María Inés Becker

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Carmen Molina

Dra. María Antonieta Valenzuela

Dr. Christian Wilson

AGRADECIMIENTOS

He tenido la suerte de que todos los compañeros y profesores quienes me han acompañado y guiado en esta etapa son, además de grandes científicos y profesionales, tremendas personas.

Por eso quiero agradecer especialmente a mi tutora de tesis, la profesora María Inés Becker, quien me re-encantó con la ciencia y me ha demostrado que lo más importante es el amor por lo que uno hace. Además, a la profesora Luisa Martínez-Pomares, quien me recibió amablemente en su laboratorio por tres meses. Mis más profundos agradecimientos para ella, por su hospitalidad, consejos y confianza. Así también al Doctor Daniel Mitchell de la Universidad de Warwick, Inglaterra.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de laboratorio (FUCITED), Claudia, Miguel, Juan Jo, Taying, José y a Fabián, por las discusiones, consejos, almuerzos y amistad. A Leo Vargas y la Dra. María Rosa Bono, muchísimas gracias por sus consejos y ayuda en la citometría. Además, a la Fabi y a mis compañeros de la U por las risas cada vez que fueron necesarias.

Finalmente, quiero darle gracias infinitas a mi familia. A mis papás, hermano, abuelos, tíos y primos. No tendría sentido terminar este ciclo si no pudiera compartirlo y celebrarlo con ustedes.

Me sentiré siempre una mujer muy afortunada por haber compartido esta etapa con todos ustedes.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1110651 y 1151337 de la Dra. María Inés Becker. Además, la estudiante recibió el apoyo de la Beca para Estudios de Magíster Nacional de CONICYT y también apoyo de BIOSONDA S.A. y de la Fundación Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (FUCITED).

COLABORACION INTERNACIONAL

En la obtención de los resultados de esta tesis se contó con la colaboración de la **Dra. Luisa Martinez-Pomares** (Faculty of Medicine and Health Sciences School of Life Science, University of Nottingham, Reino Unido) y con el **Dr. Daniel Mitchell** (Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, Reino Unido).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Javiera Villar, Miguel Del Campo, Daniel Mitchell, Luisa Martínez-Pomares, María Inés Becker. Estudio de la unión de hemocianinas a los receptores de lectina tipo C: MR y DC-SIGN. LVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile y XIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Inmunología. Noviembre, 23–25, 2015. Puerto Varas, Chile.

PUBLICACIONES

Zhong T, Arancibia S, Born R, Tampe R, **Villar J**, Del Campo M, Manubens A, Becker MI. Hemocyanins stimulate innate immunity by inducing different temporal patterns of pro-inflammatory cytokine expression in macrophages, *The Journal of Immunology*, 196 (11), 2016. doi:[10.4049/jimmunol.1501156](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501156)

ÍNDICE

	Pág
Agradecimientos	3
Financiamiento	4
Colaboración Internacional	4
Presentaciones a congresos	5
Publicaciones	5
Índice	6
Índice de Figuras	10
Índice de Tablas	12
Abreviaturas	13
Resumen	15
<i>Abstract</i>	17
Abreviaturas	13
1. Introducción	19
1.1. Propiedades estructurales de las hemocianinas y su inmunogenicidad	19
1.2. La respuesta inmune y sus componentes	26
1.3. Receptores de antígenos presentes en APCs	29
1.3.1. Receptores lectinas tipo C	29
1.4. Procesamiento de los antígenos endocitados por APCs; rol de la presentación cruzada	33
1.5. Respuesta inmune contra hemocianinas	36
2. Hipótesis	44
3. Objetivo General	45
4. Objetivos Específicos	45
5. Materiales	46
5.1. Materiales biológicos	46
5.1.1. Hemocianinas	46

5.1.2. Animales de experimentación	46
5.1.3. Líneas celulares	47
5.1.4. Anticuerpos	47
5.1.5. Muestras de sangre humana	49
5.1.6. Constructos recombinantes	49
6. Metodología	51
6.1. Preparación de hemocianinas	51
6.1.1. Cuantificación de proteínas	51
6.1.2. Desglicosilación química de las hemocianinas	51
6.1.3. Hemocianinas conjugadas a fluoróforos	52
6.2. Cultivo celular	53
6.2.1. Cultivo de líneas celulares	53
6.2.2. Cultivo primario de células dendríticas murinas desde precursores de médula ósea	53
6.2.3. Cultivo primario de macrófagos intraperitoneales murinos	54
6.2.4. Cultivo primario de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas	55
6.3. Ensayos inmunoquímicos	56
6.3.1. Unión de hemocianinas a receptores lectina tipo-C por ELISA indirecto	56
6.3.2. Análisis de la unión de hemocianinas a receptores mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, Surface Plasmon Resonance)	57
6.4. Ensayos de incorporación <i>in vitro</i> de hemocianinas fluorescentes en diferentes tipos celulares	59
6.4.1. Incorporación de hemocianinas en células CHO	59

6.4.2. Incorporación de hemocianina en APCs murinas	60
6.4.3 Evaluación de marcadores de superficie de APCs por citometría de flujo	61
6.4.4. Ensayos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal	61
6.5. Análisis estadístico	64
7. Resultados	65
7.1. Caracterización de la unión de hemocianinas a CLR	65
7.1.1. Las hemocianinas interactúan con el dominio lectina (CTLD4-7) del MR y con DC-SIGN de una manera dosis-dependiente y se requiere la presencia de sus oligosacáridos	62
7.1.2. La unión de las hemocianinas al MR y DC-SIGN es específica	69
7.1.3. Las hemocianinas presentan diferentes constantes de unión aparentes a MR y DC-SIGN	73
7.2. Incorporación de hemocianinas mediada por CLR en APCs	82
7.2.1. El MR es capaz de capturar a las hemocianinas en un sistema artificial de células CHO que sobre-expresan el receptor	82
7.2.2. Macrófagos y células dendríticas humanas que expresan el MR y/o DC-SIGN internalizan las hemocianinas	84
7.2.3. La internalización de hemocianinas en macrófagos y en la línea DC2.4 de células dendríticas murinas es parcialmente inhibida por EDTA y D-Manosa	89

7.3. Determinación del tipo de compartimento/s subcelular al cual se destinan las hemocianinas una vez endocitadas	93
7.3.1. Rab5 y Rab7 en BMDCs presentan un patrón punteado característico de vesículas citoplasmáticas	96
7.3.2. Las tres hemocianinas colocalizan parcialmente con Rab7 y Lamp-1, mientras que FLH y KLH también colocalizan con Rab5	98
7.4. Evaluar la presentación antigénica de hemocianinas por DCs a linfocitos T CD8 ⁺	101
7.4.1 Macrófagos murinos incubados con FLH aumentan la expresión de MHC-I y MHC-II	101
7.4.2. Células tumorales MOC7, MB49 y B16F10 incorporan FLH en mayor medida que CCH o KLH	103
8. Discusión	108
8.1. Unión de hemocianinas a CLR _s	110
8.2. Reconocimiento e internalización de hemocianinas mediada por receptores que reconocen azúcares	118
8.3. Destinación intracelular de las hemocianinas en APCs	120
8.4. ¿Podrían las hemocianinas ser presentadas a linfocitos T CD8 ⁺ ?	123
8.5. Proposición de un modelo que explique el procesamiento y presentación antigénica de FLH	127
9. Conclusiones	129
10. Referencias	132

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág
Figura 1	Microscopía electrónica de transmisión de hemocianinas de moluscos con tinción negativa	20
Figura 2	Sitios putativos de N-glicosilación en KLH	25
Figura 3	Receptores lectina tipo C (CLRs) en células presentadoras de antígenos humanas	31
Figura 4	Vías de internalización y procesamiento de antígenos extra- e intra-celulares	35
Figura 5	Ingreso de CCH en DCs murinas cultivadas <i>in vitro</i>	39
Figura 6	Receptores lectinas tipo C recombinantes	67
Figura 7	La unión las hemocianinas a los CLRs MR y DC-SIGN es dependiente de los azúcares presentes en su estructura	68
Figura 8	La unión de hemocianinas a CTLD4-7 y DC-SIGN muestra un comportamiento dosis-respuesta	71
Figura 9	La unión de las hemocianinas a CTLD4-7-Fc y DC-SIGN-Fc es específica	72
Figura 10	Sensorgramas de unión de controles positivos y negativos al chip funcionalizado con MR, CTLD4-7, DC-SIGN y MGL	75
Figura 11	Sensorgramas de la unión de hemocianinas a CTLD4-7, MR, DC-SIGN o MGL obtenidos por MC-SPR	76
Figura 12	Ajustes al modelo de Langmuir 1:1 para la obtención de parámetros cinéticos (Tabla 3) de las curvas de unión obtenidas por MC-SPR de la unión de hemocianinas a CTLD4-7, MR, DC-SIGN y MGL	78
Figura 13	Las hemocianinas desglicosiladas no interactúan con los receptores MR y DC-SIGN	81
Figura 14	El MR es capaz de internalizar las hemocianinas <i>in vitro</i>	83

Figura 15	Caracterización por citometría de flujo de las APCs obtenidas desde leucocitos periféricos humanos	85
Figura 16	APCs humanas generadas a partir de PBMCs, son capaces de internalizar las hemocianinas <i>in vitro</i>	87
Figura 17	Control de internalización de CCH-Alexa Fluor-488 a 4°C en APCs humanas	88
Figura 18	Expresión de CLRs en células presentadoras de antígeno murinas	90
Figura 19	La incorporación de hemocianinas-Alexa488 en la línea celular DC2.4 presenta un efecto dosis-respuesta	92
Figura 20	EDTA y D-Manosa inhiben la incorporación de hemocianinas en células DC2.4	94
Figura 21	EDTA y D-Manosa inhiben la incorporación de hemocianinas en macrófagos intraperitoneales murinos	95
Figura 22	La inmunofluorescencia indirecta de BMDCs con los anticuerpos anti-Rab5 y anti-Rab7, resulta en un patrón punteado característico de vesículas citoplasmáticas	97
Figura 23	Las hemocianinas colocalizan parcialmente con el marcador de endosomas tardíos Rab7 en BMDCs	100
Figura 24	Macrófagos intraperitoneales incubados 24 horas con FLH aumentan la expresión de MHCI y MHCII	102
Figura 25	Incorporación de hemocianinas en células tumorales MOC7	105
Figura 26	FLH dentro de células tumorales MOC7 por microscopía electrónica	106
Figura 27	Las líneas celulares tumorales B16F10 y MB49 incorporan FLH incluso a bajas concentraciones	107
Figura 28	Tinción negativa de las hemocianinas CCH, FLH y KLH obtenida por microscopía electrónica de transmisión	114
Figura 29	Modelo del procesamiento antigénico de FLH en células presentadoras murinas.	128

ÍNDICE DE TABLAS

		Pág
Tabla 1	Anticuerpos utilizados para la evaluación de marcadores de superficie en células humanas	48
Tabla 2	Anticuerpos utilizados para la evaluación de marcadores endosomales y de superficie en células murinas	48
Tabla 3	Parámetros cinéticos de la interacción de las hemocianinas con los CLRs determinados mediante SPR	79

ABREVIATURAS

Ac	: anticuerpo
ANOVA	: <i>analysis of variance</i>
APCs	: <i>antigen presenting cells</i>
BMDCs	: <i>bone marrow-derived dendritic cells</i>
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
CCH	: <i>Concholepas concholepas hemocyanin</i>
CHO	: <i>Chinese hamster ovary</i>
CLRs	: <i>C-type lectin receptors</i>
CRD	: <i>cysteine rich domain</i>
CTLD	: <i>c-type lectin domain</i>
DAPI	: <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DC	: <i>dendritic cell</i>
DC-SIGN	: <i>dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FLH	: <i>Fisurella latimarginata hemocyanin</i>
FNII	: <i>fibronectin tipe II domain</i>
Gal	: Galactosa
GM-CSF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
IFN γ	: <i>Interferon gamma</i>
IL	: Interleuquina
ITAM	: <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
ITIM	: <i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
k _a	: constante cinética de asociación
k _d	: constante cinética de disociación
K _D	: constante de disociación
KLH	: <i>key-hole limpet hemocyanin</i>
LPS	: lipopolisacárido
Man	: Manosa
MFI	: <i>mean fluorescence intensity</i>
MGL	: <i>macrophage galactose receptor</i>

MHC	: <i>major histocompatibility complex</i>
Møs	: Macrófagos
MR	: <i>mannose receptor</i>
NK	: <i>Natural Killer</i>
NLRs	: <i>NOD-like receptor</i>
OVA	: <i>ovalbumin</i>
PAMPs	: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMCs	: <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	: <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	: p-Formaldehído
PRRs	: <i>Patern recognition receptors</i>
SFB	: Suero Fetal Bovino
SPR	: <i>surface plasmon resonance</i>
TAP	: <i>Transporter associated with antigen processing</i>
TCR	: <i>T cell receptor</i>
TGF β	: <i>transforming growth factor beta</i>
TLRs	: <i>toll-like receptors</i>
TNF	: <i>tumor necrosis factor</i>
VIH	: virus de la inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Las hemocianinas provenientes de los gastrópodos *Megathura crenulata*, conocida como KLH, *Concholepas concholepas* (CCH) y *Fissurella latimarginata* (FLH), presentan propiedades inmunomoduladoras en mamíferos, las cuales han permitido su uso en biomedicina como proteína carrier de antígenos tumorales y como inmunoestimulantes no específicos en el tratamiento de ciertos cáncer. Para explicar esta propiedad se han invocado características tales como su tamaño, xenogenicidad, estructura compleja y contenido de azúcares, siendo este último uno de los rasgos estructurales de importancia en esta Tesis, ya que podrían ser reconocidos por receptores de inmunidad innata de tipo lectinas tipo C (CLRs), presentes en células presentadoras de antígeno (APCs).

La endocitosis mediada por CLRs, tales como el receptor de manosa (MR), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) o MGL (*macrophage galactose lectine*), tiene diversas consecuencias en la respuesta inmune y una de ellas es la presentación cruzada de antígenos por APCs, un mecanismo por el cual los péptidos antigénicos de proteínas exógenas, que se presentan normalmente en el contexto de antígenos de Histocompatibilidad de Clase II (MHC II) a linfocitos T CD4⁺, son cargados en MHC de clase I y presentados a linfocitos T CD8⁺, células fundamentales en la respuesta inmune celular antitumoral. Siendo las hemocianinas antígenos exógenos, la hipótesis ha sido que: **la endocitosis de las hemocianinas mediada por receptores lectinas tipo C en APCs, conduce a su presentación cruzada.**

Para estudiar la unión de las hemocianinas y los CLRs, se realizaron ensayos de unión *in vitro* mediante ELISA, entre quimeras recombinantes del MR y DC-SIGN con hemocianinas nativas y desglucosiladas; además de ensayos de inhibición con sus ligandos naturales, en presencia y ausencia de EDTA. Se caracterizó la interacción receptor/ligando utilizando SPR (*surface plasmon resonance*), permitiendo determinar las constantes de afinidad aparente entre las hemocianinas y dichos receptores. Además, mediante citometría de flujo se realizaron estudios en un modelo artificial de células

CHO que sobre-expresan el MR y, con APCs humanas y murinas. Usando microscopia confocal de fluorescencia y marcadores específicos, se estudió en APCs murinas a qué compartimento intracelular se destinan las hemocianinas. Finalmente, se iniciaron los estudios para determinar si APCs murinas y líneas tumorales internalizan y presentar las hemocianinas en MHC-I.

Los principales resultados muestran que las hemocianinas interactúan con más de un receptor, así CCH, FLH y KLH interactúan con MR y DC-SIGN, pero solo FLH y KLH lo hacen con MGL. Además, se demostró en APCs murinas, que la incorporación de hemocianina es inhibida parcialmente por EDTA y D-Manosa. Por otro lado, se observó que el MR participa en la captura de las hemocianinas en células CHO que sobreexpresan el MR; además, que APCs humanas y murinas, que expresan CLR, internalizan las hemocianinas.

También se encontró, que las tres hemocianinas se destinan a compartimentos lisosomales (Lamp-1+) y endosomas tardíos (Rab7+). Sin embargo, no se encontró CCH en endosomas tempranos (Rab5+), a diferencia de FLH y KLH, sugiriendo diferencias en la ruta endocítica que siguen las hemocianinas una vez internalizadas por las APCs. Así, FLH y KLH podrían estar siguiendo una ruta de procesamiento alternativa, que las conduzca a ser presentadas a linfocitos T CD8+.

La vía de procesamiento alternativa de las hemocianinas, podría explicar en parte su efecto antitumoral no específico, ya que sumada a la vía de presentación en MHC II, al activar linfocitos T CD8+ vía MHC I, se liberarían citoquinas y factores humorales que indirectamente, activarían la destrucción de células tumorales u otras respuestas específicas latentes, efecto conocido como *bystander*.

ABSTRACT

Hemocyanins from the gastropod *Megathura crenulata* (KLH), *Concholepas concholepas* (CCH) and *Fissurella latimarginata* (FLH) have mainly been used as non-specific immunostimulants with beneficial clinical outcomes, to prevent the progression of recurrent superficial bladder cancer or as carriers/adjuvants for producing antibodies against tumor-associated antigens in therapeutic vaccines against cancer. However, the mechanism involved in the positive immunomodulatory effects of these proteins has been scarcely studied.

An important feature of these hemocyanins is its carbohydrate content, which can reach up to 3% (w/w), being mannose as the most abundant sugar. These oligosaccharides can be recognized by C-type lectin receptors (CLRs) of innate immunity, such as Mannose Receptor (MR), DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) or MGL (*macrophage galactose lectine*), present on antigen presenting cells (APCs). Furthermore, these innate receptors have been involved in classical and alternative antigen presentation by MHC I and MHC II to CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes, respectively. Hence, we proposed that **CLRs-mediated endocytosis of hemocyanins in antigen presenting cells triggers the cross-presentation of these proteins.**

In this work, we studied the interaction between CLRs and hemocyanins using indirect ELISA and SPR (surface plasmon resonance). We found that CCH, FLH, and KLH bind to MR and DC-SIGN with high affinity constants; additionally FLH and KLH also bind to MGL.

Our results demonstrate that the interaction between MR and hemocyanins trigger their endocytosis, analysed by an artificial CHO-MR system. Furthermore, human and murine APCs-expressing CLRs can uptake hemocyanins and ovalbumin. We also found that hemocyanins uptake by murine macrophages and dendritic cells can be partially inhibited by EDTA and D-Mannose. These results suggest an important role of CLRs in endocytosis and signalling transduction of hemocyanins.

On the other hand, we studied the cellular destination of hemocyanins in bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) using confocal microscopy. FLH and KLH showed a similar localization in Rab5⁺, Rab7⁺ and Lamp-1⁺ compartments. However, CCH was not found in Rab5⁺ early endosomes, suggesting differential compartmentalization between the hemocyanins. Thus, FLH and KLH could be involved in an alternative processing pathway such as cross-presentation.

Finally, we determined if murine APCs could present hemocyanins on MHC I context. Our results showed that *in vitro* stimulation of macrophages with FLH, but not with CCH or KLH, increased MHC I and MHC II expression, supporting our hypothesis.

Hemocyanins cross-presentation could explain one of the mechanisms involved in the antitumoral effect of these proteins, in addition to the classic presentation by MHC II. Moreover, CD8⁺ lymphocytes activation could promote cytokines and humoral factors release that indirectly trigger other latent immune responses against the tumoral cells, effect known as *bystander effect*.

INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son glicoproteínas de alto peso molecular, presentes en la hemolinfa de algunos moluscos, cuya principal función es el transporte de oxígeno molecular, sin embargo, se les han encontrado diversas propiedades que han permitido su uso en biotecnología y medicina, siendo consideradas hoy día inmunomoduladores eficaces y seguros¹.

Las hemocianinas de moluscos y especialmente las de los gastrópodos, han sido ampliamente usadas en inmunología debido a que son potentes inmunógenos en mamíferos. Para explicar esta capacidad se han involucrado su xenogenicidad, gran tamaño, estructura cuaternaria compleja (**Figura 1**) y presencia de carbohidratos¹. Sin embargo, estas características no explican el mecanismo por el cuál son capaces de activar al sistema inmune, lo cual permanece pobremente conocido. No obstante, se han utilizado ampliamente en biomedicina². Así, como ejemplo de estas aplicaciones, encontramos el de su uso como proteínas transportadoras (*carrier*) para producir anticuerpos contra moléculas de haptenos y péptidos sintéticos, *carrier* de antígenos asociados a tumores en vacunas terapéuticas experimentales contra cáncer y además, como adyuvante e inmunostimulante no-específico en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga luego de la extirpación del tumor¹.

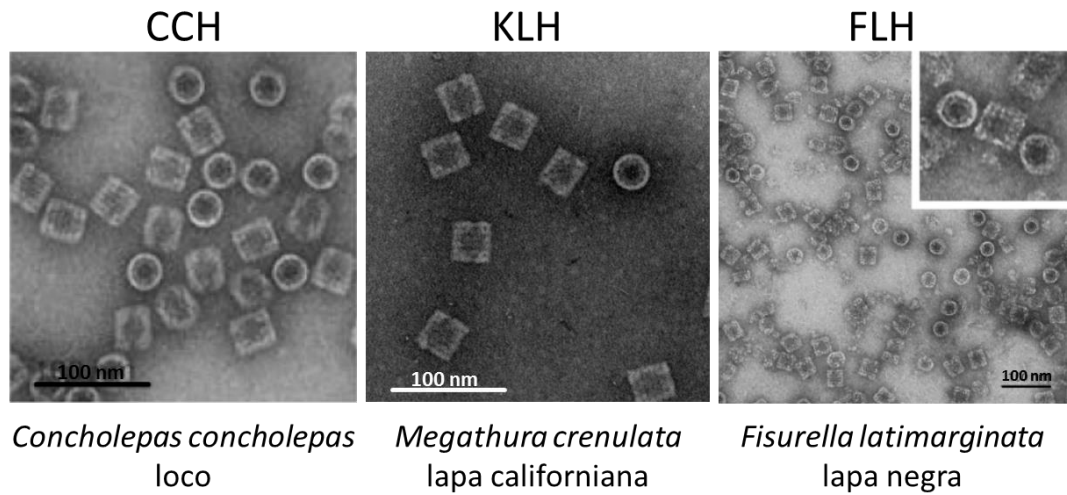


Figura 1. Microscopía electrónica de transmisión de hemocianinas de moluscos con tinción negativa. Se muestra la estructura con forma de cilindro hueco conservada en las tres hemocianinas que se utilizarán en este trabajo, a saber CCH³, KLH⁴ y FLH⁵. Se observan vistas de las moléculas desde arriba (círculos) y laterales (rectángulos). Imágenes obtenidas de las referencia 3, 4 y 5 respectivamente.

La hemocianina proveniente del molusco Californiano Keyhole Limpet (*Megathura crenulata*), conocida como KLH por *Keyhole limpet hemocyanin*, ha sido la más utilizada y estudiada cómo inmunógeno, debido a que fue la primera en ser descubierta⁶. Pero no es la única que posee estas interesantes características, de hecho en nuestro laboratorio se han descrito dos hemocianinas de gastrópodos que habitan el litoral chileno, la proveniente del loco (*Concholepas concholepas*) denominada CCH y de la lapa negra (*Fissurella latimarginata*) denominada FLH^{5,7}. Estas dos proteínas poseen capacidades inmunogénicas y anti-tumorales comparables a KLH^{5,8}. La importancia de estudiar estas hemocianinas radica en la posibilidad de obtener en nuestro país el recurso natural del cual se extrae la hemolinfa y se purifica la proteína, debido a que por su gran tamaño y compleja estructura, no ha sido posible clonaras y expresarlas en un sistema de expresión heterólogo, para poder prescindir de los moluscos que las poseen.

El uso de las hemocianinas como inmunoestimulantes no específicos ha resultado ser extremadamente seguro, sin efectos secundarios importantes. Es posible que esta sea una de las razones de por qué no se ha profundizado en el/los mecanismo(s) mediante el cual estas proteínas, a diferencia de la mayoría de las proteínas estudiadas, son capaces de activar al sistema inmune hacia una respuesta de tipo Th1, caracterizada por la secreción de IFN γ y producir un potente efecto antitumoral^{3,5,9}. La escasa información existente, es insuficiente para comprender en su totalidad la/las vía por la cual

las hemocianinas son reconocidas e ingresan a las células presentadoras de antígenos (APCs, *antigen presenting cells*), para ser procesadas y presentadas a linfocitos T específicos y, cómo este proceso desencadena la potente respuesta no-específica del sistema inmune contra ciertos tumores.

1.1. Propiedades estructurales de las hemocianinas y su inmunogenicidad

Todas las hemocianinas poseen un sitio de unión a oxígeno conformado por dos átomos de cobre, coordinados cada uno por tres histidinas, que permiten la unión de una molécula de O₂ por cada unidad funcional de la proteína lo cual le otorga su característico color azul¹⁰. No obstante, las hemocianinas de artrópodos y de moluscos difieren enormemente en su estructura terciaria y cuaternaria. Uno de los aspectos estructurales que destacan de las hemocianinas de estudio en esta tesis, es la organización de sus subunidades, que a diferencia del sitio de unión a oxígeno, es distinta para cada proteína. Tanto KLH como CCH están compuestas por dos tipos de subunidades^{4,11}, en la primera estas se organizan en homodecámeros⁴ y en la segunda en heterodecámeros⁷. FLH, por su lado, está compuesta solo por un tipo de subunidad que forma homodecámeros¹. En gastrópodos, orden al que pertenecen las hemocianinas antes señaladas, los decámeros se asocian de a pares formando enormes estructuras de 8 MDa, con forma de cilindro hueco cuando se observan con

una tinción negativa al microscopio electrónico³⁻⁵, tal como se observa en la **Figura 1**.

El sistema inmune se activa al reconocer, por diferentes tipos de receptores, un agente patógeno en el organismo. En este contexto, la mayoría de las estructuras que se reconocen como exógenas (bacterias, virus, hongos y parásitos) contienen azúcares en su superficie. Debido a esto, es una característica estructural relevante para el objetivo de este proyecto, es el alto nivel de glicosilación que contienen las hemocianinas de moluscos, ya que la presencia de estos azúcares podría explicar la existencia de epítomos altamente inmunogénicos en las hemocianinas. En KLH y CCH los azúcares corresponden a aproximadamente un 3% del peso total de la proteína¹ y, aunque para FLH no existe este dato, se estima un porcentaje similar. El estudio de los tipos de azúcares que forman parte de estas tres hemocianinas mediante MALDI-TOF-MS^{5,12}, mostró que todas contienen estructuras glicosídicas formadas por fucosa, N-acetilglucosamina, y manosa en mayor proporción, sin embargo, tanto FLH como KLH mostraron la presencia de galactosa en sus glicosilaciones, no así CCH. De esta misma forma, es importante destacar que la estructura secundaria de estos árboles glicosídicos difiere entre cada hemocianina. Recientemente, se obtuvo la primera estructura cristalográfica de una hemocianina intacta de molusco¹³, donde se concluyó que los azúcares además de estar involucrados en el efecto alostérico de unión de oxígeno de las hemocianinas, forman agrupaciones que

refuerzan la interacción entre subunidades, estabilizando la formación del decámero.

En la **Figura 2** se muestra un modelo de la estructura de un homodidecámero de KLH1 resuelto por crio-microscopía electrónica (CryoEM) a una resolución de 9-Å realizado por Gatsogiannis *et al*¹⁴, donde se señalan en color rojo los posibles sitios de N-glicosilación de la proteína. Sin embargo, está reportado que CCH, FLH y KLH también poseen O-glicosilaciones¹⁵. El conjunto de glicosilaciones, presentes en gran cantidad y variedad, otorgan la posibilidad de que la hemocianina exhiba epítomos comunes con algunos patógenos o células malignas. De hecho, se ha reportado la presencia de reactividad cruzada entre epítomos de la hemocianina y el parásito *Shistosoma mansoni*¹⁶, y lo más importante, se ha detectado la presencia del antígeno T (o antígeno de Thomsen-Friedenreich, que corresponde al disacárido Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) en KLH¹⁷, que se encuentra sobre-expresado en algunas células tumorales.

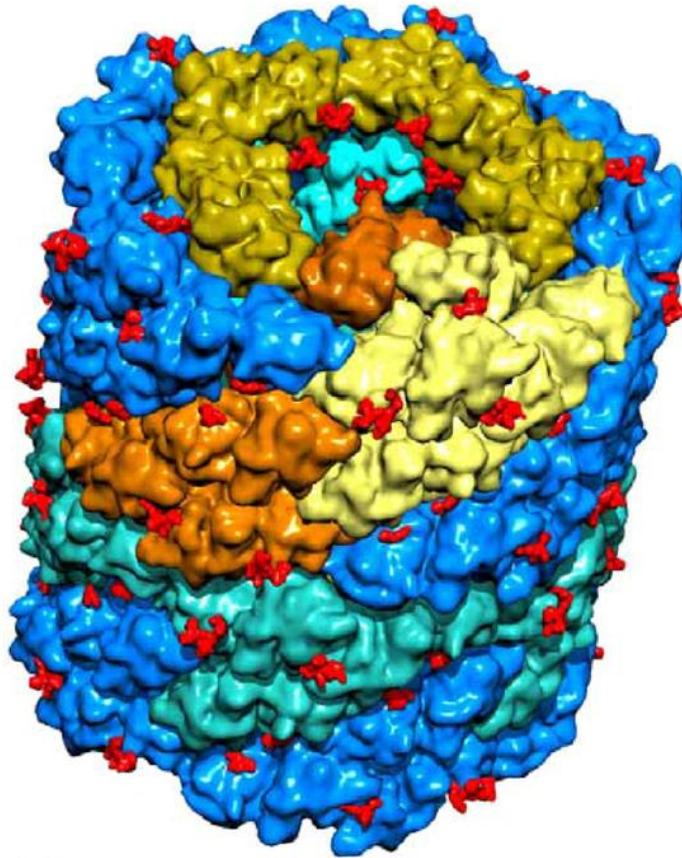


Figura 2. Sitios putativos de N-glicosilación en KLH. Modelo de un didecámero de KLH1 obtenido por crio-microscopía electrónica (9-Å de resolución), donde se muestran en rojo los posibles sitios de N-glicosilación en KLH1. Imagen obtenida de Gatsogiannis *et al.* 2008¹⁴.

De esta forma, el contenido de epítomos comunes, en la estructura primaria y en los azúcares de las hemocianinas y, la existencia de reactividad cruzada con patógenos y células tumorales, se establecen como características estructurales relevantes para las hemocianinas en estudio. Así surgen las preguntas que se desean responder en este trabajo: ¿Cómo reconocen las células del sistema inmune las hemocianinas y cuál es el rol de los azúcares en ello? y ¿Cómo este reconocimiento afecta su presentación antigénica, y como consecuencia, la respuesta inmune adaptativa que promueven?

1.2. La respuesta inmune y sus componentes

En el contexto que nos sitúan estas preguntas y, para entender el mecanismo por cuál estas proteínas promueven la activación del sistema inmune, es importante mencionar que KLH ha sido utilizada como un antígeno modelo para el estudio de las respuestas timo-dependientes⁴. Pero ¿qué implica eso? Para poder estudiar y entender el mecanismo por el cual estas proteínas funcionan como inmunoestimulantes en mamíferos y generan una respuesta antitumoral potente, es necesario hacer una breve descripción de la respuesta inmune y los factores que la afectan.

El sistema inmune es una red compleja de componentes humorales y celulares, que funciona gracias a la conjunción perfecta entre el sistema inmune innato y adaptativo. El primero presenta barreras físicas, células y

elementos humorales como el complemento, que son capaces de reconocer, fagocitar y destruir a los patógenos de manera inmediata, vía su reconocimiento por receptores de la inmunidad innata que reconocen motivos moleculares de patógenos¹⁸, sin dejar memoria. En cambio el segundo, utiliza componentes celulares y humorales para reconocer específicamente vía receptores clonotípicos a los patógenos y destruirlos activando los mecanismos efectores de la respuesta inmune, la cual deja una memoria inmunológica. Las células presentadoras de antígenos conectan estas dos respuestas, reconociendo a los patógenos y presentándolos a linfocitos B y T, los cuales reconocen epítomos específicos de los antígenos, desencadenando una respuesta inmune humoral y celular contra ellos, respectivamente. Así, a través de la secreción de citoquinas, anticuerpos, activación del complemento y activación de células efectoras, se logra defender al organismo de microorganismos y también, de células tumorales. Las APCs pueden ser macrófagos (MØs), células dendríticas (DCs, *dendritic cells*) o linfocitos B; sin embargo, las DCs son consideradas las células presentadoras de antígenos profesionales porque expresan constitutivamente moléculas presentadoras de antígeno (antígenos de histocompatibilidad, MHC, tanto de clase I como II) y son las inductoras más eficientes de la activación y proliferación de linfocitos T, así como las responsables de regular la intensidad de la respuesta inmune¹⁹.

Las células dendríticas se encuentran en todo el cuerpo, y su función es capturar e internalizar patógenos para procesarlos y presentarlos en el

contexto de MHC de clase I y clase II a células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. La **presentación de antígenos** es el comienzo de la respuesta inmune adaptativa, pero es insuficiente para activar a las células T contra un patógeno. Las células T CD4⁺ deben diferenciarse a distintos tipos de célula T “ayudadora” (Th) dependiendo del tipo de antígeno reconocido para coordinar la respuesta inmune contra él²⁰. Es así, que las células Th1 secretan Interferon- γ (IFN γ) y las interleuquinas IL-2 e IL-12, además del factor de necrosis tumoral (TNF), activando a los macrófagos para eliminar microorganismos intracelulares²¹. Por su parte, las células Th2 secretan IL-4, IL-5 e IL-13 que son claves en la eliminación de microorganismos extracelulares y parásitos; finalmente, las células Th17 que secretan IL-17 e IL-6, son fundamentales en la respuesta contra bacterias extracelulares y hongos²¹. En conjunto con esto, se activan células T reguladoras, caracterizadas por las síntesis de IL-10 y TGF β , que controlan la actividad de las células Th efectoras. Así, la APC debe traducir la información sobre el patógeno invasor en un perfil de expresión de citoquinas, que va a dirigir una vía de diferenciación correcta de los linfocitos T CD4⁺. El ambiente de citoquinas es imprescindible para dirigir la respuesta inmune y, en este proceso, el reconocimiento del patógeno es crucial²².

1.3. Receptores de antígenos presentes en APCs

En las APCs existen un gran número de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *Pattern recognition receptor*) que, como dice su nombre, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*) cuyos ligandos inducen la expresión de diversas citoquinas. Los PRRs clásicos son conocidos como receptores tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*). Sin embargo, se han ido descubriendo una gran variedad de familias de PRRs alternativos, como los NLRs (*NOD-like receptor*) que poseen un dominio de unión a nucleótidos y los receptores de lectina tipo C (CLRs, *C-type lectin receptors*) que requieren Calcio -por eso la denominación C- para funcionar²³. Algunos de estos receptores son, además, receptores endocíticos. Esto permite la captura de los antígenos por las APCs, y por lo tanto, su internalización. Junto con los receptores endocíticos, los antígenos pueden entrar por fagocitosis, macro-pinocitosis o endocitosis mediada por receptores en vesículas cubiertas de clatrina o caveolina²⁴.

1.3.1. Receptores lectinas tipo C

Los receptores lectina tipo C (CLRs), de interés en esta tesis debido al alto contenido de azúcares en las hemocianinas, pueden inducir diversas respuestas inmunes. Los procesos de señalización en que participan estos receptores son complejos y dependen de su interacción con otros PRRs, el antígeno, su contenido de carbohidratos y el tipo de célula presentadora que

lo está reconociendo. Diversos estudios sugieren que la vía de señalización que inducen los CLR's depende de los dominios citoplasmáticos que contienen en su estructura, como se muestra en la **Figura 3**. Algunos de ellos se acoplan a dominios ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) como **Dectina-2**, otros son independientes de estos dominios, como **DC-SIGN** (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*, también conocido como CD209) o **MGL** (*macrophage galactose-type lectin*, también conocido como CLEC10A, DC-ASGPR o CD301). Y existe un grupo entre los cuales se encuentra el **receptor de manosa (MR, mannose receptor**, también conocido como CD206), que no posee dominios citoplasmáticos relacionados con la señalización de una vía transduccional. Todos estos receptores poseen uno o varios dominios lectina de unión a azúcares.

El receptor de manosa, en particular, posee en su porción extracelular un dominio N-terminal rico en cisteínas (CRD, *cysteine rich domain*), que permiten la unión de azúcares sulfatados, seguido de un dominio fibronectina tipo II (FNII) que permite la unión de colágeno y ocho dominios de lectina tipo C (CTLDS) que unen glicoconjugados de manosa²³. La endocitosis mediada por MR depende de la presencia de Ca⁺² en el medio y de clatrin al interior de la célula. MR es un receptor presente tanto en humanos como ratones²³ y ha sido involucrado en la endocitosis de antígenos.

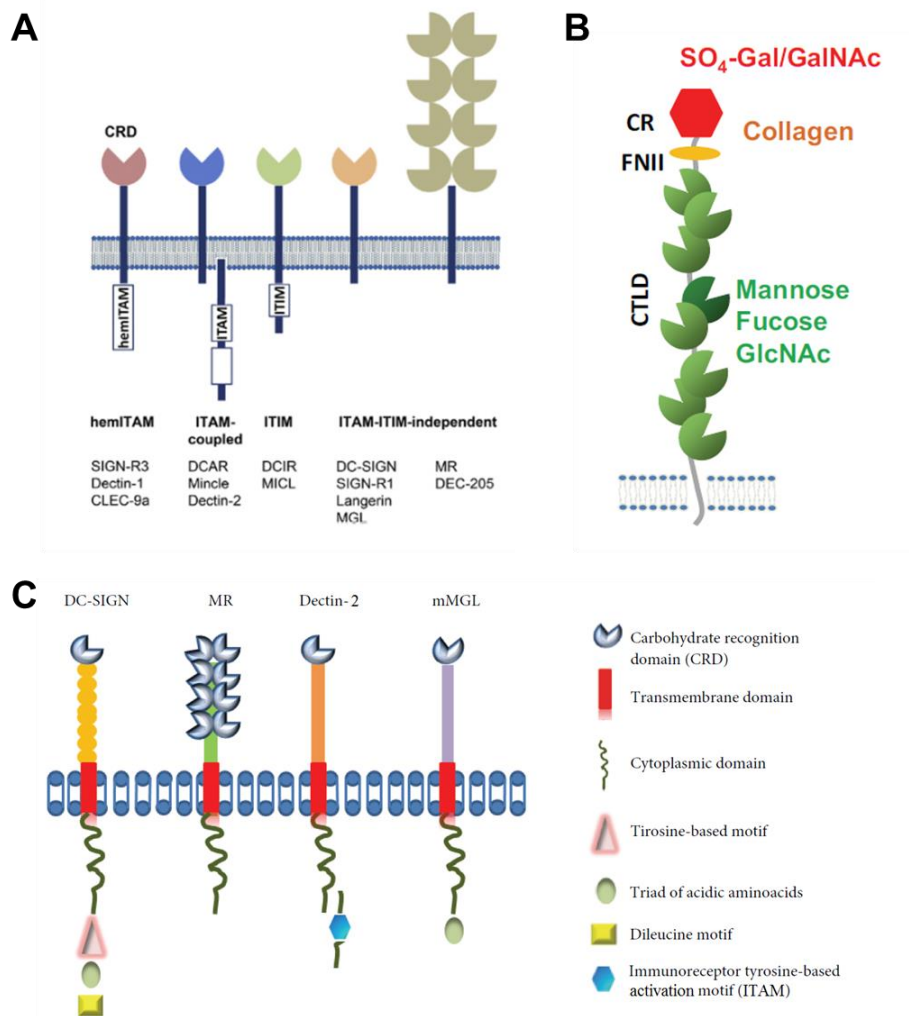


Figura 3. Receptores lectina tipo C (CLR) en células presentadoras de antígenos. (A) Imagen obtenida de Lepenies et al, 2013²⁵. Clasificación de CLRs según su asociación a un dominio citoplasmático que puede o no estar asociado a módulos ITAM o ITIM, (B) El receptor de manosa, en particular, no posee un dominio citoplasmático de señalización, sin embargo, posee tres tipos de dominios extracelulares que permiten la unión de distintas moléculas. CR: dominio rico en cisteínas, FNII: dominio de unión a fibrinógeno y CTLD: dominios lectinas que unen carbohidratos. Imagen modificada de Martínez-Pomares, 2012²³. (C) Comparación de los dominios intracelulares de los receptores de interés en esta tesis. Imagen modificada de Vásquez-Mendoza *et al*, 2013²⁶.

DC-SIGN, por su parte, posee un solo dominio lectina seguido por un tándem de secuencias repetidas y un motivo intracelular de leucinas involucrado en la endocitosis. Ha sido involucrado con la unión del virus VIH y en la endocitosis de antígenos ricos en manosa^{27,28}. Este receptor se encuentra en forma de tetrámero en la membrana celular²⁹ y no posee un homólogo directo en ratones.

Por otro lado, MGL es el único CLR en el sistema inmune humano que reconoce exclusivamente residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) terminal, incluyendo el antígeno Tn (α GalNAc-Ser/Thr) sobre-expresado en células tumorales. Esta especificidad de unión es compartida por el ortólogo murino MGL2, y no así por MGL1. Se ha descrito que MGL favorece la generación de células T reguladoras, mientras que MGL2 promueve la inmunidad humoral y respuesta tipo Th2, MGL1 facilita una respuesta tipo Th1³⁰.

Finalmente, en la **Figura 3.C** se puede observar a Dectina-2, un receptor involucrado en el reconocimiento de estructuras con alto contenido de manosa presentes en la pared celular de hongos, y para él cuál se ha descrito un ligando propio presente en células T CD4⁺ CD25⁺³⁰. Dectina-2 no posee un dominio intracelular, pero se acopla a una molécula adaptadora que posee un dominio ITAM (activador).

1.4. Procesamiento de los antígenos endocitados por APCs; rol de la presentación cruzada

Una vez endocitados, los antígenos deben procesarse. La vía clásica para el procesamiento de antígenos extracelulares está compuesta por tres compartimentos con acidez creciente; endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, donde el antígeno es degradado por enzimas hidrolíticas a pequeños péptidos de alrededor de 18 aminoácidos que pueden ser cargados en MHC de clase II y posteriormente, presentados a linfocitos T CD4+, en un fenómeno conocido como **sinapsis inmunológica**. Por otro lado, los antígenos proteicos endógenos, previamente ubiquitinados, son procesados en el proteasoma y los péptidos de alrededor de 8 aminoácidos son transportados al retículo endoplasmático por proteínas transportadoras (TAPs), donde se asocian a MHC de clase I para posteriormente ser presentados a linfocito T CD8+. Sin embargo, se ha descrito también un mecanismo denominado **presentación cruzada**, en el cual los antígenos extracelulares, en vez de seguir la vía clásica por compartimentos endocíticos y presentación en MHC de clase II³¹, pueden ser cargados en MHC de clase I y presentados a linfocitos T CD8+ citotóxicos. Aunque no existe consenso sobre el mecanismo molecular que hay detrás de este proceso, los principales modelos proponen que puede ocurrir principalmente mediante dos vías: (1) los antígenos son translocados al citoplasma donde se procesan como un antígeno intracelular o (2) son llevados a compartimentos tipo-endosomales que contienen proteasas no-lisosomales, principalmente Catepsina S³², y que

se fusionan con vesículas de reciclaje que contienen MHC de clase I³³ (ver **Figura 4**). Los datos concretos muestran que componentes del retículo endoplasmático aparecen en las vesículas que contienen estos antígenos, como Sec61 o TAP³⁴. Además, los antígenos que siguen esta vía alternativa no se dirigen a compartimentos endosomales/lisosomales clásicos, si no a compartimentos de mayor vida media donde la proteólisis está disminuída³⁵.

De las APCs, las células dendríticas son las que poseen una mayor capacidad de realizar la presentación cruzada de antígenos y dentro de la diversa población de células dendríticas, las con fenotipo CD8α+ en humanos o su homólogo BDCA3+ en ratón, se destacan por realizar este proceso³⁶. En conjunto con el tipo celular, la vía de captura del antígeno también afecta este fenómeno²⁴.

La presentación cruzada de antígenos tiene particular relevancia en la inmunoterapia contra el cáncer, debido a que se ha dedicado un enorme esfuerzo de investigación para encontrar condiciones que permitan generar linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos presentes en células tumorales (como el antígeno T y los gangliosidos GM3, GD2 y GD3, entre otros)³⁷, ya que la presentación en MHC de clase I y la consecuente activación de linfocitos T CD8+, permite la destrucción directa de las células tumorales, vía su lisis a través de la liberación de granzima y perforina³⁸.

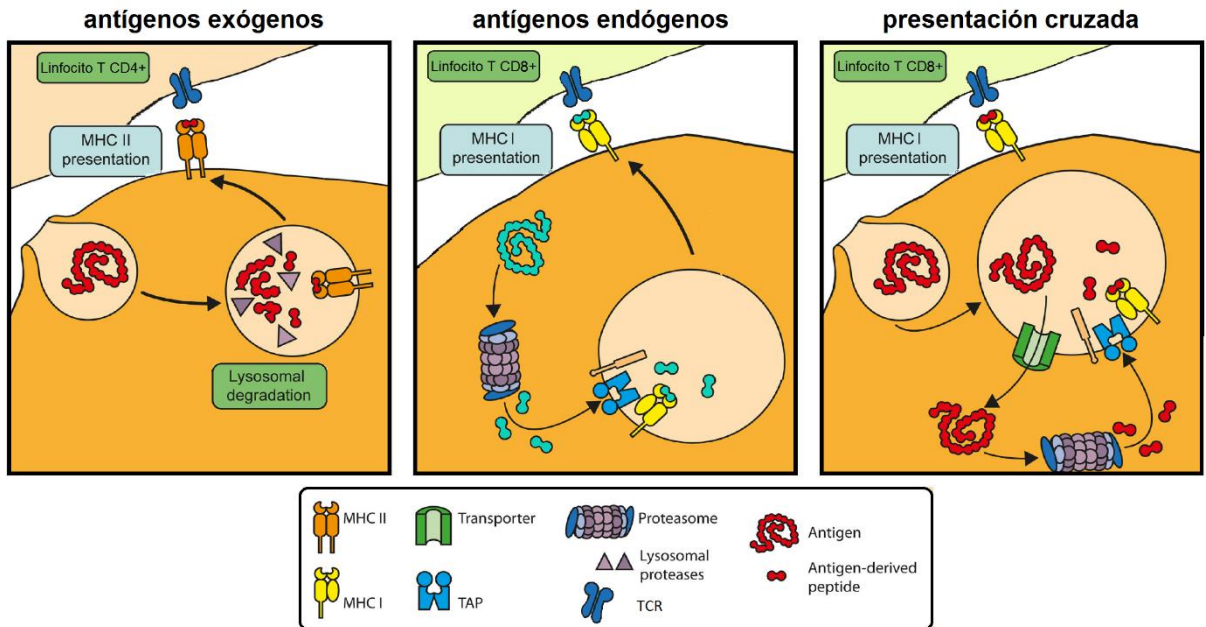


Figura 4. Vías de internalización y procesamiento de antígenos extra- e intra-celulares.

Se muestra las diferentes vías por las que puede ser procesado un antígeno para ser presentado en el contexto de moléculas de histocompatibilidad (MHC de clase I y II). Los antígenos exógenos pueden dirigirse por la vía clásica vía degradación en lisosomas para ser presentados en MHCII (primer cuadro), o puede ocurrir el fenómeno de presentación cruzada, en que el antígeno es procesado en el proteasoma y los péptidos son transportados al retículo endoplasmático por proteínas transportadoras (TAP) donde son cargados en MHC I por chaperonas especializadas. En la parte inferior de la figura, se muestra la leyenda de los diferentes componentes de las vías indicadas. Modificada de Kreer *et al*, 2012³³.

Al existir estas diferentes posibilidades de procesamiento de antígenos exógenos, cabe preguntarse **¿cuál será el destino de un antígeno como las hemocianinas?** Así se establece como relevante un estudio que determine cómo ingresan las hemocianinas a las APCs, que ruta/s endocítica siguen y, cuales son las consecuencias a nivel de la presentación antigénica y finalmente, en su efecto antitumoral no-específico.

1.5. Respuesta inmune contra hemocianinas

Ha sido ampliamente descrito que las hemocianinas promueven respuestas tipo Th1. Para concluir esto, se han evaluado distintos componentes celulares y humorales de la respuesta que inducen en mamíferos, incluyendo los seres humanos, debido a su efecto antitumoral no específico sobre algunos tipos de cáncer. Es así que usando un modelo de cáncer de vejiga murino, se describió que KLH y CCH inducen un cambio de clase de los anticuerpos IgG1 al isotipo IgG2a, por sobre el resto de los isotipos y también, se observó un aumento en la secreción de $\text{INF}\gamma^8$, todas características de una respuesta Th1. Por otro lado, al evaluar la infiltración de células inmunes en un modelo de melanoma murino, se observó un aumento significativo en la población de linfocitos T CD4+ y también, aunque no significativamente, de linfocitos T CD8+⁵.

Cuando se compara el nivel de producción de anticuerpos en ratones inmunizados con KLH y CCH, se encuentran títulos de anticuerpos séricos

muy similares⁸. Sin embargo, con FLH se producen títulos un orden de magnitud mayor que con las otras dos hemocianinas⁵. Esto sugiere que existirían diferencias en la potencia de la respuesta inmune que es capaz de generar cada hemocianina, diferencia que podría explicarse en su inicio, cuando las APCs capturan la hemocianina y la presentan a los linfocitos T para desencadenar una respuesta humoral y celular. De hecho, sobre el efecto antitumoral en sí, está descrito que en el cáncer superficial de vejiga el efecto antitumoral de CCH es comparable al de KLH, y es dependiente de la sensibilización previa de los animales de experimentación con cada hemocianina, lo cual quiere decir que: el efecto antitumoral no específico de estas proteínas requiere de la respuesta inmune adaptativa contra ellas⁸. Sin embargo en un modelo murino de melanoma, el efecto antitumoral de FLH es mayor que el de CCH y KLH y no requiere de una previa sensibilización con FLH⁵, confirmando así, la existencia de diferencias en los mecanismos mediante los cuales las diferentes hemocianinas promueven una activación de la respuesta inmune. Más aun, recientemente se ha demostrado que macrófagos cultivados *in vitro* durante 24 horas con CCH, FLH y KLH muestran diferencias temporales en la expresión génica y en la secreción de un conjunto de citoquinas pro-inflamatorias que conducen a una polarización del tipo M1 en dichas células³⁹.

Como se mencionó, toda esta evidencia apunta a un mecanismo mediado por una respuesta clásica tipo Th1. Esto implica que las APCs, al capturar la hemocianina, la dirigen a compartimentos lisosomales que

permiten su degradación y presentación a linfocitos T helper CD4+, en el contexto de MHC de clase II. **Sin embargo, y aun considerando las evidencias que se mencionarán a continuación, no se ha evaluado la posibilidad de que las APCs procesen a las hemocianinas de tal forma que también ocurra el fenómeno de presentación cruzada, lo que permitiría la activación directa de linfocitos T CD8+.**

¿Por qué pensar en presentación cruzada? basados en la información disponible sobre cómo ingresan las hemocianinas a las APCs y cuánto tiempo son capaces de permanecer en ellas. En nuestro laboratorio se demostró, utilizando microscopía electrónica de transmisión, que CCH y FLH ingresan a DCs cultivadas *in vitro*, mediante pinocitosis y también mediante vesículas cubiertas por clatrina (**Figura 5**)³. En los trabajos en que se evalúa cómo la captura del antígeno afecta la ruta de presentación antigénica, se ha demostrado que cuando los antígenos solubles ingresan por pinocitosis, son dirigidos rápidamente a compartimentos endosomales tardíos, esto permite su degradación por proteasas lisosomales y su presentación en MHC de clase II⁴⁰. Considerando lo anterior, es posible razonar que una fracción de la hemocianina internalizada por las células dendríticas estaría siguiendo esta ruta clásica de procesamiento, ya que permite finalmente la generación de una respuesta tipo Th1, tal como está descrito.

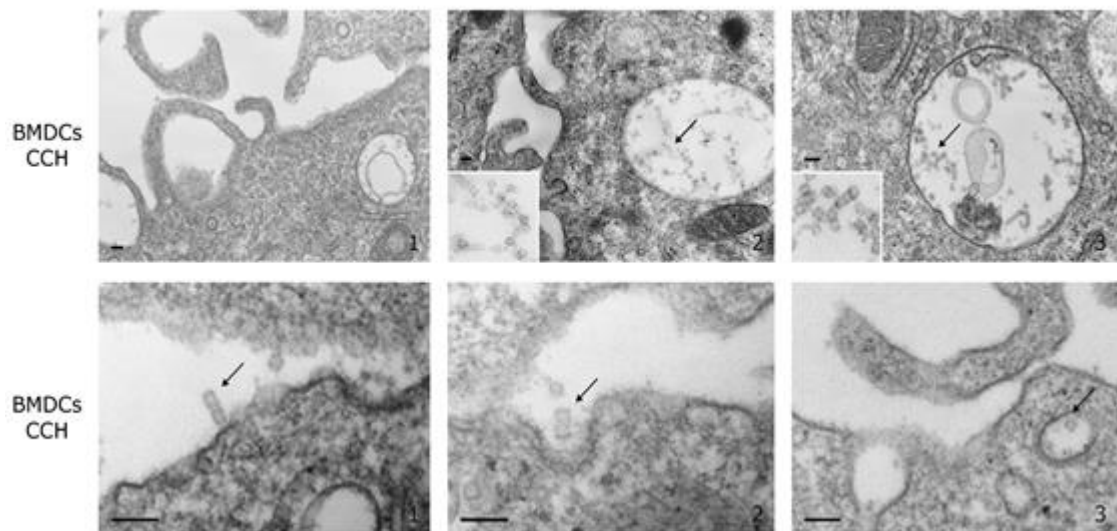


Figura 5. Endocitosis de CCH en células dendríticas murinas cultivadas *in vitro*. Microscopía electrónica de transmisión, tomada de Arancibia et al, 2012³. Se observa que CCH ingresa a las DCs a través de macropinocitosis (fila superior) y endocitosis mediada por clatrin (fila inferior). Las flechas muestran moléculas de CCH.

Sin embargo, existe una fracción de la hemocianina que es endocitada en vesículas cubiertas por clatrina, y que podría tener un destino distinto a la hemocianina internalizada por pinocitosis. Este mecanismo requeriría de un receptor que interactúe con las hemocianinas, y que podría ser un CLR (MR, Dectin, DC-SIGN, MGL, entre otros) ya que son capaces de unir azúcares. En el único estudio que entrega información sobre este punto, analizaron el efecto de KLH en células dendríticas humanas⁴¹, y se descubrió que el tratamiento de DCs con KLH promueve su maduración, y que este efecto es mediado por el receptor de manosa. Para comprobarlo realizaron ensayos de inhibición con un anticuerpo que bloquea al receptor de manosa, midiendo la expresión de moléculas co-estimuladoras que aumentan su expresión cuando la DC es tratada con KLH. En relación a esta evidencia, experimentos preliminares de nuestro laboratorio usando DCs murinas derivadas de médula ósea (BMDCs, *bone marrow derived dendritic cells*), muestran que la D-Manosa y Manano inhiben en un 30% la incorporación de CCH a dichas las células⁴². Esto posiciona a los CLRs, y especialmente al MR, como los principales candidatos para mediar la internalización de esta fracción de hemocianina que ingresa en vesículas cubiertas de clatrina.

Lo interesante de esta última observación, es que se ha propuesto un modelo donde la internalización mediada por MR dirige a los antígenos a compartimentos tipo-endosomales de larga vida media⁴³, y que tiene como consecuencia la presentación de los antígenos en MHC de clase I⁴⁰. Estudios mediante análisis de microscopia de fluorescencia confocal, revelaron que el

MR intracelular es expresado en compartimentos Rab5a positivos, que corresponde a un marcador de endosomas tempranos⁴³, observándose, además, la colocalización parcial de MR con Rab11, un marcador de compartimentos endocíticos de reciclaje. En esta misma línea, está reportado que una vez que el MR une un antígeno, su dominio citoplasmático es poli-ubiquitinado, y esto promueve el reclutamiento de proteínas que permiten la traslocación de los antígenos hacia el citoplasma⁴⁴, lo cual permitiría que antígenos extracelulares sigan la vía de procesamiento de un antígeno intracelular y sean finalmente presentados a linfocitos T citotóxicos (presentación cruzada). Toda esta evidencia sustenta un estudio más detallado del MR como el receptor endocítico de las hemocianinas que, además de permitir su internalización en APCs, podría eventualmente mediar su presentación en MHC I, temas que aún no han sido estudiados.

Respecto a la destinación intracelular de las hemocianinas, Tacke *et al*, 2005⁴⁵ demuestran que KLH colocaliza parcialmente con un marcador de lisosomas (*Lysotracker*) en células dendríticas humanas incubadas con esta proteína, observándose que una fracción de la KLH internalizada no se encontraría en estos compartimentos. Este resultado sugiere que esta fracción de proteína podría encontrarse en endosomas no lisosomales que permiten la presentación en MHC de clase I, sin embargo, no se realiza una cuantificación del fenómeno, ni se muestran experimentos independientes. Además, en este mismo trabajo, en experimentos de proliferación de linfocitos T periféricos co-cultivados con células dendríticas pre-incubadas con KLH, en

conjunto con bloqueadores de la presentación antigénica, se observó que el índice de proliferación disminuye en presencia de un bloqueador de la presentación por MHC de clase I y de clase II⁴⁴.

Adicionalmente, la presentación cruzada requiere de antígenos estables⁴⁶, que puedan mantenerse en las células dendríticas durante el tiempo que esta migra hacia un nódulo linfático, para presentar los péptidos derivados del antígeno a un linfocito *naïve*. Respecto a esto, en nuestro laboratorio se observó que en DCs, el procesamiento de CCH es mucho más lento que el de un antígeno modelo (OVA, ovoalbúmina), ya que es posible observar fragmentos de la hemocianina incluso después de 72 horas de haber incubado la proteína con las células, siendo que a las 24 horas ya no se observa OVA⁵, apoyando la hipótesis de que las hemocianinas pueden presentarse de manera cruzada.

Toda esta evidencia nos lleva a plantear esta tesis, cuyo interés es un estudio más profundo de la interacción de las hemocianinas con los CLR y el procesamiento antigénico de estas proteínas en las APCs.

La activación directa de linfocitos T citotóxicos podría explicar uno de los mecanismos mediante los cuales las hemocianinas funcionan como inmunoestimulantes no específicos. Esto, debido a que la activación de linfocitos y APCs genera un ambiente de citoquinas y señales humorales que pueden activar indirectamente otras respuestas específicas latentes o la

señalización para aumentar la destrucción de células tumorales, efecto conocido como *bystander*.

Por otro lado, la activación de linfocitos T CD8+ podría establecerse como un nuevo mecanismo para entender el poder anti-tumoral no específico de las hemocianinas, que permitiría destruir directamente a las células tumorales, a diferencia de lo que se ha estudiado hasta ahora, y que considera solamente la activación de linfocitos T helper que requieren de la participación de otras células y componentes del sistema inmune para destruir dichas células, ya que se ha reportado que un ambiente de citoquinas adecuado, puede activar a linfocitos T CD8+ *naïve* y de memoria, sin la necesidad de la señalización a través del TCR⁴⁷. Aún más, este mecanismo podría explicar por qué la terapia intra-lesional con FLH en un modelo de melanoma murino, tiene mejores resultados que la aplicación sistémica de esta proteína, ya que las células tumorales podrían incorporar y presentar péptidos de hemocianina que luego serían reconocidos por linfocitos citotóxicos específicos contra este inmunógeno.

En este contexto, la interacción de CCH, FLH y KLH con los CLRs y su consecuente internalización en las APCs, especialmente mediada por el MR, en un modelo murino no ha sido estudiada, y menos aún la posibilidad de que las hemocianinas puedan ser presentadas directamente a linfocitos T CD8+, además de activar clásicamente a los linfocitos T CD4+.

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta que las hemocianinas (CCH, FLH y KLH) son ricas en manosa, ligando natural del receptor de manosa, quien permite el tráfico de los antígenos a compartimentos que promueven su presentación a linfocitos T citotóxicos y, porque dichas hemocianinas son potentes inmunomoduladores que poseen un potente efecto antitumoral no específico, se propone la siguiente hipótesis:

La endocitosis de las hemocianinas mediada por receptores lectinas tipo C en las células presentadoras de antígenos, conduce a su presentación cruzada.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la interacción de CCH, FLH y KLH con algunos receptores lectina tipo C, especialmente con el receptor de manosa, en células presentadoras de antígeno murinas y/o humanas y la correlación de este evento con la presentación de péptidos antigénicos de dichas proteínas a linfocitos T CD8+.

4. OBJETIVO ESPECÍFICOS

- i. Evaluar y caracterizar la unión de CCH, FLH y KLH a CLR, especialmente con MR, DC-SIGN y MGL.
 - i.i Caracterizar la interacción hemocianinas con CLR.
 - i.ii Estudiar la incorporación de hemocianinas mediada por CLR en células presentadoras de antígenos.
- ii. Determinar a qué tipo de compartimento/s subcelular se destinan las hemocianinas una vez endocitadas.
- iii. Evaluar la presentación antigénica de hemocianinas por DCs a linfocitos T CD8+.

5. MATERIALES

5.1. Materiales biológicos

5.1.1. Hemocianinas

Hemocianina de los moluscos *Concholepas concholepas* (CCH) y *Fissurella latimarginata* (FLH), fueron obtenidas desde la hemolinfa, bajo condiciones estériles y libres de endotoxina y proveídas por BIOSONDA S.A (Chile) según los protocolos publicados anteriormente en De Ioannes *et al*, 2004⁷ y Arancibia *et al*, 2014⁵. En tanto KLH, la hemocianina de *Megathura crenulata*, libre de LPS fue adquirida en Calbiochem (USA).

5.1.2. Animales de experimentación

Ratones C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad fueron adquiridos en la Facultad de Odontología, Universidad de Chile y mantenidos en un área resguardada con control de acceso, entre 22-24°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, agua y alimento *ad libitum*. Los procedimientos experimentales con los animales fueron llevados a cabo de acuerdo a las normas bioéticas de FUCITED, y exigidas por CONICYT.

5.1.3. Líneas celulares

Se utilizó las líneas celulares Raw264.7 (macrófagos) y DC2.4 (células dendríticas), que corresponden a una líneas inmortalizadas de la cepa C56BL/6⁴⁸.

Transfectantes estables de CHO-MR fueron generadas usando lipofectamina (Invitrogen) y seleccionadas por la adición de 2 mg/mL de geneticina (Invitrogen).

5.1.4. Anticuerpos

Para evaluar la expresión de marcadores de superficie en células humanas se utilizaron los anticuerpos detallados en la **Tabla 1**.

Para evaluar la expresión de marcadores de superficie y de compartimentos endosomales mediante citometría de flujo y/o inmunofluorescencia indirecta en células murinas se utilizaron los anticuerpos detallados en la **Tabla 2**.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la evaluación de marcadores de superficie en células humanas mediante citometría de flujo.

Anticuerpo	Control de Isotipo correspondiente	Fabricante
HLA-DR-PC5	IgG1 Mouse Isotype Control-PC5	Beckman Coulter
CD11b-FITC	IgG1 Mouse Isotype Control-FITC	Beckman Coulter
CD3-PE CD16-PE CD206-PE (MR)	IgG1 Mouse Isotype Control-PE	Beckman Coulter
CD14-ECD	IgG2a Mouse Isotype Control-ECD	Beckman Coulter
CD209-AlexaFluor488 (DC-SIGN)	IgG1 Mouse Isotype Control-AlexaFluor488	AbDSerotec

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la evaluación de marcadores endosomales y de superficie en células murinas mediante inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo, respectivamente.

Anticuerpos primarios	Fabricante	Anticuerpos secundarios	Fabricante
Rat anti-mouse CD206, clon C068C2	Biolegend	Goat anti-rat IgG-Alexa 647	Abcam
Rat anti-mouse Dectin-2	Abcam	Goat anti-rat IgG (H+L)-Fluorescein	Thermo
Rat anti-lamp1	Abcam	Goat anti-rabbit IgG-Alexa 488	Abcam
Rabbit anti-rab7, clon EPR7589	Abcam		
Rabbit anti-rab5, clon C8B1	Cell Signaling		

5.1.5. Muestras de sangre humana

Las células dendríticas y macrófagos humanos se generaron desde células mononucleares periféricas CD14⁺ aisladas desde muestras sanguíneas (*buffy coat*) proveídas por el Servicio Nacional de Salud de Sangre y Transplante de Inglaterra, NHSBT (*National Health Service Blood and Transplant*).

La oficina principal del *NHSBT* se encuentra en Oxford, sin embargo, en este trabajo se obtuvieron las muestras de sangre desde el servicio de transfusión del *NHSBT* de Sheffield, Inglaterra.

5.1.6. Constructos recombinantes

Los receptores recombinante se obtuvieron como se indica a continuación;

CTLD4-7-Fc y **CTLD1-3-FNII-CR-Fc**: quimeras recombinantes del receptor de manosa, donde CTLD corresponden a los dominios lectina del MR, FNII corresponde al dominio fibronectina II, CR al dominio rico en cisteínas y Fc al fragmento constante de la inmunoglobulina humana. Estas proteínas fueron generadas en el laboratorio de la doctora Luisa Martínez-Pomares, mediante la transfección de células HEK293⁴⁹. Brevemente, después de cinco días de expresión, se pasó el sobrenadante del cultivo por una columna de Proteína A, donde quedaron retenidas las quimeras, que

luego fueron eluidas por pH de la columna. Finalmente, el conjunto de fracciones que contenía una mayor concentración de proteína se dializó contra PBS.

DC-SIGN-Fc: proteína recombinante humana utilizada para los estudios mediante ELISA indirecto, fue adquirida desde R&D (R&D Systems Inc, USA).

Receptor de Manosa (completo): proteína humana recombinante utilizada para los estudios en SPR, fue adquirida desde R&D.

DC-SIGN: proteína humana recombinante utilizada para los estudios en SPR, fue adquirida desde R&D.

6. METODOLOGÍA

6.1. Preparación de hemocianinas

6.1.1. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las soluciones de hemocianinas, se utilizó el reactivo Pierce 660 Protein Assay Reagent (Thermo) utilizando un estándar de BSA (Thermo), del cual se realizaron diluciones seriadas según las indicaciones del fabricante. Para esto se utilizó una placa de 96 pocillos (Corning) donde se agregaron 10 uL de muestra en conjunto con 150 uL del reactivo. La placa se agitó por 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente se leyó la absorbancia a 600 nm en un equipo 7520 Microplate Reader (Cambridge Technology Inc, USA)

6.1.2. Desglicosilación química de las hemocianinas

La desglicosilación se realizó según el protocolo de Walker⁵⁰. Brevemente, se incubó 0,5 mg/ml de CCH en una solución de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 que contenía peryodato de sodio 15 mM (concentración requerida para remover completamente los azúcares), por 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego, el exceso de peryodato se eliminó agregando 25 µL de etilenglicol puro (en exceso) por cada mL de solución de acetato de sodio y las muestras se dejaron a 4°C por toda la noche. Al día

siguiente, la solución se concentró con el sistema Amicon Ultra de 15 mL (>10K, EMD Bioscience, USA), y se lavó al menos cinco veces con 3 mL de PBS (fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) estéril preparado con agua libre de endotoxinas (Baxter, USA).

6.1.3. Hemocianinas conjugadas a fluoróforos

Para marcar las proteínas se utilizó el reactivo *NHS Ester DyLight Dye-488* o *-594* (Thermo, USA) y se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se preparó 10 mg de cada hemocianina en 1 mL de PBS 0,2 mM (estéril) y se les agregó 100 uL de bicarbonato de sodio 1M. El reactivo se resuspendió en dimetilsulfoxido (DMS, EMD Bioscience) a 10 mg/mL, y se agregó el volumen suficiente para obtener una relación molar de 1:7 entre la proteína y el fluoróforo. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, se agregó 100uL de hidroxilamina pH 8,5 para neutralizar y se incubó por 30 minutos. Posteriormente, se removió el reactivo en exceso lavando la solución de proteína al menos cinco veces con 3 mL de PBS en tubos Amicon *Ultra Free* de 15 mL (>10K, EMD Bioscience). Se rescató la solución con la proteína marcada y se centrifugó a 4500 g por 15 minutos para eliminar los agregados de proteína. Finalmente, las hemocianinas se guardaron en tubos Eppendorf autoclavados, protegidas de la luz hasta su uso.

6.2. Cultivo celular

6.2.1. Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares Raw264.7 (macrófagos) y DC2.4 (células dendríticas), se crecieron con condiciones de 10% CO₂ y temperatura regulada a 37°C, en medio DMEM alto en glucosa (GE Healthcare, USA), suplementado con penicilina (100 U/ml, Sigma-Aldrich, USA), estreptomycin (100 mg/ml, Sigma-Aldrich), L-glutamina (2 mM, Sigma-Aldrich), piruvato de sodio (GE Healthcare), aminoácidos no esenciales (GE Healthcare) y 10% de Suero fetal bovino (SFB) (GE Healthcare), medio denominado DMEM completo.

La cosecha de las células se realizó siempre después de dos lavados con PBS, e incubando con Tripsina 0,25% (GE Healthcare) por 10 minutos a 37°C. Y su expansión se realizó cosechando placas 90% confluentes, y sembrando nuevamente considerando una expansión de 1:10.

6.2.2. Cultivo primario de células dendríticas murinas desde precursores de médula ósea

Las células de médula ósea se diferenciaron a DCs según la metodología descrita por Lutz *et al*, 1999⁵¹ con modificaciones. Brevemente, se extrajo los fémures y tibias de ratones C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad, luego fueron desinfectados con etanol al 70% y lavados con PBS.

Ambos extremos de los huesos se removieron y la medula fue perfundida utilizando una jeringa con una aguja de 0,45 mm de diámetro. Para eliminar los glóbulos rojos se utilizó una solución de lisis (0,88% KCl) por 3 minutos. Las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/mL, y estimuladas con 20 ng/mL de rGM-CSF (*mouse recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, R&D System, USA) en medio DMEM alto en glucosa (GE Healthcare) suplementado con penicilina (100 U/ml, Sigma-Aldrich, USA), estreptomina (100 mg/ml, Sigma), L-glutamina (2 mM, Sigma), piruvato de sodio (Sigma-Aldrich), aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich) y 10% de Suero fetal bovino (SFB) (GE Healthcare). El medio se cambió al tercer y quinto día de cultivo; al sexto día se cosecharon las células, y se aislaron las células CD11c⁺ utilizando un ensayo inmuno-magnético (Miltenyi Biotec, Alemania).

6.2.3. Cultivo primario de macrófagos intraperitoneales murinos

Ratones C57BL/6 fueron inyectados intraperitonealmente con 1,6 mL de tioglicolato de sodio (envejecido al menos durante 3 meses) según el procedimiento descrito por Zhang *et al*, 2008⁵², y cuatro días después se sacrificaron para obtener los macrófagos intraperitoneales mediante exudación del peritoneo con 5 mL de DMEM completo. Las células peritoneales se centrifugaron a 400 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y los glóbulos rojos se eliminaron agregando una solución de lisis (0,88% KCl) por 3 minutos. Posteriormente se lavó con medio completo y

se contó el número de células, para sembrar 500.000 células/pozo en placas de 24 pocillos. Una hora después de sembradas, se eliminaron las células no adherentes lavando con tampón fosfato salino (PBS, fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2) estéril y las células que quedaron adheridas a la placa se consideraron como macrófagos intraperitoneales⁵².

6.2.4. Cultivo primario de células dendríticas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas

Muestras de sangre obtenidas de donantes humanos se diluyeron 1:1 en PBS, y transfirió a un tubo de 50 mL (Falcon, USA) que contenía 15 mL de Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) para centrifugarlo a 800g por 30 minutos. Las células mononucleares de sangre periférica presentes en la capa (anillo) entre las dos fases, se transfirieron con una pipeta de 10 mL a otro tubo, y se lavaron con 50 mL de PBS tres veces, centrifugando a 300g por 10 minutos cada vez. Después del tercer lavado, se contó el número total de células y se volvió a centrifugar a 350g por 5 minutos, luego fueron resuspendidas en 80 μ L de tampón MACS (PBS, 0,5% SFB, 2mM EDTA) por 10^8 células y agregar 10 μ L de esferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por 10^7 células. Se incubó con las esferas por 15 minutos a 4°C, se agregó 20 mL de tampón MACS y se centrifugó a 350g por 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en 3 mL de tampón MACS y se aplicó a una columna magnética (Miltenyi Biotec, LS). Se lavó dos veces con 3 mL de tampón MACS y se retiró la columna del imán, eluyendo las células adheridas con 5 mL de tampón MACS. Las células se

contaron y lavaron con 20 mL medio (RPMI-1640, 15% Suero humano AB, 2mM L-glutamina, 10mM HEPES, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL Estreptomicina). Finalmente, se sembraron 700.000 células en 1 mL de medio en placas de 24 pocillos de baja adherencia (Corning, USA), agregando hGM-CSF 50 ng/mL para obtener macrófagos o hGM-CSF 50 ng/mL y IL-4 25 ng/mL para obtener células dendríticas. El medio se cambió cada dos días, y al séptimo día se cosecharon las células en hielo por pipeteo y se utilizaron para los ensayos de incorporación o para analizar los marcadores de superficie por citometría de flujo.

6.3. Ensayos inmunoquímicos

6.3.1. Unión de hemocianinas a receptores lectina tipo-C por ELISA indirecto

Según lo publicado anteriormente por Royer *et al*, 2010⁵³, se activaron los pocillos de una placa de 96-pocillos (Maxisorp, fondo plano, Nunc, UK) con los distintos ligandos (hemocianinas a 10 µg/mL y azúcares a 5 µg/mL) durante toda la noche a 4°C. Después, se lavó tres veces con TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM Ca²⁺, 154 mM NaCl y 0,05% (p/v) Tween 20) y se incubó por 2 horas con los diferentes constructos recombinantes (CTLD4-7-Fc, CR-FNII-CTLD1-3-Fc, DC-SIGN-Fc) en TBS a temperatura ambiente. Luego, se lavó tres veces con TBS y se determinó la unión de los receptores incubando con un anticuerpo anti IgG humana conjugado con fosfatasa

alcalina (FA; Sigma-Aldrich, 1:1.000) por 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó dos veces con TBS y dos con tampón AP (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O pH 9,5), se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich) en tampón AP para el revelado y 30 min después se leyó la absorbancia a 405 nm. Como control positivo se activó la placa con Manosa-Poliacrilamida (Man-PAA) para CTLD4-7 y DC-SIGN, y Galactosa sulfatada-Poliacrilamida (Gal-SO₄-PAA) para CR-FNII-CTLD1-3. Como control negativo de la técnica se incubó el anticuerpo secundario sobre la placa activada (sin los constructos), y como control negativo experimental se activó la placa con Galactosa-Poliacrilamida (Gal-PAA) ya que no se une a ninguno de los receptores evaluados.

6.3.2. Análisis de la unión de hemocianinas a receptores mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR, *Surface Plasmon Resonance*)

El análisis usando un sistema multicanal de SPR (MC-SRP) se realizó en un equipo Biorad ProteOn XPR36 SPR biosensor (Biorad, USA) perteneciente al laboratorio del doctor Daniel Mitchell (Clinical Sciences Research Institute, Warwick Medical School, University of Warwick, Reino Unido). De acuerdo a lo descrito^{27,54}, proteínas recombinantes (MR, CTLD4-7, DC-SIGN, MGL o BSA) fueron inmovilizadas en canales discretos dentro de un *sensor chip* GMC (Biorad) por acoplamiento de aminas primarias. Los analitos (CCH, FLH, KLH, Man-BSA, Gal-BSA, o las hemocianinas oxidadas)

fueron preparados en tampón de unión (225 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0,01% Tween-20) en un rango de concentración entre 1 a $4,9 \times 10^{-5}$ mg/mL y fluyeron sobre los receptores ya inmovilizados, a un flujo de 25 μ L/min por 300 segundos a 25°C. La regeneración del chip fue realizada agregando 10 mM EDTA al tampón de unión. Como control positivo se utilizó un ligando conocido de los receptores (Manosa-BSA o Galactosa-BSA para MR, DC-SIGN o MGL, respectivamente).

Los parámetros cinéticos fueron obtenidos ajustando las curvas al modelo de Langmuir 1:1, utilizando el software TraceDrawer para calcular la K_D aparente (ajuste global). Para realizar los ajustes, se consideró el peso molecular de las hemocianinas como 4 MDa (decámero) y no 8MDa (di-decámero), debido a que hemos observado por microscopia electrónica que estas proteínas no se encuentran en su totalidad en un estado di-decamérico, más bien es posible observar decámeros e incluso estructuras de menor tamaño.

6.4. Ensayos de incorporación *in vitro* de hemocianinas fluorescentes en diferentes tipos celulares

6.4.1. Incorporación de hemocianinas en células CHO

Células CHO y CHO-MR (previamente transfectadas de manera permante con el receptor de manosa) fueron sembradas en una placa de 24 pocillos (Nunc) a una densidad de 250.000 células/pocillo en DMEM/F12 (agregando 0,6 mg/mL de geneticina para las células CHO-MR) y cultivadas toda la noche. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se agregó 500uL de opti-MEM (GE Healthcare) a cada pocillo por 30 minutos a 37°C. Ese medio fue descartado y se agregó 500 uL de cada ligando marcado con un fluoróforo (CCH, FLH, KLH, OVA -Alexa488) por 1 hora a 37°C en oscuridad. Después, se lavó cada pocillo dos veces con PBS y se cosecharon las células con tripsina/EDTA diluida 1:1 con PBS. Finalmente, la suspensión de células se transfirió a un tubo de citometría que contenía 200 uL de Paraformaldehído (PFA) 4% p/v. Las muestras se guardaron en oscuridad a 4°C hasta que fueron adquiridas en un citómetro FC 500 MPL Flow Cytometry System (Beckman Coulter, USA), Laboratorio de Alergia, Universidad de Nottingham, dirigido por la Dra. Luisa Martínez-Pomares.

6.4.2. Incorporación de hemocianina en APCs murinas

Se siguió el protocolo realizado por Arancibia y cols.⁴², con pequeñas modificaciones; se sembraron 3×10^5 células (DC 2.4, BMDCs o Macrófagos intraperitoneales) en 1 mL de medio completo por pozo, en placas de 24 pocillos (Nunc) y se cultivaron 24 horas previamente a los ensayos. Para determinar la concentración de hemocianina a utilizar, se realizó una curva de dosis respuesta agregando las hemocianinas en estudio en concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 1 hora a 37°C y 10% de CO_2 en medio completo, sin suero. Para inhibir la incorporación de hemocianina se pre-incubaron las células durante 30 minutos con D-Manosa 10-200mM, D-Galactosa 10-200mM, EDTA 10mM. Como control se utilizaron células sin estimular. Las células tratadas fueron recolectadas desde cada pozo de cultivo con una solución PBS-EDTA (10 mM), se centrifugaron 500 g por 5 min y luego se resuspendió el *pellet* en PBS-SFB 2%. Cuando correspondió, se incubó con el anticuerpo de interés por 45 minutos a 4°C en oscuridad. Luego las células se centrifugaron dos veces a 500 g por 5 min y se lavó el *pellet* con PBS-SFB al 2%. Para fijar las células, se agregó PBS-p-formaldehído (PFA) al 4% a temperatura ambiente y en oscuridad por 30 minutos; posteriormente, se centrifugó para eliminar el PFA y se resuspendió las células en PBS-SFB2%, y se analizaron mediante citometría de flujo (FACSort de BectonDickinson, USA), Servicio de Citometría de Flujo, dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

6.4.3 Evaluación de marcadores de superficie de APCs por citometría de flujo

Se cosecharon las células a utilizar (BMDC, DC2.4, macrófagos intraperitoneales, macrófagos o DCs humanas) y se contaron, para obtener el número total de células a ocupar (200.000 células por condición). Trabajando en hielo, se agregó PBS, SFB 2%, suero de ratón 5% por 45 minutos para bloquear los receptores Fc presentes en las células inmunes, y se centrifugaron a 350 g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y se ajustó el número de células para obtener las 200.000 células en 50 µL de PBS-SFB 2%. Luego, se transfirieron a una placa de 96 pocillos con fondo V (Corning), donde se les agregó el anticuerpo anti-marcador de superficie marcado con fluorescencia (véase **Tabla 1** y **Tabla 2** con anticuerpos utilizados) y se incubó en oscuridad por 1 hora a 4°C. Posteriormente, se lavó con 200 µL de PBS-SFB 2% dos veces, centrifugando a 35 g por 5 minutos cada vez. Finalmente, se transfirieron las células en 200 µL de PBS-SFB 2% a tubos de citometría que contenían 200 µL de Paraformaldehído 2%.

6.4.4. Ensayos de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal

Se sembraron 20.000 células (DC2.4, BMDCs o Macrófagos Intraperitoneales) en portaobjetos para inmunofluorescencia (*chamber-slide* de 8 pocillos, Thermo) en 200 uL, el día anterior al ensayo. Previo a la fijación,

las células se incubaron con las hemocianinas fluorescentes a 10 µg/mL por 1 o 24 horas. La fijación se realizó con PFA 4% (p/v) por 20 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se lavó tres veces con PBS. Seguido a esto, se incubó las células por 20 minutos en solución de permeabilización (PBS-SFB 2%-Tritón-X100 0,3%), y se bloqueó con líquido ascítico enriquecido en IgG, del hibridoma de ratón anti-GZ 2H6-H12⁵⁵ al 5% en solución de permeabilización por 1 hora a temperatura ambiente. Inmediatamente después, se agregó el anticuerpo primario (ver **Tabla 2**, marcador de compartimento endocítico) según la dilución correspondiente en solución de permeabilización por toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavó con PBS tres veces y se incubó con el anticuerpo secundario anti-especie en solución de permeabilización por 2 hora a temperatura ambiente. Se lavó con PBS y se agregó DAPI (Thermo, 1:1.000) por 5 minutos. Finalmente, se agregó una gota de medio de montaje DABCO (1,4-diazobis(2,2,2-octano 10%, NaN₃ 0,04%, Glicerol 90% en PBS 10%, pH 7,2) por pocillo y se colocó un cubreobjetos. Para determinar la autofluorescencia se agregó una condición sin anticuerpos ni marcas, y como control se utilizó siempre una condición solo con el anticuerpo secundario, para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo marcado. Los portaobjetos se mantuvieron a 4°C hasta que se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal Nikon, Servicio de Microscopía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Las imágenes fueron procesadas utilizando el programa 'ImageJ' y el *plugin* 'Iterative deconvolve 3D' para la deconvolución. Para la cuantificación de la colocalización se utilizó el *plugin* 'Colocalization Threshold', el cual se aplicó a células individuales

positivas para las hemocianinas (canal rojo) en cada condición y que permitió obtener los coeficientes de correlación tM1 y tM2 (coeficiente de Manders para el canal 1 y canal 2 que se calcula considerando un umbral de intensidad de fluorescencia para cada canal). Todas las imágenes fueron obtenidas y procesadas bajo los mismos parámetros y criterios.

6.4.5 Incorporación de hemocianina en células tumorales

Se siguió el protocolo realizado por Arancibia y cols.⁴², con pequeñas modificaciones; se sembraron 3×10^5 células tumorales (MOC7, MB49 o B16F10) en 1 mL de medio completo por pozo, en placas de 24 pocillos (Nunc) y se cultivaron 24 horas previamente a los ensayos. El día del experimento, las células se incubaron con diferentes concentraciones de hemocianina fluorescente (0,01 – 1 mg/mL) por 1 hora a 37°C y 10% de CO₂ en medio completo, sin suero. Posteriormente las células fueron cosechadas con tripsina 0,25%, lavadas con PBS-SFB 2%, y guardadas en PBS-SFB 2%-PFA 0,5% en oscuridad, hasta ser analizadas mediante citometría de flujo (FACSort de Becton Dickinson, USA), Servicio de Citometría de Flujo, dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

6.5. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados, los experimentos fueron realizados al menos 3 veces en forma independiente y con los controles apropiados para cada caso, se utilizó la prueba ANOVA de una o dos vías dependiendo de si se debía analizar dentro de un mismo grupo o entre diferentes grupos, respectivamente, y el programa computacional GraphPad Prism 5.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de la unión de hemocianinas a CLRs

7.1.1. Las hemocianinas interactúan con el dominio lectina (CTL4-7) del MR y con DC-SIGN de una manera dosis-dependiente y se requiere la presencia de sus oligosacáridos

Debido al alto contenido de azúcares de las hemocianinas y, especialmente de manosa⁵, se evaluó si interactuaban *in vitro* con los receptores lectina tipo-C: el receptor de manosa y DC-SIGN humanos recombinantes. Este último se incorporó porque nos permitió establecer similitudes y diferencias entre las hemocianinas con un panel más amplio de CLR. Para esto se realizó un ensayo de unión a dichos receptores mediante un ELISA indirecto, tal como se ha publicado anteriormente⁵³. Brevemente, se activó las placas de multipozos con los diferentes ligandos (proteínas a 10 µg/mL, y los azúcares a 5 µg/mL), posteriormente se incubó con los diferentes receptores recombinantes, los cuales tienen incorporado un fragmento Fc de una inmunoglobulina de tipo G humana (IgG)⁵³ y finalmente, se reveló con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado a fosfatasa alcalina. Los receptores recombinantes fueron CTL4-7; una quimera que contiene los últimos cuatro dominios lectina del MR, siendo el número 4 el dominio funcional de dicho receptor; CR-FNII-CTL1-3 que contiene el dominio rico en cisteínas, el dominio fibronectina II y los primeros tres dominios lectina del MR (**Figura 6A**).

Estas dos quimeras permitieron determinar con qué dominio del MR interactúan las hemocianinas. Además, se evaluó DC-SIGN-Fc, que corresponde al receptor humano recombinante, tetramerizado y que también tiene un fragmento Fc humano incorporado (**Figura 6B**).

En la **Figura 7** se muestra el resultado de estos experimentos, donde la absorbancia a 405 nm refleja la unión de los receptores a los distintos ligandos. Se observa que **todas las hemocianinas**, así como los controles positivos ovoalbúmina (OVA) y Manosa-poliacrilamida (Man-PAA), **se unen tanto a CTLD4-7** (en verde) como **DC-SIGN** (en azul). La diferencia en los valores de absorbancia entre las hemocianinas sugiere diferentes afinidades de las hemocianinas a los diferentes receptores, factor que se evaluó con mayor sensibilidad más adelante. Al comparar la unión de las hemocianinas a las dos quimeras que contienen dominios del MR, se observa unión solo a CTLD4-7 y no a CR-FNII-CTLD1-3 (en rojo) como sí lo hace el control positivo para este dominio (SO4-Gal-PAA), sugiriendo que la interacción con este receptor está mediada por el dominio lectina 4 (dominio funcional) y no por el dominio CR ni FNII, de acuerdo a como se esperaba. Por otro lado, al observar las hemocianinas desglicosiladas (CCHox, FLHox y KLHox) por un método químico que oxida los azúcares con peryodato de Sodio⁵⁰, no se ve un aumento de la absorbancia con ninguno de los receptores evaluados, por lo que se concluye que por este método no hay unión de las hemocianinas desglicosiladas a los CLR.

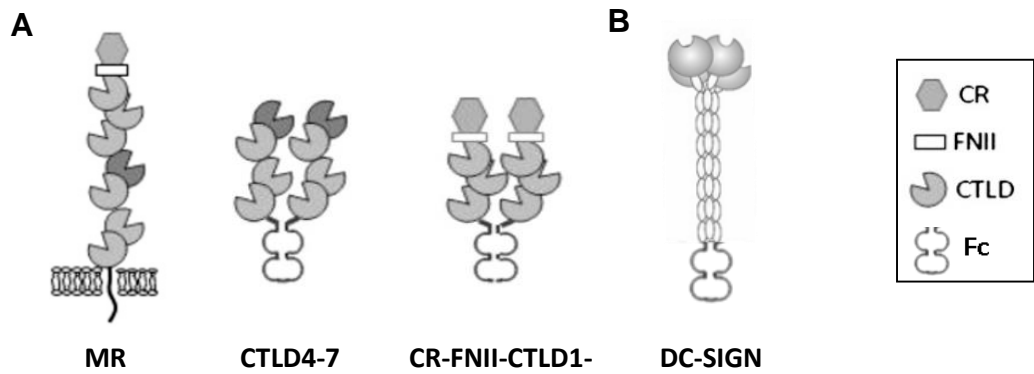


Figura 6. Receptores lectinas tipo C recombinantes. Esquema de los diferentes receptores que se utilizaron en los experimentos de ELISA indirecto para determinar la unión a hemocianinas. A la derecha, en el recuadro, se muestra a que dominio corresponde cada figura. **(A)** Receptor de Manosa unido a membrana y sus respectivas quimeras recombinantes (CTL4-7 y CR-FNII-CTL1-3) conteniendo un dominio Fc humano. **(B)** DC-SIGN recombinante conteniendo un dominio Fc humano. Modificada de Royer et al, 2010⁵³.

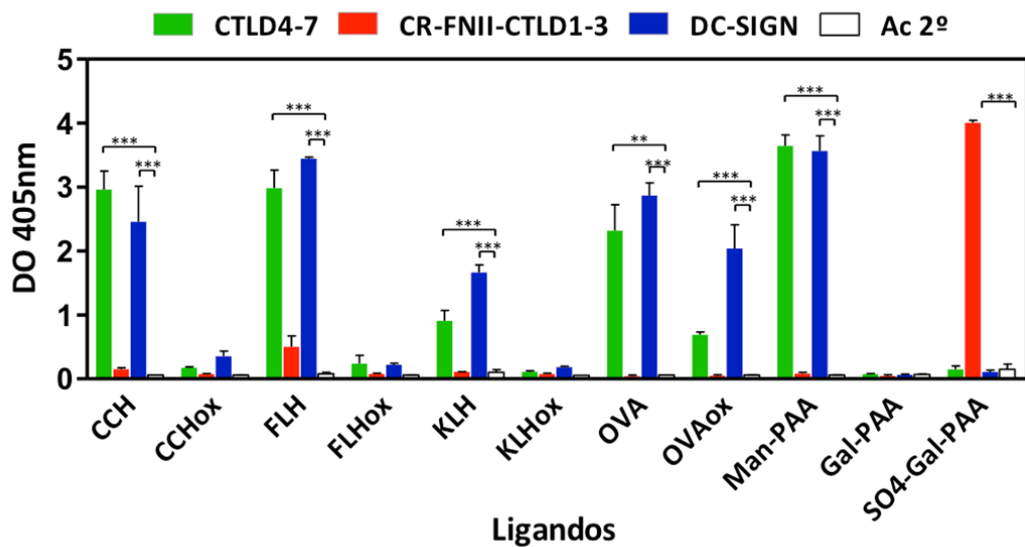


Figura 7. La unión las hemocianinas a los CLR MR y DC-SIGN es dependiente de los azúcares presentes en su estructura. Ensayo de unión tipo ELISA indirecto, utilizando dos quimeras recombinantes del MR (CTLD4-7 en verde y CR-FNII-CTLD1-3 en rojo) a 10 µg/mL y DC-SIGN (en azul) a 5 µg/mL, todos conjugados a un fragmento Fc de una IgG humana. En el eje X se encuentran los diferentes ligandos con los que se activó la placa: las Hcs (CCH, FLH y KLH), y sus respectivas formas deglicosiladas (CCHox, FLHox y KLHox), además de OVA, Manosa (Man-PAA) y Galactosa sulfatada (SO4-Gal-PAA) como controles positivos y, OVA deglicosilada (OVAox) y Galactosa (Gal-PAA) como controles negativos. Todas las proteínas se usaron a 10 ug/mL y los azúcares a 5 µg/mL. En blanco se muestra el control, incubando solo con el antisuero anti-FC. Para la estadística se realizó una ANOVA de dos vías, y se comparó con el valor obtenido solo con el anticuerpo secundario, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. Las barras corresponden a la media de tres experimentos independientes ± SEM (error estándar de la media).

Aunque si hubo unión de OVAox a CTLD4-7 y DC-SIGN, esta fue menor que la de la OVA nativa a estos receptores. Como control negativo de la técnica se incluyó la incubación con el anticuerpo secundario anti-Fc (en blanco) y los resultados fueron negativos en todos los casos.

Finalmente, se realizó un ensayo dosis respuesta activando la placa con concentraciones crecientes de cada una de las hemocianinas (0,2 a 20 µg/mL) y se evaluó la unión a CTLD4-7 y DC-SIGN a una concentración constante de 2 µg/mL. Aquí se observó que todas las proteínas se comportaron de manera distinta, como se ilustra en la **Figura 8**, siendo FLH (■) la que mostró una unión mayor tanto a MR como a DC-SIGN, ya que en la saturación alcanzó en torno a 3 UA (unidades de absorbancia) con ambos receptores, en contraste con CCH (▲) y KLH (Δ) que alcanzaron en torno a 1 UA, similar a OVA (□), usada como control positivo.

7.1.2. La unión de las hemocianinas al MR y DC-SIGN es específica

Para determinar la especificidad de la unión de las hemocianinas al MR y DC-SIGN, se realizó un ensayo de competencia, utilizando como base un ensayo similar al anterior⁵³, pero en que se pre-incubaron los receptores con concentraciones crecientes de D-Manosa, el ligando natural del MR y DC-SIGN, además con D-Galactosa, un azúcar que no se une a estos receptores y que sirve como control de especificidad de la inhibición. En la **Figura 9** se presentan los resultados, en que se graficó la unión a los CLRs (eje Y) en

función de la concentración de azúcar con que se pre-incubó el receptor (eje X). Se observa que la unión de todas las proteínas a CTLD4-7 disminuye a un nivel cercano a 0 ante la presencia de 5 mM de D-Manosa, lo que no ocurre en presencia de D-Galactosa (**Figura 9**, gráficos superiores), confirmando la especificidad de la interacción entre las hemocianinas y los CLR's evaluados. Por otro lado, la inhibición de la unión de las hemocianinas con DC-SIGN es gradual (**Figura 9**, gráfico inferior izquierdo), alcanzándose el máximo de inhibición después de los 20 mM de D-Manosa, en contraste con D-Galactosa (**Figura 9**, gráfico inferior derecho).

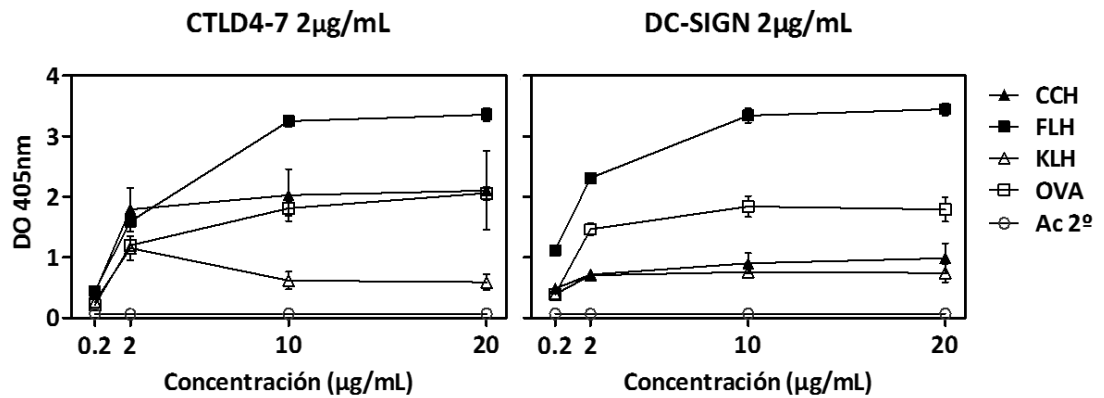


Figura 8. La unión de hemocianinas a CTLD4-7 y DC-SIGN muestra un comportamiento dosis-respuesta. Ensayo de unión donde se activó la placa multipozos con concentraciones crecientes de cada hemocianina y ovoalbúmina (CCH ▲, FLH ■, KLH △ y OVA □ de 0,2 a 10 µg/mL), y posteriormente se incubó con los CLR_s (MR a la izquierda y DC-SIGN a la derecha) a una concentración constante de 2 µg/mL. Como control negativo de la técnica se utilizó la incubación solo con el anticuerpo secundario (○). La absorbancia a 405nm indica la unión de los receptores a los ligandos. Los resultados corresponden a la media de tres experimentos independientes ± SEM.

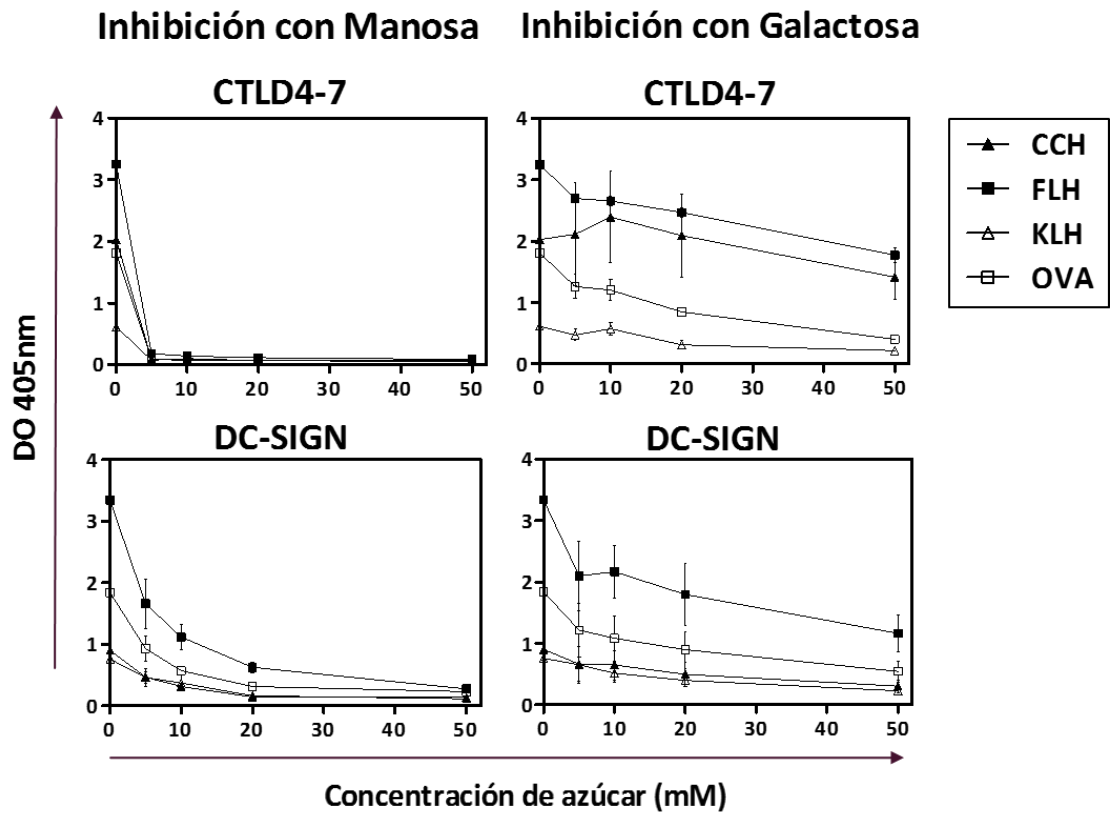


Figura 9. La unión de las hemocianinas a CTLD4-7 y DC-SIGN es específica. Ensayo de inhibición de la unión de hemocianinas a los CLR's mediante un ELISA indirecto. Se pre-incubó los receptores CTLD4-7 (gráficos superiores) y DC-SIGN-Fc (gráficos inferiores) a 2 µg/mL, con concentraciones crecientes (entre 0 y 50 mM de D-Manosa o D-Galactosa), y posteriormente, se realizó el ensayo de unión en placas multipozos activadas con las proteínas CCH▲, FLH■, KLH△ y OVA□ a 10 µg/mL. La absorbancia a 405 nm refleja la unión de los receptores a los distintos ligandos. Los resultados corresponden a la media de dos experimentos independientes ± SEM.

7.1.3. Las hemocianinas presentan diferentes constantes de unión aparentes a MR y DC-SIGN

Para caracterizar de una manera más precisa y sensible la interacción de las hemocianinas y los CLR, se utilizó la técnica de MC-SPR (análisis por resonancia de plasmones superficiales multi-canal) la cual permite obtener la velocidad de unión y disociación de varios ligandos y receptores a la vez. En esta determinación se evaluó la unión de las hemocianinas nativas y desglicosiladas a los CLR en estudio, utilizando un Biosensor SPR Biorad ProteOn XPR36 (Biorad, USA).

Este equipo posee un sistema multi-canal que permite realizar análisis de varios analitos y ligandos al mismo tiempo, por lo que se funcionalizó un *chip* Biacore Sensor Chip GLC con: MR (receptor completo), CTLD4-7-Fc, DC-SIGN, MGL y BSA como canal de referencia, según los protocolos publicados anteriormente^{27,54}. A continuación, se realizó un barrido de concentraciones de Manosa-BSA y Galactosa-BSA para confirmar la presencia de los receptores en el *chip*. Los sensorgramas que se obtuvieron se muestran en la **Figura 10**, donde se observa que los canales funcionalizados con MR, CTLD4-7 y DC-SIGN se unen a Manosa-BSA y no a Galactosa-BSA, mientras que el funcionalizado con MGL se une a Galactosa-BSA y no a Manosa-BSA, confirmándose la funcionalización de los canales y la especificidad de los receptores acoplados al *chip*.

Luego, para evaluar la unión de las hemocianinas se realizó un barrido de 18 concentraciones en un rango entre 390 pM y 250 nM con las tres hemocianinas nativas. Todas las curvas de unión obtenidas se muestran en la **Figura 11**, donde se observa que CCH no se unió a MGL, receptor que reconoce galactosa o N-acetilgalactosamina, al contrario de FLH y KLH que si se unieron a este receptor. Por otro lado, se destaca la alta capacidad de unión de las hemocianinas a DC-SIGN, debido a que con las concentraciones más altas se saturó el receptor (no aumentan las RU aunque aumente la concentración de hemocianina).

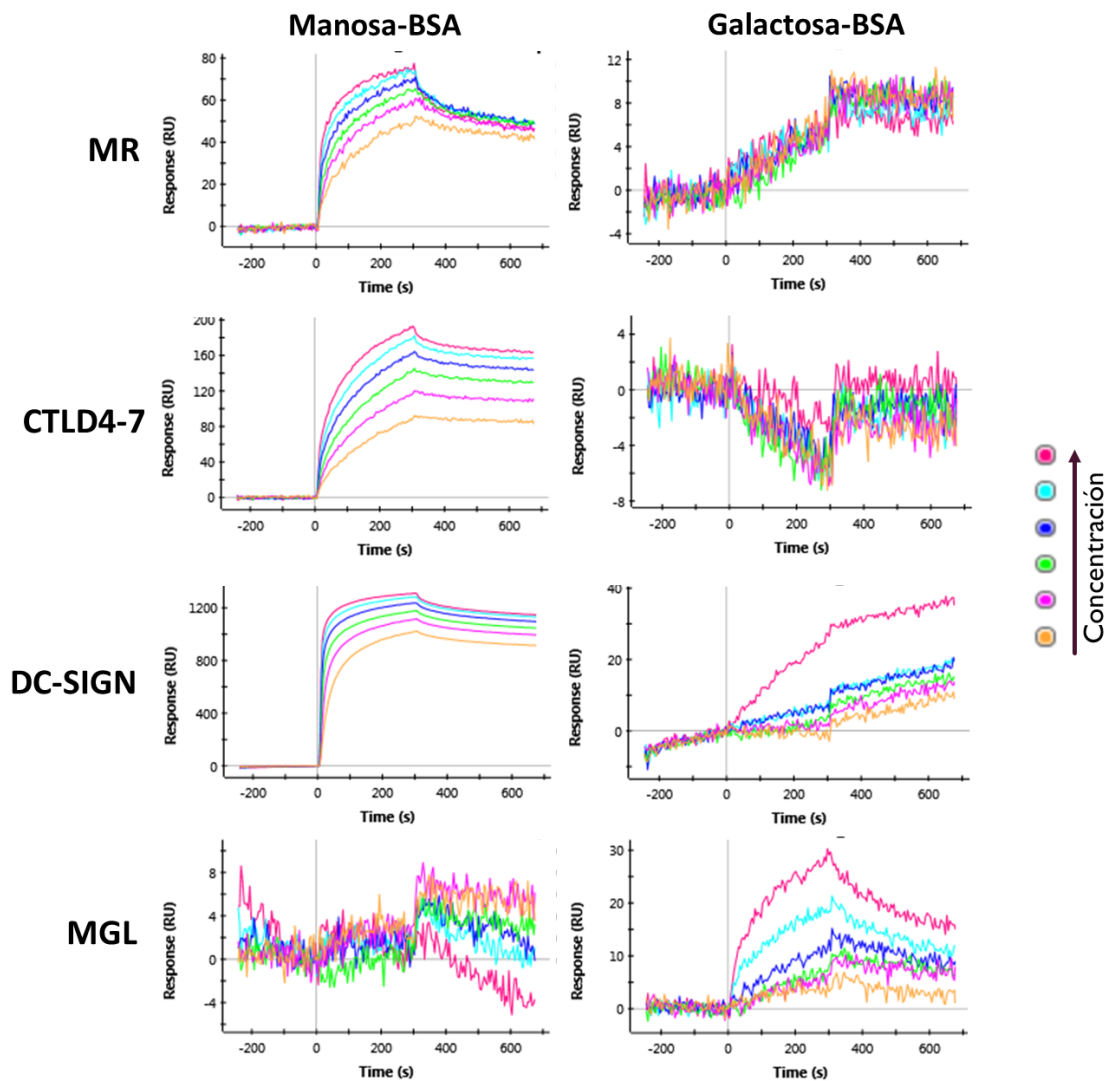


Figura 10. Sensorgramas de unión de controles positivos y negativos al chip funcionalizado con MR, CTLD4-7, DC-SIGN y MGL. Curvas de unión de Manosa-BSA (para MR, CTLD4-7 y DC-SIGN) y Galactosa-BSA (para MGL), obtenidas por MC-SPR. Al tiempo= 0 segundos se inyectaron los ligandos a un flujo de 25 μ L/min durante 300 segundos (fase de asociación), luego se observa la fase de disociación por 400 segundos. Equipo SPR Biorad ProteOn XPR36.

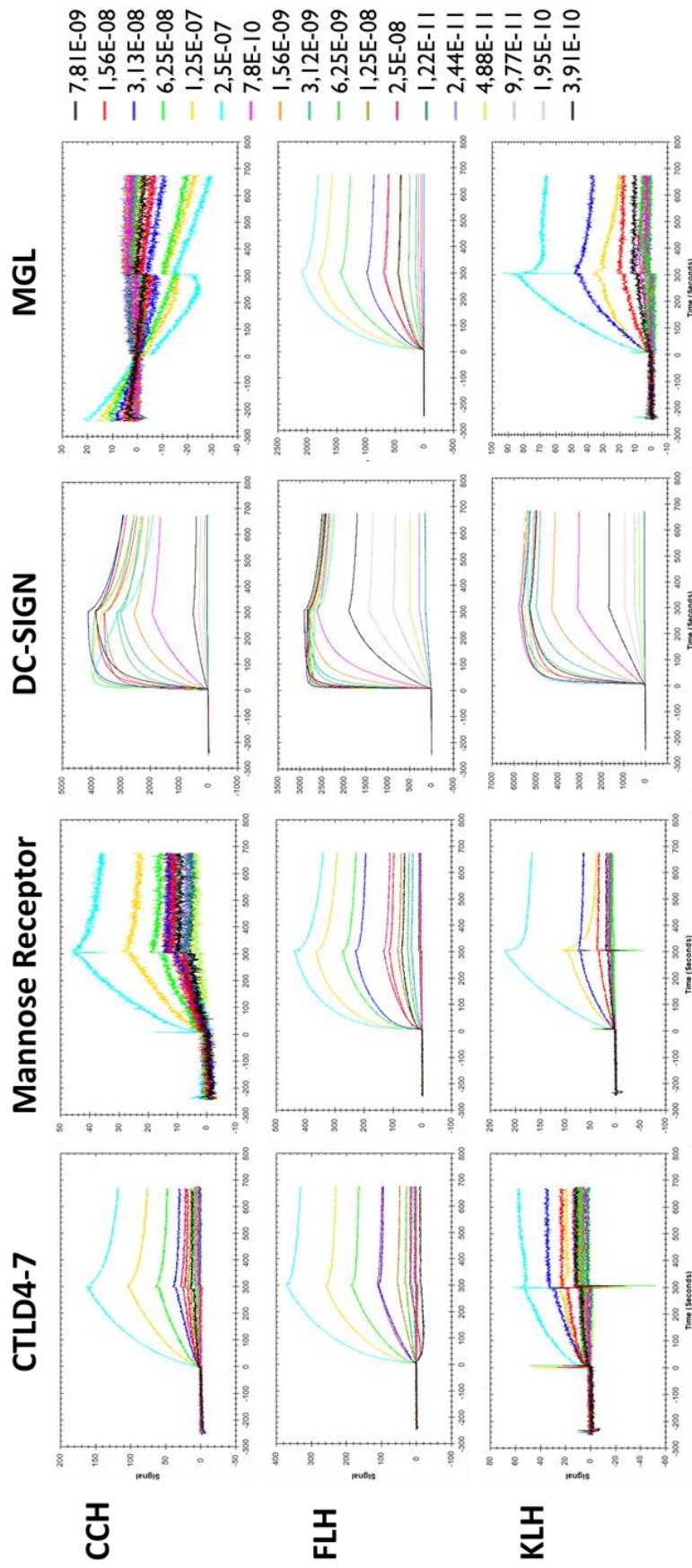


Figura 11. Sensorgramas de la unión de hemocianinas a CTLD4-7, MR, DC-SIGN o MGL obtenidos por MC-SPR. Curvas de unión obtenidas por resonancia de plasmones superficiales, en un equipo a Biorad ProteOn XPR36 (Biorad, Hercules CA). Cada gráfico muestra las Unidades de Respuesta (RU) en función del tiempo de contacto, donde cada color representa una concentración de ligando distinta (indicada a la derecha de los gráficos). Se utilizó un flujo de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$ y un tiempo de contacto de 300s. El canal de referencia fue funcionalizado con BSA. Equipo SPR Biorad ProteOn XPR36.

Para obtener los parámetros cinéticos se ajustaron las curvas de unión obtenidas para cada hemocianina con cada receptor, al modelo de adsorción de Langmuir²⁷. Este modelo considera una estequiometría de reacción de 1:1, es decir, se considera que cada receptor posee solo un sitio de unión al ligando, y que cada ligando se unirá solo a un receptor, por lo que es recomendable usar concentraciones bajas de ligando y receptor, donde no existan problemas estéricos que permitan a un mismo ligando interactuar con dos receptores o viceversa. Es por esto que no todas las curvas obtenidas se utilizaron para realizar el ajuste, y este se realizó solo con las de más baja concentración y sin llegar a la saturación. En la **Figura 12** se muestran las curvas experimentales que se utilizaron, así como las curvas teóricas y parámetros estadísticos como los residuales y χ^2 , derivados del ajuste cinético. Esto permitió obtener las constantes de la velocidad de asociación k_a y disociación k_d y la constante de unión K_D aparentes, las cuales se detallan en la **Tabla 3**. Al analizar los parámetros obtenidos, se observa que CCH y KLH poseen constantes de disociación con el MR del mismo orden de magnitud que el control positivo Man-BSA (de -9 órdenes de magnitud). Sin embargo, FLH posee una K_D menor que las otras dos hemocianinas, de un orden de 10^{-10} , sugiriendo una mayor afinidad al receptor. Por otro lado, las constantes de las hemocianinas a CTLD4-7 (dominios lectina del 4 al 7 del MR) son distintas a las obtenidas con el MR, y en este caso, es KLH la que posee mayor afinidad, con una constante en el orden de 10^{-12} M.

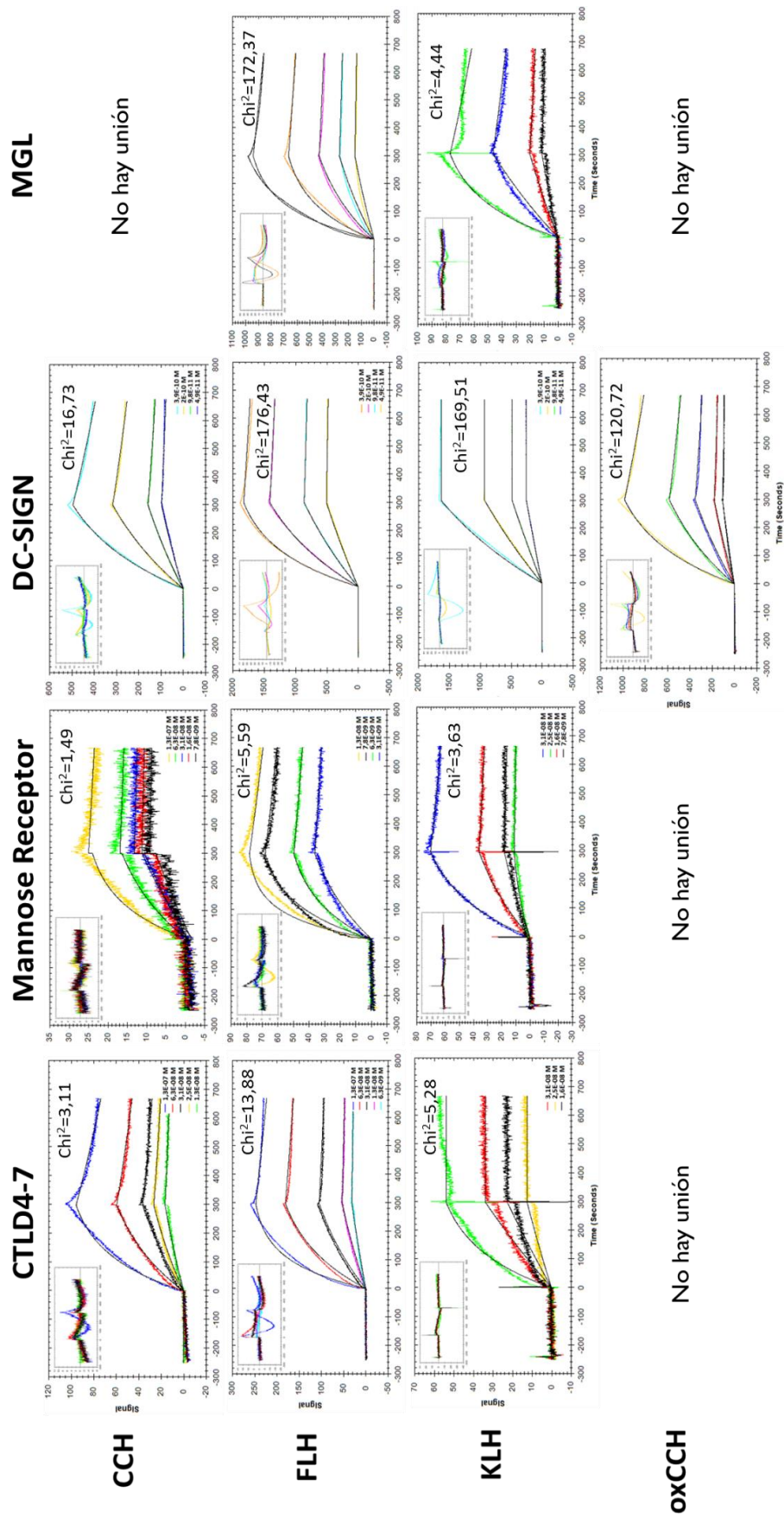


Figura 12. Ajustes al modelo de Langmuir 1:1 para la obtención de parámetros cinéticos (Tabla 3) de las curvas de unión obtenidas por MC-SPR de la unión de hemocianinas a CTLD4-7, MR, DC-SIGN y MGL. Sensorgramas obtenidos por MC-SPR, en que cada gráfico muestra las unidades de respuesta (RU) en función del tiempo de contacto. En color se muestran las curvas experimentales y en negro las curvas teóricas, según el modelo de Langmuir. El inserto de la esquina superior izquierda indica los valores residuales del ajuste, y el valor estadístico χ^2 se indica en la esquina superior derecha.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la interacción de las hemocianinas con los CLRrs, determinados mediante SPR. Constante de unión K_D , constante de velocidad de asociación k_a y constante de disociación k_d aparentes de las hemocianinas a los receptores CTLD4-7, MR, DC-SIGN y MGL calculadas a partir de ajustes cinéticos utilizando el modelo 1:1 de Langmuir, detallado en la Figura 12. Espacios en blanco indican constantes que no se calcularon por la baja reproducibilidad de las curvas. Las líneas punteadas indican que no hubo unión.

	DC-SIGN			MR			CTLD4-7			MGL		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
Man-BSA	2,25x10 ⁺⁵	3,96x10 ⁻⁴	1,76x10 ⁻⁹	6,22x10 ⁺⁴	8,75x10 ⁻⁴	1,41x10 ⁻⁹						
CCH	1,01x10 ⁺⁷	6,13x10 ⁻⁴	6,08x10 ⁻¹¹	5,86x10 ⁻⁴	1,69x10 ⁻⁴	2,88x10 ⁻⁹	5,32x10 ⁺⁴	7,06x10 ⁻⁴	1,33x10 ⁻⁸	----	----	----
FLH	1,75x10 ⁺⁷	1,57x10 ⁻⁴	8,97x10 ⁻¹²	1,02x10 ⁺⁶	3,16x10 ⁻⁴	3,09x10 ⁻¹⁰	8,29x10 ⁺⁴	2,82x10 ⁻⁴	3,40x10 ⁻⁹	2,87x10 ⁺⁵	2,43x10 ⁻⁴	8,48x10 ⁻¹⁰
KLH	6,14x10 ⁺⁶	2,46x10 ⁻⁷	4,01x10 ⁻¹⁴	1,77x10 ⁺⁵	2,99x10 ⁻⁴	1,69x10 ⁻⁹	2,63x10 ⁺⁴	6,93x10 ⁻⁸	2,64x10 ⁻¹²	2,55x10 ⁺⁴	5,97x10 ⁻⁴	2,34x10 ⁻⁸
CCHox	4,16x10 ⁺⁵	5,2x10 ⁻⁴	1,25x10 ⁻⁹	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Por otro lado, la unión de FLH y KLH a MGL también presentó diferencias, con constantes de afinidad del orden de 10^{-10} y 10^{-8} , respectivamente. Al analizar el comportamiento con DC-SIGN, se observa que las k_a , k_d y K_D son distintas para cada ligando, dentro de esto destaca la K_D de KLH con DC-SIGN (10^{-14} M), significativamente menor que la de FLH (10^{-12} M) y CCH (10^{-11} M), sugiriendo una mayor afinidad de KLH por DC-SIGN.

Posteriormente, se evaluó la unión de las hemocianinas desglucosiladas por un método químico a los CLRs en estudio, en un rango de concentración entre 0,75 a 25 nM. Los sensorgramas obtenidos se muestran en la **Figura 13**, donde se observa la pérdida de la unión de las hemocianinas a los CLRs, confirmando que la interacción entre estas proteínas y los receptores MR, DC-SIGN y MGL depende de los azúcares presentes en las hemocianinas. Sin embargo, CCHox fue capaz de interactuar con DC-SIGN, presentando una K_D de $1,2 \times 10^{-9}$ M, en comparación con CCH nativa que presentó una K_D de $1,8 \times 10^{-11}$ (**Tabla 3**), evidenciando una disminución de la afinidad al receptor.

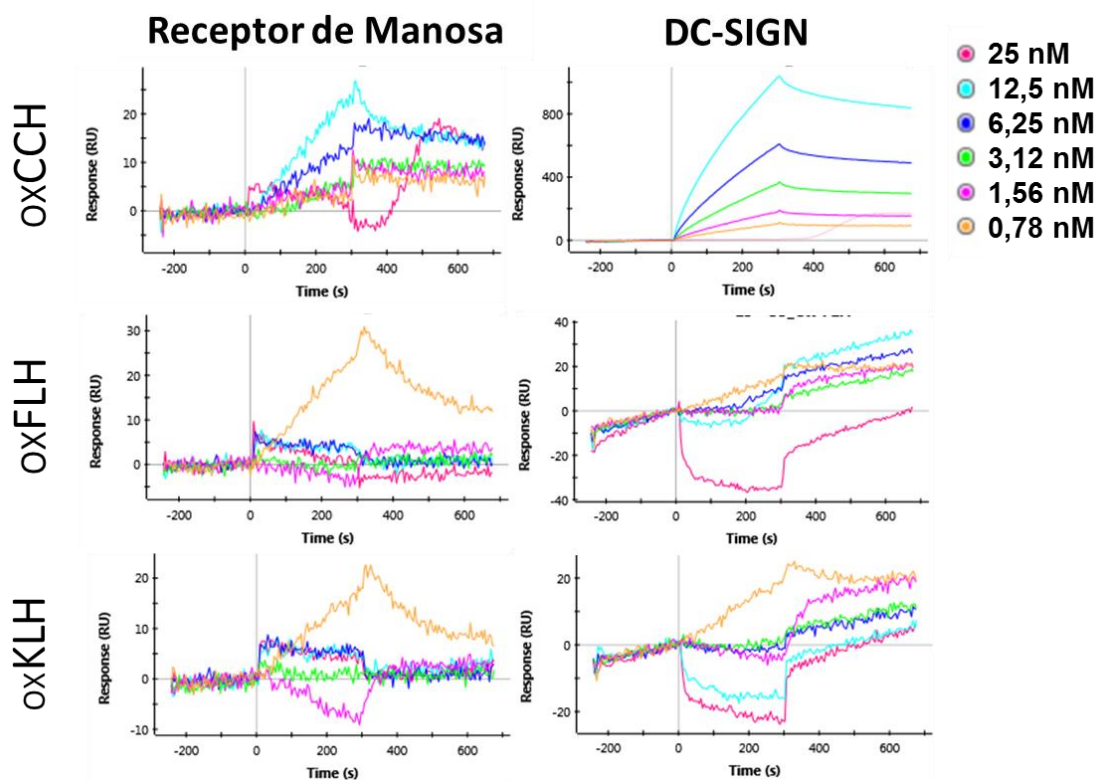


Figura 13. Las hemocianinas desglicosiladas no interactúan con los receptores MR y DC-SIGN. Curvas de unión a MR y DC-SIGN obtenidas por MC-SPR de las hemocianinas desglicosiladas. Cada gráfico muestra las Unidades de Respuesta (RU) en función del tiempo de contacto y cada color representa una concentración de ligando distinta (indicada en la esquina superior derecha). Se utilizó un flujo de 25 $\mu\text{l}/\text{min}$ y un tiempo de contacto de 300s. El canal de referencia fue funcionalizado con BSA. Equipo SPR Biorad ProteOn XPR36.

7.2. Incorporación de hemocianinas mediada por CLRs en APCs

Para evaluar si la unión de las hemocianinas a los receptores MR, DC-SIGN o MGL intervienen en la incorporación de estas proteínas en las células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas), donde se expresan estos CLR, se realizaron experimentos de incorporación con las hemocianinas marcadas con un fluorocromo. Con este propósito, se utilizaron distintos tipos celulares de APCs humanas y murinas, y además, un sistema artificial con células de ovario de hamster chino CHO y CHO-MR, que corresponden a células permanentemente transfectadas con el gen que codifica para el MR humano⁵⁶. Todas estas células se incubaron con 10 µg/mL de hemocianina, ovoalbúmina, D-manosa o D-galactosa, marcadas con un fluoróforo (AlexaFluor-488) y después de 1 hora se evaluó la intensidad de fluorescencia de las células por citometría de flujo.

7.2.1. El MR es capaz de capturar a las hemocianinas en un sistema artificial de células CHO que sobre-expresan el receptor

Para determinar si la unión que se observó entre las hemocianinas y el receptor de manosa por ELISA y SPR, se traduce en la endocitosis de estas proteínas, se evaluó en primer lugar mediante citometría de flujo, la incorporación de las proteínas marcadas al sistema artificial de células CHO-MR⁴⁹. Los resultados se muestran en la **Figura 14**, donde se observan los

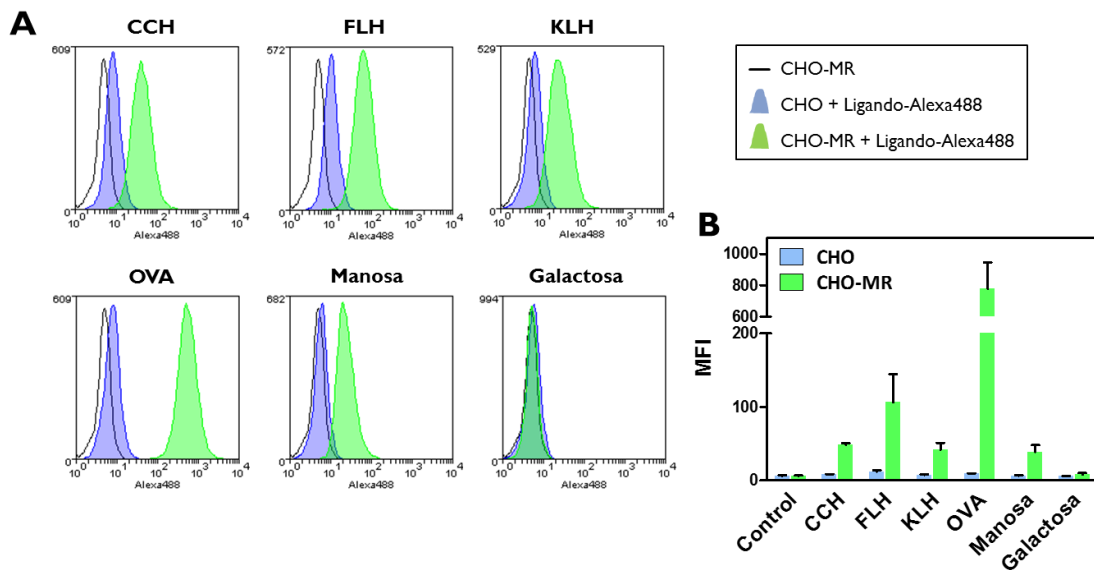


Figura 14. El MR es capaz de internalizar las hemocianinas *in vitro*. Ensayo de incorporación de hemocianinas-Alexa Fluor 488 en células CHO y CHO-MR. Se incubaron las células con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de las proteínas-alexa488 por 1h en medio sin suero, posteriormente se fijaron y analizaron por citometría de flujo. **(A)** Histogramas de un experimento representativo, donde la línea continua representa las células CHO-MR, la curva azul representa las células CHO que no expresan el MR incubadas con los ligandos marcados, lo cual se utilizó para determinar que lo que se observa es incorporación de las proteínas y no adsorción en la superficie celular y la curva verde representa las células CHO-MR incubadas con los ligandos-alexa488, tal como se indica en la leyenda a la derecha. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de dos experimentos independientes, las barras representan la media \pm SEM.

histogramas de un experimento representativo (**Figura 14A**) y la cuantificación de dos experimentos independientes (**Figura 14B**). Al comparar las curvas azules, correspondientes a las células CHO incubadas con los diferentes ligandos, con las curvas verdes, correspondientes a las células CHO-MR incubadas con los diferentes ligandos, se observa que al estar presente el receptor de manosa (CHO-MR) aumenta significativamente la intensidad de fluorescencia media (MFI), confirmando que la unión de las hemocianinas al MR promueve su internalización. Como control positivo se utilizó Manosa-Alexa488, la cual fue capturada por las células CHO-MR y no por las células CHO. En contraste, la captura de Galactosa-Alexa488 no se vio afectada por la presencia del receptor de manosa en las células CHO.

7.2.2. Macrófagos y células dendríticas humanas que expresan el MR y/o DC-SIGN internalizan las hemocianinas

Posteriormente, se evaluó la incorporación de las hemocianinas en APCs humanas asiladas desde PBMCs. Para caracterizar dichas poblaciones celulares primero se determinó su fenotipo por citometría de flujo, usando marcadores de superficie característicos de las células inmunes. Tanto los macrófagos (estimulados por 7 días con GM-CSF a 50 ng/mL⁵⁷) como las células dendríticas (estimuladas por 7 días con IL-4 a 25 ng/mL y GM-CSF a 50 ng/mL^{53,58}) mostraron la expresión CD11b pero no de CD3 (marcador de linfocitos) ni de CD16 (marcador de células NK). La expresión de CD14, por su parte, se observó en macrófagos (**Figura 15.A**)

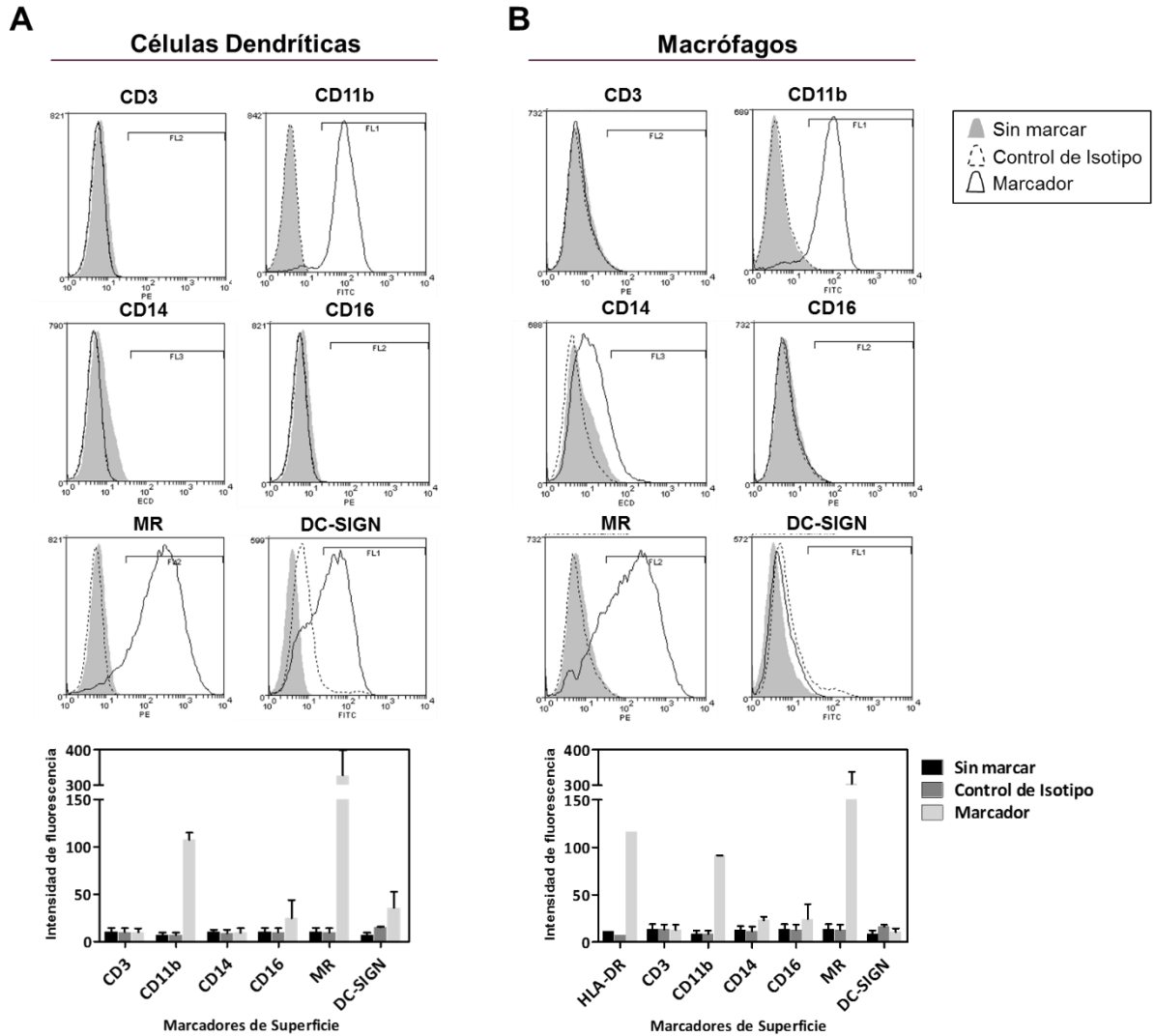


Figura 15. Caracterización por citometría de flujo de las APCs obtenidas desde leucocitos periféricos humanos. Expresión de marcadores de superficie (CD3, CD11b, CD14, CD16) y de los receptores MR y DC-SIGN evaluado por citometría de flujo en **(A)** células dendríticas y **(B)** macrófagos derivados de monocitos humanos. Se evaluó la expresión de los receptores MR y DC-SIGN utilizando los anticuerpos anti-MR-FITC y anti-DC-SIGN-PE. La línea continua representa las células incubas con el anticuerpo específico, la línea discontinua representa las células incubas con el control de isotipo para cada anticuerpo y la curva gris son las células sin marcar, tal como se indica en la leyenda a la derecha

pero no en células dendríticas (**Figura 15.B**). Por otro lado, al evaluar la expresión de los CLRs, se observó que ambos tipos celulares expresan MR, sin embargo, solo las células dendríticas presentan DC-SIGN en su superficie.

Una vez caracterizados ambos tipos celulares, se realizaron los ensayos de incorporación cuyos resultados se muestran en la **Figura 16.B** y la **Figura 16.A**. Las tres hemocianinas fueron capturadas por ambas APCs humanas, que expresan el MR y/o DC-SIGN, al igual que la Ovoalbúmina y el control positivo D-Manosa. De manera paralela, se realizó un control de la endocitosis con CCH-Alexa488 (**Figura 17**), donde se observó que al incubar los macrófagos y células dendríticas con la proteína fluorescente a 4°C, la intensidad de fluorescencia media no aumentó con respecto a las células incubadas con el antígeno fluorescente a 37°C.

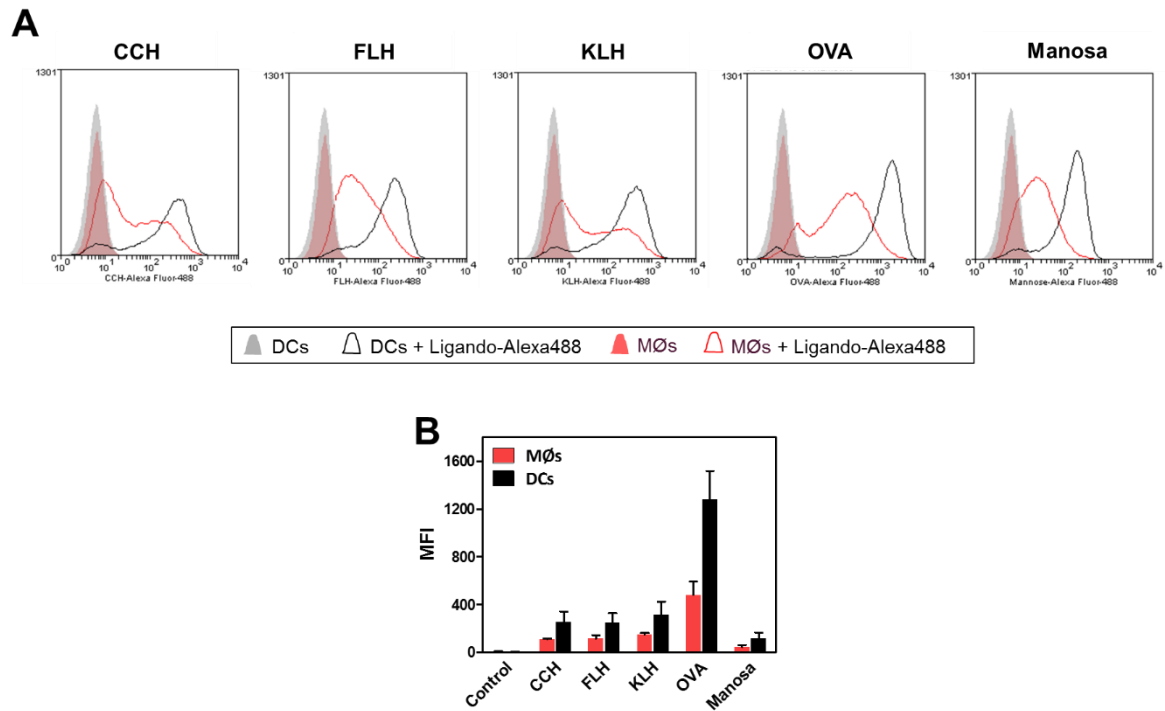


Figura 16. APCs humanas generadas a partir de PBMCs, son capaces de internalizar las hemocianinas *in vitro*. Experimento de incorporación en MØs (en rojo) y DCs (en negro) derivadas de monocitos humanos. Las células se incubaron con 10µg/mL de los ligandos-alexa488 (CCH, FLH, KLH además de OVA y Manosa como controles positivos) por 1h en medio sin suero, se fijaron y analizaron por citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de un ensayo de incorporación de hemocianinas-Alexa488 en células dendríticas (en negro) y macrófagos (en rojo) obtenidos desde PBMCs humanas. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI), las barras representan la media de tres experimentos independientes (tres pacientes distintos) ± SEM.

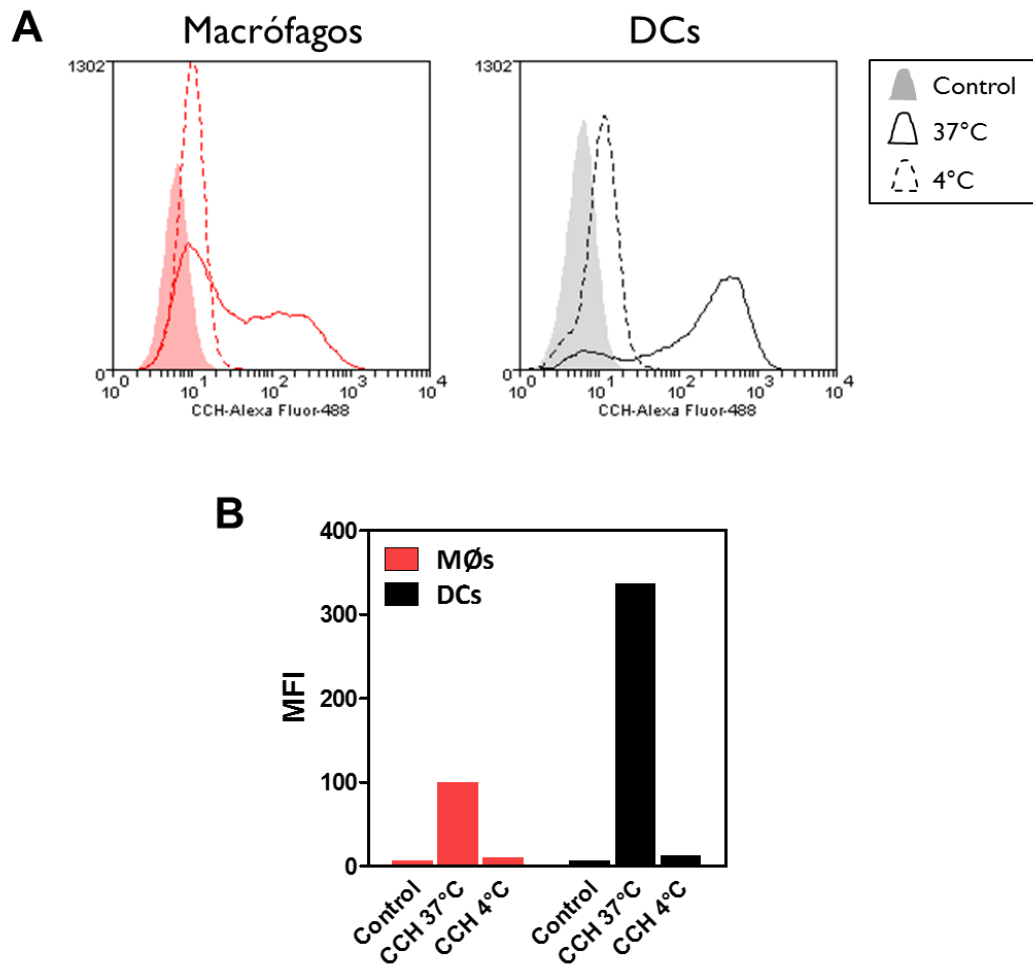


Figura 17. Control de internalización de CCH-Alexa488 a 4°C en APCs humanas. Experimento de internalización de CCH en células dendríticas (DCs) y macrófagos (MØs) obtenidos desde PBMCs humanas. Se incubaron los dos tipos celulares con 10 µg/mL de CCH-Alexa488 en medio sin suero por 1 hora a 37°C y 4°C. **(A)** Histogramas de frecuencias de macrófagos y células dendríticas, la curva continua representa las células incubadas con CCH a 37°C y la línea discontinua representa las células incubadas con CCH a 4°C. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de un experimento.

7.2.3. La internalización de hemocianinas en macrófagos y en la línea DC2.4 de células dendríticas murinas es parcialmente inhibida por EDTA y D-Manosa

Para extrapolar a un modelo murino la unión de las hemocianinas a los CLR's humanos estudiados hasta ahora, se decidió realizar un experimento de inhibición de la incorporación en la línea celular murina DC2.4 y en macrófagos intraperitoneales, utilizando los ligandos naturales de estos receptores y un quelante de Ca^{+2} .

En una primera aproximación se determinó si los tipos celulares en estudio expresan el receptor de manosa o Dectina-2 en su superficie (ambos receptores presentes en humanos y ratones). En la **Figura 18.A** se muestran los histogramas, cuantificación y porcentaje de células positivas para cada caso. Se observó que la línea celular DC2.4 no expresa de manera significativa ninguno de los dos receptores, sin embargo, un 64% de las BMDCs expresan Dectina-2 y un 4% expresan el MR, al contrario, un 30% de los macrófagos intraperitoneales expresa el MR y solo un 15% expresa Dectina-2. Adicionalmente, se realizó una inmunofluorescencia indirecta de BMDCs para evaluar la inmunolocalización de los receptores en estudio (**Figura 18.B**), y se encontró que Dectina-2 se encuentra preferentemente en la membrana celular, mientras que el MR se localiza al interior de las células, tal como se ha descrito anteriormente²³. Por otro lado, cabe destacar que

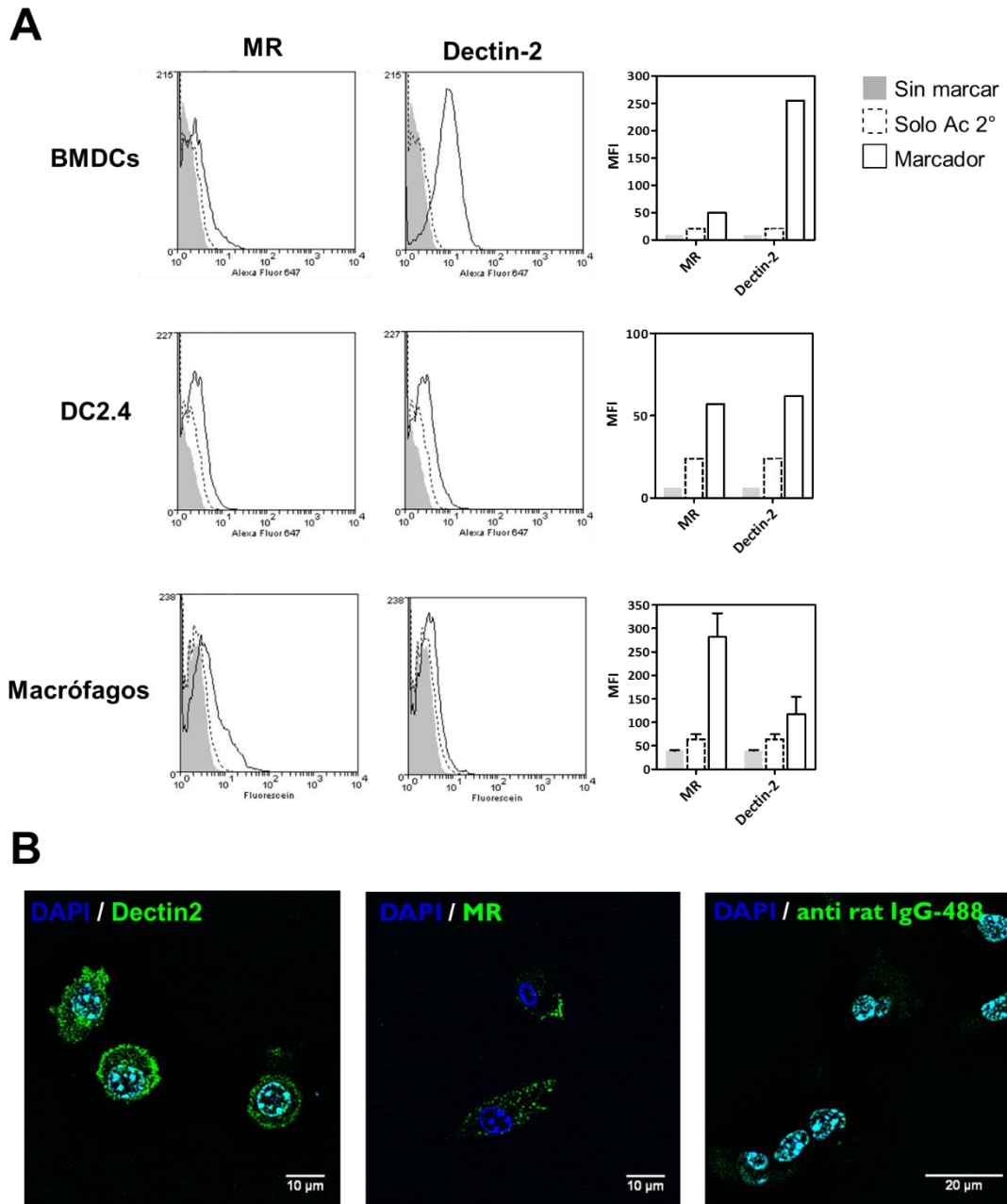


Figura 18. Expresión de CLR en células presentadoras de antígeno murinas. (A) Evaluación de la expresión de MR y Dectina-2 en la superficie de células BMDCs (superior), DC.24 (central) y macrófagos intraperitoneales (inferior) mediante citometría de flujo. A la izquierda se muestran los histogramas, y a la derecha la cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada grupo. Solo para los macrófagos se muestra la media de dos experimentos independientes \pm SEM. **(B)** Imágenes de inmunofluorescencia indirecta de células BMDCs utilizando los anticuerpos específicos para Dectina-2 (en verde, a la izquierda) y el receptor de manosa (en verde, en el centro). El control (a la derecha) se incubó solo con el anticuerpo secundario anti- IgG de rata -488. Los núcleos, de color azul, fueron teñidos con DAPI.

solo una pequeña población de las BMDCs observadas fue positiva para el MR, mientras la mayoría de ellas expresaban Dectina-2, tal como se observó por citometría de flujo (**Figura 18.A**). Así también, se demostró que el anticuerpo secundario que reconoce a los anticuerpos anti-MR y anti-Dectina-2 no se une inespecíficamente a las células en las condiciones probadas (control, **Figura 18.A**).

Luego, para determinar la concentración a la que se harían los experimentos de incorporación, se hizo una curva a distintas concentraciones de hemocianinas, evaluando la intensidad de fluorescencia después de incubar por 1 hora con 1, 10 y 100 µg/mL de hemocianinas fluorescentes. En la **Figura 19** se observa el efecto dosis-respuesta de la captura de hemocianina en la línea celular DC2.4. Considerando este resultado, sumado a lo publicado previamente donde se evalúa incorporación de antígenos^{40,54}, se decidió utilizar 10 µg/mL para todos los ensayos que se harían a continuación.

Los experimentos de inhibición de la incorporación se realizaron en células DC2.4 y en macrófagos intraperitoneales, en presencia de D-Manosa, un ligando natural de la gran mayoría de los CLR, EDTA, un quelante de iones divalentes como el Ca⁺², el cual es imprescindible para la unión de azúcares por los CLR y D-Galactosa, como un azúcar control negativo de la unión a receptores que unen manosa. Los resultados se

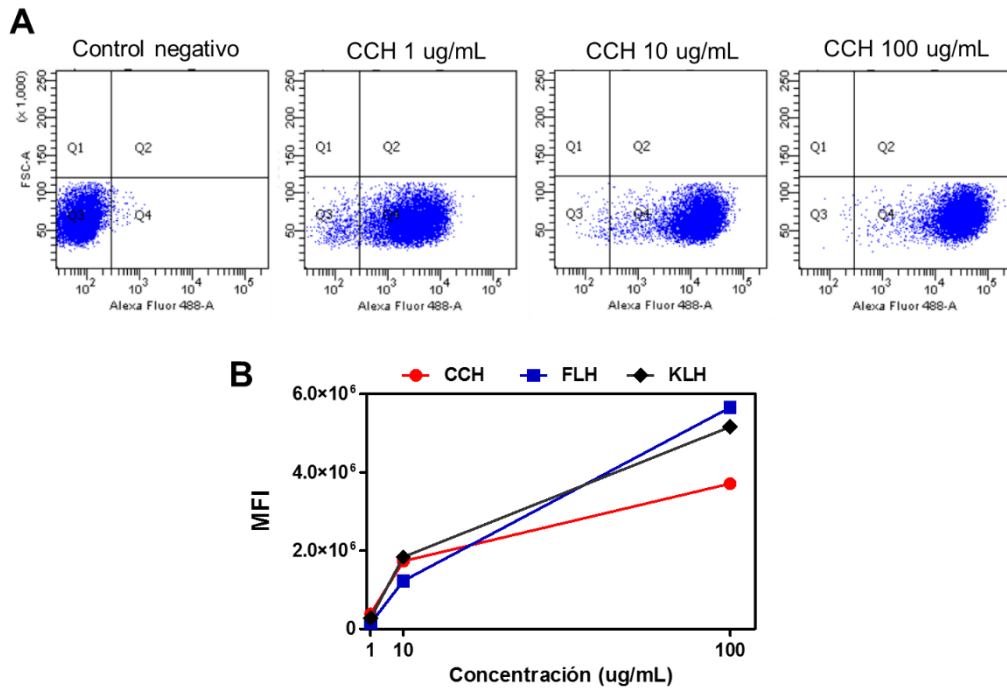


Figura 19. La incorporación de hemocianinas-Alexa488 en la línea celular DC2.4 presenta un efecto dosis-respuesta. Estudio de la incorporación de CCH, FLH y KLH fluorescentes a 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la línea celular DC2.4 mediante citometría de flujo. **(A)** Gráficos de puntos del grupo CCH. **(B)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) en función de la concentración de hemocianinas (CCH, FLH o KLH, según se indica en la leyenda).

muestran en la **Figura 20** (DC2.4) y **Figura 21** (macrófagos intraperitoneales), donde se graficó el porcentaje de captura de cada ligando, considerando como 100% la intensidad de fluorescencia media obtenida en la condición control de cada grupo experimental. Se encontró que en células DC2.4 y macrófagos intraperitoneales, la D-Manosa y el EDTA disminuyen significativamente la captura de hemocianinas, así como la de OVA (control positivo de incorporación mediada por CLR, en especial el MR). Así también, sólo en macrófagos disminuyó significativamente la captura de FLH ante la presencia de D-Galactosa. Por otro lado, el control de incorporación a 4°C es significativamente inferior en todos los casos, observándose un porcentaje de captura menor al 20%.

7.3. Determinación del tipo de compartimento/s subcelular al cual se destinan las hemocianinas una vez endocitadas.

La interacción de las hemocianinas con los receptores lectina tipo C, como MR, DC-SIGN estudiados en esta tesis, podría desencadenar diferentes rutas de procesamiento de antígenos, las cuales dependen tanto del receptor como del antígeno. Se ha descrito en varios trabajos que la interacción de diversos antígenos con receptores como MR o DC-SIGN podría promover tanto la presentación cruzada de los antígenos^{35,40,44,59}, así como también su degradación en lisosomas y consecuente presentación a linfocitos T CD4⁺ (vía clásica)⁶⁰⁻⁶².

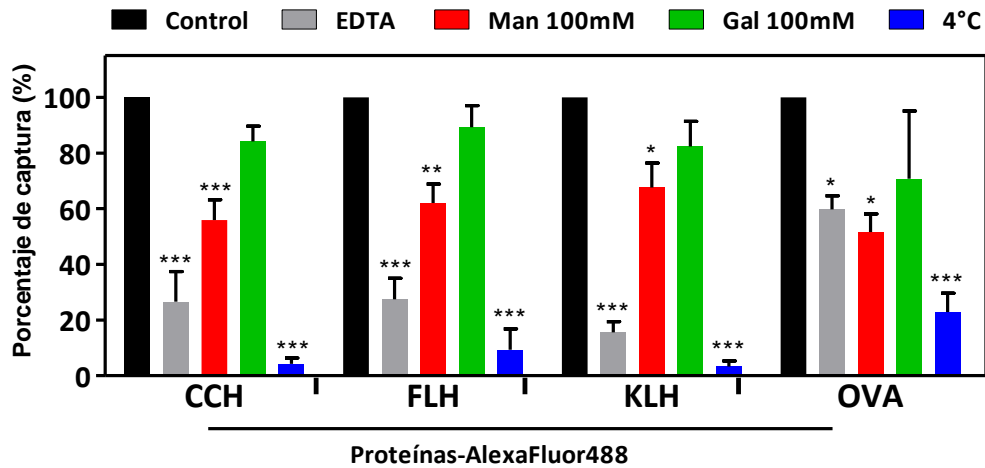


Figura 20. EDTA y D-Manosa inhiben la incorporación de hemocianinas en células DC2.4. Ensayo de incorporación de hemocianinas y ovoalbúmina fluorescentes (marcadas con Alexa Fluor 488) en la línea celular murina DC2.4 mediante citometría de flujo en presencia de EDTA 10mM, D-manosa, D-fucosa o D-galactosa a 100mM. Se incubaron las células con 10 µg/mL de proteínas-Alexa488 por 1h en medio sin suero, posteriormente se fijaron y analizaron. Como control negativo de incorporación se realizó el ensayo a 4°C. El porcentaje de captura se calculó considerando la intensidad de fluorescencia media obtenida en el grupo control, al cual se le asignó el 100%. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía, con un post test de Dunnette, donde *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 con respecto a la condición control (PBS, en negro). Las barras representan la media de tres experimentos independientes ± SEM.

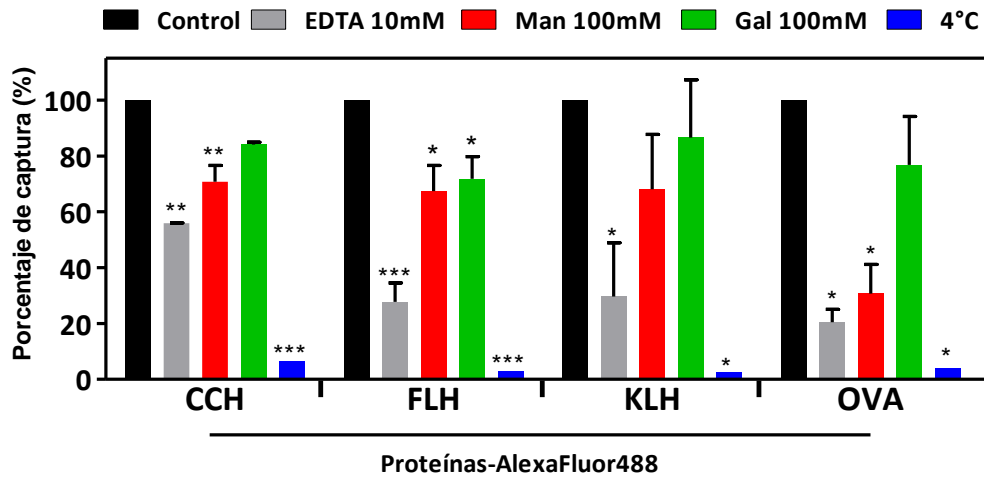


Figura 21. EDTA y D-Manosa inhiben la incorporación de hemocianinas en macrófagos intraperitoneales murinos. Ensayo de incorporación de hemocianinas y ovoalbúmina fluorescentes (marcadas con Alexa Fluor 488) en la línea celular murina DC2.4 mediante citometría de flujo en presencia de EDTA 10mM, D-manosa, D-fucosa o D-galactosa a 100mM. Se incubaron las células con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas-Alexa488 por 1h en medio sin suero, posteriormente se fijaron y analizaron. Como control negativo de incorporación se realizó el ensayo a 4°C. El porcentaje de captura se calculó considerando la intensidad de fluorescencia media obtenida en el grupo control, al cual se le asignó el 100%. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA de una vía, con un post test de Dunnette, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ con respecto a la condición control (PBS, en negro). Las barras representan la media de dos experimentos independientes \pm SEM.

Para determinar a cuál de esta(s) vía(s) están siendo destinadas las hemocianinas y por lo tanto, qué ruta/s de procesamiento antigénico están siguiendo, en esta tesis se evaluó la colocalización de estas proteínas con diversos marcadores intracelulares como Lamp-1 (proteína de membrana asociada al lisosoma uno), Rab5 o Rab7 (GTPasas que se se expresan en endosomas tempranos y en compartimientos endocíticos tardíos, respectivamente) mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopia confocal.

7.3.1. Rab5 y Rab7 en BMDCs presentan un patrón punteado característico de vesículas citoplasmáticas

En primer lugar, se determinó en células BMDCs el marcaje específico con todos los anticuerpos que se deseaban evaluar. En la **Figura 22A** y **Figura 22B** se muestran imágenes representativas de células BMDCs donde se marcaron los endosomas tempranos y tardíos, con Rab5 y Rab7 respectivamente, observándose en ambos casos un patrón punteado de la fluorescencia, que corresponden a **vesículas** presentes en dichas células. Mientras que los controles sin anticuerpos (autofluorescencia), y solo con el anticuerpo secundario especie-específico no muestran fluorescencia (**Figura 22C** y **Figura 22D**, respectivamente).

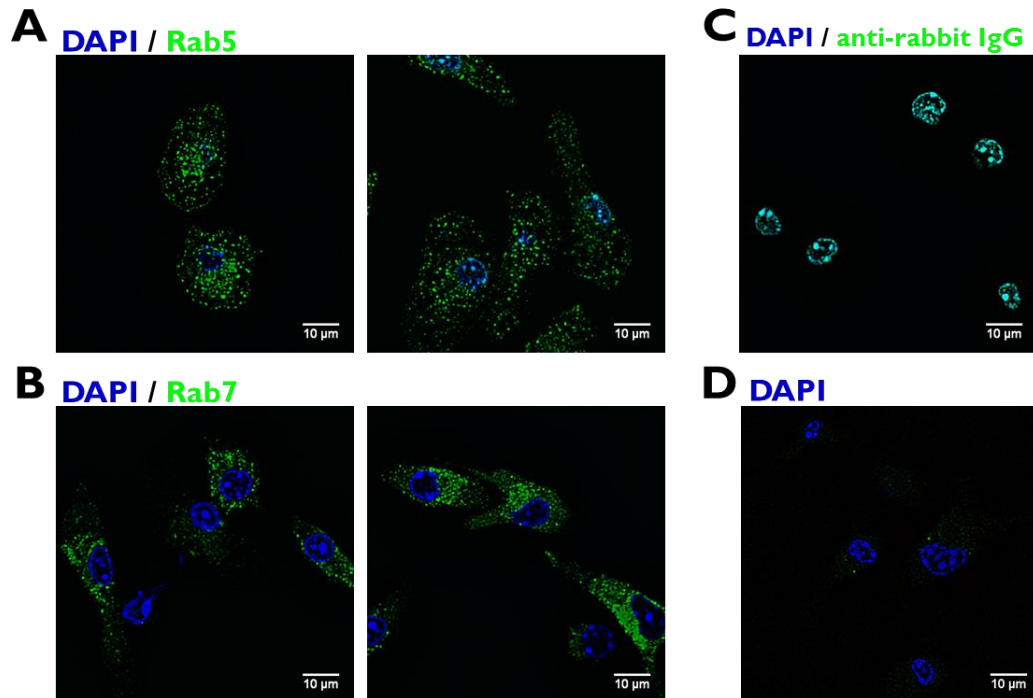


Figura 22. La inmunofluorescencia indirecta de BMDCs con los anticuerpos anti-Rab5 y anti-Rab7 que reconocen endosomas tempranos y tardíos, respectivamente, resulta en un patrón punteado característico de vesículas citoplasmáticas. Fotografías de células dendríticas murinas derivadas de médula ósea (BMDCs) incubadas con anticuerpos específicos de marcadores de compartimentos intracelulares, revelados mediante inmunofluorescencia indirecta. **(A)** Inmunolocalización de Rab5. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-Rab5 diluido 1:100 seguido de un suero de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor-488 diluido 1:1.000. **(B)** Inmunolocalización de Rab7. Se utilizó el anticuerpo monoclonal de conejo anti-Rab7 1:100 y el mismo anticuerpo secundario y condiciones que en A. **(C)** Control de unión inespecífica donde solo se incubó con el anticuerpo secundario suero de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor-488. **(D)** Control negativo donde se realiza la incubación sin anticuerpos. Todas las imágenes fueron obtenidas y procesadas con los mismos criterios y parámetros. Los núcleos, de color azul, fueron teñidos con DAPI.

7.3.2. Las tres hemocianinas colocalizan parcialmente con Rab7 y Lamp-1, mientras que FLH y KLH también colocalizan con Rab5.

Mediante imágenes de inmunofluorescencia indirecta obtenidas por microscopía confocal de células BMDCs, se determinó la colocalización de hemocianinas fluorescentes (CCH- FLH- y KLH- Alexa Fluor-594) con los marcadores de endosomas tempranos, tardíos y de lisosomas, Rab5, Rab7 y Lamp-1 respectivamente. Para esto se realizó una inspección visual de las imágenes, donde los puntos amarillos indican colocalización de los marcadores con las hemocianinas, y además se cuantificó la colocación mediante el *plugin* de ImageJ *Colocalization Threshold*, el cual entrega el coeficiente de correlación de Manders de las hemocianinas (canal rojo) con respecto al marcador endosomal (canal verde).

En la **Figura 23.A** se muestra una célula representativa de cada condición, con su respectivo coeficiente de Mander, y además, en la **Figura 23.B** se graficó la cuantificación de la colocalización de las hemocianinas con respecto a los marcadores endosomales, de 9 a 10 células que fueron analizadas en forma independiente. Para CCH, FLH y KLH, se observó una colocalización parcial con Rab7, evidente tanto por los puntos amarillos abundantes en las imágenes que se muestran, como por una alta media de los coeficientes de correlación obtenidos (alrededor de 0,5 unidades). Sin embargo, con Lamp-1 la media de los coeficientes de Manders es significativamente menor para todas las hemocianinas, con respecto a Rab7,

así como también se observan muy pocas vesículas positivas para las hemocianinas y Lamp-1 (amarillas). Por otro lado, para Rab5 se observó una colocalización parcial con FLH y KLH, evidente tanto por la inspección visual como por una media del coeficiente de Manders cercana a 0,4 unidades. Sin embargo, la colocalización de CCH con Rab5 es prácticamente nula, ya que en ninguna célula se observó vesículas amarillas (positivas tanto para CCH como para Rab5), lo cual se correlaciona con un coeficiente de Manders medio muy bajo, menor a 0,2 unidades.

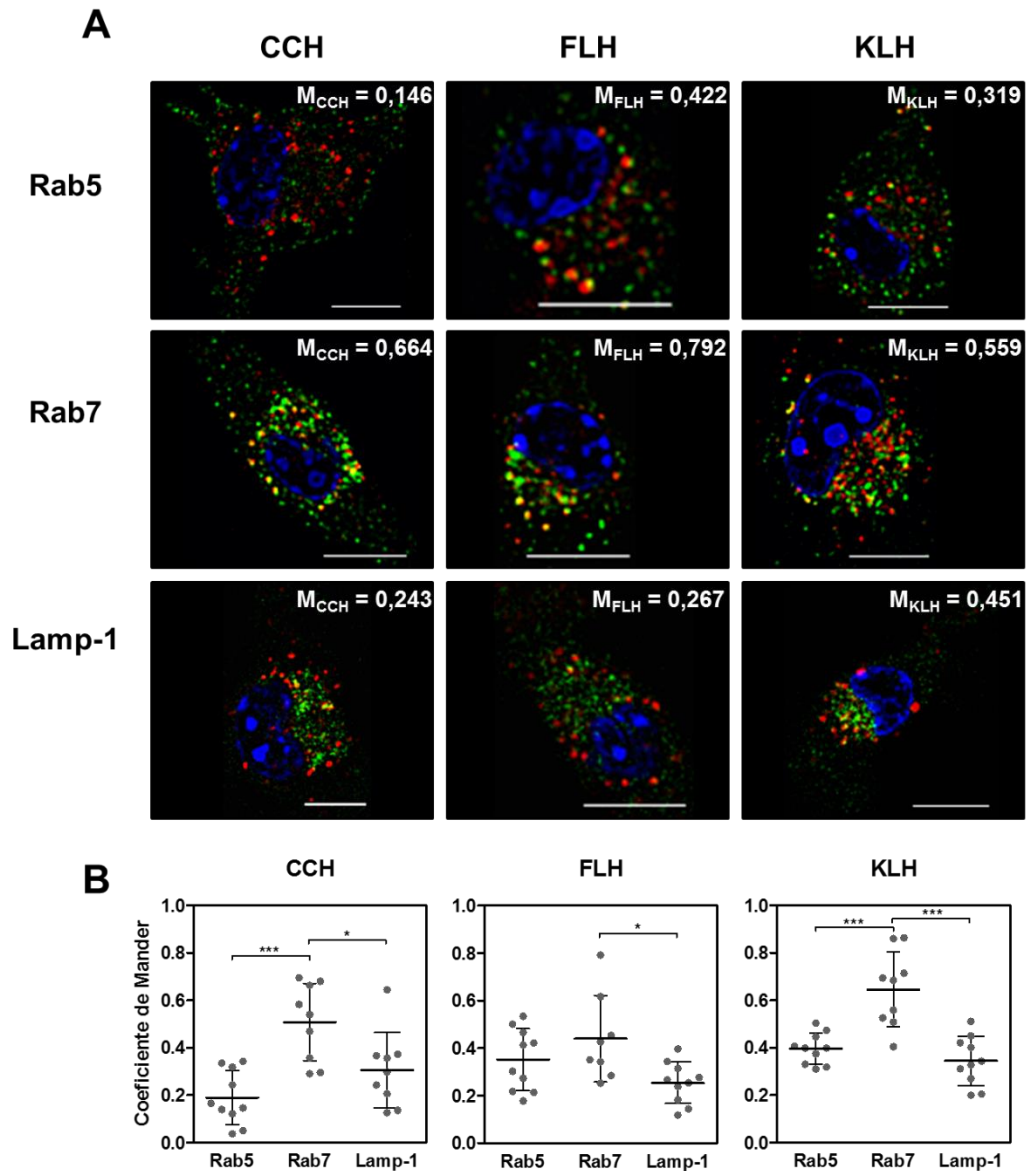


Figura 23. Las hemocianinas colocalizan parcialmente con el marcador de endosomas tardíos Rab7 en BMDCs. Inmunofluorescencia indirecta de células dendríticas murinas derivadas de médula ósea pre-incubadas por 1h con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CCH, FLH o KLH marcadas con Alexa Fluor-594. **(A)** Imágenes representativas de cada condición donde se observa en rojo las hemocianinas, en verde Rab5, Rab7 o Lamp-1 y en azul el núcleo teñido con DAPI. **(B)** Cuantificación de la colocalización de las hemocianinas con respecto a los marcadores endosomales Rab5, Rab7 y Lamp-1. Cada punto representa la medición del coeficiente de correlación de Mander de una célula individual mediante el *plugin* de ImageJ *Colocalization Threshold*, la línea horizontal representa la media \pm SD, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ determinado por una prueba t-student.

7.4. Evaluar la presentación antigénica de hemocianinas por APCs y células tumorales a linfocitos T.

7.4.1 Macrófagos intraperitoneales incubados con FLH aumentan la expresión de MHCI y MHCII

Dado los resultados encontrados por Zhong *et al*, donde se observó que CCH, FLH y KLH generan distintos patrones de expresión de citoquinas en macrófagos intraperitoneales y, en busca de un modelo que permita estudiar la presentación de estas proteínas a través de MHC I y II, se determinó la expresión de estas dos moléculas en macrófagos intraperitoneales estimulados con hemocianinas a 1 mg/mL por 24 y 72 horas. En la **Figura 24.A** se puede observar que CCH y KLH no producen un aumento significativo de la expresión de MHC I, e incluso se observa una tendencia a la disminución de la expresión de MHC I en las células incubadas con CCH. Sin embargo, en los macrófagos incubados con FLH por 24 horas se observó un aumento significativo de la expresión de MHC I, sugiriendo que FLH está promoviendo la presentación de antígenos a linfocitos T CD8⁺. Ahora bien, al analizar la expresión de MHC II (**Figura 24.B**), se observó una tendencia al aumento de la expresión tanto en KLH como en FLH, y no así con CCH. Es importante destacar que con FLH, la expresión de MHCI y MHCII presenta el mismo patrón.

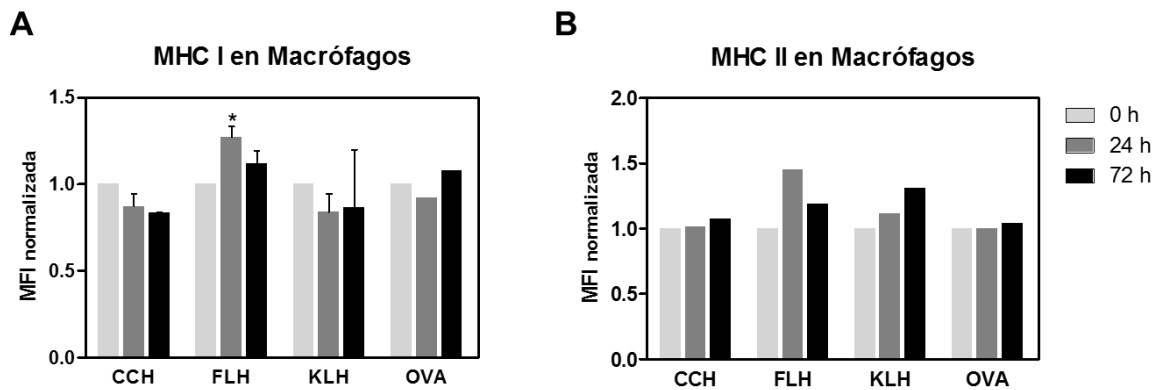


Figura 24. Macrófagos intraperitoneales incubados 24 horas con FLH aumentan la expresión de MHC I y MHC II. Macrófagos intraperitoneales murinos inducidos con tioglicolato se incubaron con hemocianinas (CCH, FLH y KLH) y ovoalbúmina (OVA) a 1 mg/mL por 24 y 72 horas. Luego, se determinó por citometría de flujo la expresión de **(A)** MHC I y **(B)** MHC II. Se graficó la MFI normalizada por el valor obtenido a 0 horas de incubación. En **(A)** se graficó la media \pm SD de dos experimentos independientes, donde * $p < 0,05$ en comparación con la media a 0 horas de incubación obtenido por un ANOVA de una vía. En **(B)** se graficó la MFI normalizada de un experimento.

7.4.2. Células tumorales MOC7, MB49 y B16F10 incorporan FLH en mayor medida que CCH o KLH.

Considerando que la terapia intra-lesional con KLH es la más eficiente en la inmunoterapia del cáncer superficial de vejiga con esta hemocianina^{1,63}, se pensó que si las células tumorales incorporan hemocianinas y la presentan en MHC-I, serían un buen blanco para linfocitos TCD8⁺ específicos contra estas proteínas. En este contexto y como otra aproximación a un bioensayo funcional, se estudió si células tumorales con las que se ha evaluado el poder antitumoral de las hemocianinas en nuestro laboratorio, son capaces de capturar e internalizar las hemocianinas. Para esto se utilizaron las líneas MOC7, MB49 y B16F10, correspondientes a modelos murinos de cáncer oral, cáncer superficial de vejiga y melanoma, respectivamente. Las células se incubaron con concentraciones crecientes de hemocianinas acopladas al fluoróforo Alexa Fluor-488, y se analizó por citometría de flujo la intensidad de fluorescencia.

En la **Figura 25** se muestra el resultado del experimento con las células MOC7. Estas células capturaron las tres hemocianinas a altas concentraciones, sin embargo, la incorporación de FLH fue mucho mayor a la de CCH o KLH, ya que a 1 mg/mL de hemocianina, el 100% de las células capturaron FLH, sin embargo, solo un 50% capturó CCH o KLH.

Para comprobar que lo se observaba era hemocianina internalizada en las células, se realizó una microscopía electrónica de transmisión de células MOC7 incubas con 0,125 mg/mL de FLH. En la **Figura 26** se muestran células que contienen moléculas de FLH al interior de vacuolas y vesículas cubiertas de clatrina.

Finalmente, se realizó el mismo experimento de incorporación en células MB49 y B16F10 (**Figura 27**), encontrándose que, al igual que en las células MOC7, estas líneas tumorales son capaces de capturar FLH en mayor medida que CCH y KLH. Esto se evidencia al analizar el número de células positivas para el fluróforo Alexa Fluor-488, el cual llega a un 100% para FLH a 1 mg/mL (**Figura 25.B** y **Figura 27**) y solo a un 40 y 60% para CCH y KLH, respectivamente, a la misma concentración.

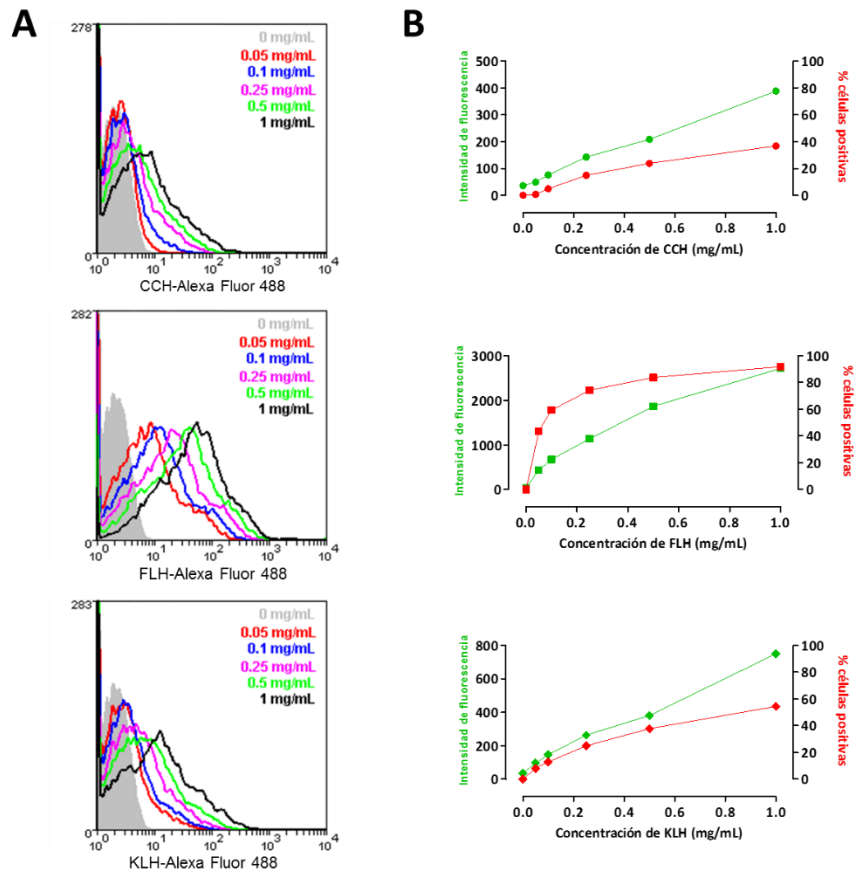


Figura 25. Incorporación de hemocianinas en células tumorales MOC7. Las células MOC7 de cáncer oral murino fueron incubadas con hemocianina fluorescente a concentraciones crecientes y analizadas por citometría de flujo. **(A)** Histogramas de frecuencias del experimento de incorporación en células MOC7. Cada curva de color representa una concentración de hemocianina (CCH, FLH o KLH) según se indica en la leyenda de cada histograma. **(B)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (en verde, a la izquierda) y del porcentaje de células positivas para Alexa Fluor-488 (en rojo, a la derecha) del experimento de incorporación de hemocianinas.

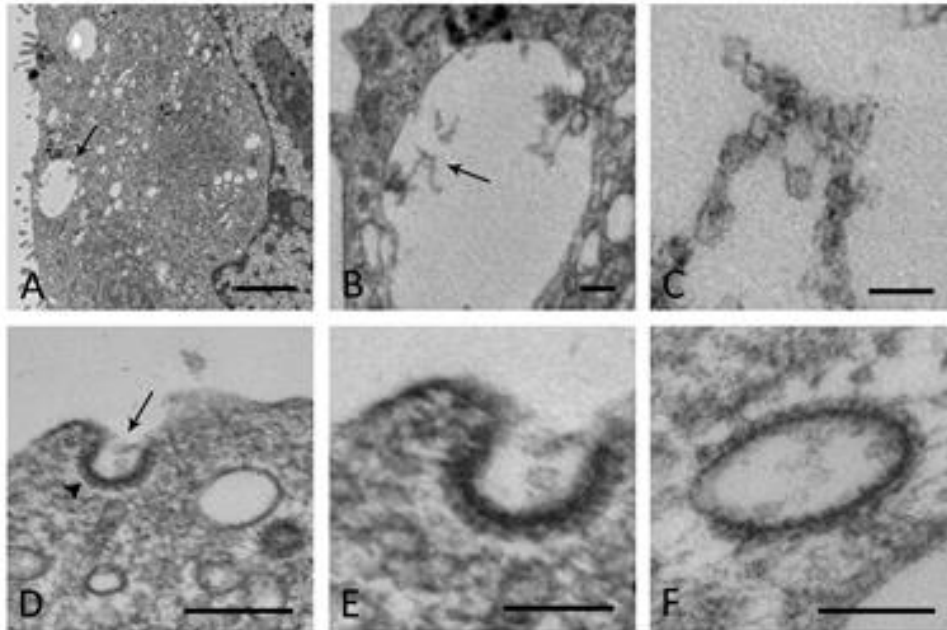


Figura 26. FLH dentro de células tumorales MOC7 por microscopía electrónica. Imágenes de células MOC7 incubadas por 2 horas con FLH a 0,12 mg/mL, obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. **(A)** Célula con una vacuola (flecha) que en su interior contiene moléculas de FLH, las cuales se muestran con mayor aumento en **(B)** y en **(C)**. **(D)** Superficie celular en que muestra una *coated-pit* (cabeza de flecha) con moléculas de FLH en su interior, mostradas con mayor aumento en **(E)**. **(F)** Vesícula cubierta de clatrina (*coated-vesicle*) con moléculas de FLH en su interior. Las barras representan: A 500 nm, B 200 nm, C 100 nm, D 200 nm, E 100 nm y F 100 nm.

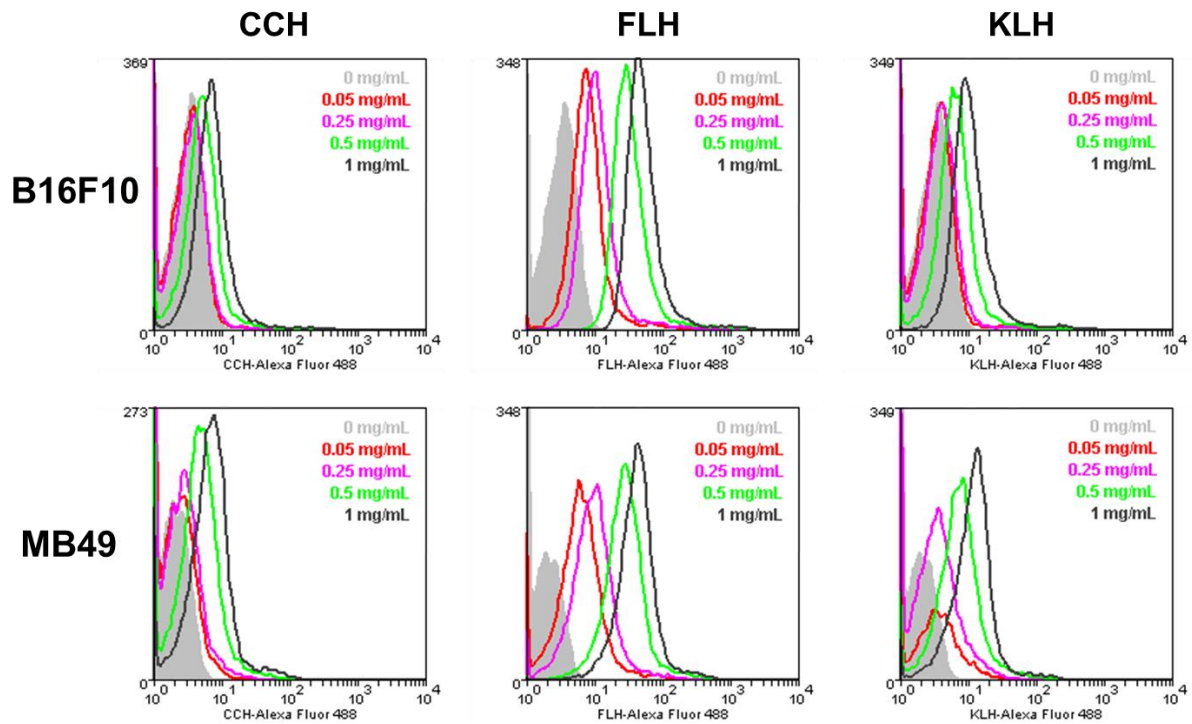


Figura 27. Las líneas celulares tumorales B16F10 y MB49 incorporan FLH incluso a bajas concentraciones. Histogramas de frecuencia de un experimento de incorporación de hemocianinas fluorescentes en líneas celulares de melanoma (B16F10, fila superior) y cáncer superficial de vejiga (MB49, fila inferior) analizado mediante citometría de flujo. Las células fueron incubadas por 1 hora con concentraciones crecientes de CCH, FLH o KLH –Alexa Fluor-488 (según se indica en la leyenda), posteriormente fueron lavadas, fijadas y analizadas en un equipo FACSort (BectonDickinson).

8. DISCUSIÓN

Las hemocianinas de moluscos son proteínas altamente glicosiladas que han sido utilizadas como inmunoestimulantes/adyuvantes en diferentes modelos murinos de cáncer y, en humanos, como proteínas transportadoras de antígenos asociados a tumores en el desarrollo de vacunas terapéuticas para cáncer⁶³. Sin embargo, el/los mecanismo/s mediante el cual estas proteínas modulan la respuesta del sistema inmune ha sido escasamente estudiado. En este trabajo se abordó la contribución de los azúcares en el reconocimiento de las hemocianinas por las células presentadoras de antígeno, a través de receptores lectina tipo C. Mediante ensayos de unión por ELISA indirecto y resonancia de plasmones superficiales, se determinaron algunos parámetros cinéticos de la interacción de las hemocianinas con MR y DC-SIGN. Así, se encontró que CCH, FLH y KLH poseen altas afinidades con dichos CLR. Además, se encontró que la interacción entre las hemocianinas y el MR efectivamente promueve la captura de estas proteínas en células CHO que expresan este receptor y por último, se observó que tanto las APCs humanas como murinas, que expresan CLR, son capaces de internalizar las hemocianinas *in vitro*. Estos datos sugieren fuertemente que el reconocimiento mediado por los CLR podría ser uno de los mecanismos mediante el cual las APCs internalizan las hemocianinas, para procesarlas y presentarlas a linfocitos T.

Sin embargo, dado que los efectos antitumorales de las hemocianinas se producen por ellas solas^{3,5,8}, sin adyuvantes adicionales, surgen dos preguntas fundamentales que se han tratado de responder en esta tesis, la primera ¿cómo las hemocianinas inician la respuesta inmune?, considerando que el dogma actual de la inmunología postula que toda respuesta se inicia vía una activación del sistema inmune innato, que conlleva mecanismos pro-inflamatorios y, la segunda, ¿cómo vía presentación antigénica de hemocianinas a linfocitos T, ya sea CD4⁺ o CD8⁺, se logra una respuesta antitumoral tan potente que genera un efecto terapéutico? Para responderlas, en esta tesis se ha puesto el foco en las estructuras glicosídicas de estas proteínas, que como se dijo, corresponden a aproximadamente un 3% de su peso total, siendo manosa el azúcar más abundante. Ya que estos oligosacáridos podrían jugar un papel importante en el reconocimiento de las hemocianinas vía receptores de la inmunidad innata presentes en células del sistema inmune como son los receptores lectinas tipo C.

Los CLR^s participan en la endocitosis y destinación de los antígenos a compartimentos intracelulares donde son procesados para ser presentados a linfocitos T, ya sea vía MHC-I o II^{60,64,65}. Es así que, siendo la hemocianina un antígeno exógeno, podría estar siendo presentada también vía MHC-I a linfocitos TCD8⁺ citotóxicos, por un mecanismo de presentación cruzada. Este aspecto no ha sido reportado extensivamente y se sustenta en evidencia experimental indirecta previa de otros autores, como se expuso en la Introducción y, en lo observado en esta tesis, donde encontramos que en

células dendríticas derivadas de médula ósea, las hemocianinas son endocitadas y destinadas a diversos compartimentos, algunos de ellos característicos de antígenos como la ovoalbúmina, que son procesados de forma alternativa vía presentación cruzada.

8.1. Unión de hemocianinas a receptores lectinas tipo C

En esta tesis se demostró que CCH, FLH y KLH interactúan con uno o más receptores lectina tipo C, presentando diferencias entre ellas. Específicamente, se observó que las tres hemocianinas se unen a la quimera recombinante CTLD4-7 y no a CR-FNII-CTLD1-3 del receptor de manosa. Esto sugiere que los azúcares de las hemocianinas están interactuando con el dominio lectina número 4, que es el dominio funcional de este receptor y no con el dominio que reconoce colágeno (FNII) ni con el que reconoce azúcares sulfatados (CR) (**Figura 7**, barras verdes y rojas). En estos ensayos de unión por ELISA indirecto se obtuvieron valores sobre 1 unidad de absorbancia, lo cual no permite establecer con certeza una relación causal entre absorbancia y afinidad. Por esta razón, se realizaron ensayos de SPR para determinar los parámetros cinéticos de estas interacciones. Así, encontramos que la constante de asociación K_D aparente entre las hemocianinas y **CTLD4-7** fue de $1,3 \times 10^{-8}$ M para CCH, $3,4 \times 10^{-9}$ M para FLH y $2,6 \times 10^{-12}$ M para KLH (**Tabla 3**), lo cual indica que KLH es la hemocianina más afín por CTLD4-7. Esta mayor de afinidad de KLH por la quimera, en comparación con FLH y CCH, se explica por una menor constante de velocidad de disociación (k_d) de KLH

en comparación con las otras hemocianinas (10^{-8} s^{-1} para KLH y 10^{-4} s^{-1} para CCH y FLH), y no por diferencias en la constante de velocidad de asociación (k_a), las cuales son del mismo orden de magnitud para todos los ligandos ($10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Cabe mencionar, que la constante de disociación K_D es una constante de equilibrio calculada como la razón entre la constante cinética de disociación y de asociación (k_d/k_a), por lo tanto, mientras más rápido se asocie el complejo ligando/receptor o más lento se disocie, menor será la K_D , lo que extrapolamos como una mayor afinidad⁶⁶.

Así, cuando se evaluó la afinidad de las hemocianinas por el **MR completo**, se observaron constantes de unión diferentes a las obtenidas con la quimera recombinante, siendo de $5,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ para CCH, $3,1 \times 10^{-10} \text{ M}$ para FLH y de $1,7 \times 10^{-9} \text{ M}$ para KLH (**Tabla 3**). En este caso es FLH la que presenta una mayor afinidad, lo cual se explica por una mayor velocidad de asociación (del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) en comparación con CCH y KLH (del orden de 10^4 y $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente).

Las diferencias entre las afinidades de las hemocianinas con CTLD4-7 en comparación con el MR completo podrían deberse a situaciones conformacionales, como a impedimentos estéricos por una menor exposición del sitio de unión de los ligandos que presenta el receptor completo con respecto al dominio CTLD4-7 quimérico, ya que con el MR se observaron

menores afinidades que con la quimera recombinante. También, esto podría deberse a una disposición espacial particular que experimente el receptor al ser funcionalizado en el chip. Sin embargo, aunque los datos de interacción *in vitro* son de sumo interesantes, porque muestran la interacción ligando-receptor y las semejanzas y diferencias entre las hemocianinas, **los datos de mayor importancia biológica** son los obtenidos con el receptor de manosa completo, ya que son las condiciones en las que las hemocianinas y el receptor interactuarían en una célula presentadora de antígeno.

Por otro lado, todas las hemocianinas nativas también mostraron unión a **DC-SIGN**, tanto por ELISA indirecto (**Figura 7**, barras azules) como por SPR (**Figura 11**), mostrando una K_D de $6,1 \times 10^{-11}$ M para CCH, $9,0 \times 10^{-12}$ M para FLH y de $4,0 \times 10^{-14}$ M para KLH, lo que indica que es KLH la hemocianina con mayor afinidad por este receptor. Esto se debe a que KLH se disocia más lento de DC-SIGN que las otras hemocianinas (k_d del orden de 10^{-7} M para KLH versus 10^{-4} M para CCH, FLH y Manosa-BSA).

Ahora bien, cabe destacar que en todos los casos, las hemocianinas poseen una constante de unión igual o menor (igual o mayor afinidad) que el control positivo Manosa-BSA, de un orden de magnitud alrededor del pico molar (**Tabla 3**), suficiente para considerar que las interacciones que estamos observando podrían tener una gran importancia en el contexto biológico en que ocurrirían. Así por ejemplo, se ha demostrado utilizando un sistema y equipo muy similar al empleado en este trabajo, que la interacción de la

glicoproteína gp120 de la cubierta del VIH (virus de inmunodeficiencia humana) con DC-SIGN presentan una K_D de 4 pM²⁷, del mismo orden de magnitud de afinidad que las hemocianinas con la mayoría de los receptores evaluados. La interacción entre gp120 y DC-SIGN permite la trans-infección de células T (a través de las células dendríticas)⁶⁷ y se ha observado, incluso, que la inhibición de esta interacción con un anticuerpo monoclonal específico, previene la infección con VIH mediada por células dendríticas⁶⁸.

También, es importante mencionar que todas las constantes calculadas son constantes **aparentes**, y son comparables solo en el contexto del experimento particular en que se realizó. Además, hemos observado por microscopía electrónica (**Figura 28**) que, especialmente en el caso de KLH y FLH, una porción de estas proteínas se encuentran disociadas en solución (véase **Figura 28**), por esta razón, se decidió realizar los ajustes cinéticos considerando un peso molecular de las hemocianinas de 4 MDa (decámero) y no 8 MDa (di-decámero).

Con los ensayos de inhibición con D-Manosa y D-Galactosa, se demostró además que la interacción de las hemocianinas con los CLR's en estudio es específica (**Figura 9**), ya que es posible inhibir significativamente la unión en presencia del ligando natural de estos receptores D-Manosa, y no así en presencia de D-Galactosa. Con CTLD4-7 la inhibición ocurre de manera drástica solo a 5 mM de D-Manosa para todos los ligandos,

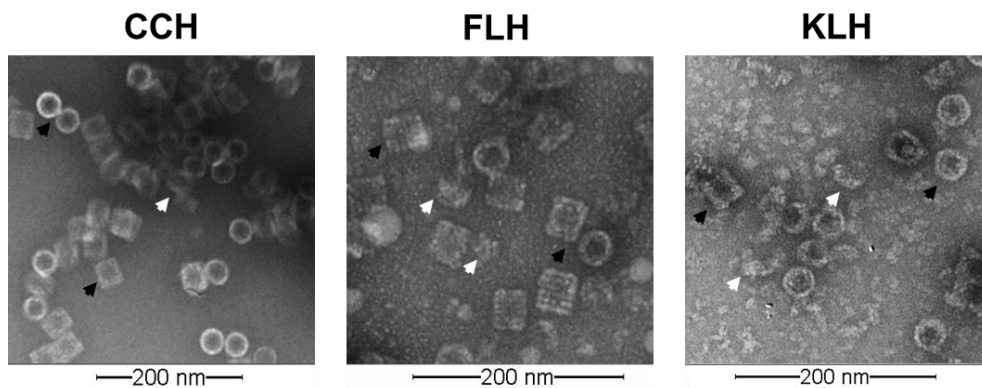


Figura 28. Tinción negativa de las hemocianinas CCH, FLH y KLH obtenida por microscopía electrónica de transmisión. Imágenes representativas de las muestras de hemocianinas nativas en PBS, con las que se realizaron los experimentos de esta tesis. Las flechas negras indican las moléculas completas (di-decámeros), más evidentes en CCH. Las flechas blancas muestran las moléculas disociadas, más abundantes en FLH y KLH. El aumento se señala al pie de cada imagen.

sin embargo, con DC-SIGN se observa una curva de inhibición donde a los 20 mM de D-manosa hay una disminución total de la unión, sugiriendo una mayor afinidad de las hemocianinas por DC-SIGN en comparación con CTLD4-7 y/o una mayor afinidad de CTLD4-7 por manosa monomérica en comparación con DC-SIGN.

Por otro lado, cuando se evaluó la unión de las hemocianinas desglicosiladas (CCHox, FLHox y KLHox) a los receptores, no se obtuvieron resultados positivos, concluyendo que la unión a los CLR's que se observó por ELISA indirecto (**Figura 7**) y por SPR (**Figura 13**) es dependiente de la presencia de los azúcares en las hemocianinas nativas. Sin embargo, este fenómeno ocurrió de manera menos drástica por SPR entre CCHox y DC-SIGN, donde sí se observó interacción, mostrando una K_D de $1,2 \times 10^{-9}$ M, mayor en comparación con la hemocianina nativa, que presentó una K_D de $6,1 \times 10^{-11}$ M (**Tabla 3**). Esto sugiere que en las condiciones en que se realizó la reacción de oxidación con peryodato para eliminar totalmente los azúcares, con CCH no ocurrió por completo, no obstante hubo una pérdida parcial de azúcares ya que la afinidad de CCHox por el receptor disminuyó 100 veces en comparación con la CCH nativa.

Así también, encontramos que FLH y KLH a diferencia de CCH, pueden interactuar con el receptor de galactosa y N-acetilgalactosamina, MGL (**Figura 11**). Lo cual es consistente con lo descrito por Arancibia *et al*, 2014⁵, donde se determinó por espectrometría de masas que FLH posee galactosa en sus

estructuras glicosídicas, mientras que CCH no tiene esta característica. Esto sugiere que FLH y KLH son capaces de unir un repertorio más amplio de receptores, debido a que poseen una mayor variedad de azúcares, lo que se correlaciona con un mejor efecto antitumoral en comparación con CCH, especialmente en el caso de FLH⁵. Esta característica podría, también, estar relacionada con una mayor capacidad de inducir vías transduccionales que activen a las APCs y promuevan el efecto inmuno-estimulante descrito. En apoyo a esta aseveración, recientemente hemos demostrado que macrófagos peritoneales murinos cultivados in vitro durante 24h con las diferentes hemocianinas usadas en esta tesis, muestran patrones de expresión génica diferentes para un conjunto de citoquinas pro-inflamatorias características del fenotipo M1⁶⁹.

El conjunto de los datos obtenidos, nos muestran que efectivamente CCH, FLH y KLH interactúan con los CLR, lo cual no había sido experimentalmente demostrado hasta ahora. Solo se había descrito que el efecto de KLH sobre células dendríticas humanas está mediado parcialmente por el MR⁴¹. En esta tesis se demostró que las tres hemocianinas en estudio pueden interactuar con los receptores MR y DC-SIGN humanos, y que FLH y KLH pueden unirse a MGL. Esta interacción podría tener varias consecuencias. Por un lado, respecto al procesamiento y presentación de antígenos, se ha descrito que tanto el MR como DC-SIGN pueden promover la presentación cruzada de antígenos^{40,46,59,60,62}, ya que destinan los antígenos a compartimentos Rab5⁺ tipo endosomas-tempranos, que permiten

que los péptidos provenientes del antígeno sean presentados a linfocitos T CD8⁺. Por otro lado, respecto a la activación de las células presentadoras de antígenos, se ha descrito que la activación de MGL induce la activación de células dendríticas humanas inmaduras⁷⁰. También, la unión de ligandos al MR es capaz de generar la maduración de células dendríticas murinas⁷¹. En esta misma línea, es importante considerar que las hemocianinas están interactuando con más de un CLR, como lo demuestra este trabajo, y como consecuencia, es probable que el efecto final que ellas generen sobre las células presentadoras de antígenos sea un balance entre todas las vías que ellas logran activar.

Por otro lado, la capacidad de FLH y KLH de interactuar con MGL podría ser muy relevante a la hora de entender el mecanismo mediante el cual las hemocianinas generan un efecto antitumoral, ya que MGL es un receptor que une el antígeno Tn, combinación de N-acetilgalactosamina (GalNac) unida covalentemente a serina o treonina, presente de manera abundante en algunas células tumorales y ausente en tejido normal y que por esta razón, ha sido involucrado como un promisorio blanco en vacunas contra el cáncer^{70,72}. De hecho, Freire *et al*,⁷² describen que el tratamiento de DCs que expresan MGL con ligandos del receptor, promueve la respuesta tanto de linfocitos B, como de linfocitos T CD8⁺ específicos contra el antígeno Tn.

Con respecto a la técnica utilizada para determinar las constantes de unión (SPR) es importante destacar la importancia de las curvas control

realizadas con manosa-BSA y galactosa-BSA (**Figura 10**), ya que estas confirman la presencia de los receptores en el chip. MR, CTLD4-7 y DC-SIGN unen Manosa-BSA y MGL une Galactosa-BSA, confirmando, además, la especificidad y funcionalidad de los receptores.

8.2. Reconocimiento e internalización de hemocianinas mediada por receptores que reconocen azúcares

Mediante un sistema artificial utilizando células CHO que sobreexpresan el MR (CHO-MR), encontramos que al estar presente este receptor aumenta significativamente la intensidad de fluorescencia media de las células, lo que interpretamos como que la interacción entre las hemocianinas y el MR efectivamente promueve su captura en la células CHO-MR *in vitro*. Aunque no se descarta la presencia de hemocianinas en la superficie de las células CHO-MR, pensamos que la proteína se encuentra mayoritariamente al interior de las células, basados en evidencia previa de nuestro laboratorio obtenida por microscopía electrónica de transmisión⁸ que muestra moléculas de hemocianina al interior de vesículas cubiertas de clatrina de células dendríticas y macrófagos murinos luego de solo 10 minutos de incubación con estas proteínas³. Además, porque se ha descrito al receptor de manosa principalmente como un receptor endocítico, debido a que se encuentra en mayor proporción dentro de las células y no en la superficie^{23,54}.

En cuanto a la incorporación de hemocianinas en APCs humanas, se demostró que tanto macrófagos como células dendríticas derivados de monocitos que expresan el receptor de manosa y/o DC-SIGN (**Figura 15**), son capaces de capturar las tres hemocianinas en estudio, así como los controles positivos OVA y Manosa, ligandos conocidos del MR (**Figura 16**). También, es importante destacar que en todas las condiciones experimentales, la intensidad de fluorescencia media de los macrófagos fue sistemáticamente inferior a la obtenida con las células dendríticas, sugiriendo una mayor capacidad de las DCs para internalizar las hemocianinas. Por otra parte, al incubar las células con CCH-Alexa Fluor-488 a 4°C, se observó una menor intensidad de fluorescencia media de la población (**Figura 17**), indicando una menor captura de la hemocianina. Este experimento demuestra que lo que se observa en la incubación a 37°C es, probablemente, hemocianina endocitada y no adsorbida en la superficie de la célula, ya que a 4°C se impide la polimerización de los microtúbulos y, por lo tanto, la endocitosis de antígenos⁴⁵.

Paralelamente, encontramos que al pre-incubar la línea de células dendríticas murinas DC2.4 y macrófagos intraperitoneales murinos con un ligando natural de la mayoría de los CRLs como la D-Manosa o con un quelante de Ca⁺² (EDTA) que impide la unión de los ligandos por parte de los CLR, se observa una disminución parcial y significativa de la captura de las hemocianinas en estudio (**Figura 20** y **Figura 21**). Debido a que en todos los ensayos de unión *in vitro* realizados anteriormente se utilizaron proteínas recombinantes humanas, este experimento nos permitió **extrapolar** a un

modelo murino la unión de las hemocianinas a los receptores lectina tipo C. Así también, se encontró que la D-Galactosa inhibe significativamente la incorporación de FLH en macrófagos intraperitoneales murinos (**Figura 21**), lo cual podría explicarse por la unión de esta hemocianina al receptor de galactosa/N-acetilgalactosamina MGL, ya que en este trabajo se observó que FLH es capaz de unirse con gran afinidad a este receptor (**Tabla 3**). Es importante mencionar que se ha descrito que los macrófagos intraperitoneales aislados con tioglicolato expresan tanto MGL1 como MGL2 (ortólogos murinos del MGL humano)⁷³.

Ahora bien, se debe tener presente que aunque en estos tipos celulares solo determinamos la expresión de MR y Dectina-2 (**Figura 18**), existen CLRs que no se midieron en los modelos utilizados, tales como Langerina⁷⁴ y SIGNR3, que es un homólogo de DC-SIGN en murinos⁷⁵, los cuales también podrían estar involucrados en la internalización de hemocianinas mediante receptores.

8.3. Destinación intracelular de las hemocianinas en APCs

Como bien se mencionó anteriormente, la interacción de las hemocianinas con los receptores lectina tipo C podría tener diversas consecuencias. Centro de ellas, el tipo de compartimento endocítico al cual se destinan, característica que determina el tipo de procesamiento antigénico que estaría involucrado en su presentación a linfocitos T, evento

indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa, la cual, a su vez, es necesaria para el efecto antitumoral de KLH, FLH y CCH⁵.

Mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, se analizó la localización de las hemocianinas en BMDCs, cuantificándose la colocalización de hemocianinas fluorescentes con los marcadores Rab5, Rab7 y Lamp-1, de endosomas tempranos, tardíos y lisosomas, respectivamente. Como primera aproximación, se realizó una inspección visual y posteriormente, se realizó un análisis cuantitativo mediante el coeficiente de correlación de Manders, el cual mostró altos valores para las tres hemocianinas con Rab7. Esto indica que una fracción de la hemocianina endocitada por las BMDCs, después de una hora de incubación, se destina a endosomas tardíos Rab7⁺. Es importante destacar que esta compartimentalización no es exclusiva, ya que en todos los casos fue posible observar una gran cantidad de puntos rojos (hemocianinas) independientes de los puntos verdes (Rab7), sugiriendo que las hemocianinas podrían ser destinadas, además, a otro tipo de compartimentos.

Ahora bien, al analizar la colocalización con Lamp-1 encontramos resultados distintos, ya que los coeficientes de correlación de Manders son menores en comparación a los encontrados con Rab7 para todas las hemocianinas, pero no llegan a ser no-significativos. Por lo que, también es posible encontrar CCH, FLH, y KLH en mayor medida, en compartimentos lisosomales tempranos Lamp-1⁺ después de una hora de incubación en

células BMDCs. Es importante mencionar que esta colocalización no se observó en todas las células inspeccionadas, habiendo células donde no se observó vesículas amarillas indicativas de colocalización, y en las cuales el coeficiente de correlación de Manders fue muy bajo (**Figura 23.B**). Sin embargo, está descrito que los cultivos de células dendríticas CD11c⁺ derivadas de médula ósea son cultivos heterogéneos, donde más bien, es posible encontrar diversos tipos celulares de macrófagos y células dendríticas⁷⁶. Por lo que es de esperar que el comportamiento no sea homogéneo, y de ahí la importancia de graficar cada célula en forma individual. Finalmente, al analizar la colocalización de las hemocianinas con Rab5, los resultados sugieren que, al igual que con Lamp-1, es posible encontrar FLH y KLH en compartimentos endosomales tempranos Rab5⁺. CCH, en cambio, no se encuentra en este tipo de compartimentos.

Estos resultados sugieren fuertemente que existirían diferencias en el procesamiento de las hemocianinas, ya que no todas se encuentran compartimentalizadas de la misma forma, ni en la misma proporción. La colocalización con el marcador de endosomas tempranos Rab5 es especialmente importante, ya que se ha descrito que antígenos extracelulares que son presentados en MHC I, se encuentran por largo tiempo en este tipo de compartimentos^{33,35}. Por lo que es plausible sugerir que FLH y KLH efectivamente pueden seguir un procesamiento no-clásico que tenga como consecuencia la presentación cruzada a linfocitos T CD8⁺ vía MHC I, sin embargo, sería importante verificar la presencia de estas proteínas en

compartimentos Rab5⁺ a mayores tiempo de incubación. Por otro lado, la alta colocalización con Rab7 y la menor con Lamp-1, sugiere que la mayoría de la hemocianina endocitada, tanto CCH, FLH como KLH, está siguiendo la ruta endocítica clásica, conformada en primera instancia por endosomas tempranos, seguido por la maduración de aquellas vesículas a endosomas tardíos y finalmente, la fusión con lisosomas que poseen la maquinaria proteolítica para degradar los antígenos que luego serán cargados en moléculas de histocompatibilidad de clase II⁷⁷. Esto concuerda con lo observado previamente por el laboratorio, donde se observó que la mayoría de la hemocianina (CCH) endocitada por BMDCs es internalizada mediante macropinocitosis³, mecanismo que ha sido involucrado con la presentación clásica de antígenos extracelulares mediante MHC II⁴⁰.

8.4. ¿Podrían las hemocianinas ser presentadas a linfocitos T CD8+?

Esta compleja pregunta puede ser abordada experimentalmente desde diferentes aristas. Una de ellas son ensayos funcionales de presentación entre células dendríticas y linfocitos T donde se mide la producción de citoquinas como IL-2, sin embargo, este enfoque posee una desventaja importante, y es que estos ensayos se han realizado históricamente con dos modelos murinos transgénicos para el receptor del linfocito T (TCR), denominados OTI y OTII, los cuales poseen linfocitos T CD8⁺ y TCD4⁺, respectivamente, que responden específicamente a dos

péptidos de la OVA, uno que se presenta en el contexto de MHC-I y otro en MHC-II, respectivamente^{78,79}. Dado que para las hemocianinas no se dispone de animales transgénicos con estas características, un ensayo de presentación antigénica utilizando animales inmunizados con hemocianinas, se torna experimentalmente complicado, ya que no es posible seleccionar los clones de linfocitos T reactivos con péptidos de las hemocianinas, y por el contrario, uno trabaja con un pool de linfocitos T (CD4⁺ y/o CD8⁺), donde está representado todo el repertorio de linfocito T del ratón. De hecho, se ha descrito que la población de células T específicas para un antígeno en animales no inmunizados es menor a un 0,001% del total de linfocitos, y después de una inmunización ese número aumenta solo a un ~0,01% de la población total, dependiendo del antígeno^{80,81}.

Sin embargo, para demostrar la hipótesis aquí planteada, un experimento posible es demostrar que en un animal inmunizado con estas proteínas, existen linfocitos T CD8⁺ que reconocen hemocianina siendo presentada en el contexto de MHC-I, ya sea a través de una célula presentadora de antígeno o de cualquier otra célula que endocite hemocianina y exprese MHC I, como podría ser también una célula epitelial o una célula tumoral. Solo la existencia de estos linfocitos, demostraría inequívocamente que en esa situación ocurrió presentación cruzada, pues a la fecha no se ha descrito otra forma de que un antígeno exógeno sea presentado a linfocitos T CD8⁺. Al respecto, nuestros resultados con macrófagos peritoneales incubados con hemocianinas a diferentes tiempos, muestran que a las 24 hrs

de incubación se produce un aumento de la expresión de MHC-I con FLH (**Figura 24**), lo cual apoya la presentación cruzada de esta hemocianina. En estudios posteriores esperamos evaluar funcionalmente este fenómeno con linfocitos T.

Por otro lado, es importante tener en mente el efecto antitumoral de las hemocianinas y la información que estos modelos nos han entregado. Cabe destacar las observaciones de que la terapia intra-lesional con KLH (en humanos)² o FLH (en ratones)⁸² es más efectiva que la terapia sistémica, lo que sugiere un efecto de las hemocianinas directamente en el lugar del tumor, que podría corresponder a un efecto citotóxico de linfocitos T CD8⁺ anti-hemocianina sobre las células tumorales, si es que estas células presentan péptidos de hemocianina. En efecto, ratones desafiados con una línea de cáncer oral (MOC7), sometidos a inmunoterapia intralesional con FLH o KLH más QS-21, un adyuvante Th1, muestran una reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) positiva frente a FLH o KLH⁸², demostrando que existe una respuesta inmune celular contra estas hemocianinas.

Bajo estos parámetros, y en búsqueda de un modelo que nos permitiera testear la presencia de linfocitos T CD8⁺ específicos para la hemocianina a través de ensayos de citotoxicidad, se decidió estudiar si las células tumorales son capaces de endocitar las hemocianinas, y eventualmente presentarlas en MHC de clase I.

En esta línea, encontramos que las células tumorales evaluadas (MOC7, B16F10 y MB49) son capaces de capturar e internalizar FLH en mucho mayor proporción que CCH o KLH (**Figura 25** y **Figura 27**). Lo cual se correlaciona con la potencia del efecto antitumoral observado en el modelo de melanoma murino con células B16F10 y de cáncer oral con células MOC7, siendo FLH la más efectiva de las tres hemocianinas^{5,82}. Finalmente, para asegurarse que lo que se estaba observado era hemocianina endocitada, se realizó una tinción negativa de células MOC7 incubadas con FLH, confirmándose la presencia de moléculas de hemocianina, distinguibles por su estructura cilíndrica característica y por su tamaño, dentro de vacuolas y vesículas cubiertas de clatrina en la célula tumoral (**Figura 26**).

Ahora bien, cómo proyección de este trabajo se debe confirmar la expresión de la molécula de histocompatibilidad de clase I en los modelos tumorales que se están estudiando, concentrados principalmente en la FLH, ya que es capturada por el 100% de las células a concentraciones moderadas (1 mg/mL), y porque es la que posee un mayor efecto antitumoral. Seguido a esto, se podrán realizar ensayos de citotoxicidad entre linfocitos T CD8+ aislados de animales inmunizados y células tumorales incubadas previamente con hemocianinas.

8.5. Proposición de un modelo que explique el procesamiento y presentación antigénica de FLH

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, y especialmente con la FLH, se propone el modelo que se presenta en la **Figura 29**, y que se resume a continuación.

Las hemocianinas son endocitadas por varios receptores lectina tipo C (MR, DC-SIGN, MGL) y destinadas a diferentes compartimentos subcelulares donde serán procesadas. A tiempos tempranos, es posible encontrarlas mayoritariamente en endosomas tardíos (Rab7⁺), pero también en endosomas tempranos (Rab5⁺) y lisosomas tempranos (Lamp-1⁺). Posteriormente, son procesadas por proteasas lisosomales, que permitirían la generación de péptidos antigénicos que se unen a MHC II para ser presentados a linfocitos T CD4⁺ (vía clásica), y alternativamente, serían procesadas en el citoplasma (proteosoma) o en vesículas, para finalmente ser presentadas en MHC I a linfocitos T CD8⁺ (presentación cruzada).

Se debe destacar que los resultados de este trabajo sientan las bases para comprender cómo las hemocianinas llegan a producir una respuesta antitumoral tan poderosa, que involucra tanto elementos de la inmunidad innata así como los componentes humorales y celulares de la respuesta inmune adaptativa.

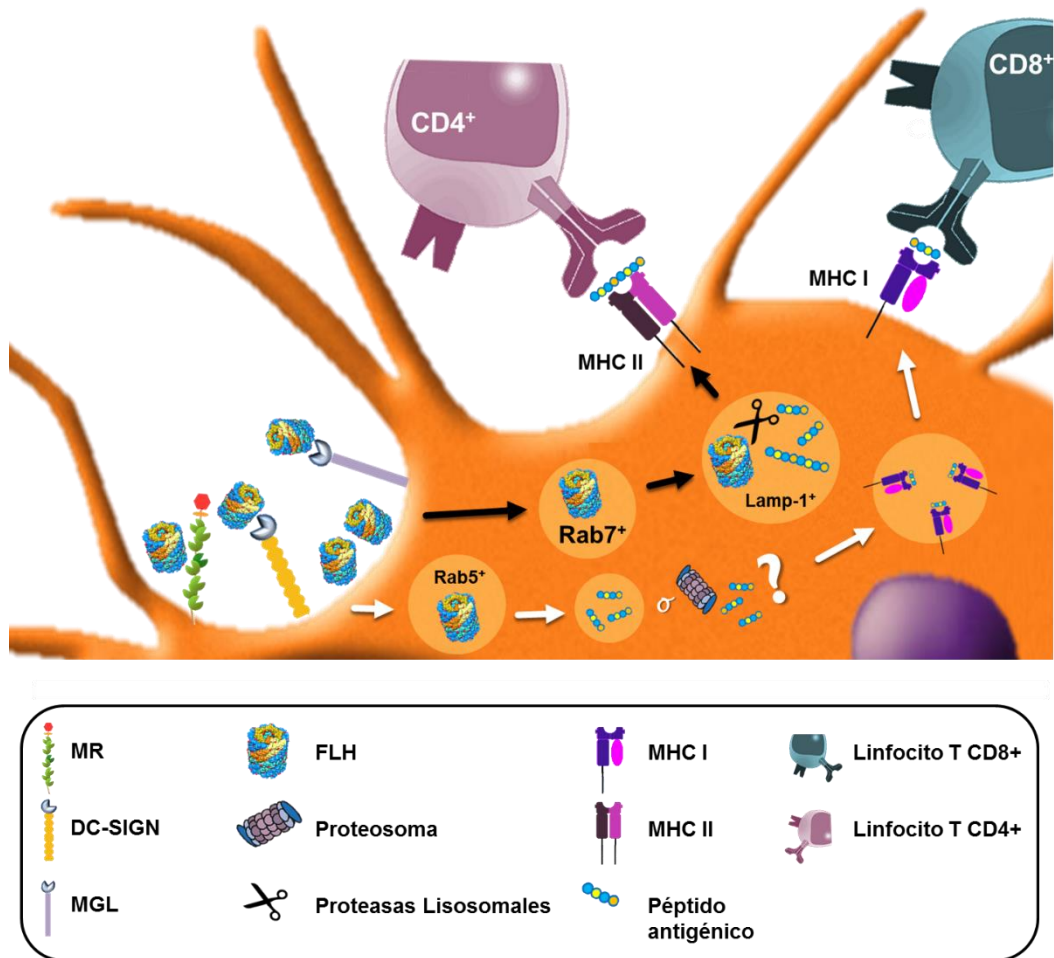


Figura 29. Modelo del procesamiento antigénico de FLH en células presentadoras murinas. Esquema que resume los principales resultados encontrados en esta tesis y que muestra la endocitosis de FLH mediada por CLR y su destinación intracelular a diferentes compartimentos Rab7+, Lamp1+ o Rab5+, que finalmente conducen a la presentación de péptidos antigénicos en MHC II (flechas negras), y en MHC I (flechas blancas) por un mecanismo citoplasmático (mediante proteosoma) o vesicular.

9. CONCLUSIONES

El conjunto de resultados presentados en este trabajo demuestran que:

1. Las tres hemocianinas estudiadas **interactúan** de manera **específica** con DC-SIGN y con el dominio lectina 4 del MR, observándose un comportamiento **dosis-respuesta** de la unión. FLH y KLH interactúan, además, con MGL, resultado que concuerda con la presencia de manosa en las tres hemocianinas y de galactosa solo en FLH y KLH.
2. La afinidad de las hemocianinas por cada receptor varía, siendo KLH la más afín tanto a MR como DC-SIGN. Sin embargo todas presentan **constantes de afinidad significativas** en el contexto biológico en que la interacción ocurriría. En el caso de MGL, es FLH más afín que KLH por este receptor.
3. Los estudios *in vitro* con una línea de células CHO que sobreexpresa el MR, muestra que este receptor participa en la **endocitosis** de las tres hemocianinas.

4. Los estudios *in vitro* con células presentadoras de antígeno **humanas** (células dendríticas y macrófagos) que expresan MR y DC-SIGN, muestran que estos receptores participan en la **captura** de hemocianinas.
5. En las células dendríticas murinas DC2.4 y en macrófagos intraperitoneales murinos, la **inhibición parcial y significativa** de la incorporación de hemocianinas generada por EDTA y D-Manosa, sugiere que la captura de hemocianina ocurre parcialmente por receptores lectina tipo C (dependientes de Ca^{+2}) que reconocen manosa.
6. Las tres hemocianinas estudiadas son destinadas mayoritariamente a compartimentos que corresponden a endosomas tardíos. La principal diferencia entre ellas, fue la **ausencia de CCH en endosomas tempranos**, a diferencia de FLH y KLH, sugiriendo que la ruta endocítica que siguen estas proteínas una vez internalizadas por las APCs, no es la misma para todas las hemocianinas; y que FLH y KLH podrían estar siguiendo una **ruta de procesamiento alternativa**, que las conduce a ser presentadas en el contexto de MHC-I a linfocitos T CD8⁺.

7. Macrófagos peritoneales cultivados *in vitro* con las tres hemocianinas muestran que a las 24 horas se produce un **aumento** significativo de los **MHC-I** con FLH, sugiriendo fuertemente que se trata de presentación cruzada, lo cual debe ser corroborado mediante ensayos funcionales con linfocitos T.

8. Finalmente, se destaca que este es el primer trabajo en que se investiga la interacción de las hemocianinas con receptores, y la incorporación y presentación cruzada de hemocianinas por APCs, sentando las bases para llegar a comprender como las hemocianinas ejercen su efecto inmunomodulador potenciador de la respuesta inmune antitumoral.

10. REFERENCIAS

1. Del Campo, M. *et al.* Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina. *Rev Med Chile* **21**, 236–246 (2011).
2. Arancibia, S., Salazar, F. & Becker, M. in *Bl. Cancer - From Basic Sci. to Robot. Surg.* (Canda, A.) (InTech, 2012). doi:10.5772/28281
3. Arancibia, S., Del Campo, M., Nova, E., Salazar, F. & Becker, M. I. Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur. J. Immunol.* **42**, 688–699 (2012).
4. Harris, J. . & Markl, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* **30**, 597–623 (1999).
5. Arancibia, S. *et al.* A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One* **9**, 1–12 (2014).
6. Riggs, D. R., Jackson, B., Vona-Davis, L. & McFadden, D. In Vitro Anticancer Effects of a Novel Immunostimulant: Keyhole Limpet Hemocyanin. *J. Surg. Res.* **108**, 279–284 (2002).
7. De Ioannes, P. *et al.* Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 26134–26142 (2004).
8. Moltedo, B. *et al.* Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J. Urol.* **176**, 2690–2695 (2006).
9. McFadden, D. W., Riggs, D. R., Jackson, B. J. & Vona-Davis, L. Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Am. J. Surg.* **186**, 552–555 (2003).
10. Markl, J. Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1840–1852 (2013).
11. Oliva, H. *et al.* Monoclonal Antibodies to Molluscan Hemocyanin from *Concholepas concholepas* Demonstrate Common and Specific Epitopes among Subunits. *Hybrid. Hybridomics* **21**, 365–374 (2002).
12. Wuhrer, M., Robijn, M. L. M., Koeleman, C. A. M., Balog, C. I. A. & Geyer, R. A novel Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem. J.* **378**, 625–632 (2004).

13. Matsuno, A. *et al.* Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin. *J. Struct. Biol.* **190**, 379–382 (2015).
14. Gatsogiannis, C. & Markl, J. Keyhole limpet hemocyanin: 9-A CryoEM structure and molecular model of the KLH1 didecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. *J. Mol. Biol.* **385**, 963–983 (2009).
15. Kurokawa, T. *et al.* Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(β 1-6)Man-motifs. *Eur. J. Biochem.* **269**, 5459–5473 (2002).
16. Geyer, H., Wuhrer, M., Resemann, A. & Geyer, R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* **280**, 40731–40748 (2005).
17. Wirguin, I., Suturkova-milosevi, L., Briani, C. & Latov, N. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(B1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother* **40**, 307–310 (1995).
18. Medzhitov, R. & Janeway, C. a. Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
19. Alfaro, C., Oñate, C., Rodríguez, A. & Sanmamed, M. F. De. Células dendríticas especializadas en presentación de antígenos exógenos a linfocitos T citotóxicos antigens to cytotoxic T lymphocytes. **36**, 519–538 (2013).
20. Abbas, A. K., Murphy, K. M. & Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787–793 (1996).
21. O'Garra, A. Cytokines Induce the Development of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets. *Immunity* **8**, 275–283 (1998).
22. Russ, B. E., Prier, J. E., Rao, S. & Turner, S. J. T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front. Genet.* **4**, 1–10 (2013).
23. Martinez-Pomares, L. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1177–1186 (2012).
24. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
25. Lepenies, B., Lee, J. & Sonkaria, S. Targeting C-type lectin receptors with multivalent carbohydrate ligands. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1271–1281 (2013).

26. Vázquez-mendoza, A., Carrero, J. C. & Rodríguez-sosa, M. Parasitic Infections: A Role for C-Type Lectins Receptors. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–11 (2013).
27. Becer, C. R. *et al.* High-Affinity Glycopolymer Binding to Human DC-SIGN and Disruption of DC-SIGN Interactions with HIV Envelope Glycoprotein. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 15130–15132 (2010).
28. Mitchell, D. a, Fadden, a J. & Drickamer, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* **276**, 28939–28945 (2001).
29. Kerrigan, A. M. & Brown, G. D. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* **214**, 562–575 (2009).
30. Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 491–529 (2012).
31. Carbone, B. F. R. & Bevan, M. J. Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo I. *J Exp Med* **171**, 377–387 (1990).
32. Hari, A. *et al.* Redirecting soluble antigen for MHC class I cross-presentation during phagocytosis. *Eur. J. Immunol.* **00**, 1–13 (2014).
33. Kreer, C., Rauen, J., Zehner, M. & Burgdorf, S. Cross-presentation : how to get there – or how to get the ER. **2**, 1–10 (2012).
34. Wiertz, E. J. H. J. *et al.* Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432–438 (1996).
35. Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R. & Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat. Immunol.* **9**, 558–566 (2008).
36. Kamphorst, A. O., Guermonprez, P., Dudziak, D. & Nussenzweig, M. C. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J. Immunol.* **185**, 3426–3435 (2010).
37. Kolter, T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem.* **2012**, 1–36 (2012).
38. Shresta, S., Pham, C. T. N., Thomas, D. A., Graubert, T. A. & Ley, T. J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Cancer* **10**, 581–587 (1998).
39. Zhong, T.-Y. *et al.* Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *J. Immunol.* **196**, 000–000 (2016).

40. Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. a & Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*. **316**, 612–616 (2007).
41. Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M. L. & Della Bella, S. Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol. Immunol.* **45**, 1136–1145 (2008).
42. Arancibia, S. Participación de receptores tipo-lectina en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral de hemocianinas de moluscos en mamíferos. Tesis para obtener el grado de doctor. *Universidad de Chile* (2012).
43. Wainszelbaum, M. J., Proctor, B. M., Pontow, S. E., Stahl, P. D. & Barbieri, M. A. IL4/PGE2 induction of an enlarged early endosomal compartment in mouse macrophages is Rab5-dependent. *Exp. Cell Res.* **312**, 2238–2251 (2006).
44. Zehner, M. *et al.* Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9933–9938 (2011).
45. Tacke, P. J. *et al.* Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* **106**, 1278–1285 (2005).
46. Rauen, J. *et al.* Enhanced cross-presentation and improved CD8+ T cell responses after mannosylation of synthetic long peptides in mice. *PLoS One* **9**, 1–9 (2014).
47. Ramanathan, S., Gagnon, J. & Ilangumaran, S. Antigen-nonspecific activation of CD8+ T lymphocytes by cytokines: relevance to immunity, autoimmunity, and cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **56**, 311–323 (2008).
48. Shen, Z., Reznikoff, G. & Dranoff, G. Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *J. Immunol.* **158**, 2723–2730 (1997).
49. Martinez-Pomares, L. *et al.* Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1074–1082 (2006).
50. Walker, J. M. The protein protocols Handbook 3ed. *Totowa, New Jersey: Humana Press*. 633–636 (1996).

51. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77–92 (1999).
52. Gonçalves, R. & Mosser, D. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 14**, 1–18 (2008).
53. Royer, P.-J. *et al.* The mannose receptor mediates the uptake of diverse native allergens by dendritic cells and determines allergen-induced T cell polarization through modulation of IDO activity. *J. Immunol.* **185**, 1522–1531 (2010).
54. Sorvillo, N. *et al.* The macrophage mannose receptor promotes uptake of ADAMTS13 by dendritic cells. **119**, 3828–3836 (2015).
55. Manosalva, H., De Ioannes, A. E. & Becker, M. I. Development of monoclonal antibodies bearing the internal image of the gizzerosine epitope and application in a competitive ELISA for fish meal. *Hybrid. Hybridomics* **23**, 45–54 (2004).
56. Paveley, R. A. *et al.* The Mannose Receptor (CD206) is an important pattern recognition receptor (PRR) in the detection of the infective stage of the helminth *Schistosoma mansoni* and modulates IFN gamma production. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1335–1345 (2011).
57. Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J. & Hamilton, J. a. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 411–421 (2009).
58. Kiertscher, S. M. & Roth, M. D. Human CD14+ leukocytes acquire the phenotype and fuction of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 208–218 (1996).
59. Fehres, C. M. *et al.* Cross-presentation through langerin and DC-SIGN targeting requires different formulations of glycan-modified antigens. *J. Control. Release* **203**, 67–76 (2015).
60. García-Vallejo, J. J. *et al.* The Consequences of Multiple Simultaneous C-Type Lectin-Ligand Interactions: DCIR Alters the Endo-Lysosomal Routing of DC-SIGN. *Front. Immunol.* **6**, 1–12 (2015).
61. Fehres, C. M., Unger, W. W. J., Garcia-Vallejo, J. J. & van Kooyk, Y. Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Front. Immunol.* **5**, 1–10 (2014).
62. Engering, a. *et al.* The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *J. Immunol.* **168**, 2118–2126 (2002).

63. Reyes, D. *et al.* Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* **109**, 1488–1497 (2013).
64. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 465–79 (2009).
65. Van Vliet, S. J., García-Vallejo, J. J. & van Kooyk, Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol. Cell Biol.* **86**, 580–587 (2008).
66. Schasfoort, R. B. M. *et al.* Handbook of Surface Plasmon Resonance. Cambridge, UK: RSC Publishing. 81–102 (2008).
67. Geijtenbeek, T. B. H. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–597 (2000).
68. Hong, P. W.-P. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Envelope (gp120) Binding to DC-SIGN and Primary Dendritic Cells Is Carbohydrate Dependent but Does Not Involve 2G12 or Cyanovirin Binding Sites: Implications for Structural Analyses of gp120-DC-SIGN Binding. *J. Virol.* **76**, 12855–12865 (2002).
69. Zhong, T. Patrón de expresión de citoquinas y quimioquinas de células presentadoras de antígenos murinas en respuesta a estimulación in vitro con hemocianinas de moluscos. (2013).
70. Napoletano, C. *et al.* Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation. *Eur. J. Immunol.* **42**, 936–945 (2012).
71. Li, J., Jiang, H., Wen, W., Zheng, J. & Xu, G. The dendritic cell mannose receptor mediates allergen internalization and maturation involving notch 1 signalling. *Clin. Exp. Immunol.* **162**, 251–261 (2010).
72. Freire, T. *et al.* Glycosidic Tn-based vaccines targeting dermal dendritic cells favor germinal center B-cell development and potent antibody response in the absence of adjuvant. *Blood* **116**, 3526–3536 (2010).
73. Denda-Nagai, K. *et al.* Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J. Biol. Chem.* **285**, 19193–19204 (2010).
74. Valladeau, J. *et al.* Langerin, a Novel C-Type Lectin Specific to Langerhans Cells, Is an Endocytic Receptor that Induces the Formation of Birbeck Granules. *Immunity* **12**, 71–81 (2000).

75. Nagaoka, K. *et al.* Expression of C-type lectin, SIGNR3, on subsets of dendritic cells, macrophages, and monocytes. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 913–924 (2010).
76. Helft, J. *et al.* GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c+MHCII+ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* **42**, 1197–1211 (2015).
77. Watts, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 821–850 (1997).
78. Barnden, M. J., Allison, J. A. N., Heath, W. R. & Carbone, F. R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).
79. Clarke, S. R. *et al.* Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 110–117 (2000).
80. Kisielow, P., Blüthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. & von Boehmer, H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **333**, 742–746 (1988).
81. Kisielow, P., Sia Teh, H., Blüthmann, H. & von Boehmer, H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* **335**, 730–733 (1988).
82. Mora, J. J. Efecto inmunomodulador de hemocianinas de moluscos combinadas con adyuvantes de vacuna en cáncer oral murino. Tesis para obtener el grado de magíster. *Universidad de Chile* (2015).