

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



**PARTICIPACIÓN DE RECEPTORES TIPO-LECTINA
EN LA INMUNOGENICIDAD Y EN EL EFECTO
ANTITUMORAL DE HEMOCIANINAS DE
MOLUSCOS EN MAMIFEROS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Bioquímica

Sergio Arancibia Zunino

Directora de Tesis:

María Inés Becker C., Ph.D.

**Santiago-Chile
2012**

Esta Tesis fue desarrollada en la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED) y en el Area de Investigación y desarrollo de BIOSONDA S.A.

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis fue financiada parcialmente por los siguientes Proyectos: Fundación COPEC-Pontificia Universidad Católica CQ057 y FONDECYT 105-0150 y 1110651. Además, se recibió el apoyo de BIOSONDA S.A., y de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

Durante el desarrollo de este trabajo, se recibió el apoyo de una Beca CONICYT regular (marzo/2008 a marzo/2011) y una Beca de Extensión de CONICYT (marzo/2011 a agosto/2011).

PUBLICACIONES

Los resultados originados de esta Tesis han sido publicados en:

Revistas Indexadas

- **Arancibia S**, Del Campo M, Nova E, Salazar F, Becker MI. Enhanced structural stability of *Concholepas* hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. Eur. J. Immunol. (2011). DOI: 10.1002/eji.201142011
- Del Campo M, **Arancibia S**, Nova E, Salazar F, González A, Moltedo B, De loannes P, Ferreira J, Manubens A, Becker MI. Hemocianins as immunostimulants. Revista Médica de Chile 139: 236-246 (2011).
- **Arancibia S**, Espinoza C, Salazar F, Del Campo M, Moltedo B, De loannes P, Ferreira J, Manubens A, De loannes AE, Becker MI. Novel hemocyanin from *Fissurella latimarginata* exhibits an outstanding immunogenicity and adjuvant-immunostimulatory effects in a mouse melanoma model. **(Manuscrito en preparación)**

Capítulos de Libros

- **Arancibia S**, Salazar F, Becker MI. Hemocyanins in the immunotherapy of superficial bladder cancer. En: Bladder Cancer. Intech Publishing. Chapter 11, pag. 221- 242 (2012).

Presentaciones a Congresos Internacionales

- **Arancibia S**, Del Campo M, De loannes AE, Becker MI. Evaluation of the role of sugar moieties of *Concholepas concholepas* hemocyanin (CCH) immunological effects, in dendritic cells (DC) and in a mouse melanoma model. 9th Latin American Congress of Immunology, Viña del Mar, Chile. Noviembre 2009.
- **Arancibia S**, Espinoza C, Del Campo M, Becker MI. Exceptional immunologic and anticancer properties of a new hemocyanin from *Fissurella latimarginata* (FLH). 25th Annual Meeting International Society of Biological Therapy of Cancer. October 2010. Washington, USA. J Immunother. 33 (8): 891. 2010.

- **Arancibia S.** Espinoza, C, Del Campo M, Salazar F, Manubens A, De Ioannes A, Becker MI. *Fissurella latimarginata* hemocyanin exhibits outstanding adjuvant properties for potential use in therapeutic vaccines against cancer. Mainz, Alemania. 9th Annual Meeting Cancer Immunotherapy. Mainz, Alemania 25-27 Mayo 2011. Abstract pág.140. 2011

Presentaciones a Congresos Nacionales

- **Arancibia S.** Espinoza C, Del Campo M, Salazar F, Manubens A, Becker MI. *Fissurella latimarginata* hemocyanins a novel non-specific immunostimulant and antitumor agent. XXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. 1-5 Noviembre. Pucón, Chile. Libro Resúmenes Pág. 63, 2010.
- **Arancibia S.** Del Campo M, Becker MI. The deglycosylation of *Concholepas concholepas* hemocyanins enhances its immunogenicity. Reunión Anual de la Sociedad de Biología Celular de Chile. 1-5 Noviembre. Pucón, Chile. Libro Resúmenes Pág. 83, 2010.

ESTADÍAS INTERNACIONALES DE INVESTIGACIÓN

Estudio del efecto de las hemocianinas de moluscos sobre la inmunidad innata: evaluación de la activación del inflammasoma. Adjuvant Research Group, School of Biochemistry and Immunology, Trinity College, Dublin, Irlanda.

Profesor responsable Dr. Edward Lavelle. 1 Agosto 2011 - 1 Marzo 2012.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir por agradecer a mi tutora, la Dra. María Inés Becker por su incansable e incondicional apoyo y amistad.

A los chicos del laboratorio y al personal de Biosonda, por su ayuda y los gratos momentos compartidos.

A mi familia por estar siempre presentes

Y a Carroll por todo su amor, apoyo y por los buenos momentos que hemos compartidos a lo largo de este camino.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. ABREVIATURAS	1
2. RESUMEN	3
2.1 SUMMARY	5
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Hemocianinas	8
3.2 Sistema inmune	12
3.3 Célula presentadora de antígenos (APC)	12
3.4 Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)	14
3.5 La familia de receptores de manosa	16
3.6 Receptor de manosa (MR)	17
3.7 Carbohidratos de hemocianinas y su relación con células tumorales	20
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivos generales	24
5.2 Objetivos específicos	25
6. MATERIALES	26
6.1 Animales de Experimentación	26
6.2 Líneas Celulares	26

7. REACTIVOS	27
7.1 Proteínas	27
7.2 Anticuerpos y citoquinas	27
7.3 Reactivos para cultivo celular	27
7.4 Reactivos químicos	28
8. MÉTODOS	29
8.1 Cultivo celular	29
8.1.1 Líneas Celulares	29
8.1.2 Cultivo Primario de DCs	29
8.1.3 Macrófagos peritoneales	30
8.2 Ensayo de proliferación celular	30
8.3 Determinaciones y ensayos bioquímicos	31
8.3.1 Tinción de PAS (<i>Peryodic acid Schiff</i>)	31
8.4 Desglicosilación de hemocianinas	31
8.4.1 Desglicosilación enzimática	31
8.4.2 Desglicosilación química	32
8.4.3 Ensayo de digestión con tripsina y proteinasa K	32
8.5 SDS-PAGE e <i>Inmunoblots</i>	32
8.5.1 Hemocianinas	32
8.5.2 Extractos de células	33
8.5.3 <i>Inmunoblots</i>	33
8.5.4 Geles nativos	34
8.6 Determinaciones Inmunoquímicas	34
8.6.1 <i>Dot blots</i>	34
8.6.2 Ensayo inmunoenzimática en fase solida (ELISA)	35
8.6.2.1 ELISA para determinar anticuerpos anti-hemocianina	35
8.6.2.2 ELISA para determinar anticuerpos anti-antígenos de superficie de células B16F10	35

8.6.2.3	ELISA para citoquinas	35
8.7	Determinación de la propiedad de proteína transportadora (<i>carrier</i>) de las hemocianinas	35
8.8	Reacción de Griess	35
8.9	Bioensayos	37
8.10	Actividad de células <i>natural killer</i> (NK)	37
8.11	Citometría de flujo	38
8.11.1	Identificación de células usando marcadores CD	38
8.11.2	Análisis de incorporación de hemocianina	39
8.12	Microscopía electrónica de transmisión	40
8.12.1	Tinción negativa de hemocianinas	40
8.12.2	Líneas celulares y DCs	40
8.13	Estadística	41
9.	RESULTADOS	42
9.1	Caracterización bioquímica y estructural de las hemocianinas desglicosiladas.	42
9.2	Cambios en la estructura de CCH y FLH por efectos del tratamiento de desglicosilación química.	48
9.3	Análisis del efecto antitumoral <i>in vitro</i> de CCH, KLH y FLH.	52
9.3.1	Estudio de la viabilidad de células tumorales murinas enfrentadas a hemocianinas	54
9.4	Estudio de la incorporación de hemocianinas en DCs.	56
9.4.1	Participación de receptores de manosa en la incorporación de CCH en DCs.	57
9.4.2	Tipo de endocitosis involucrada en la internalización de CCH y Ox-CCH	60
9.5	Procesamiento de CCH en DCs.	62
9.6	Bioensayos para evaluar el efecto antitumoral de hemocianinas <i>in vivo</i>	64
9.6.1	Participación de los azúcares en el efecto antitumoral de las hemocianinas en melanoma murino	69

9.7	Respuesta inmune celular antitumoral en ratones desafiados con melanoma.	71
9.8	Respuesta inmune humoral murina frente a las hemocianinas nativas y desglicosiladas	73
9.9	Maduración y activación de DCs por CCH	76
9.9.1	Activación de células NK	78
9.9.2	Producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos estimulados con hemocianinas	80
9.9.3	Producción de citoquinas pro-inflamatorias en DCs	82
9.9.4	Activación del inflamasoma	86
10.	DISCUSION	88
10.1	Efecto de la desglicosilación sobre de la estructura de las hemocianinas de moluscos.	91
10.2	Efecto antitumoral per se de las hemocianinas de moluscos.	92
10.3	Reconocimiento y procesamiento de hemocianinas por el sistema inmune.	93
10.4	Respuesta antitumoral de hemocianinas en un modelo murino de melanomas.	96
10.5	Modelo de activación del sistema inmune por hemocianinas	99
11.	CONCLUSIONES	101
12.	REFERENCIAS	104
	ANEXO	113

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Representación general de la estructura de las hemocianinas de molusco	10
Figura 2.	Esquema de las diferencias estructurales entre las hemocianinas KLH y CCH	10
Figura 3.	Esquema de los dominios del receptor de manosa	18
Figura 4.	Caracterización de hemocianinas desglicosiladas	45
Figura 5.	Caracterización de hemocianinas de lapas de la familia <i>Fissurellidae</i>	47
Figura 6.	Modificaciones de CCH por los tratamientos de desglicosilación	50
Figura 7.	Tinción negativa de las hemocianinas	51
Figura 8.	Endocitosis de CCH y efecto sobre la expresión de MHC-I en células de melanoma (B16F10) y de cáncer superficial de vejiga (MB-49)	53
Figura 9.	Efecto de hemocianinas sobre la viabilidad de líneas de melanoma murino y humano	55
Figura 10.	Participación de receptores de manosa en la incorporación de CCH en DCs	59
Figura 11.	Tipos de endocitosis de CCH	61
Figura 12.	Procesamiento de CCH por DCs cultivadas <i>in vitro</i>	63
Figura 13.	Determinación del número de células de melanoma de la línea B16F10 a utilizar en un bioensayo antitumoral para probar el efecto inmunoterapéutico de las hemocianinas	65
Figura 14.	Efecto antitumoral no-específico de hemocianinas en melanoma murino	68
Figura 15.	Análisis del efecto antitumoral de la remoción de los azúcares de CCH y FLH	70
Figura 16.	Perfil de IFN- γ en animales desafiados con células tumorales de melanoma y sometidos a inmunoterapia con distintas hemocianinas	72
Figura 17.	Respuesta inmune humoral contra las hemocianinas en estudio	75
Figura 18.	Maduración de células dendríticas por CCH	77
Figura 19.	Actividad de células NK de ratones <i>naïve</i> mediante un ensayo de liberación de $^{51}\text{Cromo}$	78
Figura 20.	Activación de macrófagos por hemocianinas	81
Figura 21.	FLH induce la secreción de varias citoquinas pro-inflamatorias	83
Figura 22.	Los azúcares de FLH son fundamentales para la secreción IL-6 e IL-12	84
Figura 23.	La liberación de citoquinas pro-inflamatorias por FLH es dependiente de Syk quinasa	85
Figura 24.	KLH y FLH inducen la secreción de IL-1 α e IL-1 β .	87
Figura 25.	Modelo de activación del sistema inmune por las distintas hemocianinas	100

1. ABREVIATURAS

ADCC	:	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
APC	:	Célula presentadora de antígeno.
ASGP-r	:	Receptores asialoglicoproteicos
BCR	:	Receptor del linfocito B
BMDCs	:	Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea
BSA	:	Albúmina sérica bovina.
CCH	:	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
CD	:	Grupos de diferenciación (<i>Cluster of differentiation</i>).
CTL	:	Linfocitos T citotóxicos
DMEM	:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco's
DCs	:	Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea
DC-SIGN	:	DC-specific ICAM grabbing non-integrin
ELISA	:	Ensayo inmuno enzimático en fase sólida
FAL	:	Fosfatasa alcalina
FCH	:	Hemocianina de <i>Fissurella cumingi</i>
FLH	:	Hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>
FMH	:	Hemocianina de <i>Fissurella maxima</i>
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
GM-CSF	:	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
HP	:	Peroxidasa de rábano
ILs	:	Interleuquinas
INF- γ	:	Interferón gama
KLH	:	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i> (<i>Keyhole limpet</i>)
KO	:	Ratones <i>knock-out</i> para un gen
Lamp-1	:	Proteína de membrana asociada al lisosoma
LB	:	Linfocito B
LPS	:	Lipopolisacárido
LT	:	Linfocitos T
MET	:	Microscopía electrónica de transmisión
MHC-I	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MR	:	Receptor de manosa

NLRs	:	Receptor dominio tipo oligomerización de nucleótidos
NK	:	Células asesinas naturales
NKT	:	Células asesinas naturales tipo linfocito
OVA	:	Ovoalbúmina
Ox-CCH	:	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i> desglucosilada
Ox-FLH	:	Hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i> desglucosilada
Ox-KLH	:	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i> desglucosilada
PAPMs	:	Motivos moleculares de patógenos
PBS	:	Tampón fosfato salino
PMSF	:	Fenil metil sulfonilfluoruro
PNGasa F	:	Peptido N-glicosidasa F
SFB	:	Suero fetal bovino
TAA	:	Antígenos asociados a tumores
TCR	:	Receptor de linfocito T
Th1	:	Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 1
Th2	:	Respuesta de linfocitos T helper (CD4 +) tipo 2
TLR	:	Receptores de tipo Toll

2. RESUMEN

Las hemocianinas de moluscos son glicoproteínas que generan una potente activación del sistema inmune de mamíferos direccionando la respuesta hacia un perfil inmunológico de tipo Th1, esto es una respuesta caracterizada por la activación de linfocitos T CD4+ y la secreción de IFN- γ . Esta cualidad ha permitido su amplio uso en biomedicina y en biotecnología como proteínas transportadoras (*carrier*) para producir anticuerpos, como adyuvantes en el desarrollo de vacunas terapéuticas para ciertos cánceres y como inmunoestimulantes no-específicos en la terapia contra el carcinoma superficial de vejiga. Las hemocianinas provenientes de los gastrópodos *Megathura crenulata* (KLH) y *Concholepas concholepas* (CCH) han sido las más utilizadas para estos fines. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares por los cuales dichas proteínas ejercen su efecto inmunológico son muy poco conocidos. En este sentido, KLH y CCH poseen una estructura cuaternaria diferente, sin embargo presentan estructuras oligosacáridas similares, rasgo que ha sido invocado ampliamente en la literatura para explicar el efecto antitumoral de KLH y de las hemocianinas en general, no obstante esta idea no ha sido experimentalmente abordada. Por esta razón, en esta tesis hipotetizamos que: las hemocianinas activan la respuesta innata a través de un receptor de tipo lectina localizado en células presentadoras de antígenos (APCs) generando así un ambiente de citoquinas pro-inflamatorias, que indirectamente potencian la respuesta adaptativa antitumoral.

Es así, que el objetivo general del trabajo experimental estuvo destinado a estudiar la participación de los azúcares de las hemocianinas en la activación de células presentadoras de antígenos (APCs) y su contribución a la inmunogenicidad y la actividad antitumoral de estas proteínas. Para ello, se usaron tres hemocianinas modelo, a saber KLH, CCH y FLH, esta última descubierta recientemente en nuestro laboratorio, proveniente del gastrópodo *Fissurella latimarginata*. Los objetivos específicos incluyeron: 1) Preparar hemocianinas desglicosiladas y caracterizarlas fisicoquímicamente. 2) Determinar la participación de un receptor de tipo lectina en la endocitosis de dichas proteínas por células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) cultivadas *in vitro*. 3) Analizar la contribución de los azúcares en la activación de BMDCs y macrófagos peritoneales y 4) Estudiar la participación de los azúcares en la inmunogenicidad y el efecto antitumoral de las hemocianinas usando por primera vez un modelo murino de melanoma, ya que numerosas vacunas terapéuticas usan hemocianina como *carrier*/adyuvante de antígenos asociados (TAA) a dicho cáncer.

Entre los principales resultados, se destacan los siguientes. Análisis con lectinas biotiniladas mostraron diferencias en la composición de azúcares entre las distintas hemocianinas empleadas. Por una parte, las hemocianinas provenientes de la familia *Fissurellidae* (KLH y FLH) poseen el disacárido Gal-(β 1-3)-GalNAc que generalmente se encuentra en estructuras de tipo *O-linked*, y además α -manosa terminal asociado a estructuras de tipo *N-linked*. En contraste, CCH sólo presentó en común con ellas el residuo α -manosa terminal. Las hemocianinas fueron desglicosiladas a través de un procedimiento químico que utiliza peryodato de sodio con el cual se logró oxidar todos los carbohidratos, demostrándose al microscopio electrónico de transmisión (MET) que la estructura cuaternaria de las hemocianinas oxidadas fue similar a la nativa. Sin embargo, diversos análisis electroforéticos de las proteínas

desglicosiladas y tratadas con enzimas proteolíticas mostraron que este procedimiento además de remover los carbohidratos también generó cambios intra-moleculares en la proteína, debido a la formación de bases de Schiff.

Contrario a lo esperado, CCH desglicosilada (Ox-CCH) fue igualmente incorporada que su forma nativa por BMDCs, principalmente por macropinocitosis y en menor medida por vesículas recubiertas de clatrina. Ox-CCH presentó una mayor resistencia a ser proteolizada, ya sea *in vitro* o *in vivo*, acumulándose por mayor tiempo en estructuras de tipo endosomal y en la membrana plasmática de BMDCs, fenómeno que además fue corroborado mediante *Western blot*, analizando el procesamiento de otro antígeno modelo como es ovoalbúmina (OVA). Estas características aumentaron significativamente su inmunogenicidad en comparación con la proteína nativa. A pesar de esto, la estimulación de BMDCs con CCH y Ox-CCH, *in vitro*, no indujo la expresión de marcadores de maduración (MHC-II, CD80, CD86 y CD40) hasta las 72 horas de tratamiento, ni promovió la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, a diferencia de FLH que si lo hizo, induciendo la secreción de IL-6, IL-23, IL-12p40 y TNF- α .

La inmunogenicidad y antigenicidad de Ox-CCH fue superior a la de su forma nativa, sin embargo no se observó un efecto similar con Ox-KLH. Por otra parte, la capacidad de inmunostimulación no-específica de las hemocianinas nativas, analizadas en el modelo murino de melanoma B16F10 mostraron que las terapias ya sea con CCH, KLH o FLH redujeron significativamente el volumen del tumor y aumentaron la supervivencia de los ratones, fenómeno que también se observó con Ox-CCH pero no con Ox-FLH. Al respecto y asombrosamente, la forma nativa de FLH demostró tener capacidades antitumorales significativamente superiores a CCH y KLH, hecho que motivó la búsqueda de los factores que dan cuenta de esta propiedad. Es así que estudios en desarrollo, sugieren fuertemente que la vía de señalización por la cual FLH promueve la secreción de citoquinas pro-inflamatorias depende casi exclusivamente de la quinasa spleen tyrosine kinase (syk), sugiriendo fuertemente la participación de algún receptor de lectina tipo-C.

En conclusión, en esta tesis se demuestra que una de las causas de la inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos en mamíferos es su lento procesamiento por células presentadoras de antígeno y sorprendentemente, que hemocianinas diferentes pueden inducir vías de activación inmunológica diferentes, por el hecho que la eliminación de sus azúcares afecta diferencialmente sus propiedades inmunogénicas y antitumorales. Es así que postulamos que los componentes oligosacáridos de CCH y KLH no son determinantes ni en su inmunogenicidad ni en su efecto antitumoral no específico, a diferencia de lo observado en FLH, en que aunque la eliminación de sus componentes oligosacáridos no afectó su inmunogenicidad si fueron determinantes en sus superiores propiedades inmunostimulantes no-específicas, abriendo así nuevas interrogantes sobre las propiedades estructurales que posee cada una de estas proteínas para activar la respuesta del sistema inmune.

2.1 SUMMARY

Mollusk hemocyanins are glycoproteins that generate a strong activation of mammal's immune system leading to a Th1 immune profile, which is characterized by the activation of CD4+ T cells and IFN- γ secretion. This property has led their wide use in biomedicine and biotechnology as carrier protein to produce antibodies, as adjuvants in the development of therapeutic vaccines for certain cancers and as non-specific immunostimulant in superficial bladder carcinoma therapy. Hemocyanins from the gastropod *Megathura crenulata* (KLH) and *Concholepas concholepas* (CCH) have been the most commonly used for these purposes. However, the cellular and molecular mechanisms by which these proteins exert their immune effects are still poorly understood. KLH and CCH have a different quaternary structure; however they exhibit similar oligosaccharide structures that have been invoked extensively in literature to explain the antitumor effect of KLH and hemocyanins in general. Nevertheless, this idea has not been experimentally addressed yet. For this reason, in this thesis we hypothesized that: hemocyanins activate the innate immune response through the engagement to a lectin-like receptor located in antigen presenting cells (APCs), promoting the release of pro-inflammatory cytokines, which indirectly enhance the antitumor adaptive response.

The overall objective of this thesis was designed to study the involvement of hemocyanins sugars-moieties in the activation of APCs and their contribution to the immunogenicity and antitumor activity of these proteins. To do this, we used three model hemocyanins: KLH, CCH and FLH, being the latter recently discovered in our laboratory from the gastropod *Fissurella latimarginata*. The specific objectives included: 1) To prepare and characterize physicochemically the deglycosylated hemocyanins. 2) To determine the involvement of a lectin-like receptor in the endocytosis of these proteins by bone marrow-derived dendritic cells (BMDCs) cultured in vitro. 3) To analyze the contribution of the sugars-moieties in the activation of BMDCs and peritoneal macrophages. 4) To study the role of the oligosaccharides in the immunogenicity and antitumor effect of hemocyanins, using for the first time a melanoma mouse model.

Biotinylated lectins analysis showed differences in the oligosaccharide composition among the hemocyanins. On the one hand, the *Fissurellidae* family of hemocyanins (KLH and FLH) has the disaccharide Gal-(β 1-3)-GalNAc, which is usually found in O-linked structures, and also terminal α -mannose residue that is associated with N-linked oligosaccharides. In contrast, CCH only presents in common with KLH and FLH the terminal α -mannose residue. Hemocyanins were deglycosylated by a chemical procedure using sodium periodate to oxidize all the carbohydrates, showing, by transmission electron microscopy (TEM), that the quaternary structure of the oxidized hemocyanins was similar to the native protein. However, several electrophoretic analyses of the deglycosylated proteins, which were also treated with proteolytic enzymes, showed that this procedure, besides of removing the carbohydrates, generated intra-molecular changes within the protein, due to the formation of Schiff bases.

Contrary to our expectations, deglycosylated CCH (Ox-CCH) was endocytosed faster than its native form by BMDCs, mainly through the process of macropinocytosis and to a lesser extent by clathrin-coated vesicles. Ox-CCH presented a higher resistance to proteolysis, *in vitro* and *in vivo*, being accumulated for a longer period in endosomal-like structures and in the plasmatic membrane of BMDCs. This phenomenon was also confirmed with western blot analysis by comparing the processing of CCH versus another model antigen, ovalbumin (OVA). These characteristics significantly increased the immunogenicity of Ox-CCH compared to the native protein. Despite of this, the stimulation of BMDCs with Ox-CCH and CCH, *in vitro*, did not induce the expression of maturation markers (MHC-II, CD80, CD86 and CD40) up to 72 hours of treatment, or promoted the secretion of pro-inflammatory cytokines, unlike to FLH that produced the secretion of IL-6, IL-23, IL-12p40 and TNF- α .

The immunogenicity and antigenicity of Ox-CCH was superior to its native form. However, this effect was not observed with Ox-KLH. Moreover, the non-specific immunostimulatory effects of native hemocyanins were analyzed in a murine B16F10 melanoma model. The results showed that CCH, KLH and FLH significantly reduced the tumor volume and increased mice survival. Surprisingly, the native form of FLH presented a higher antitumor effect than CCH and KLH, which led us to search the factors that explain this property. Thus, ongoing studies strongly suggest that the signaling pathway by which FLH promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines depends almost exclusively on spleen tyrosine kinase (Syk), indicating the participation of a C-type lectin receptor.

Finally, this thesis demonstrates that the immunogenicity of mollusks hemocyanins in part depends of its slow processing by antigen presenting cells and, surprisingly, that hemocyanins can activate different immune pathways by the fact that the elimination of their sugars-moieties differentially affect their immunogenic and antitumor properties. Thus, we postulate that the oligosaccharides components of CCH and KLH are not determinant for their immunogenicity or non-specific antitumor effect, unlike FLH, that although the elimination of its oligosaccharides components did not affect their immunogenicity, they were determinants of its superior non-specific immunostimulatory properties. This result opens up new questions about the structural properties that these proteins possess to activate the immune system response.

3. INTRODUCCIÓN

Las variadas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas de las hemocianinas de moluscos y particularmente las de algunos gastrópodos, han llevado a un creciente interés por entender la relación entre sus notables rasgos estructurales, su adyuvanticidad y su efecto antitumoral en mamíferos, destacándose como uno de los más poderosos inmunógenos naturales, aunque se conoce muy poco de los mecanismos inmunológicos involucrados. Se ha invocado su xenogenicidad, enorme tamaño, compleja estructura cuaternaria y presencia de carbohidratos para explicar sus propiedades inmunológicas, sin embargo estas han sido pobremente exploradas experimentalmente [1].

Actualmente las aplicaciones clínicas de las hemocianinas incluyen: transportador de antígenos asociados a tumores (TAA) en vacunas experimentales contra cáncer, adyuvante en inmunoterapia de tumores que utilizan células dendríticas cargadas con extractos tumorales y además, por sí solas, se utilizan como inmunoestimulante no-específico en el tratamiento del cáncer superficial de vejiga . Curiosamente, por más de 30 años para todos estos usos se ha empleado exclusivamente la hemocianina conocida como KLH, proveniente del molusco Californiano Keyhole limpet (*Megathura crenulata*), simplemente porque fue la primera utilizada [2], desconociéndose si otra hemocianina podría ser igualmente eficiente como agente inmunomodulador. Nuestro grupo de investigación, demostró por primera vez que la hemocianina obtenida del molusco Chileno Loco (*Concholepas concholepas*), conocida como CCH, tenía características inmunoestimulantes comparables a KLH. Interesantemente, un análisis detallado de su estructura demostró que ambas hemocianinas no solo difieren en su origen si no también en su organización, sin embargo, se demostró que ambas hemocianinas inducen una respuesta inmune similar: activan respuestas celulares y humorales de tipo Th1 [3, 4]. Recientemente, hemos descrito una nueva hemocianina proveniente de la lapa *Fissurella latimarginata*, denominada FLH, que presenta propiedades inmunogénicas y antitumorales significativamente superiores a KLH y

CCH [5], desconociéndose a la fecha cuáles son sus atributos estructurales que le confieren estas propiedades.

Considerando que los efectos inmunológicos que producen dichas hemocianinas no requieren de adyuvantes adicionales, la pregunta que surge es **¿cómo estas proteínas inician la respuesta inmune?** Una posibilidad es que los azúcares presentes en la proteína puedan jugar un rol en promover señales inflamatorias que estimulen células de la respuesta innata y que de esta forma se potencien respuestas inmunes latentes en los ganglios periféricos que potencien indirectamente una respuesta adaptativa antitumoral. Por esta razón, en esta tesis hemos abordado experimentalmente, por primera vez, el estudio del rol que juegan los azúcares en las propiedades inmunogénicas y antitumorales de las hemocianinas, usando como modelos KLH, CCH y FLH, ya sea todas en paralelo o alguna de ellas en forma particular, y especialmente CCH, por su estabilidad y porque se disponía de cantidades ilimitadas, dependiendo de la serie experimental.

A continuación se resumen los antecedentes que dan el marco conceptual a los diferentes aspectos involucrados en esta Tesis.

3.1 Hemocianinas

Las hemocianinas son metalo-glicoproteínas de alto peso molecular, presentes en la hemolinfa de algunos moluscos y artrópodos. Estas proteínas poseen átomos de cobre en su estructura, que les permiten unir, transportar y liberar tanto oxígeno como monóxido de carbono (O_2 y CO) durante la respiración. Los sitios de unión a oxígeno se caracterizan por poseer dos átomos de cobre coordinados a la proteína por una triada de residuos de histidina, que al unirse al O_2 muestran una cinética de unión alostérica con algunas de las más altas cooperatividades moleculares observadas en la naturaleza. La afinidad por el oxígeno es, usualmente, sensible al pH, temperatura, fuerza iónica y a cofactores, tales como cloruro, calcio y magnesio [6, 7].

Las hemocianinas de moluscos difieren grandemente de las de artrópodos en su peso, estructura cuaternaria, organización de las subunidades y en la capacidad de unir oxígeno. Estas proteínas al ser observadas mediante tinción negativa en un microscopio electrónico presentan una forma de cilindro hueco, de aproximadamente 35 nm de diámetro y 38 nm de largo, y se caracterizan por poseer una estructura básica constituida por 10 subunidades (de aproximadamente 400 kDa) que se denominan decámeros [7, 8]. Cada subunidad está compuesta de siete a ocho unidades funcionales (FUs), de alrededor de 50 kDa cada una, que se enlazan covalentemente gracias a pequeños segmentos proteicos (de 10 a 15 aminoácidos) denominados "*linkers*". En algunos grupos, como en gastrópodos y bivalbos, la hemocianina adopta una estructura didecámerica (dos decámeros ensamblados de manera axial) conformando gigantescas moléculas con una masa molecular de 8 a 9 MDa (Figura 1a). Las subunidades de las hemocianinas no están unidas covalentemente y por lo tanto pueden ser disociadas modificando el pH y la fuerza iónica, lo cual ha ayudado enormemente al descifrar la estructura de estas proteínas [7].

Las hemocianinas de gastrópodos tienen gran importancia en biomedicina y en biotecnología, porque han demostrado una gran capacidad inmunogénica en vertebrados y especialmente en mamíferos. El mecanismo es aún controversial, ya que no se conoce a cabalidad como estas proteínas son capaces de producir una respuesta inmune tan potente, sin embargo se sabe que son antígenos con una adjuvanticidad intrínseca, timo-dependientes y que su acción depende de la activación de los linfocitos T CD4⁺ [2, 9]. Se ha especulado mucho sobre el mecanismo específico por el cual estas hemocianinas ejercen su efecto inmunológico, algunas de estas explicaciones incluyen la naturaleza xenogénica de la proteína, su gran tamaño, la repetitividad de sus epítomos (hasta 60 veces), y también por el alto porcentaje de azúcares que poseen, en un rango del 2 al 9% de su peso [2].

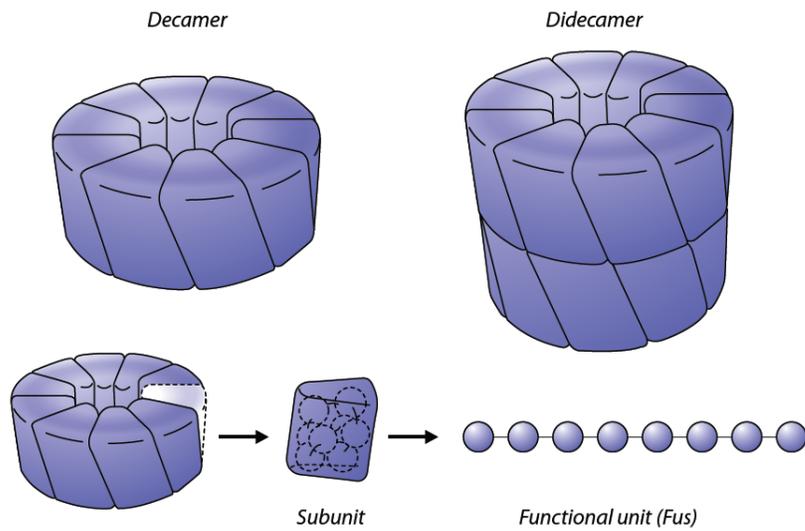


Figura 1. Representación general de la estructura de las hemocianinas de moluscos [10]

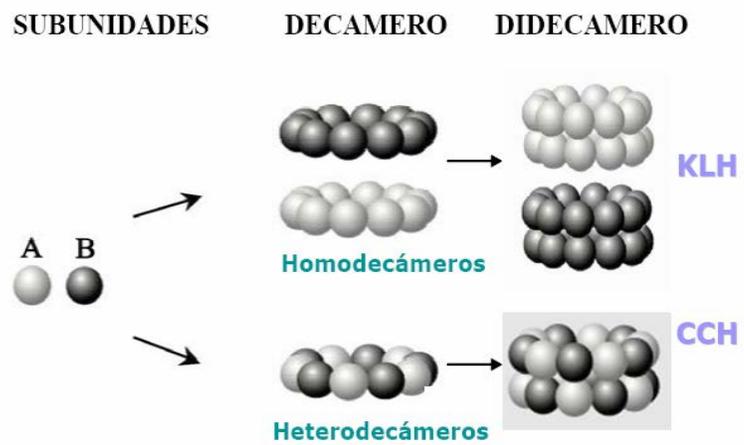


Figura 2. Esquema que representa las diferencias estructurales entre KLH y CCH

Como se mencionó previamente, KLH ha sido una de las más utilizadas para diversos fines tales como, proteína transportadora para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos, en el desarrollo de vacunas contra patógenos y algunos tipos de cáncer, como adyuvante en la presentación antigénica de células dendríticas (DCs) pulsadas con lisados tumorales y como inmunoestimulante no-específico en la terapia del cáncer superficial recurrente de vejiga [2, 11]. Sin embargo, en el último tiempo, han aparecido hemocianinas con propiedades similares a KLH, dentro de las que destacan la de *Rapana thomasiana* (RtH) y la de *Concholepas concholepas* (CCH), siendo esta última la única evaluada y considerada como alternativa a KLH en la inmunoterapia del cáncer superficial de vejiga [4].

Si bien KLH y CCH presentan dos tipos de subunidades, en KLH (formada por las subunidades KLH1 y KLH2) constituyen homodécámeros que se asocian de a pares formando homodidecámeros, que no presentan epítomos comunes y cuya estabilidad dependen del Ca^{+2} y Mg^{+2} en su medio de mantención [12]. En cambio, en CCH, las subunidades (CCHA y CCHB) están entremezcladas, tienen epítomos comunes y se organizan como heterodécámeros que a su vez conforman heterodidecámeros, sin la necesidad de iones divalentes, lo cual le confiere mayor estabilidad comparativa frente a KLH (Figura 2) [3, 13].

Al igual que KLH, CCH, también, ha demostrado poseer importantes propiedades para el campo de la biomedicina tales como en la generación de anticuerpos [14-17], en la terapia del cáncer superficial de vejiga superficial [4], como antígeno experimental [18], y en vacunas [19]. En cuanto a los mecanismos inmunológicos, se sabe que, *in vivo*, KLH y CCH estimulan la actividad citotóxica de células Natural killer (NK) generando un aumento de citoquinas del tipo Th1 (Interferón- γ , IFN γ), siendo fundamental para ello una sensibilización previa [4], e *in vitro*, participa en la activación y maduración de DCs [20]. Por ende mayores estudios se necesitan para dilucidar el mecanismo por el cual las hemocianinas ejercen su potente función inmunológica.

3.2 Sistema Inmune

El sistema inmune comprende una red molecular y celular integrada que protege al organismo de la exposición a sustancias extrañas, el ataque de microorganismos patógenos y el surgimiento de células tumorales. El sistema inmune está compuesto de dos sistemas interconectados: el innato y el adaptativo. El sistema innato posee un primer mecanismo de defensa ante la invasión que no es específico al agresor, y que corresponde a barreras físicas tales como las mucosas, la piel, y factores químicos como el pH. Si estos patógenos o sustancias extrañas logran atravesar dichas barreras se inicia la activación de células especializadas en el reconocimiento y fagocitosis de estos agentes por medio de receptores especializados en el reconocimiento de patógenos (receptores de reconocimiento de patrones, PRRs y el receptor de la célula B, BCR). Al mismo tiempo, comienza la secreción de moléculas solubles en los fluidos corporales, tales como citoquinas, anticuerpos y también se activa el sistema del complemento.

Luego, el antígeno es internalizado, se procesa y es presentado a los Linfocitos T (LT) por medio de células presentadoras de antígeno (APC), en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), iniciando la activación de la respuesta inmune adaptativa. La especificidad clonotípica de los receptores de linfocitos B y T (TCR) es una de las dos propiedades que distinguen el sistema adaptativo del innato. La otra es la memoria inmunológica, que permite efectuar una mayor y más rápida respuesta posterior al primer encuentro con el antígeno, dejando al organismo en una mejor posición para resistir futuros ataques de los microorganismos patógenos [21, 22].

3.3 Células presentadoras de antígenos (APCs)

Una célula presentadora de antígenos puede ser definida como cualquier célula que expresa el complejo mayor de histocompatibilidad o moléculas relacionadas y que une componentes antigénicos que pueden ser reconocidos por los LT vía el receptor de la célula T (TCR) o células NK tipo linfocito T (NKT), siendo estas últimas importantes en

el reconocimiento de glicolípidos a través del receptor CD1. Así, células T citotóxicas (CTL, CD8⁺) y T helper (Th, CD4⁺), reconocen péptidos a través de los complejos MHCI y MHCII, respectivamente.

La mayoría de las células de mamíferos, si es que no todas, pueden funcionar como APCs permitiendo a las células T reconocer lo presentado y comenzar una respuesta inmune apropiada. En general, una vez que los LT son activados pueden responder a cualquier APC que exprese el complejo péptido-MHC para el cual su receptor es específico. A su vez, existen APCs profesionales o especializadas tales como, DCs, Macrófagos (MΦ) y LB, que no solo pueden expresar complejos péptido-MHC, sino que también tienen la capacidad adicional de activar LT vírgenes, a través de la expresión de señales co-estimuladoras y citoquinas que conllevan a la activación del LT e iniciación de la respuesta inmune adaptativa [21, 22].

Las células dendríticas son APCs profesionales que han sido reconocidas como importantes mediadoras de la homeostasis inmunológica. Las DCs de origen humano presentan cuatro subclases: DCs derivadas de monocitos sanguíneos CD14⁺, intersticiales, de Langerhans y plasmocitoideas [23]. En cambio, las DCs murinas han sido clasificadas en dos tipos: mieloides o linfoides. Sin embargo, en el último tiempo han aparecido nuevas subclases demostrando tener un alto grado de complejidad, al igual que las humanas [24]. Al ser APCs profesionales no solo expresan ambos tipos de MHCs y moléculas co-estimuladoras, sino que también secretan varias citoquinas y quimioquinas (como IL-12 e IL-18) que participan en la iniciación y en el aumento de la respuesta de los LT y LB. Estas respuestas incluyen: 1) Inicio de la diferenciación de los LT CD4⁺ hacia el tipo Th1 o Th2., 2) Activación y aumento de la actividad citotóxica de los LT CD8⁺, y 3) Maduración de los LB y producción de anticuerpos [25].

Las DCs derivadas de precursores mieloides o linfoides exhiben un fenotipo inmaduro caracterizado por una alta capacidad fagocítica y una baja expresión de moléculas co-estimuladoras tales como CD40, CD80 y CD86. La gran variedad de receptores de fagocitosis localizados en la superficie celular tales como, CD14, Scavenger receptor-A (SR-A), receptores para FC (FcR) y el receptor de Manosa (MR)

que presentan estas células permiten la ingesta de una gran diversidad de patógenos y antígenos. Tras la fagocitosis y activación, las DCs migran desde los tejidos periféricos a los nódulos linfáticos cercanos, para terminar de madurar, presentar y estimular LT y LB [23, 25].

3.4 Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs)

La mayoría de las moléculas involucradas en la respuesta inmune innata y adaptativa (como inmunoglobulinas, citoquinas, complemento, TCR y MHCs) son glicoproteínas. Asimismo, numerosos antígenos tales como proteínas de la envoltura viral y de la pared bacteriana también son glicoproteínas [26]. Los carbohidratos incorporados en proteínas o péptidos son clasificados por la naturaleza de su unión a la cadena polipeptídica, principalmente como *N-linked* u *O-linked* oligosacáridos. En los residuos de tipo *N-linked* un residuo de N-acetilglucosamina (GlcNAc) se une a la amina del grupo R de una asparagina, en cambio en los *O-linked* un residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) se une al hidroxilo del grupo R de una serina o treonina.

Los glicoconjugados tienen tres papeles principales: primero, los azúcares confieren estabilidad a la proteína a la cual están unidos, protegiéndola de las proteasas y de las interacciones proteína-proteína inespecíficas, en este sentido los azúcares juegan un papel fundamental en el correcto funcionamiento de las chaperonas. Segundo, participan en la transducción de señales, en el control del desarrollo y la diferenciación celular. Tercero, regiones específicas de la cadena del oligosacárido proporcionan epítomos de reconocimiento, los cuales influyen la respuesta inmune innata y adaptativa. Los glicopéptidos no solo dan cuenta de la presencia de oligosacáridos específicos, sino que también entregan información de la secuencia aminoacídica [27].

Los carbohidratos afectan la estructura y función de las moléculas inmunes, ya que modificaciones en los azúcares pueden perturbar funciones del sistema inmune que conducen a una serie de patologías tales como enfermedades auto-inmunes y cánceres [28]. La ubicua presencia de azúcares especie-específicos en células del

huésped predispone a estos como convenientes puntos de entrada para ser explotados por microorganismos patógenos, específicamente, en el reconocimiento del huésped, su adhesión e invasión por medio de una amplia variedad de lectinas virales y bacterianas (adhesinas, pilis y hemaglutininas, etc.) [27]. Además de reconocer al huésped e invadirlo, los microbios pueden explotar estos azúcares de varias maneras: como una fuente de carbono, imitando al huésped sintetizando azúcares idénticos o casi idénticos, y modulando los glicoconjugados celulares expresando glicosidasas que destruyen azúcares específicos [29].

El alto grado de conservación de algunos azúcares en los patógenos ha sido explotado por el huésped para evitar la invasión y el daño que puedan causar. En este sentido, el sistema inmune reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de PRRs, que se encuentran ampliamente distribuidos en células epiteliales y del sistema inmune, preferentemente. Estos receptores han sido descritos como participantes esenciales en el inicio de la respuesta inmune, así como también en la fagocitosis de microorganismos patógenos.

Los organismos multicelulares han sido capaces de utilizar dichos PAMPs, al grado de extender su reconocimiento por medio de una gran gama de receptores de la inmunidad innata, tales como los receptores de tipo-Toll (Toll-like receptors (TLRs), DC-specific ICAM-grabbing non-integrin (DC-SIGN) y el receptor de manosa (MR), entre otros) [30-32].

Entre los PAMPs más estudiados se encuentran el lipopolisacárido (LPS) de la pared externa de bacterias Gram negativas que es reconocido por el complejo TLR4/MD2/CD14 y, el ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas que es reconocido por el TLR2. Los oligosacáridos con una alta cantidad de manosa pueden ser reconocidos por MR, DC-SIGN y Dectina-2 [30, 31, 33]. Además, algunos azúcares pueden participar como determinantes inmunológicos, en este sentido, los mamíferos utilizan la ausencia del ácido siálico, como carbohidrato terminal, en la detección de moléculas u organismos extraños [34]. La ausencia de ácido siálico en cualquier

superficie celular perturba la unión del factor H y permite el depósito de moléculas del complemento marcando la célula para ser atacada por el sistema inmune [35].

En el transcurso de la carrera evolutiva entre parásitos y huéspedes, algunos patógenos han podido burlar el accionar del sistema inmune utilizando PAMPs específicos. Asimismo, la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* en su estructura posee un Lipooligosacárido (LOS) que reconoce receptores asialoglicoproteicos (ASGP-R), presentes en macrófagos, hepatocitos y células espermáticas, y que, en este último tipo celular, le permiten alcanzar al tracto reproductivo femenino e infectar al organismo [36]. Otros patógenos presentan azúcares terminales análogos al ácido siálico, como el ácido pseudamínico de *Pseudomonas* y el ácido legionamínico proveniente de *Legionella*, evitando al sistema inmune y generando cepas extremadamente virulentas e invasivas [37]. Por otra parte, ha sido demostrado que células COS-1 que expresan el cDNA de MR pueden mediar la endocitosis de albúmina sérica de albúmina (BSA) manosilada, la fagocitosis de *Candida albicans* que no ha sido opsonizada y la de *Cryptococcus neoformans* por cultivos primarios de células dendríticas [38, 39].

3.5 La familia de receptores de manosa

La familia de receptores de manosa es un subgrupo de la superfamilia de las lectinas de tipo C, que a su vez, forman parte de los PRRs. Los receptores de manosa son proteínas transmembrana tipo I constituidas por cuatro integrantes: el receptor de manosa, el receptor de fosfolipasa A₂ del tipo M (PLA₂R), DEC-205 y Endo180. Los cuatro miembros de esta familia poseen dominios estructurales característicos tanto en su porción extracelular como en su fracción intracelular.

Algunos de los componentes extracelulares son: múltiples dominios de lectina de tipo C (CTDLs, motivo Ca⁺² dependiente encargado del reconocimiento de carbohidratos), un motivo amino terminal rico en cisteínas (CRD, que participa en el reconocimiento de azúcares sulfatados), un dominio único de fibronectina del tipo II (FNII, que participa en la unión a colágeno) [40]. El resto de la proteína está constituida

por: un dominio transmembrana y una porción intracelular que, a su vez, posee la capacidad de endocitar elementos desde la membrana plasmática vía vesículas recubiertas de clatrina hasta el sistema endosomal. Este mecanismo se realiza gracias a la existencia de dos motivos, en la porción citoplasmática del receptor, que le permiten unir complejos adaptadores que desencadenan distintas vías de transducción de señales.

El primer motivo corresponde a una tirosina conservada cercana a un residuo hidrofóbico (HxNxxY o YxxH, H es el residuo hidrofóbico e Y la tirosina conservada), y el segundo motivo consta de dos residuos hidrofóbicos contiguos (LV, LM, LI, o ML) junto a un residuo ácido en la posición -4 [41, 42]. A pesar de que cada miembro de la familia tiene ambos motivos citoplasmáticos, solo uno de ellos es funcional a la hora de internalizar o endocitar un antígeno. Al respecto, ensayos con mutaciones para estos motivos han demostrado que la tirosina conservada es fundamental para la endocitosis de MR, sin embargo para Endo180 los aminoácidos hidrofóbicos son los más importantes al momento de internalizar al antígeno [43].

3.6 Receptor de manosa (MR)

El receptor de manosa es una proteína transmembrana de 175 kDa que primeramente fue descubierto en humanos, específicamente en macrófagos para luego ser encontrado en células dendríticas y una gran variedad de células endoteliales y epiteliales [44]. MR posee un motivo CRD, un FNII, ocho CTLDs (de los cuales del CTLD-4 al -8 son funcionales), un dominio intermembrana y una porción intracelular de 45 aminoácidos (Figura 3) [38]. Además, esta proteína puede sufrir modificaciones post-traduccionales tales como N- y O-glicosilaciones [45].

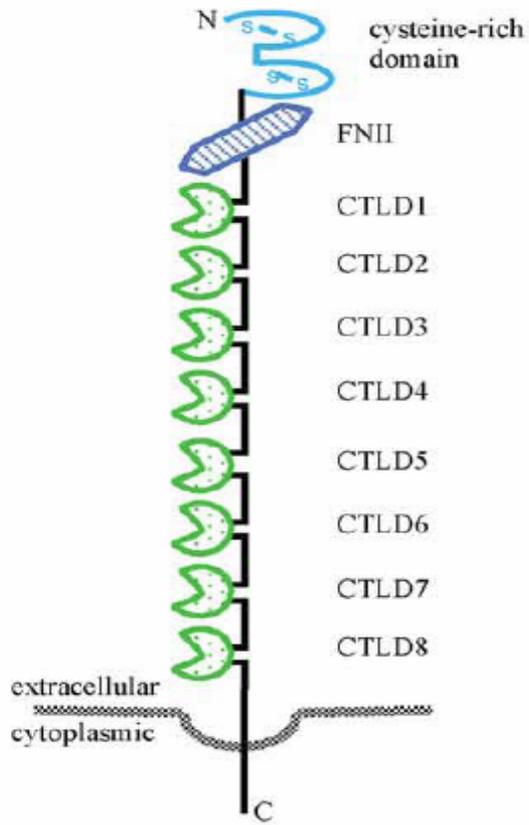


Figura 3. Esquema de los dominios del receptor de manosa. (CTDLs, dominios de lectina tipo C (reconocen monosacáridos, manosa principalmente); CRD, dominio rico en cisteínas (une azúcares sulfatados); FNII, dominio de fibronectina del tipo II (reconoce colágeno) [40].

El receptor de manosa une e internaliza una gran variedad de glicoproteínas, que poseen residuos terminales de manosa, fucosa y GlcNAc, participando en la limpieza de diversas macromoléculas solubles que son normalmente liberadas a los fluidos corporales durante los procesos inflamatorios tales como enzimas lisosomales, mieloperoxidasas derivadas de neutrófilos, hormonas tiroideas y mucinas que poseen residuos sulfatados del tipo Lewis^x [46-48]. El receptor de manosa se encuentra altamente expresado en APCs profesionales jugando un papel fundamental en el funcionamiento del sistema inmune innato y adaptativo. Como parte del sistema inmune innato MR ha sido involucrado en el reconocimiento y fagocitosis de una gran variedad de microorganismos patógenos que incluyen hongos, bacterias, virus y protozoos [49-51]. Esto se debe a que la mayoría de las glicoproteínas de mamíferos no poseen residuos terminales de manosa o GlcNAc, a diferencia de los que sucede en la superficie de microorganismos patógenos en donde estos residuos abundan.

El rápido y constante reciclaje del receptor permite la sucesiva acumulación de los ligandos naturales o de los antígenos manosilados en compartimentos intracelulares que le dan acceso para iniciar la vía de procesamiento antigénico para la presentación por MHC. En este sentido, un gran número de estudios apoya el papel que tiene MR de generar respuestas inmunes restringidas a MHC clase I y II. Estas investigaciones han usado manosa conjugada a varias formas de antígenos para promover la internalización de las partículas a través de MR. Estudios *in vitro* han exhibido que el uso de MR como blanco puede aumentar la eficiencia de la presentación MHCII a linfocitos T antígeno-específicos en varios órdenes de magnitud [52, 53]. Además, antígenos tumorales humanos (MUC1) conjugados a manan oxidado inducen respuestas Th1, de CTLs y una completa protección tumoral de los ratones enfrentados a adenocarcinomas [54, 55]. Además, algunas bacterias han utilizado este receptor como una vía de escape, ya que pueden disociarse, evitar su incorporación en lisosomas y el ataque bactericida producido por las especies radicalarias del oxígeno (ROS) [56]. La expresión de MR puede ser modificada por la presencia de citoquinas y moléculas inflamatorias. En este sentido, IFN γ disminuye la expresión de MR, a diferencia de IL-4, IL-10, IL-13 y prostaglandina E (PGE) que aumentan su expresión [57, 58].

3.7 Carbohidratos de hemocianinas y su relación con células tumorales

El mecanismo molecular y celular por el cual KLH y CCH ejercen su efecto inmunoestimulante, es aún incierto. Recientemente, ha sido demostrado que ni el gran tamaño, ni la simetría D_5 de las hemocianinas de moluscos son los responsables de su inmunogenicidad, ya que las subunidades aisladas de CCH o Rth producen un efecto similar que el de la proteína completa [59, 60].

La composición de los monosacáridos en hemocianinas es bastante diversa, no obstante la manosa es el azúcar que presenta el más alto porcentaje dentro de todos los otros carbohidratos presentes, incluso en algunas hemocianinas alcanza más del 60% [61]. El papel biológico de esta abundancia de manosa en las hemocianinas de moluscos y su participación en la inmunogenicidad no ha sido claramente demostrada, sin embargo, se ha reportado que KLH participa en la maduración y activación de DCs humanas cultivadas *in vitro*, por medio del MR, y que además aumenta la expresión de citoquinas allo-estimulantes (IL-12) dentro del microambiente circulante, sugiriendo que los residuos de manosa presentes en KLH son importantes partícipes en la respuesta del sistema inmune [62].

En cuanto a las hemocianinas que estudia esta tesis, alrededor de un 3% del peso total de CCH corresponde a carbohidratos. La subunidad CCHA posee un 3,6% p/p de carbohidratos correspondiendo el 1,2% a *N-linked* y el 2,4% a *O-linked*, en cambio CCHB tiene un 2,5% p/p de carbohidratos, 2,3% corresponden a *N-linked* y 0,2% a *O-linked* oligosacáridos [60]. A su vez, cerca de un 3% del peso total de KLH son azúcares, y al igual que CCH, una de sus subunidades presenta una mayor cantidad de *O-linked* oligosacáridos (KLH2) [63]. Los azúcares de KLH, serológicamente, presentan una reacción cruzada con un *N-linked* oligosacárido (Fuc(1–3)GalNAc(1–4)[Fuc(1–3)]GlcNAc) del patógeno *Schistosoma mansoni*, permitiendo el diagnóstico de *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. hematobium* por medio del ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas (ELISA) [64]. Recientemente, se descubrió que los azúcares de una FU de Rth (Rth2-e) contribuyen a la inmunogenicidad de la proteína, reafirmando la

importancia funcional de los azúcares de las hemocianinas de moluscos en su efecto inmunomodulador [65].

Las células tumorales sufren distintos cambios que transforman su correcto funcionamiento celular. Una de estas modificaciones se produce al nivel de las glicosilaciones aberrantes que sufren algunas proteínas y lípidos de la membrana plasmática [66]. Dependiendo del tipo celular que es transformado, la variación puede involucrar un aumento o disminución de los N- u *O-linked* oligosacáridos. Ha sido demostrado que glicosilaciones aberrantes del tipo *N-linked* (algunos tipos muestran oligosacáridos ricos en manosa, similares a los encontrados en KLH), asociados a algunos receptores de la superficie celular, participan en la progresión y metástasis de las células tumorales [67, 68]. Asimismo, algunos adenocarcinomas presentan proteínas en su superficie con variaciones de sus azúcares (aumento de los *O-linked* oligosacáridos) que ayudan a la progresión del cáncer, tales como las mucinas (MUC1) [69].

Algunos autores han enfatizado que los *O-linked* oligosacáridos asociados a KLH2 (específicamente en la FU-2c) estarían involucrados en las propiedades antitumorales, debido a una posible reacción cruzada con los carbohidratos presentes en proteínas de algunas células tumorales [2, 27, 70, 71]. Por esta razón que, en esta tesis, estudiaremos experimentalmente el papel de los azúcares en la capacidad inmunoestimulante de las hemocianinas, tanto en su inmunogenicidad como en su efecto antitumoral; por lo tanto, comprender la constitución y disposición de los carbohidratos como así mismo, las moléculas involucradas en su reconocimiento en células presentadoras de antígenos, es crucial para entender el funcionamiento de las hemocianinas y los mecanismos involucrados en su poderoso efecto inmunomodulador.

Si hemocianinas que provienen de especies distintas, poseen diferencias en la estructura cuaternaria, de las subunidades que las componen y en la identidad de la secuencia aminoacídica, entonces, **¿Por qué presentan efectos y funciones inmunomoduladoras similares?** Se ha postulado que la inmunogenicidad intrínseca

de las hemocianinas podría relacionarse con la existencia de linfocitos B (LB) de memoria, generados por una previa estimulación con xenoantígenos que contienen epítomos peptídicos y carbohidratos similares a los de la proteína, los cuales podrían ser reconocidos por una reacción cruzada, o debido a alguna propiedad aún no descubierta [2]. Últimamente, ha aumentado el interés y el estudio de MR y su principal ligando, manosa, ya que han aparecido trabajos que destacan a este receptor como blanco para mejorar la eficiencia de vacunas y agentes terapéuticos [72-75].

¿Son estos residuos terminales de manosa, que abundan en las hemocianinas como KLH, CCH y FLH los responsables de su inmunogenicidad y de su efecto antitumoral? En esta tesis queremos tratar de dilucidar el papel de los azúcares de dichas hemocianinas, tanto en su incorporación en DCs cultivadas *in vitro* como en su inmunogenicidad y efecto inmunoestimulante usando dos modelos murinos, ya sea de cáncer superficial recurrente de vejiga o melanoma. Estos dos modelos fueron elegidos porque hoy día se utiliza KLH como agente terapéutico en el cáncer superficial de vejiga [76] y en el caso del melanoma, se trata de uno de los cánceres más agresivos de la piel y desde hace un tiempo se usa KLH como *carrier*-adyuvante en su terapia ya sea con vacunas terapéuticas que emplean KLH como *carrier* de epítomos de tipo gangliósido o de tipo mucina, y también para potenciar el efecto terapéutico de células dendríticas pulsadas con extractos de melanoma [77-79]. Sin embargo, cabe mencionar que trabajos realizados por Riggs y cols (2000-2002) han demostrado que KLH posee un efecto antitumoral *per se* sobre distintas líneas tumorales cultivadas *in vitro*. Es por esto, que en esta tesis también se analizó si este efecto se reproduce con CCH y FLH y si los carbohidratos asociados a estas proteínas tenían alguna participación en dicho efecto.

La investigación desarrollada en esta Tesis, es una contribución a la comprensión del rol de los carbohidratos en las propiedades estimulantes no-específicas de las hemocianinas así como también en los mecanismos bioquímicos e inmunológicos involucrados que dichas proteínas inducen en mamíferos, conocimiento que podría contribuir a la creación de vacunas más eficaces contra patógenos y también contra el cáncer.

4. HIPOTESIS

Considerando la inmunogenicidad y efecto antitumoral *per se* de las hemocianinas modelo, a saber KLH, CCH y FLH, que poseen diferencias en su origen, organización y secuencia aminoacídica, pero que sin embargo presentan similitudes en la composición de sus residuos oligosacáridos, pensamos que este rasgo podría tener relación con dichas propiedades inmunomoduladoras.

Por lo tanto se postula que:

Las hemocianinas de moluscos gastrópodos activan la respuesta innata a través de un receptor de tipo lectina localizado en células presentadoras de antígenos profesionales generando así un ambiente de citoquinas pro-inflamatorias, que indirectamente conduce a una potente respuesta adaptativa antitumoral

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el papel de los azúcares en la inmunogenicidad y efecto antitumoral de las hemocianinas de moluscos en mamíferos, usando como modelos KLH, CCH y FLH.

5.2 Objetivos específicos

5.2.1 Preparación de las hemocianinas desglicosiladas

- 5.2.1.1 Eliminación de todos los azúcares usando un tratamiento químico con NaIO_4 .
- 5.2.1.2 Remoción selectiva de los azúcares de tipo *N-linked* y *O-linked* usando enzimas específicas.
- 5.2.1.3 Conjugación de hemocianinas a fluoróforos como Alexa488 o Alexa647.
- 5.2.1.4 Análisis de las hemocianinas desglicosiladas mediante tinción negativa al microscopio electrónico de transmisión.
- 5.2.1.5 Caracterización de las hemocianinas desglicosiladas mediante diversos métodos electroforéticos, tales como *Western blot* con anticuerpos específicos y *dot blot* con lectinas biotiniladas.
- 5.2.1.6 Análisis de las hemocianinas desglicosiladas mediante digestión con Tripsina y Proteinasa K.

5.2.2 Determinar el efecto de la endocitosis de hemocianinas en células tumorales

- 5.2.2.1 Determinar el efecto de hemocianinas desglicosiladas sobre la proliferación de líneas celulares de vejiga (MB-49) y en células de melanoma (B16F10) cultivadas *in vitro*, usando el ensayo del MTT.

5.2.3 Determinar la participación del receptor de manosa en la endocitosis y activación de hemocianinas en DCs cultivadas *in vitro*

- 5.2.3.1 Analizar la incorporación de hemocianinas desglicosiladas mediante citometría de flujo y microscopia de luz y electrónica de transmisión.
- 5.2.3.2 Evaluar la participación del MR en la incorporación de hemocianinas utilizando un anticuerpo monoclonal que bloquea su actividad.
- 5.2.3.3 Realizar ensayos de competencia usando D-manosa para distinguir la importancia de MR frente a otros receptores de lectinas.
- 5.2.3.4 Analizar el procesamiento de hemocianinas mediante *Western blot*
- 5.2.3.5 Analizar por ELISA la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-12) en presencia de hemocianinas.
- 5.2.3.6 Determinar por citometria de flujo, la expresión de los marcadores de superficie MHC-II y CD86.

5.2.4 Estudiar la participación de los azúcares en el efecto antitumoral de las hemocianinas en cáncer superficial de vejiga o en melanoma

- 5.2.4.1 Evaluación del crecimiento e incidencia de tumores así como la supervivencia en ratones C57Bl/6 desafiados con células de melanoma (línea B16F10) o de vejiga (línea MB-49), sensibilizados previamente con hemocianina desglicosilada.
- 5.2.4.2 Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos T y otras células inmunes infiltrantes de la zona del tumor, usando marcadores específicos.

6. MATERIALES

6.1 Animales de experimentación

El modelo animal preferente utilizado en el desarrollo de esta Tesis fueron ratones de la cepa C57BL/6 (haplotipo H2-b) obtenidos en el Bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los ratones C57BL/6 NALP3^{-/-} fueron donados por el Dr. Edward Lavelle y obtenidos del Bioterio del Trinity College Dublin, Irlanda. En todos los experimentos se utilizaron ratones hembras de 2 a 4 meses de edad sometidas a un periodo de luz/oscuridad (12/12 h), a una temperatura de 21-25°C y, agua y comida *ad libitum*.

En algunos experimentos se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/C, obtenidos de BiosChile I.G.S.A. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo a la normas para el buen cuidado de los animales de experimentación exigidos por la Fundación Ciencia y tecnología para el Desarrollo y por FONDECYT.

6.2 Líneas celulares

En esta tesis se utilizaron la línea de melanoma murino B16F10, donadas por el Dr. Flavio Salazar (ICBM, Universidad de Chile). Las células de carcinoma superficial de vejiga de ratón MBT-2 fueron donadas por el Dr. Dale Riggs (West Virginia University School of Medicine, USA). Las células MB-49 también de carcinoma de vejiga fueron donadas por el Dr. Tim Ratliff (University of Iowa, Iowa City, USA) Las células de linfoma murino YAC-1 fueron proporcionadas por Dr. J. Ortaldo (University of the Health Sciences, Bethesda, USA). Las células tipo monocito/macrófago murino J774.2 y RAW264.7 fueron obtenidas de Biosonda S.A.

7 Reactivos

7.1 Proteínas

La hemocianina de *Megathura crenulata* (Keyhole Limphet, KLH) fue obtenida de Pierce (USA), Calbiochem (California, USA) y Biosonda S.A. (Santiago, Chile), la hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH, Immunocyanine[®] - libre de Lipopolisacáridos, LPS), *Fissurella latimarginata* (FLH), *Fissurella cumingi* (FCH) y *Fissurella máxima* (FMH) fueron suministradas por Biosonda S.A. (Santiago, Chile).

Lectinas biotiniladas, Peanut Agglutinin (PNA), Concanavalin A (ConA), Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA), *Vicia villosa* lectin (VVL), Wheat germ agglutinin (WGA) y Fosfatasa Alcalina (FAL) unida a avidina-D fueron obtenidas de Vector Laboratories (USA). Las enzimas para desglicosilación *Peptide-N-glycosidase* F (PNGasa F) y *O-Glicosidase* fueron de Sigma (USA).

7.2 Anticuerpos y citoquinas

Los anticuerpos anti-CD11c-PE, anti-H-2Kb-FITC, anti-IAb-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD80-FITC y anti-F4/80-Alexa Fluor 647, además del factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos recombinante (rGM-CSF) fueron obtenidos de BD Pharmingen (USA). Los conjugados anti-IgG de conejo y ratón, marcados con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), Fosfatasa alcalina (FAL) y Peroxidasa (HP) fueron de Pierce (USA). Alexa Fluor 488 fue obtenido de Invitrogen.

7.3 Reactivos para cultivo celular

Los siguientes reactivos de cultivo celular fueron obtenidos de Invitrogen (USA), dulbecco's modified eagle's medium (DMEM), piruvato de sodio, aminoácidos no esenciales (MEM AA), penicilina/estreptomocina, tripsina/EDTA y fungizona. El suero

fetal de bovino fue de HyClone (USA): Las diferentes soluciones adicionadas al cultivo fueron preparadas con agua, libre de LPS (Baxter, USA). Para la preparación de soluciones y tampones se utilizaron reactivos de grado pro-análisis.

7.4 Reactivos químicos

El reactivo MTT fue obtenido de Sigma Aldrich (USA). $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Perkin Elmer, USA) fue gentilmente proporcionado por el Dr. Dante Miranda (Universidad de Chile, Chile). El reactivo peryodato de sodio fue obtenido de Merck (Alemania).

8. METODOS

8.1 Cultivo celular

8.1.1 Líneas celulares

Todas las líneas celulares (B16F10, MBT-2, MB-49 y YAC-1) fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera de 10% CO₂ en aire y 100% humedad en medio de cultivo DMEM suplementado con 5%-10% de suero fetal bovino (Hyclone, USA), minimal essential amino acids (MEMAA), Piruvato de sodio 100 mM (100X), 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina, siendo subcultivadas cada 3 ó 4 días. En el caso de las líneas adherentes, se cosecharon según el procedimiento estándar que utiliza una solución de tripsina/EDTA (Invitrogen, USA).

8.1.2 Cultivo primario de DCs

Se utilizaron células dendríticas CD11c+ que fueron derivadas de precursores de médula ósea según el protocolo previamente establecido [80], con algunas modificaciones, como se describe a continuación. Ratones C57BL/6 de entre dos y cuatro meses de edad fueron sacrificados por dislocación cervical, para luego quirúrgicamente y en condiciones de esterilidad extraerles la tibia y el fémur. Posteriormente, los huesos fueron perfundidos con medio de cultivo DMEM para obtener su médula ósea, la que fue colectada y centrifugada a 1.500 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (150 mM de NH₄Cl, 10 mM de KHCO₃ y 0,1 mM de EDTA) durante 2-3 min, reacción que se detuvo adicionando entre 6 a 8 ml de medio DMEM suplementado. Las células fueron centrifugadas nuevamente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en medio DMEM suplementado al que se le agregó rGM-CSF (10 ng/ml). Las células fueron contadas, sembradas a una densidad de 1x10⁶/ml y cultivadas por 5 días (cambiando el medio al día 3) para luego ser seleccionadas con el kit de aislamiento CD11c+ MACS (magnetic cell sorting - Miltenyi

Biotec, Alemania) de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante. Brevemente, al quinto día luego de extraídos los precursores de médula ósea y de la incubación con rGM-CSF, las células fueron recolectadas, contadas y resuspendidas en 300 μ l de tampón de columna (PBS pH 7.2, 0,5% SFB y 2 mM EDTA). Las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-CD11c+ unido a esferas magnéticas a razón de 100 μ l para 1×10^8 células por 15 min a 4°C, posteriormente, se incubaron con un anticuerpo anti-CD11c+-PE unido a ficoeritrina por 20 min a 4°C en oscuridad. Finalmente, por selección positiva en una columna imantada se obtuvieron las células dendríticas CD11c+.

8.1.3 Macrófagos Peritoneales

Células peritoneales de ratones C57BL/6 inmunizados con las diferentes hemocianinas en estudio y con PBS como control, fueron obtenidas mediante exudación del peritoneo con una solución de PBS estéril. Posteriormente, los macrófagos fueron seleccionados y analizados con el marcador específico de macrófagos F4/80-Alexa647 en un citómetro de flujo FACSsort de Becton Dickinson (Laboratorio de Inmunología Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile).

8.2 **Ensayo de proliferación celular**

El compuesto bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) fue utilizado para detectar la viabilidad de líneas tumorales expuestas a distintas concentraciones de hemocianinas, según un procedimiento estándar [81]. Las células que presentaron actividad mitocondrial redujeron el MTT (de color amarillo) a formazán (cristales de color púrpura). Los cristales fueron disueltos en DMSO o isopropanol acidificado (HCl 0.1N) por 15-30 min a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia a 570 nm en el lector de ELISA 7520 (Cambridge Technology, Inc). Los resultados se expresaron como un porcentaje de proliferación con respecto al cultivo control, en medio suplementado, al cual se asignó el 100% de viabilidad.

8.3 Determinaciones y ensayos bioquímicos

8.3.1 Tinción de PAS (*Periodic Acid Schiff*)

La tinción de PAS se realizó de acuerdo al protocolo establecido por el fabricante (Pierce, USA). Brevemente, membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con 5 µl de muestras de distintas concentraciones de CCH (35-70 µg) colocadas mediante succión al vacío. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y se bloqueó con PBS-1%BSA por 1 h a temperatura ambiente. Luego, la membrana fue lavada dos veces en ácido acético al 3% por 10 min y se transfirió a una solución oxidante por 15 min. Nuevamente, la membrana fue lavada tres veces con ácido acético al 3% por 5 min y se incubó en el reactivo de tinción de glicoproteínas Gelcode (Pierce) por 15 min para luego traspasarla a una solución reductora por 5 min. Finalmente la membrana se lavó con ácido acético al 3% y se esperó la aparición de las bandas de color morado que indican que la muestra posee azúcares.

8.4 Desglicosilación de hemocianinas

8.4.1 Desglicosilación enzimática

La hemocianina CCH fue desglicosilada enzimáticamente utilizando dos tipos de enzimas: peptide-N-glycosidase F (PNGasa F) que remueve los azúcares de tipo N y la O-glicosidasa que elimina los oligosacáridos del tipo O, ambas se usaron de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante (Sigma, USA) y evaluado en nuestro laboratorio (Becker, *et al* 2009). Brevemente, 1 mg/ml de proteína nativa (CCH o fetuina utilizada como control positivo para la enzima PNGasa F) se incubó con 10 unidades de enzima a 37°C por 6 días. Luego, las muestras fueron dejadas a 4°C y el correcto funcionamiento de las enzimas fue analizado por *dot blot* y SDS-PAGE.

8.4.2 Desglicosilación química

La desglicosilación de tipo química se realizó según el protocolo de Walker JM, (1996). Brevemente, se incubó 0.5 mg/ml de CCH en una solución de acetato de sodio 0,1 M pH 5,5 (ácido acético) que contiene peryodato de sodio 15 mM (concentración requerida para remover completamente los azúcares), por 1 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Luego, el exceso de peryodato se eliminó agregando 25 μ l 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. Finalmente, la solución se concentró con el sistema amicon ultra-15 (Millipore, USA), hasta alcanzar un volumen de 3 ml y se dializó en un A-slider de 10.000 MW toda la noche contra PBS estéril preparado con agua libre de endotoxinas (Baxter, USA). Cabe destacar que todos los elementos utilizados en este protocolo fueron esterilizados y despirogenizados.

8.4.3 Ensayo de digestión con tripsina y proteinasa K

En los ensayos de digestión con tripsina y proteinasa K [82], las enzimas se incubaron en una relación de porcentaje peso/peso de 0,2 y 1% con las hemocianinas en estudio por distintos tiempo a 37 °C. Las reacciones se realizaron en un tampón que contenía 50 mM de Tris pH 8,8 y se detuvieron utilizando Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) al 1% [82].

8.5 SDS-PAGE e *Inmunoblots*

8.5.3 Hemocianinas

La cantidad total de proteínas fue determinada con el método de Bradford utilizando el reactivo de Pierce, siguiendo las especificaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, USA). A una cantidad equivalente de proteínas se le agregó el tampón de muestra que contenía SDS y β -mercaptoetanol 4x (SDS 0,08 gr/ml, Tris/HCl 50%,

Glicerol anhidro 40%, β -mercaptoetanol 4%, en PBS), para luego ser desnaturadas por calor por 5 min a 100°C. Se cargaron y corrieron entre 0,3 a 10 μ g de proteína pura o de extracto celular (dependiendo del experimento) en geles en gradiente de poliacrilamida con SDS (3%-15% y 5%-15%), utilizando la solución de tampones descrita por Laemmli [83].

8.5.2 Extractos de células

Para los extractos celulares se utilizó una cantidad de 1×10^6 por ml de DCs obtenidas según se describió en el punto 1.2, las que fueron tratadas con CCH nativa y desglicosilada a distintos tiempos. Posteriormente se recolectaron las células, se lavaron con PBS 1% y se lisaron en un tampón con baja concentración de detergente (*low detergent buffer* (LDB), compuesto por 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, y 0.5% Triton X-100), en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (Roche, USA), para luego ser homogenizadas en un vortex por 5-10 min. A las muestras se les agregó tampón de muestra que contiene SDS (4x), para luego ser desnaturadas por calor por 5 min a 100°C.

8.5.3 Immunoblots

Una vez que las proteínas se resolvieron en el gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 300 mA por 1 h y 30 min, que fue bloqueada toda la noche con leche descremada al 5% en la solución de lavado TBS-Tween-20 al 0,05%. La membrana se incubó con los anticuerpos primarios anti-CCHB (1:3000) y secundarios anti-IgG-peroxidasa (1:20000) diluidos en la solución de lavado por 60 y 45 min., respectivamente. Luego, se lavó cinco veces por 5 min después de cada incubación con los anticuerpos primarios y secundarios. Finalmente, la membrana se reveló con el reactivo quimio-luminiscente *Supersignal west pico chemiluminescent substrate* (Pierce, USA).

8.5.4 Geles Nativos

Se realizaron geles nativos en dos tipos de condiciones: disociante y no disociante [3]. Los geles fueron preparados en agarosa al 1,5% en tampón de corrida y corridos en una cámara horizontal a 100 Volts por 1 h y 30 min. En la condición disociante las hemocianinas fueron dializadas contra una solución de Glicina/NaOH (130 mM) pH 9,6 por toda la noche y corridas en un tampón que contiene 100 mM de Tris, 500 mM de ácido bórico y 2,5 mM de EDTA a pH 9. En la condición no disociante las hemocianinas no fueron dializadas y el tampón de corrida utilizado fue 70 mM de Tris y 261 mM de ácido bórico a pH 7,4. Previo a la corrida, las muestras se prepararon utilizando un tampón de carga 2x que contenía glicerol anhidro y azul de bromofenol.

8.6 **Determinaciones inmunoquímicas**

8.6.1 Dot blot

Para los ensayos de *dot blot* se usó el procedimiento habitual [84]. Brevemente, membranas de nitrocelulosa (Bio-rad, USA) fueron incubadas con muestras de distintas concentraciones de CCH y KLH (35-70 µg en 5 µl) colocadas mediante un mecanismo de succión al vacío. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min y se bloqueó con PBS-1%BSA por 1 h a temperatura ambiente. Luego, cada una de las membranas fue incubada con alguna de las siguientes lectinas biotiniladas: Peanut agglutinin (PNA), Concanavalin A (ConA), *Ulex Europaeus* agglutinin I (UEA), *Vicia villosa* lectin (VVL), Wheat germ agglutinin (WGA) (2 µg/ml) y un antisuero policlonal anti-CCH o anti-KLH (diluidos 1:3000) por 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron lavadas en PBS-0,05%Tween-20 para ser incubadas con avidina-D conjugada a FAL para las lectinas y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo unido a FAL, diluido 1:2000 para los antisueros. Nuevamente, la membrana fue lavada y luego, se reveló la enzima con el reactivo One-Step™ NBT/BCIP (Thermo, USA).

8.6.2 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)

8.6.2.1 ELISA para determinar anticuerpos anti-hemocianina

Para medir el título de anticuerpos anti-hemocianinas se utilizó el procedimiento de Oliva y cols, utilizando sueros de los ratones inmunizados con las proteínas de estudio [13]. Placas de poliestireno de 96 pozos (Pierce) se activaron a 4°C por 24 h con 100 µl de una solución de PBS que contenía 10 µg/ml de hemocianina.

8.6.2.2 ELISA para determinar anticuerpos anti-antígenos de superficie de células B16F10

Para medir el título de anticuerpos anti-antígenos de superficie de células B16F10, se sembraron 2×10^4 células B16F10 por pozo en una placa de ELISA a 37°C por 24 h. Luego, las células fueron lavadas con PBS estéril y fijadas con p-formaldehído al 2%. A continuación se describe el protocolo común de desarrollo de estos ensayos, ya sea activando con hemocianinas ó con células tumorales. Las placas fueron bloqueadas con PBS-1% BSA por 1 h a 37°C y luego, se incubaron con los sueros de ratón anti-hemocianinas o anti-células B16F10, según correspondía, entre 1 a 2 h a 37°C. La placa se lavó con una solución de PBS-1%BSA-0,05%Tween-20. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a FAL por 1 h a 37°C. Finalizado el periodo de incubación la placa fue lavada nuevamente y revelada con una solución que contenía 1 mM de $MgCl_2$ y 1 mg/ml de para-nitrofenil fosfato (pNpp) en tampón FAL (carbonato-bicarbonato 0,2 M, a pH 9,6). La placa se dejó incubando por un tiempo determinado (entre 20 a 30 min) a 37°C para luego detener la reacción con 50 µl de NaOH 5N. Luego la muestra fue leída a 405 nm.

8.6.2.3 ELISA para citoquinas

Para medir INF- γ , se utilizaron sueros de ratones C57BL/6 inmunizados con las hemocianinas de estudio y que fueron enfrentados al melanoma B16F10 (revisar

Bioensayo, punto 5). La concentración de citoquina se midió con kits comerciales de ELISA de captura (Pierce), según los protocolos del fabricante. La lectura de la reacción de la enzima peroxidasa se midió a 450 nm. Las mediciones se realizaron en un lector de ELISA 7520 (Cambridge Technology, Inc.). Para la medición de citoquinas pro-inflamatorias se utilizaron anticuerpos pareados de R&D systems (IL-1 β , IL-12p70, IL-23 y TNF- α), BD biosciences (IL-6 e IL-12p40) y Biolegend (IL-10 e IL-1 α) utilizando el sistema biotina/estreptavidina-peroxidasa. La lectura de la reacción se midió a 492 nm.

8.7 Determinación de la propiedad de proteína transportadora (*carrier*) de las hemocianinas

Ratones BALB/c de 3-4 meses (tres por grupo) fueron inmunizados vía i.p. con las hemocianinas acopladas a IgG humana en presencia de CFA o IFA. Brevemente, 100 μ g de IgG humana (Griffold, USA) fue acoplada a CCH nativa y desglicosilada en buffer borato y glutaraldehído al 0,3%, según el procedimiento descrito en Becker y cols (2004) [3]. En el día 1 las muestras fueron inyectadas vía i.p en presencia de CFA, y en los días 18 y 53 los ratones fueron nuevamente inmunizados vía i.p (inoculación secundaria y terciaria, respectivamente) en presencia de IFA. Posteriormente, los ratones fueron sangrados, se obtuvo el suero y se midió el título de anticuerpos séricos contra la IgG humana por ELISA. El título se definió como la dilución del suero en que se obtiene la mitad de la absorbancia máxima.

8.8 Reacción de Griess

La activación de líneas celulares tipo macrófago RAW264.7 y J774.2 por distintos agentes fue determinada indirectamente mediante la liberación de óxido nítrico (NO) y en consecuencia la formación de nitritos (NO₂⁻) en el medio, según lo que se conoce como reacción de Griess [85]. Se cultivaron 20.000 células por pozo en placas de 96 pocillos las cuales fueron tratadas por distintos antígenos a diferentes tiempos.

Posteriormente, se obtuvieron 100 µl del medio de cultivo los cuales se mezclaron con una solución de sulfanilamida 1% p/v en H₃PO₄ 5% (50 µl) por 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, la solución resultante se incubó con NED 0,1% p/v en H₂O (N-(1-naftil) etilen-diaminadihidrocloruro) (50 µl) por 15 min en oscuridad a 25°C. La concentración de nitritos se midió en base a una curva de calibración realizada a partir del estándar NaNO₂ (100 mM). Las muestras fueron leídas en un lector de ELISA a 570 nm.

8.9 Bioensayos

Se utilizó el procedimiento general de Moltedo, *et al.* 2006. Ratones hembra C57BL/6 de dos a cuatro meses de edad fueron seleccionados al azar, individualizados con marcas en las orejas y la inserción de las extremidades con picrato de sodio saturado en agua. Previo al desafío con las células, los animales recibieron una dosis subcutánea, en el flanco derecho del cuerpo, de 400 µg hemocianinas/100 µl PBS. Veinte días después los ratones recibieron una inyección subcutánea que contenía entre 1,5x10⁵ a 2x10⁵ células de melanoma de la línea B16F10. A las 24 h siguientes se inició la terapia de 100 µg de las hemocianinas en estudio durante 6 días consecutivos. Los ratones fueron evaluados en cuanto a la presencia de tumor, el volumen del tumor y su sobrevivencia. También se analizó visualmente si había irritación o inflamación. Además, en diferentes días del experimento los ratones fueron sangrados para obtener muestras de suero que fueron utilizados para determinar el nivel de IFN-γ y para determinar el título de anticuerpos séricos contra cada hemocianina. El volumen del tumor fue calculado de acuerdo a la fórmula del elipsoide $0,52 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$.

8.10 Actividad de células *Natural Killer* (NK)

La actividad de células NK se midió por medio del ensayo de liberación de ⁵¹Cr [86]. Las células YAC-1 (células blanco) en una densidad de 3x10⁶ células/ml fueron

incubadas con 100 μCi de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ por 1 h en una atmosfera con 5% CO_2 y 95% aire a 37°C. Luego, fueron lavadas dos veces con medio DMEM y resuspendidas en DMEM suplementado. Células mononucleares extraídas de bazos (células efectoras) de ratones C57BL/6 fueron purificadas por Ficoll-Hypaque (Sigma, USA) y resuspendidas en medio DMEM suplementado. Se sembraron distintas razones de células blanco y efectoras (1:25, 1:50, 1:100 y 1:200). Posteriormente, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos con fondo curvo e incubadas por 4 h a 37°C, 5% CO_2 y 100% humedad. Luego, se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min y una porción de cada sobrenadante fue recolectado en de fondo curvo (tubos khan) y medido en un contador de radiación γ . Como control positivo se utilizó Poli I:C (Sigma-Aldrich), como control de lisis espontánea se utilizó células YAC-1 incubadas con medio DMEM suplementado y como control de lisis total se incubaron las células YAC-1 en una solución de PBS-1%Triton X-100.

Los valores de lisis se obtuvieron de acuerdo a la fórmula que mide el porcentaje de actividad de células NK y que corresponde a: $100 \cdot (\text{Lisis experimental} - \text{Lisis espontánea}) / (\text{Lisis total} - \text{Lisis espontánea})$.

El decaimiento radioactivo del ^{51}Cr se calculó según la siguiente fórmula:

$A = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$ donde A = radioactividad que queda el día del experimento

A_0 = radioactividad el día de la calibración, $\lambda = \ln 2 / \text{tiempo de vida media}$

t = días que han pasado con respecto a la calibración.

8.11 Citometría de flujo

8.11.1 Identificación de células usando marcadores CD

En los experimentos de citometría de flujo se siguieron protocolos comunes para distintos tipos de ensayos. Células B16F10, DCs y macrófagos peritoneales tratados con diferentes concentraciones de las proteínas en estudio (CCH, Ox-CCH, CCHAlexa488, KLH, FLH y LPS) durante los tiempos indicados para cada condición,

fueron recolectadas del pozo con una solución de PBS-EDTA (2 mM), se centrifugaron a 5.000 rpm por 3 min eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en PBS-SFB 2%. Luego, se agregó una dilución del anticuerpo de interés (1:50 ó 1:100; anti-CCH, anti-CD11c+-PE, anti-I-Ab-FITC, anti-H-2Kb-FITC, anti-CD86-FITC) por 20 min a 4°C en oscuridad. En el caso de los experimentos con CCHAlexa488 no fue necesaria la utilización de anticuerpos. Posteriormente, las células se centrifugaron a 5.000 rpm por 3 min, se eliminó el sobrenadante y se lavaron con PBS-SFB 2%. Se centrifugó nuevamente, se eliminó el sobrenadante y, para fijar las células, se agregó PBS-p-formaldehído 2% a 4°C en oscuridad, posteriormente esta misma solución se utilizó para mantener las células hasta el momento de su lectura en el citómetro. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSort de Becton Dickinson (Servicio de Citometría de Flujo, dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y analizadas usando el programa WinMD.

8.11.2 Análisis de incorporación de hemocianina

Para analizar incorporación de CCH nativa y desglicosilada en DCs, las células fueron fijadas con PBS-p-formaldehído 2% por 15 min y luego se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 0,5% por 20 min a temperatura ambiente. Luego, las células se lavaron con PBS-SFB 2%, se eliminó el sobrenadante y se incubaron con un suero policlonal de conejo anti-CCH, diluido 1:160 en la solución de permeabilización, por 30 min a 4°C. Se centrifugó, se lavó y se resuspendió el pellet en una solución de permeabilización que contiene un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con FITC (Pierce), diluido 1:250, por 30 min a 4°C y en oscuridad. Finalmente, las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS-SFB 2%. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro en las condiciones descritas previamente.

8.12 Microscopía Electrónica de Transmisión

8.12.1 Tinción Negativa de hemocianinas

Para determinar las características estructurales de las hemocianinas nativas o las sometidas a distintos tratamientos se realizó tinción negativa. Gotas de alrededor de 30 μ l de cada muestra fueron colocadas en grillas de cobre previamente cubiertas con Parlodion (Polyscience) al 3% en acetato de amilo. Luego, las preparaciones fueron teñidas con acetato de uranilo al 2% por 1 min de acuerdo al método descrito por Fernández-Morán y cols [87], con modificaciones [3]. Las grillas fueron secadas y observadas en un microscopio electrónico *Phillips Tecnai 12*, en la Unidad de Microscopía Electrónica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

8.12.2 Líneas celulares y DCs

Las líneas celulares y los cultivos de DCs fueron centrifugadas a 2.000 rpm y se fijaron en la forma de un pellet de alrededor de 5×10^5 - 1×10^6 con glutaraldehído al 2 % en tampón cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4; luego se realizó una postfijación con OsO₄, se deshidrató y se embebió cada muestra en Epon (Polyscience, USA) de acuerdo a [88]. La resina se polimerizó a 60°C durante 48 h y luego se realizaron cortes finos de alrededor de 500 Å de grosor en un ultramicrotomo. Los cortes se recogieron en grillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en 50% metanol durante 1-5 min, se lavaron con 50% etanol frío, y luego se tiñeron con citrato de plomo de acuerdo al método estándar que utiliza citrato de plomo [89]. Finalmente las muestras se lavaron con agua destilada y se observaron al microscopio electrónico a 80 KV en la Unidad de Microscopía, Pontificia Universidad Católica de Chile.

8.13 Estadística

Para los análisis estadísticos se utilizó una comparación mediante ANOVA (de una o dos vías) con un post test de Bonferroni ó unpaired t test student. Los ensayos de sobrevivencia fueron analizados por Kaplan-Meier. Al menos tres experimentos independientes en duplicado o triplicado fueron realizados y las muestras fueron significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, USA).

9. RESULTADOS

9.1 Caracterización bioquímica y estructural de las hemocianinas desglicosiladas

El primer objetivo de esta tesis tuvo como propósito determinar la participación de los oligosacáridos de las hemocianinas de moluscos, en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral no-específico que provocan en algunos tipos de tumores murinos y humanos, usando originalmente como modelos principalmente CCH y en forma secundaria KLH. Curiosamente, la literatura sobre el tema atribuye en gran medida dichos efectos inmunológicos a los componentes oligosacáridos de estas enormes proteínas, sin embargo no hay publicaciones en que se haya evaluado experimentalmente el efecto de su remoción sobre estas propiedades. Posteriormente, se incorporó en este trabajo FLH, una nueva hemocianina descrita por nuestro grupo de investigación, por su poderosa inmunogenicidad en comparación con CCH y KLH [90].

Para estudiar la contribución de los oligosacáridos, las hemocianinas fueron desglicosiladas químicamente (remoción total de los azúcares), utilizando el método de oxidación de carbohidratos con peryodato de sodio y también, enzimáticamente (remoción selectiva) usando glicosidasas específicas, tales como la enzima PNGasa F que remueve los oligosacáridos de tipo *N-linked* o la enzima O-glicosidasa, que elimina los de tipo *O-linked*. Para determinar el estado de las proteínas luego de dichos tratamientos, se realizaron diversos análisis incluyendo ensayos de tipo *dot blot* con tinción de PAS y diversas lectinas biotiniladas (entre ellas, ConA y PNA para los azúcares de tipo *N-linked* y *O-linked*, respectivamente) además de geles nativos y desnaturantes. **En las figuras y en el texto, cuando las hemocianinas se desglicosilan químicamente se les designa como Ox-CCH, Ox-KLH u Ox-FLH.**

En la Figura 4 se presenta un *dot blot* donde se observa que CCH solo fue reactiva con ConA y no con PNA, sugiriendo que CCH solo poseería azúcares expuestos de

tipo *N-linked*. Además, se observa que la desglicosilación enzimática no logra remover totalmente los azúcares de tipo *N-linked* en CCH, a diferencia de la desglicosilación química que sí lo hizo (Figura 4a).

Otra forma de verificar cambios en la estructura de la proteína por efecto del tratamiento de desglicosilación fue a través de geles desnaturantes. En la Figura 4b se observa la forma cómo se resuelve CCH nativa en comparación con la Ox-CCH y también CCH desglicosilada enzimáticamente. En el primer carril se presentan las cuatro bandas características de CCH, que corresponden a sus subunidades (CCHA y CCHB de 405 y 350 kDa, respectivamente) y a los fragmentos CCHA1 y CCHA2 (300 y 108 kDa, respectivamente). Sin embargo, y sorpresivamente, Ox-CCH no se resuelve en el gel, no se observan las bandas correspondientes a sus subunidades y solo se logra obtener un bandeo al comienzo de la porción concentradora del gel, indicando que el tratamiento para eliminar los azúcares introdujo cambios internos en la estructura de la proteína que la hacen distinta a la nativa. En cambio, como se observa en los carriles 3 y 4, que corresponden a los tratamientos de desglicosilación enzimática, no se observó el mismo efecto, apreciándose los polipéptidos habituales. Aunque se sabe que alrededor del 3% del peso de las hemocianinas corresponde a azúcares, por el elevado tamaño de las subunidades es difícil observar diferencias en la migración electroforética de las subunidades desglicosiladas enzimáticamente [91].

Para confirmar que los resultados anteriormente mencionados en cuanto a que el tratamiento de CCH con glicosidasas no fue eficiente en las condiciones empleadas para remover los azúcares, posiblemente a causa de algún problema de tipo estérico que afectaba el acceso de la PNGasa F a ciertos residuos oligosacáridos de la proteína y no a un mal funcionamiento o inactivación de la enzima, se utilizó como control positivo la proteína fetuina, en la cual un 20% de su peso total corresponde a residuos del *N-linked* y un 5% al *O-linked* [92, 93]. La Figura 4c corresponde a una tinción de PAS que demuestra que la enzima PNGasa F logró remover los azúcares de tipo *N-linked* en la fetuina, destacándose una disminución en la intensidad de la marca de la misma. Además, esto quedó corroborado mediante el análisis de la migración de la

proteína completa y desglicosilada con PNGasa F, donde esta última muestra una mayor movilidad en el gel (Figura 4d).

El siguiente paso fue comparar con mayor detalle mediante *dot blot* y un panel de lectinas biotiniladas, las estructuras oligosacáridas presentes en CCH y KLH, principalmente para determinar si existen diferencias en la composición de los azúcares expuestos y por ende con posibilidad de interactuar con las lectinas, que podrían ser determinantes en la comprensión de las propiedades antitumorales que estas proteínas poseen.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4e y muestran que CCH y KLH tienen notables diferencias en cuanto a la composición de azúcares se refiere, ya que una vez más se confirmó que CCH solo presentó una reactividad evidente frente a ConA, lectina que reconoce residuos de manosa terminal, a diferencia de KLH que fue positiva para la mayoría de las lectinas utilizadas en estos experimentos. Otra diferencia importante entre CCH y KLH, fue que esta última exhibió reactividad con PNA, lectina que reconoce al disacárido Gal-(β 1-3)-GalNAc, utilizado comúnmente como marcador de los azúcares de *O-linked*. Además, y a diferencia de CCH, KLH fue positiva con VVL y WGA las cuales reconocen N-acetilgalactosamina terminal y ácido siálico, respectivamente. La aglutinina del espinillo 1 (UEA, que reconoce residuos terminales de L-fucosa) fue negativa con ambas hemocianinas. Además, se corroboró una vez más, que el procedimiento de desglicosilación química de CCH fue exitoso debido a que no presentó reactividad frente a ConA. En este caso y a modo de control, se utilizó un antisuero de conejo anti-CCH para demostrar que la proteína desglicosilada es reconocida por el antisuero de conejo anti-CCH y que por lo tanto, estaba presente en la membrana de nitrocelulosa al realizar las tinciones con lectinas.

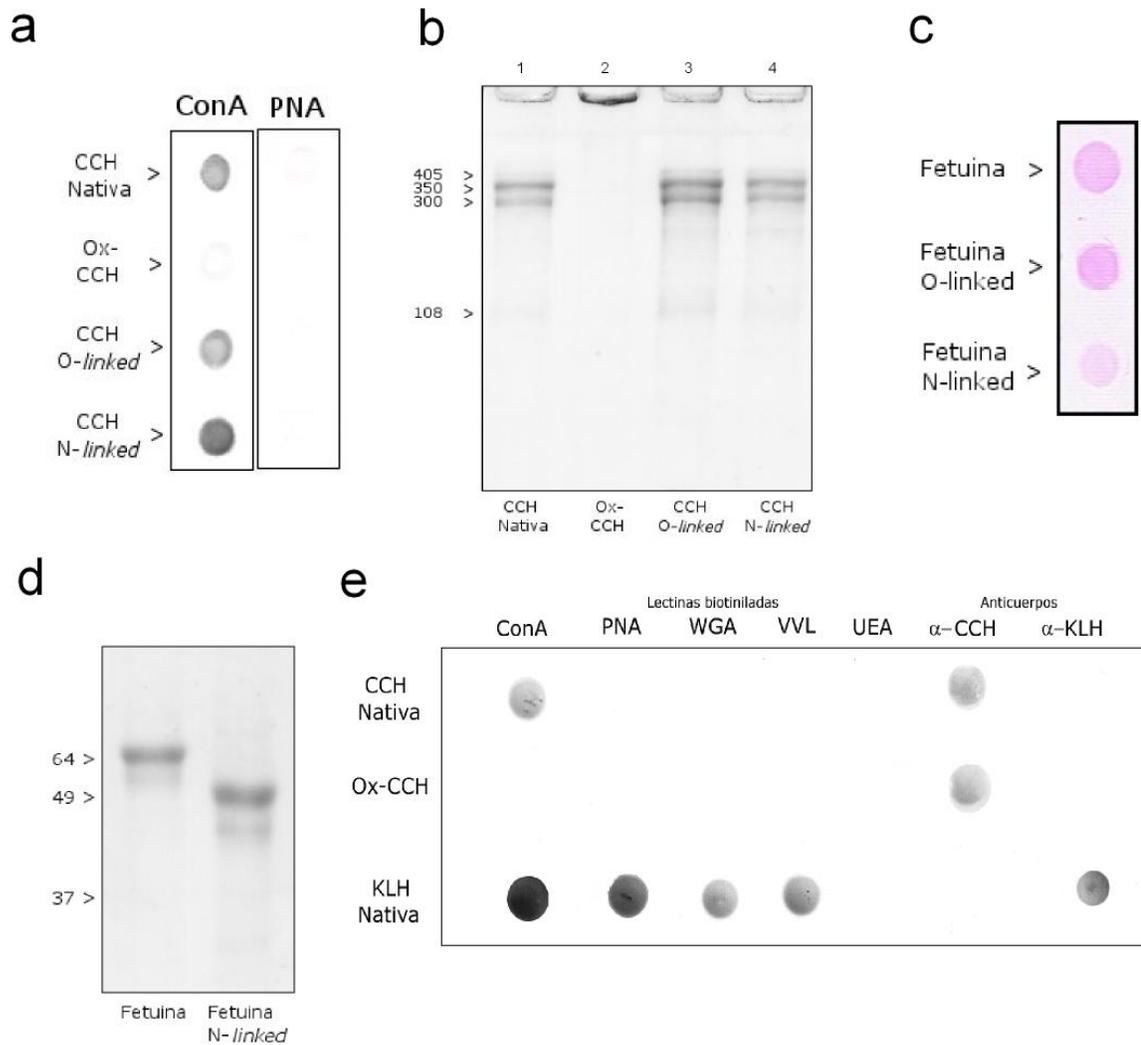


Figura 4. Caracterización de hemocianinas desglucosiladas. **a)** *Dot-blot* de CCH nativa y sus formas desglucosiladas química y enzimática incubadas con las lectinas biotiniladas ConA y PNA (2 µg/ml) (n=2). **b)** SDS-PAGE en gradiente (5-15%) de las hemocianinas desglucosiladas, teñidas con azul de Coomassie (n=3). **c)** Tinción de PAS de la proteína fetuina nativa y desglucosilada (n=1). **d)** SDS-PAGE en gradiente (5-15%) de una fetuina control y su forma desglucosilada con PNGasa-F, teñido con azul de Coomassie (n=2). **e)** *Dot-blot* de CCH y KLH nativas, y CCH desglucosilada químicamente, incubadas con distintas lectinas biotiniladas (2 µg/ml) y un antisuero policlonal de conejo anti-CCH y anti-KLH (n=3).

Además, se realizaron ensayos de *dot blot* utilizando las lectinas PNA y ConA para caracterizar a las hemocianinas provenientes de lapas de la familia *Fissurellidae*. Los resultados indicaron que dichas hemocianinas, que provienen de especies de lapas emparentadas filogenéticamente ya que pertenecen a la misma familia como FLH, FCH, FMH y KLH fueron positivas con ConA y PNA, a diferencia de CCH, que pertenece a la familia *Muricidae*, y que como ya se demostró, solo mostró reactividad frente a ConA (Figura 5a).

El perfil electroforético (SDS-PAGE) de FLH, FMH y FCH fue similar a KLH ya que todas presentaron una banda principal alrededor de los 350 kDa. Sin embargo, FLH presentó algunas bandas secundarias de menor peso molecular, que atribuimos a una mayor inestabilidad cuando se utiliza PBS como tampón de mantención, que no tiene Ca^{+2} y Mg^{+2} . Está ampliamente descrito para todas las hemocianinas conocidas a la fecha excepto para CCH [3], que la presencia de iones divalentes es fundamental para mantener la estructura cuaternaria de las hemocianinas de moluscos, en su ausencia se produce fragmentación (Figura 5b). En los estudios posteriores, de estas tres nuevas hemocianinas se seleccionó FLH por su mayor inmunogenicidad [90] y sorprendente efecto antitumoral frente a KLH y CCH, como se describirá más adelante. Además, la oxidación de los azúcares de FLH (Ox-FLH) evidenció el mismo fenómeno previamente descrito con CCH (Figura 5c).

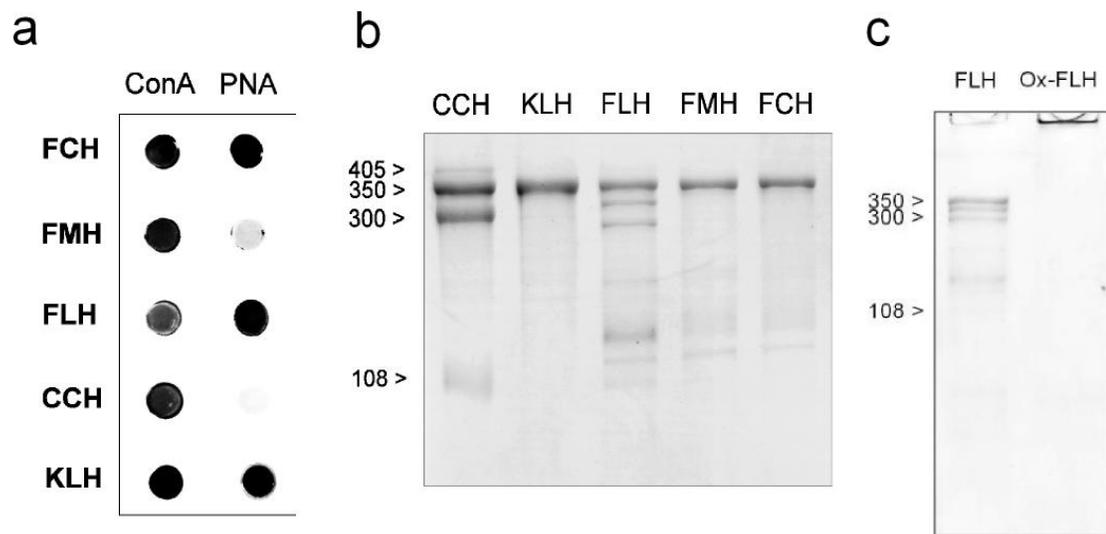


Figura 5. Caracterización de hemocianinas de lapas de la familia Fissurellidae. a) *Dot-blot* de CCH, KLH, FLH, FMH y FCH incubadas con PNA y ConA biotinizadas (2 $\mu\text{g/ml}$) (n=3). **b)** SDS-PAGE en gradiente (5-15%) de CCH, KLH, FLH, FMH y FCH, teñido con azul de Coomassie (n=3). **c)** Gel desnaturalante en gradiente (3-15%) cargado con 0,8 μg de FLH nativa y desglucosilada químicamente; teñidas con tinción de Coomassie (n=3).

9.2 Cambios en la estructura de CCH y FLH por efecto del tratamiento de desglicosilación química

Las diferencias en la migración electroforética observadas para Ox-CCH y Ox-FLH estarían asociadas al efecto que produce el tratamiento con peryodato sobre la estructura de la proteína. La hipótesis que se propuso para explicar este fenómeno está relacionada con una resistencia de la proteína a las condiciones desnaturalantes, ya sea por un cambio intramolecular o por la formación de polímeros de CCH.

Para demostrar el primer punto se utilizó un tratamiento proteolítico utilizando tripsina, enzima habitualmente usada para estudiar las unidades funcionales de las hemocianinas [94], bajo el supuesto de que si habían cambios intramoleculares debían producirse modificaciones en los sitios normales de corte de la enzima, esto es en el carboxilo de argininas y lisinas [95]. Es así que CCH nativa y Ox-CCH fueron sometidas a una proteólisis controlada con tripsina al 0,2% p/p por distintos periodos de tiempo, observándose que la proteína nativa ya a los 10 min de incubación con la enzima está completamente proteolizada, a diferencia de Ox-CCH que presenta resistencia a dicho tratamiento, lo cual se evidenció porque permanecía retenida en la porción concentradora del gel (Figura 6c). Para confirmar que los cambios en la proteína estaban asociados a una modificación estructural de los aminoácidos reconocidos por la tripsina se utilizó una enzima de amplio espectro como es la proteinasa K, que corta en el carboxilo de aminoácidos alifáticos y aromáticos [95]. Los resultados mostraron que a los 10 min de tratamiento con proteinasa K la hemocianina nativa y la desglicosilada son igualmente proteolizadas (Figura 6d).

En la Figura 6e, se aprecian diferencias significativas en el patrón de bandas de CCH nativa y desglicosilada que fueron incubadas con una alta concentración de tripsina (1% p/p), confirmando así que el procedimiento de desglicosilación química no solo eliminó los azúcares si no que también afectó la estructura interna de la proteína.

Otro análisis que se realizó para demostrar el cambio estructural que ocurre en CCH por la desglicosilación química, fue mediante geles nativos en condiciones disociantes y no disociantes. En geles no disociantes se observó claramente las diferencias en el bandeo de ambas proteínas. La hemocianina nativa se separó en sus dos subunidades (CCHA y CCHB) sin embargo, Ox-CCH reveló un patrón de bandas totalmente distinto (Figura 6f).

Sin embargo, aun faltaba por demostrar si este cambio generado por el proceso de desglicosilación química provocaba una agregación de la proteína, para lo cual la hemocianina control y tratada fueron estudiadas por microscopía electrónica de transmisión utilizando tinción negativa. La Figura 7 muestra microfotografías de moléculas de CCH nativa y moléculas sometidas a desglicosilación química. En todas las condiciones de tratamiento, se observa el tamaño y la forma de cilindro hueco característico de estas proteínas, concluyéndose que el tratamiento de desglicosilación no induce cambios aparentes en la estructura cuaternaria de la proteína.

Con los resultados obtenidos en la caracterización de Ox-CCH y Ox-FLH, mediante el tratamiento con peryodato, en adelante solo se trabajó con esta preparación de proteínas porque nos daba certeza de que el proceso de eliminación de los azúcares funcionó y que efectivamente, disponíamos de hemocianinas sin azúcares.

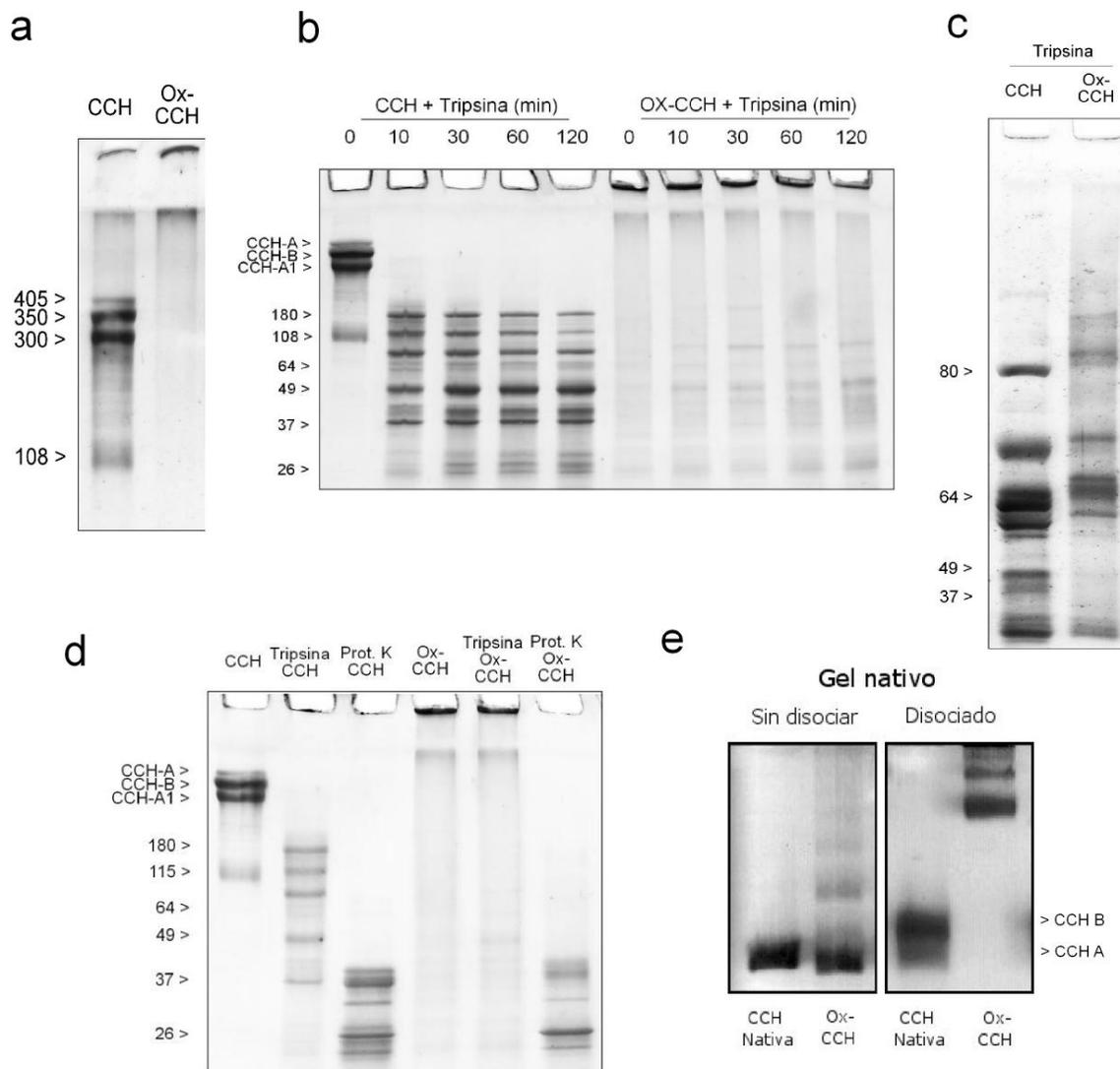


Figura 6. Modificaciones de CCH por los tratamientos de desglicosilación. a y b) Gel desnaturante en gradiente (3-15%) cargado con 0,8 μ g de CCH nativa y desglicosilada químicamente; teñidas con tinción de plata y azul de Commassie, respectivamente (n=3). **c)** Gel desnaturante en gradiente (5-15%) de CCH nativa y desglicosilada (6 μ g de proteína por carril) sometidas a proteólisis con tripsina (1% p/p) por 4 h a 37°C (n=2). **d)** SDS-PAGE en gradiente del 5-15% que muestra la proteólisis (tripsina al 0,2% p/p) dependiente del tiempo de CCH nativa y desglicosilada. SDS-PAGE en gradiente del 5-15% que muestra la proteólisis de CCH nativa y desglicosilada por tripsina y proteinasa K (0,2% p/p) a los 10 min de incubación (n=2). La reacción fue detenida con PMSF al 1%. **e)** SDS-PAGE en gradiente del 5-15% que muestra la proteólisis de CCH tratada con tripsina al 1% p/p por 4 h a 37°C (n=3). **f)** Gel nativo de agarosa (1,5%) preparado en condiciones con y sin disociar (n=3).

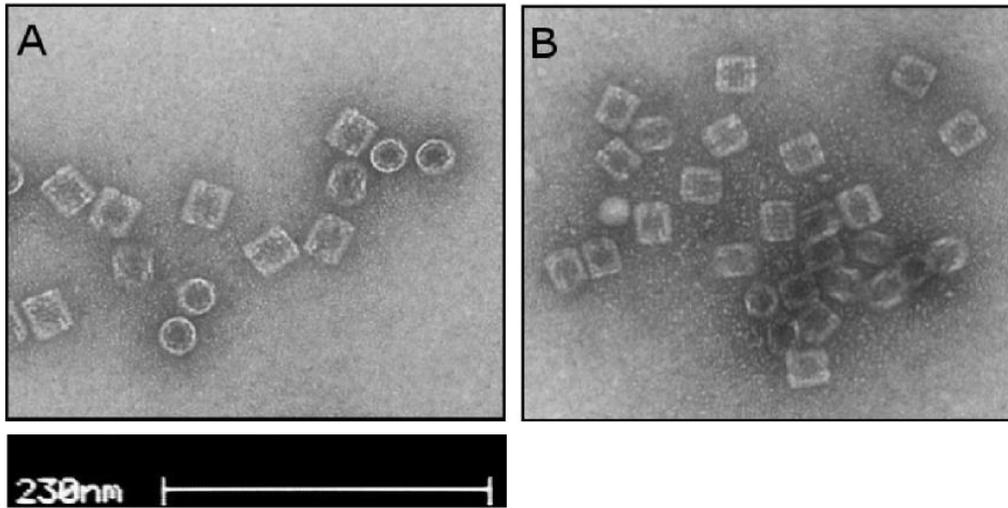


Figura 7. Tinción negativa de las hemocianinas: A) CCH nativa, B) Ox-CCH obtenida mediante desglucosilación química, (n=2).

9.3 Análisis del efecto antitumoral *in vitro* de CCH, KLH y FLH

En la última década algunos autores han propuesto que KLH induce apoptosis sobre algunas líneas tumorales humanas cultivadas *in vitro*, incluyendo melanoma [96-98]. Por esta razón se analizó si dicho efecto, se producía con las hemocianinas en estudio, utilizando líneas tumorales murinas (MB-49, MBT-2 y B16F10), debido a las implicancias que un fenómeno de esta naturaleza tendría para entender los mecanismos involucrados en el efecto inmuno-terapéutico no-específico de las hemocianinas.

En primer lugar, se analizó por citometría de flujo si CCH conjugada al fluoróforo Alexa-488 (C-488, [99]) era incorporada por las líneas tumorales en estudio. En la Figura 8a y 8b se observa que tanto las células MB-49 como B16F10 incorporan CCH-Alexa488 de manera dependiente del tiempo, observándose un máximo significativo a las 24 h de tratamiento. Sin embargo, cabe destacar que las intensidades de fluorescencia observadas fueron bajas, indicando que estas células endocitan pobremente la proteína.

El sistema inmune de los mamíferos tiene la capacidad de reconocer células tumorales principalmente por la presentación de antígenos tumorales a través del complejo MHC-I. Debido al proceso de transformación que sufren dichas células se generan mutaciones que disminuyen la expresión y presentación de péptidos tumorales asociados a MHC-I, por lo cual se favorece la evasión del sistema inmune y la sobrevivencia del tumor [100, 101]. Por esta razón, quisimos analizar, por citometría de flujo, si CCH nativa y desglucosilada tienen la capacidad de modular la expresión de MHC-I en las líneas celulares MB-49 y B16F10. Los resultados que se muestran en la Figura 8c, expresados como *dot blots*, señalan que a las 24 h de tratamiento con ambas proteínas no hay variación de la expresión de MHC-I en las líneas tumorales B16F10 y MB-49.

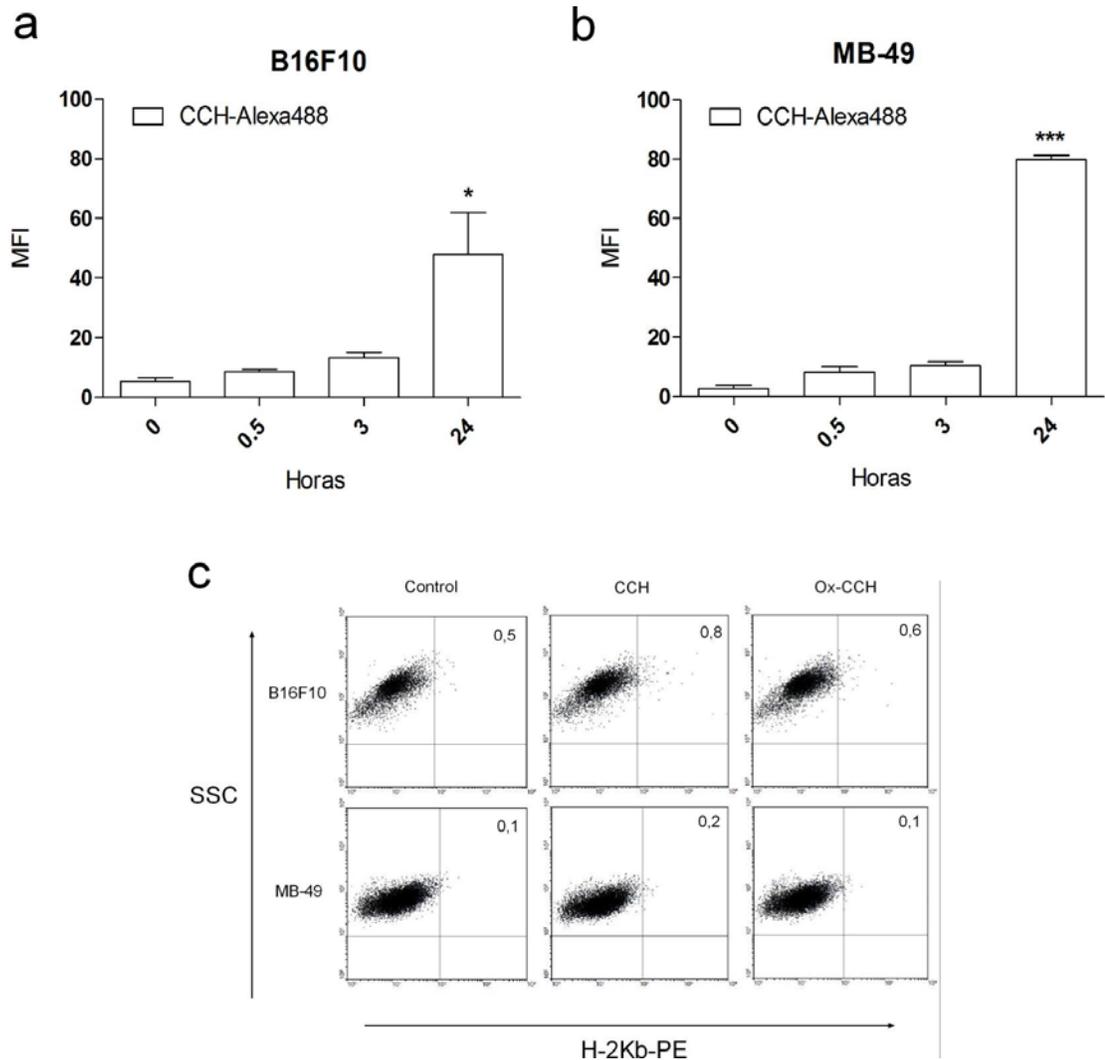
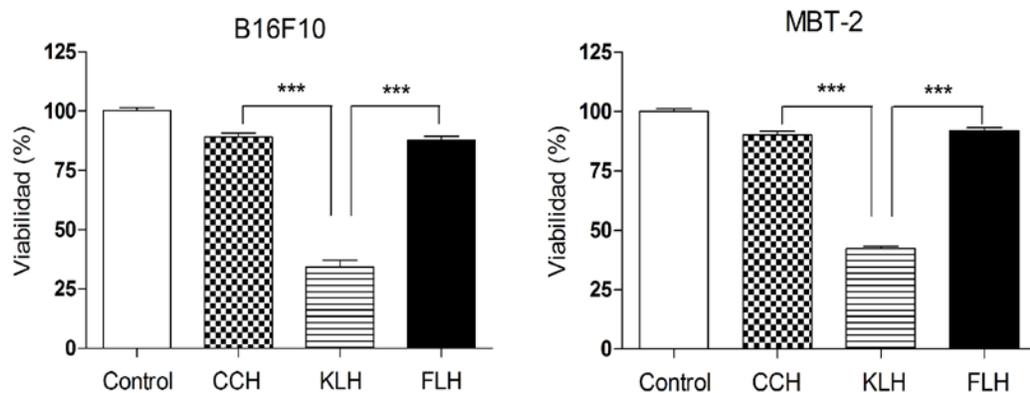


Figura 8. Endocitosis de CCH y efecto sobre la expresión de MHC-I en células murinas de melanoma (B16F10) y de cáncer superficial de vejiga (MB-49). a) y b) Gráficos obtenidos de ensayos de citometría de flujo, que muestran la intensidad de fluorescencia (MFI) de la incorporación de CCHAlexa488 (100 µg/ml) en células B16F10 y MB-49 creciendo exponencialmente, respectivamente, a distintos tiempos de incubación 0, 0,5, 3 y 24 h (n=3, * = p<0,05 y *** p<0,001 - one-way ANOVA, Tukey Post-test). c) *Dot blots* que muestran la variación de la expresión de MHC-I inducido por el tratamiento de 24 h con 100 µg/ml de CCH nativa y desglucosilada en células MB-49 y B16F10, respectivamente. Las células fueron teñidas con un anticuerpo H-2Kb conjugado a ficoeritrina. SSC, Side Scatter (Figura representativa de tres experimentos independientes).

9.3.1 Estudio de la viabilidad de células tumorales murinas enfrentadas a hemocianinas

Aunque los resultados anteriores demuestran que las células tumorales incorporan CCH, no permiten evaluar si su endocitosis induce un cambio en la viabilidad de dichas líneas celulares. Para resolver esta interrogante se realizaron ensayos de proliferación celular usando el reactivo MTT, en donde las células tumorales murinas (B16F10 y MBT-2) se incubaron por 72 h con distintas concentraciones de CCH, KLH y sus correspondientes formas desglicosiladas químicamente y FLH (100 µg/pozo). Como control positivo se utilizó Doxorubicina (10 µM por 72 h) una conocida droga antitumoral que es frecuentemente usada en quimioterapia [102, 103]. Se debe destacar que para realizar estos ensayos y evidenciar el efecto de las hemocianinas sobre las líneas en estudio, fue necesario ajustar el número de células a alrededor de 5.000 células/pozo. Estudios preliminares con 20.000 células/pozo, no mostraron efecto (Informe de Avance N°1).

En la Figura 9a se observa que las células B16F10 y MBT-2 incubadas con 100 µg/pozo de CCH y FLH presentan alrededor de un 85% de viabilidad. Cuando las células fueron tratadas con KLH la viabilidad de ambas líneas celulares disminuyó significativamente hasta aproximadamente un 40%. En este sentido, CCH y FLH presentan un comportamiento antitumoral similar, a diferencia de KLH.



Figuras 9. Efecto de hemocianinas sobre la viabilidad de líneas de melanoma murino y humano. a) Ensayos de viabilidad con MTT de células B16F10 y MBT-2 (5000 células/pozo) tratadas con hemocianinas nativas o desglucosiladas. Análisis estadístico, *** = $p < 0,001$ – one-way ANOVA, Bonferroni post-test.

9.3 Estudio de la incorporación de hemocianinas en DCs

Ha sido reportado que la respuesta inmune antitumoral inducida por CCH y KLH genera una potente activación del sistema inmune en ratones sensibilizados, promoviendo la activación de linfocitos T y B, lo que conlleva a una gran liberación de citoquinas de tipo Th1 y a una potente generación y secreción de anticuerpos, dada su naturaleza xenogénica, sumado a un aumento de la actividad citotóxica de células NK [4, 104].

Considerando los resultados previamente mostrados, que indicaron que las hemocianinas en estudio solo tendrían en común residuos de manosa terminales, los cuales proponemos en esta tesis que podrían estar involucrados en la activación del sistema inmune y en su efecto antitumoral no específico, se decidió utilizar como modelo a CCH desglicosilada y su forma nativa como control, para analizar la participación de residuos de manosa en la activación y maduración de DCs. Se eligió CCH porque es una proteína más estable y soluble que KLH y FLH [8, 105] lo que simplifica los experimentos destinados a modificarla químicamente. Además, conocemos su estructura [3, 13, 91] sumado a que el clonamiento de sus genes ya ha sido abordado [106].

9.4.1 Participación de receptores de manosa en la incorporación de CCH en DCs cultivadas *in vitro*

Como objetivo inicial nos propusimos investigar la importancia que tienen los residuos terminales de manosa de CCH en la endocitosis de DCs. Para esto, se estableció un ensayo de competencia que consistió en pre-incubar las células dendríticas durante 30 min con distintas concentraciones de D-manosa o D-fucosa en solución. Posteriormente, las células se incubaron con CCHAlexa488 por 1 y 3 h. Se debe mencionar que el receptor de manosa que se expresa en DCs presenta una alta afinidad por glicoproteínas ricas en residuos terminales de D-manosa y L-fucosa [107], es por eso que se utilizó D-fucosa como control negativo y además, nos permitió visualizar cualquier otro efecto provocado por un aumento de la viscosidad del medio. Los resultados que se muestran en la Figura 10a, muestran que en las células que fueron pre-incubadas con D-manosa (125 y 62,5 mM) se inhibió en forma dosis-respuesta la incorporación de CCH en comparación con D-fucosa.

Los resultados anteriores, permiten señalar que los residuos de manosa asociados a CCH participan parcialmente en su incorporación por DCs. Sin embargo quedaba por dilucidar si la falta de estos carbohidratos interfería en la incorporación de esta proteína por DCs. Con este propósito, mediante citometría de flujo, se analizó la endocitosis de CCH nativa y desglicosilada a 3 y 24 h, utilizando un antisuero de conejo anti-CCH, a una dilución tal que ambas hemocianinas fueran reconocidas de igual manera, lo cual se determinó previamente mediante un ensayo de ELISA de captura para establecer el título del suero para cada forma de la proteína.

En 1984, Unanue y cols, demostraron que la inmunogenicidad de KLH, en parte, depende de su unión a la membrana plasmática de células presentadoras de antígenos [108]. Por esta razón, quisimos analizar si CCH nativa y desglicosilada se localizaban en la membrana celular. Como se muestra en la Figura 10c, Ox-CCH permanece fuertemente y por más tiempo unida a la membrana de DCs (reflejado en una alta intensidad de fluorescencia) a diferencia de la proteína nativa.

El siguiente paso fue analizar la incorporación de la hemocianina en el citoplasma de las células. Con este propósito las células fueron fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con Tritón X-100. La Figura 10d muestra que a las 3 h de incubación la hemocianina desglicosilada ingresó de igual manera a la célula que CCH nativa y que este fenómeno se mantiene a las 24 h, resultados que señalarían que los carbohidratos de CCH no son determinantes en su endocitosis por DCs.

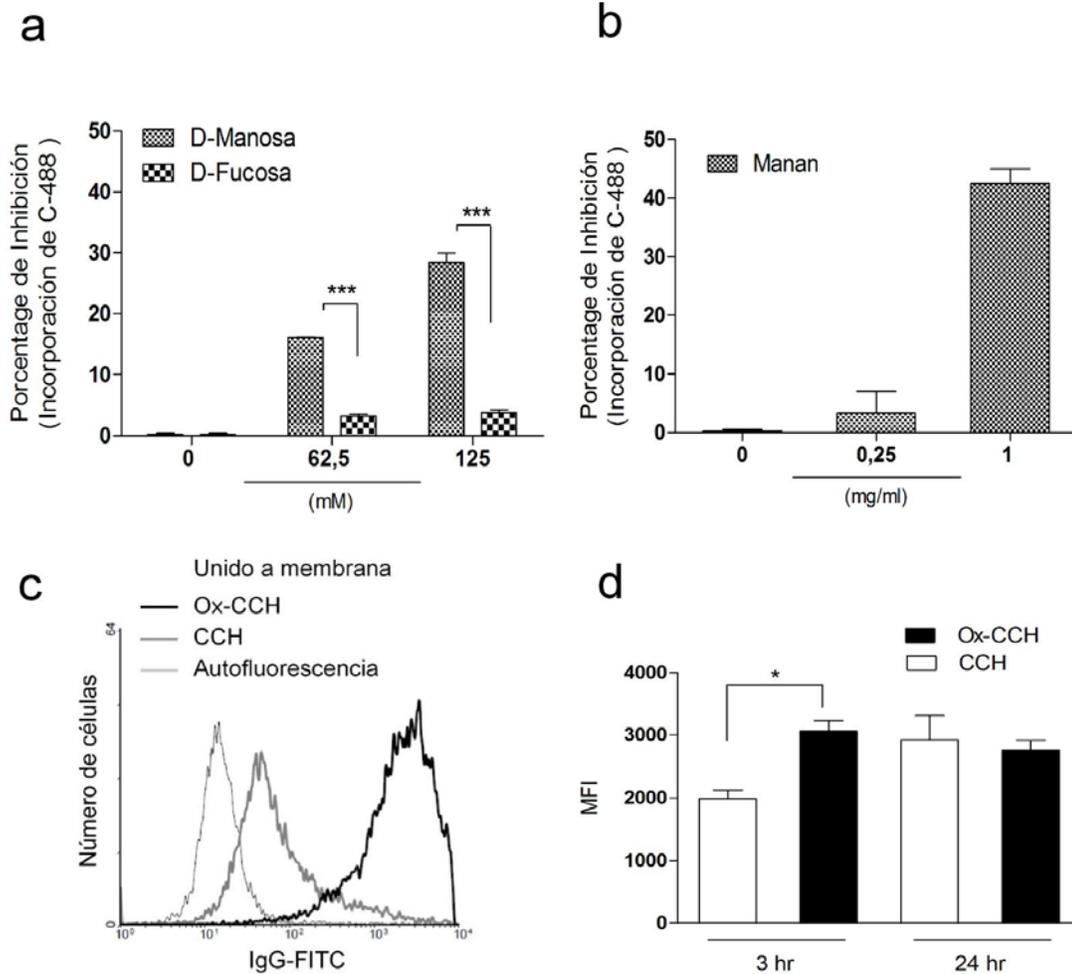


Figura 10. Participación de receptores de manosa en la incorporación de CCH en DCs. a) y b) Participación de manosa en la endocitosis de CCHAlexa488 en DCs. DCs fueron pre-tratadas con distintas concentraciones mM de D-Manosa y D-Fucosa en solución por 30 min, luego se incubaron por 1 y 3 h (a y b, respectivamente) con CCHAlexa488 (50 μ g/ml) y adquiridas en un citómetro de flujo (n=2, ** = p<0,01 y *** = p<0,001 – oneway ANOVA, Bonferroni post-test). **c) y d)** Citometría de flujo que muestra la MFI observada en la superficie celular (c) y citoplasma (d) de DCs incubadas por 24 h con CCH nativa y desglucosilada y reveladas con un antisuero policlonal anti-CCH y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo-FITC. La intensidad de fluorescencia graficada en la Figura 5d corresponde al MFI de las células permeabilizadas (CCH por dentro y fuera) menos la intensidad de las no permeabilizadas (CCH por fuera) (n=2, * = p<0,05 – oneway ANOVA, Bonferroni post-test).

9.4.2 Tipo de endocitosis involucrada en la internalización de CCH y Ox-CCH

Los azúcares juegan un importante papel en los mecanismos por los cuales diferentes APC internalizan glico-antígenos. Es así que células dendríticas reconocen los oligosacáridos mediante receptores de lectinas, permitiendo, generalmente, que la internalización de esos glico-antígenos sea mediada a través de vesículas recubiertas de clatrina o endocitosis mediada por receptores. El mecanismo de incorporación de las hemocianinas y en particular de CCH es poco conocido, es por eso que mediante microscopía electrónica de transmisión analizamos si la presencia o ausencia de los azúcares de CCH tiene un impacto en el mecanismo de endocitosis utilizado por BMDCs. Con este propósito, las células fueron incubadas con CCH (100 µg/ml) a tiempos tempranos (1-5 min) y analizadas al TEM. Dado el enorme tamaño de CCH y su forma característica de cilindro hueco, se facilita enormemente su análisis por esta metodología, no siendo necesario recurrir a técnicas de ultraimunocitoquímica.

Los resultados resumidos en la Figura 11 señalan que el principal mecanismo de endocitosis de hemocianina ya sea nativa o desglicosilada usado por BMDCs es a través de macropinocitosis, reflejado en la presencia de numerosos procesos citoplasmáticos que envuelven moléculas localizadas en la superficie celular como así mismo, vacuolas superficiales conteniendo moléculas intactas (Figura 11a) y también, pero en mucho menor medida, se observaron moléculas asociadas a vesículas recubiertas de clatrina (Figura 11b). Además, corroboran que los azúcares de CCH no son determinantes para que células dendríticas internalicen y procesen estas glicoproteínas.

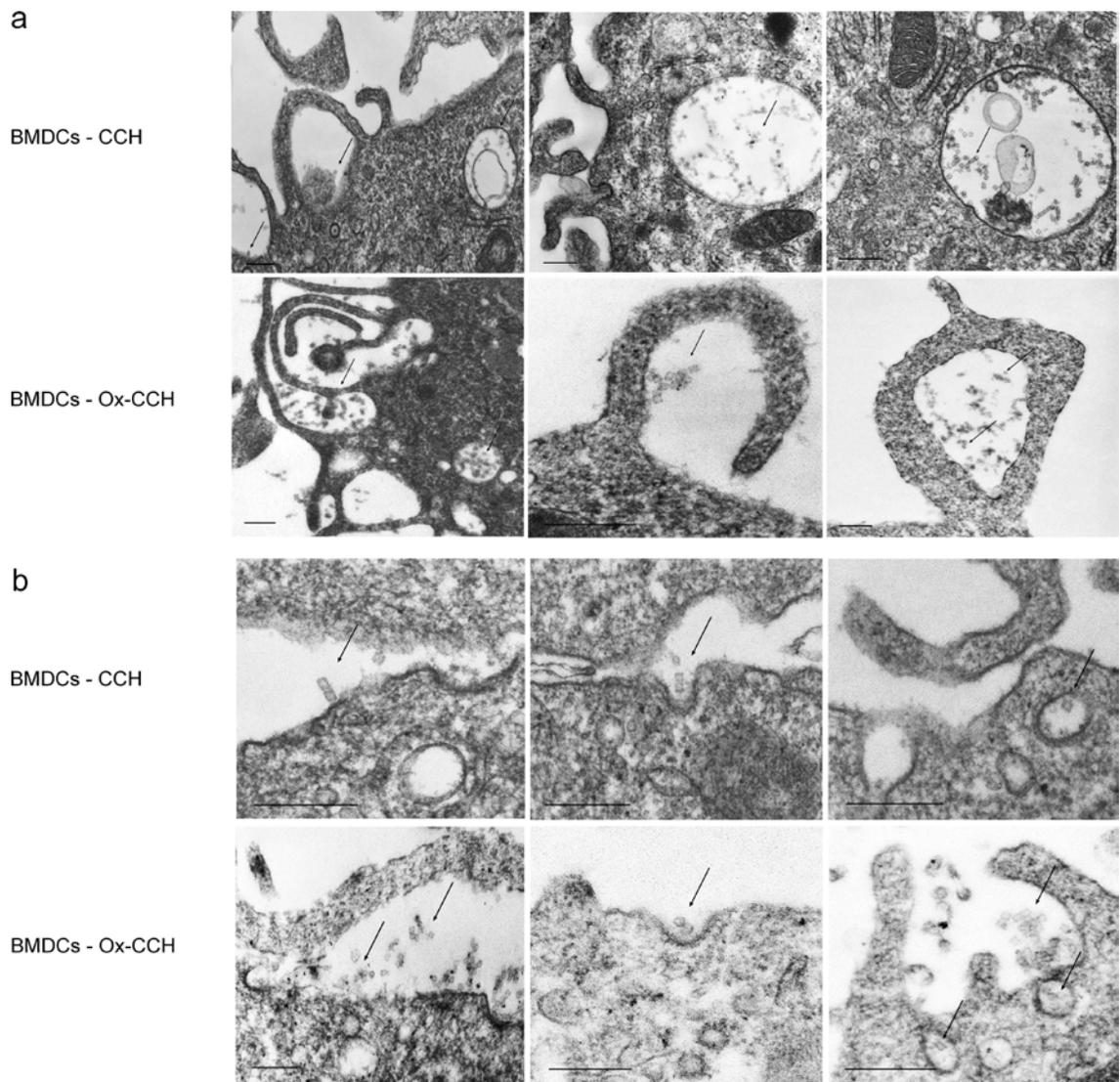


Figura 11. Tipos de endocitosis de CCH. a) y b) BMDCs fueron incubadas con CCH nativa o desglucosilada químicamente (100 µg/ml) por 5 min. Luego, las células fueron lavadas, centrifugadas y fijadas. Las muestras fueron analizadas por MET (a) macropinocitosis y (b) endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina. En los insertos de las figura 11a y 11b las flechas muestran en detalle las moléculas CCH u Ox-CCH [1]. La barra representa un aumento de 100 nm.

9.4 Procesamiento de CCH por DCs

Para determinar posibles diferencias en el procesamiento entre CCH nativa y su forma desglicosilada se cultivaron células dendríticas obtenidas desde medula ósea de ratones C57BL/6, con dichas proteínas durante diferentes tiempos y posteriormente, se analizó por *Western blot* su perfil de procesamiento. La Figura 12a muestra un análisis temporal de la proteólisis de CCH nativa y desglicosilada por DCs. Se observa que las DCs incubadas con CCH nativa al denominado tiempo 0 (esto es que se agregó la proteína y se lavó de inmediato) un conjunto de bandas de alto peso molecular (entre 390 y 108 kDa) características de CCHB, ya que se ha utilizado un anticuerpo monoclonal específico de esta subunidad [13]. Sin embargo, a las 3 h de incubación las DCs comienzan a procesar la proteína encontrándose entre las 24 y 72 h una banda única de alrededor de 50kDa. Por otra parte, Ox-CCH prácticamente no aparece en el gel hasta las 24 h de tratamiento, además y al igual que la proteína nativa, a las 24 y 72 h se distingue la misma banda de 50 kDa. Esta banda se presume que corresponde a una unidad funcional (FU).

Ha sido demostrado que la persistencia de un antígeno en el tiempo debido a un retardo de su procesamiento en DCs provoca un aumento significativo de su inmunogenicidad [109]. Con esto en mente, quisimos estudiar como las DCs discriminan y procesan la hemocianina de *Concholepas* en comparación a otra proteína modelo en inmunología como es ovoalbumina (OVA) y si este fenómeno podría estar relacionado con la alta capacidad de estimular el sistema inmune que tienen las hemocianinas. En la Figura 12b se muestra un *Western blot* de extractos de DCs que fueron pulsadas por 3 h con CCH y OVA. Los resultados indican que a las 72 h CCH aun permanece sin ser procesada totalmente, a diferencia de OVA que después de las 24 h no es reconocida por una mezcla de anticuerpos monoclonales anti-OVA, sugiriendo su total procesamiento. Por otra parte, a través de TEM observamos que Ox-CCH se acumula y permanece por más tiempo como molécula intacta en estructuras endosomales, en comparación con la proteína nativa (Figura 12c).

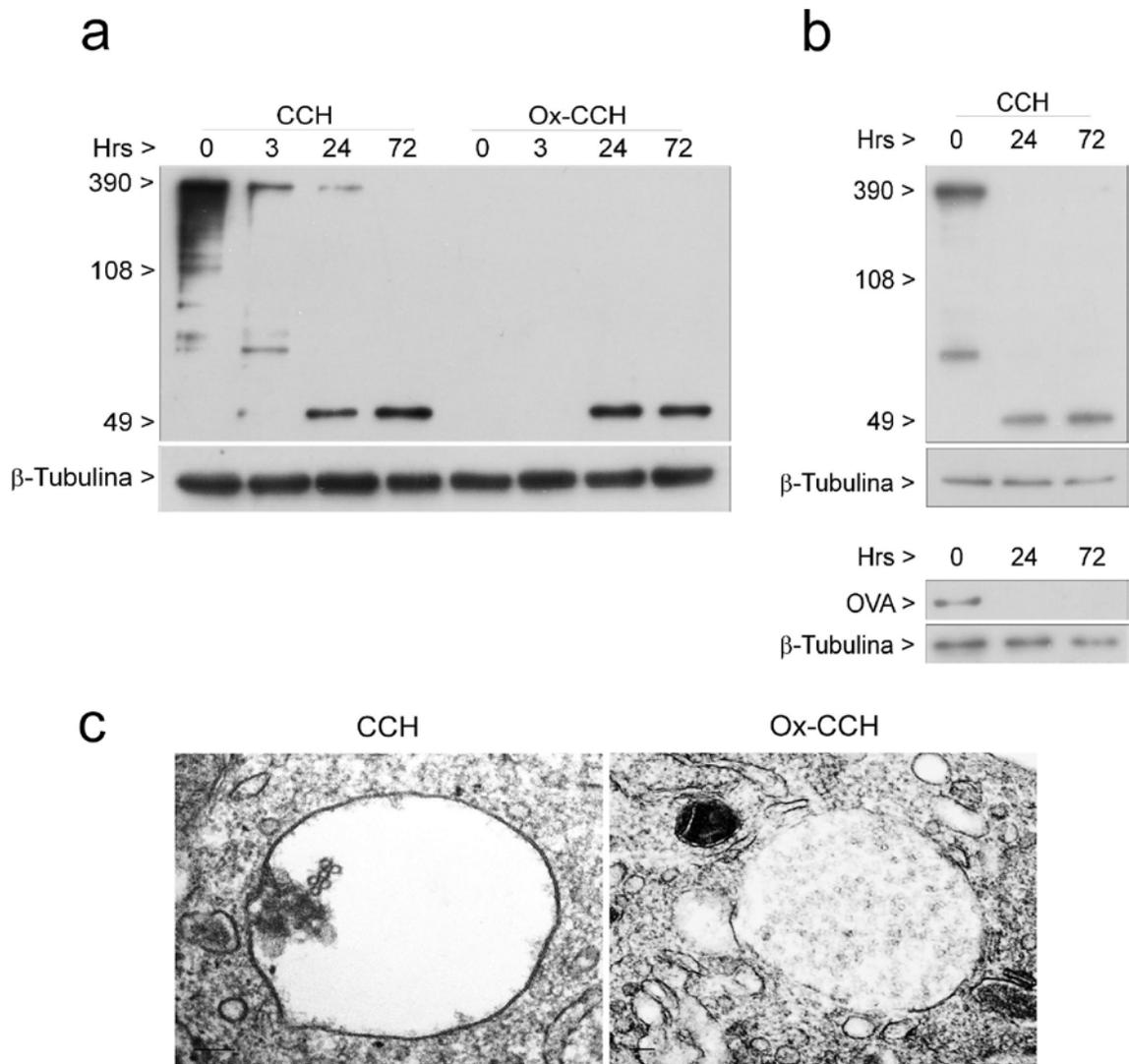


Figura 12. Procesamiento de CCH por DCs cultivadas *in vitro*. **a)** *Western blot* de DCs que fueron incubadas por 0, 3, 24 y 72 h con CCH nativa y desglucosilada (100 μ g/ml). Luego de preparar el extracto y correr el gel las muestras fueron analizadas con un anticuerpo monoclonal anti-CCHB y reveladas con un anticuerpo secundario anti-IgG ratón marcado con peroxidasa (1:20000) (Figura representativa de dos experimentos). **b)** *Western blot* de DCs pulseadas por 3 h con CCH u OVA y posteriormente fueron cosechadas a las 0, 24 y 72 h. CCH fue revelado con un mAb contra la subunidad CCHB y para OVA se utilizaron tres anticuerpos monoclonales (Figura representativa de dos experimentos). **c)** MET de DCs incubadas por 24 h con CCH y Ox-CCH (100 μ g/ml) (Figura representativa de dos experimentos independientes) [1].

9.6 Bioensayos para evaluar el efecto antitumoral de hemocianinas *in vivo* en un modelo de melanoma murino

Con el propósito de determinar la participación de los azúcares de las hemocianinas en la respuesta antitumoral no específica de estas proteínas, se realizaron ensayos en ratones C57BL/6 desafiados células tumorales de melanoma murino, de la línea de melanoma B16F10. El primer paso para desarrollar este objetivo fue determinar el número de células necesario para observar un posible efecto inmunoterapéutico, debido a que si se inyectan pocas células la respuesta inmune antitumoral del ratón basta para eliminarlas y si se pone un exceso, el tumor crecerá de todas maneras. Es así como ratones C57BL/6 fueron inyectados en el flanco derecho con diferentes cantidades de células B16F10 (1×10^5 , 2×10^5 y 4×10^5) para evaluar la evolución temporal del crecimiento del tumor, además del porcentaje de animales portadores del mismo. Los resultados indicaron que cuando se usaron entre 1×10^5 y 2×10^5 células era posible observar el efecto antitumoral de las proteínas en estudio, ya sea evitando o retardando el crecimiento del tumor y en consecuencia, aumentando la sobrevivencia de los animales, ya que no hubo animales muertos en los primeros 25 días a diferencia de cuando se utilizaron 4×10^5 células en donde algunos animales murieron antes de los 20 días (Figura 13).

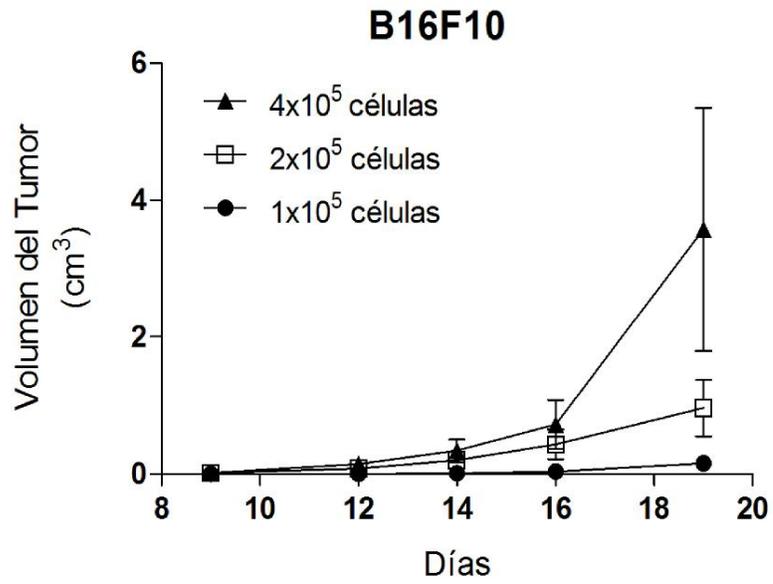


Figura 13. Determinación del número de células de melanoma de la línea B16F10 a utilizar en un bioensayo antitumoral para probar el efecto inmunoterapéutico de las hemocianinas. Estandarización del número de células de melanoma apropiado para observar un efecto inmunoterapéutico de hemocianinas (tres ratones por grupo, n=1).

Posteriormente, se estableció el protocolo general del bioensayo que se muestra en la Figura 14a, basados en trabajos previos de nuestro laboratorio [91]. Las variaciones de este protocolo se indican en las leyendas de las figuras respectivas. El primer día del bioensayo (ó día -19) los ratones fueron sensibilizados subcutáneamente en el flanco derecho con 400 µg de hemocianina o fueron dejados sin sensibilizar (dependiendo de las condiciones del experimento) por 19 días. Al día 0, los ratones fueron inyectados subcutáneamente en el mismo flanco con $1,5 \times 10^5$ células B16F10. El día 1 se inició una terapia durante 6 días consecutivos, inyectando en los ratones intralesionalmente 100 µg de CCH nativa o desglicosilada. En estas condiciones, se observó que entre el día 10 a 15 comenzaron a aparecer los tumores, los cuales se midieron día por medio hasta el día 25, momento en el cual algunos de los tumores crecen exponencialmente y se hace complicada la manipulación de los ratones. Posteriormente, se evaluó hasta el día 60 la sobrevivencia de los ratones frente a las distintas terapias.

El primer bioensayo realizado tuvo como objetivo determinar la capacidad antitumoral de CCH y la participación de sus azúcares en ratones C57BL/6 enfrentados a células B16F10. Cabe señalar que a la fecha no ha sido reportado el efecto de KLH o CCH por sí mismas en modelos tumorales de melanoma a diferencia del cáncer superficial de vejiga [4, 110]. Por esta razón, se privilegió en esta tesis el uso de la línea de melanoma. Además porque numerosas vacunas terapéuticas para melanoma utilizan hemocianina como *carrier* de TAA.

Como no hay antecedentes del efecto de la hemocianina por sí sola sobre modelos de melanoma murino *in vivo*, primeramente, se evaluó si tenía un efecto terapéutico y si este requería de una sensibilización previa de los animales. La Figura 14b muestra el transcurso temporal del crecimiento del tumor (B16F10) en ratones que no fueron sensibilizados con las hemocianinas. Los resultados señalan que no existen diferencias en el tamaño del tumor entre el control con PBS, CCH nativa y desglicosilada. Por otra parte, los ratones previamente sensibilizados con hemocianina presentaron una disminución significativa en el volumen del tumor. Estos resultados sobre el efecto de la sensibilización, han sido previamente reportados usando el modelo de tumor de

vejiga y claramente demuestran la importancia de la respuesta adaptativa en el efecto antitumoral no-específico de estas proteínas [4, 91]. Sin embargo y para nuestra sorpresa, FLH tuvo un efecto antitumoral sobre el crecimiento del tumor superior a CCH y KLH (Figura 14c). El porcentaje de animales con tumores hasta el día 25 fue categórico, de los ratones que recibieron la inmunoterapia con FLH solo un 25% presentan tumores, a diferencia de los ratones inmunizados con CCH y KLH que muestran una tendencia similar o igual a los tratados con PBS (Figura 14d).

El tiempo de duración de los bioensayos fueron 60 días, durante los cuales se evaluó la supervivencia de los ratones con la terapia antitumoral. Se observó que las curvas de supervivencia de los ratones tratados con KLH y CCH fueron similares, esto es que a los 60 días entre un 0 y 10% respectivamente de los animales sobrevivió, resultados que fueron concordantes con la tendencia observada en los gráficos del progreso del volumen tumoral.

Por otra parte, los ratones inmunizados con FLH alcanzaron un porcentaje de supervivencia cercano al 60% a los 60 días del bioensayo (Figura 14e). Estos resultados fueron inesperados y sorprendentes porque por primera vez muestran que existen hemocianinas cuyas propiedades intrínsecas las hacen mejor inmunoestimulante no-específico.

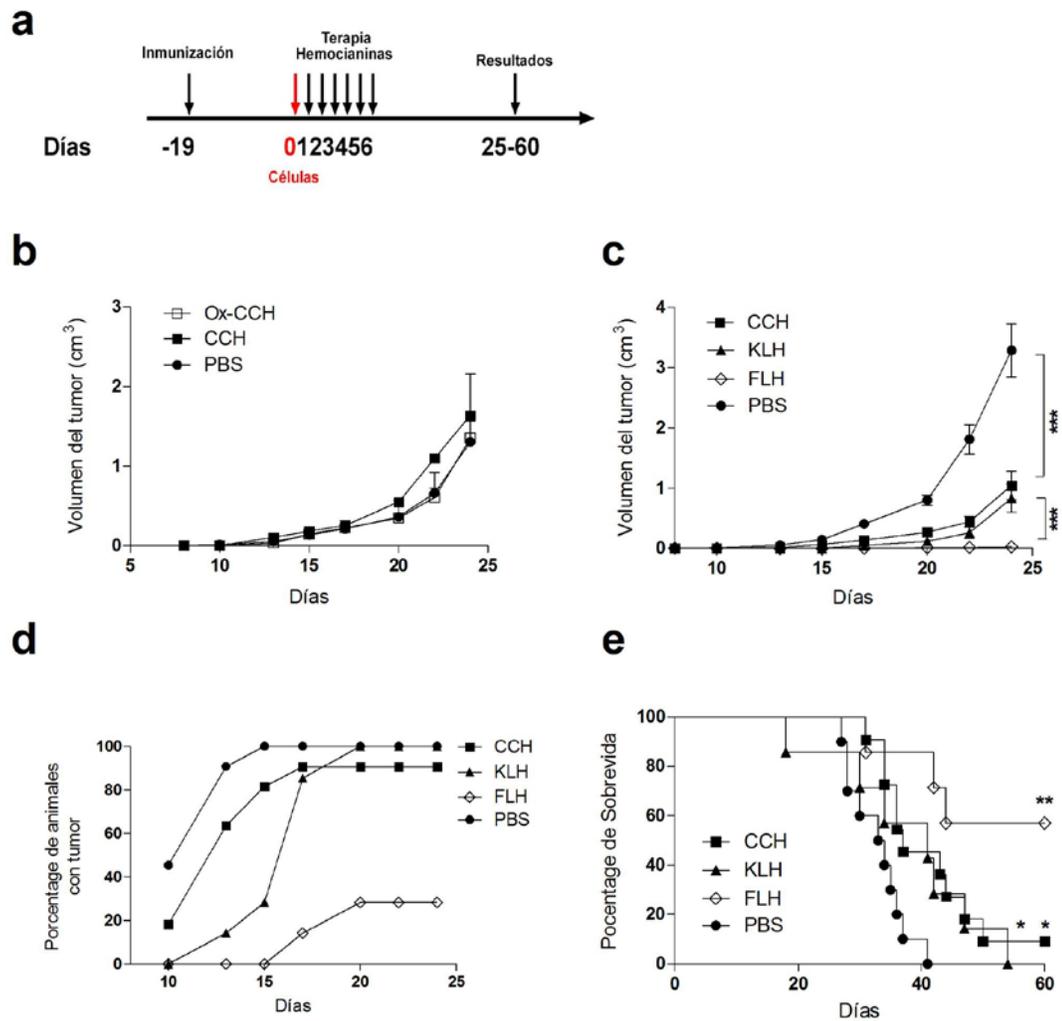


Figura 14. Efecto antitumoral no-específico de hemocianinas en melanoma murino . a) Esquema que detalla las etapas del bioensayo **b)** Bioensayo de ratones no sensibilizados en el día -19. **c)** Bioensayos de ratones C57BL/6 inmunizados con 400 µg de hemocianinas que al día 0 fueron enfrentados a $1,5 \times 10^5$ células B16F10 para posteriormente continuar con una terapia diaria de 6 días consecutivos con 100 µg de cada hemocianina. El largo y el ancho del tumor fue medido y la fórmula utilizada para calcular el volumen del tumor fue $0,52 \times (\text{largo} \times \text{ancho}^2)$ (7-11 ratones por grupo, one-way ANOVA - Bonferroni post-test) **d)** Porcentaje del número de animales con tumor. **e)** Medición de la sobrevivencia de los ratones hasta el día 60 (7-11 ratones por grupo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ - Wilcoxon test).

9.6.1 Participación de los azúcares en el efecto antitumoral de las hemocianinas en melanoma murino

Se utilizó el bioensayo de melanoma para determinar el efecto antitumoral *in vivo* de las hemocianinas desglicosiladas, específicamente de CCH y FLH. Ambas hemocianinas fueron desglicosiladas químicamente de acuerdo al protocolo establecido en materiales y métodos, usándose el mismo régimen de tratamiento que con las hemocianinas nativas (Figura 14a).

Los resultados indicaron que Ox-CCH disminuyó el crecimiento del tumor en comparación con el control y que esta reducción fue significativamente mayor que el de la proteína nativa (Figura 15a). En contraste, no se encontraron diferencias en el volumen del tumor entre FLH nativa y la proteína desglicosilada (Figura 15b), destacándose que ambas presentaron un mayor efecto antitumoral que CCH.

Los datos de supervivencia señalan que CCH nativa y desglicosilada no presentaron diferencias entre sí, alcanzándose entorno a un 10% de supervivencia, siendo ambas curvas significativas frente al control (Figura 15c). En cambio los ratones tratados con FLH nativa, alcanzaron una supervivencia de alrededor de un 60%, a diferencia de la proteína desglicosilada que disminuyó drásticamente su eficacia frente a la proteína nativa, puesto que ningún ratón sobrevivió a los 60 días, no obstante fue significativamente mejor que el control con PBS (Figura 15d).

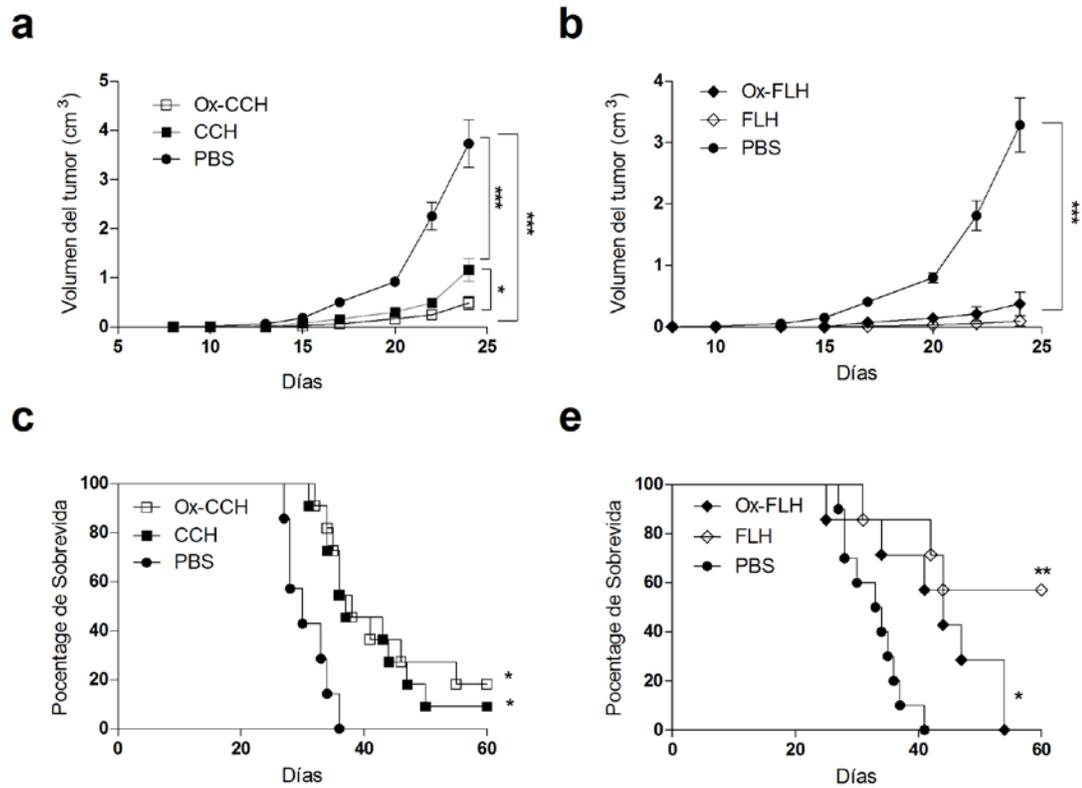


Figura 15. Análisis del efecto antitumoral de CCH y FLH desglicosiladas. **a y b)** Gráficos que muestran el crecimiento del volumen del tumor en ratones inmunizados con proteínas nativas o desglicosiladas (7-11 ratones por grupo, * = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$ - one-way ANOVA - Bonferroni post test). **c y d)** Supervivencia de los ratones enfrentados a las hemocianinas nativas o desglicosiladas (7-11 ratones por grupo, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ - Wilcoxon test).

9.7 Respuesta inmune celular antitumoral en ratones desafiados con melanoma

Debido a los resultados obtenidos en los bioensayos para determinar el efecto antitumoral con las distintas hemocianinas, se decidió medir los niveles de IFN- γ circulante, porque dicha citoquina es conocida por su importante papel en la defensa contra los tumores primarios [111]. Con este propósito, se colectaron los sueros de los ratones al día 13 del bioensayo, momento en el cual recién es posible discriminar con certeza los tumores a simple vista. La Figura 16a muestra que CCH, KLH y FLH inducen un aumento significativo de la secreción de IFN- γ , en relación al control (PBS). Además, se demostró que los azúcares no participan en el mecanismo de producción y liberación de IFN- γ , debido a que no se observaron diferencias entre las hemocianinas nativas y las desglicosiladas (Figura 16b), siendo que como se mostró anteriormente, CCH difiere grandemente en su composición de azúcares expuestos al ser comparada con KLH y FLH, las cuales presentan gran similitud.

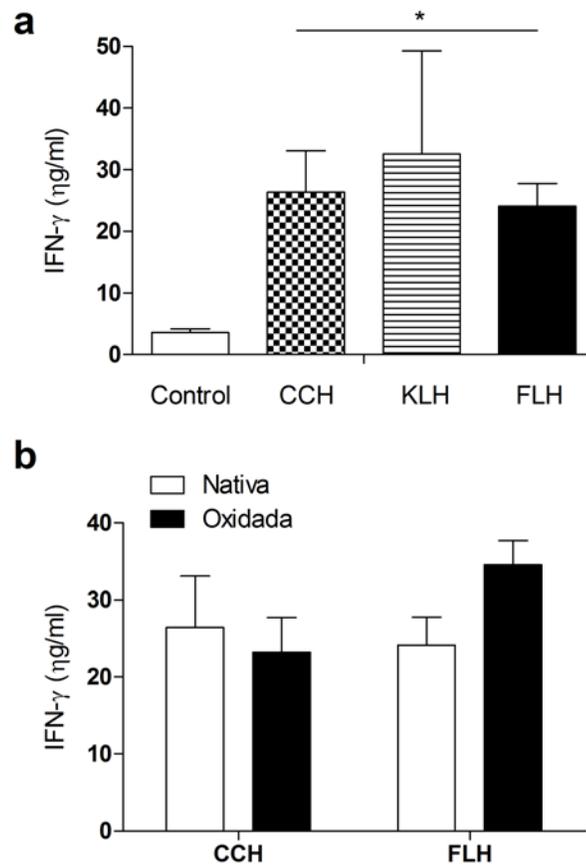


Figura 16. Perfil de IFN- γ en animales desafiados con células tumorales de melanoma y sometidos a inmunoterapia con distintas hemocianinas. a) y b) Se utilizó un ELISA de captura comercial para medir la secreción de IFN- γ de *pools* de sueros de 7-11 ratones recolectados a los 13 días post enfrentamiento con las células de melanoma B16F10. Este experimento representa un n=3 y las determinaciones fueron realizadas en duplicado (* = p<0,05, one-way ANOVA, Dunett post-test).

9.8 Respuesta inmune humoral murina frente a las hemocianinas nativas y desglicosiladas

Una de las principales cualidades de las hemocianinas de moluscos es su capacidad de activar el sistema inmune humoral de los mamíferos viéndose reflejado en una gran producción de anticuerpos específicos. Debido a esta característica, durante más de 35 años, las hemocianinas han sido utilizadas como proteínas *carrier* para generar anticuerpos contra péptidos y moléculas de haptenos. Desde esta perspectiva, quisimos evaluar la capacidad humoral de las hemocianinas clásicas (CCH y KLH) y la recientemente descubierta (FLH), y sus contrapartes desglicosiladas durante la respuesta inmune secundaria de ratones C57BL/6.

En la Figura 17a y b se presenta la respuesta humoral secundaria de ratones C57BL/6 enfrentados a CCH y KLH, ya sea nativas y desglicosiladas. Los resultados, sorpresivamente, indican que la desglicosilación de CCH aumentó significativamente su inmunogenicidad, como lo refleja el alto título de anticuerpos específicos presentes en el suero de los animales inmunizados. En contraste, el título de Ox-KLH aunque no presentó diferencias significativas frente al de la proteína nativa, muestra una tendencia a disminuir (Figura 17b).

Debido a que las hemocianinas son mayormente utilizadas como proteínas *carriers*, se evaluó si la ausencia de los azúcares afectaba dicha propiedad. Para esto, IgG humana fue acoplada a CCH y Ox-CCH y luego inyectadas vía i.p en presencia de CFA o IFA. Los resultados señalan que Ox-CCH es mejor *carrier* que CCH debido a que se encontró un mejor título de anticuerpos anti-IgG en el suero de los animales de experimentación (Figura 17c).

Para los ensayos de la Figura 17d y e se utilizaron los mismos sueros que se recolectaron para determinar la secreción de IFN- γ mostrados en la Figura 16 y que corresponden a sueros obtenidos a los 13 días posteriores al enfrentamiento con las células tumorales. Los resultados mostraron que FLH por sí sola es más inmunogénica que CCH y KLH, ya que induce una mayor liberación de anticuerpos específicos

(Figura 16d). Por otra parte, y al igual que Ox-CCH, Ox-FLH presentó una mayor inmunogenicidad que su contraparte nativa (Figura 17e).

Se ha postulado que los azúcares de las hemocianinas inducen anticuerpos que presentarían reacciones cruzadas con oligosacáridos presentes en la superficie celular de los tumores [2]. Esta idea se fundamenta en que las células normales cambian su perfil de azúcares cuanti- y cualitativamente cuando se malignizan [66, 112]. De esta forma, los anticuerpos que reconocen estructuras oligosacáridas podrían reaccionar con los azúcares de células tumorales generando una respuesta inmune adaptativa que eliminaría la célula maligna. Por esta razón, evaluamos si había reacción cruzada entre los anticuerpos anti-hemocianinas y moléculas presentes en la superficie celular de las células tumorales usadas en este estudio. Para realizar este experimento se obtuvieron sueros de los ratones que habían sido previamente sensibilizados con KLH, CCH y FLH y se incubaron en placas de ELISA de 96 pocillos activadas 24 h antes con 2×10^4 células B16F10. Los resultados que se presentan en la Figura 17f indican que no existe reacción cruzada entre los azúcares presentes en la superficie celular de las células tumorales y los presentes en la hemocianinas en estudio.

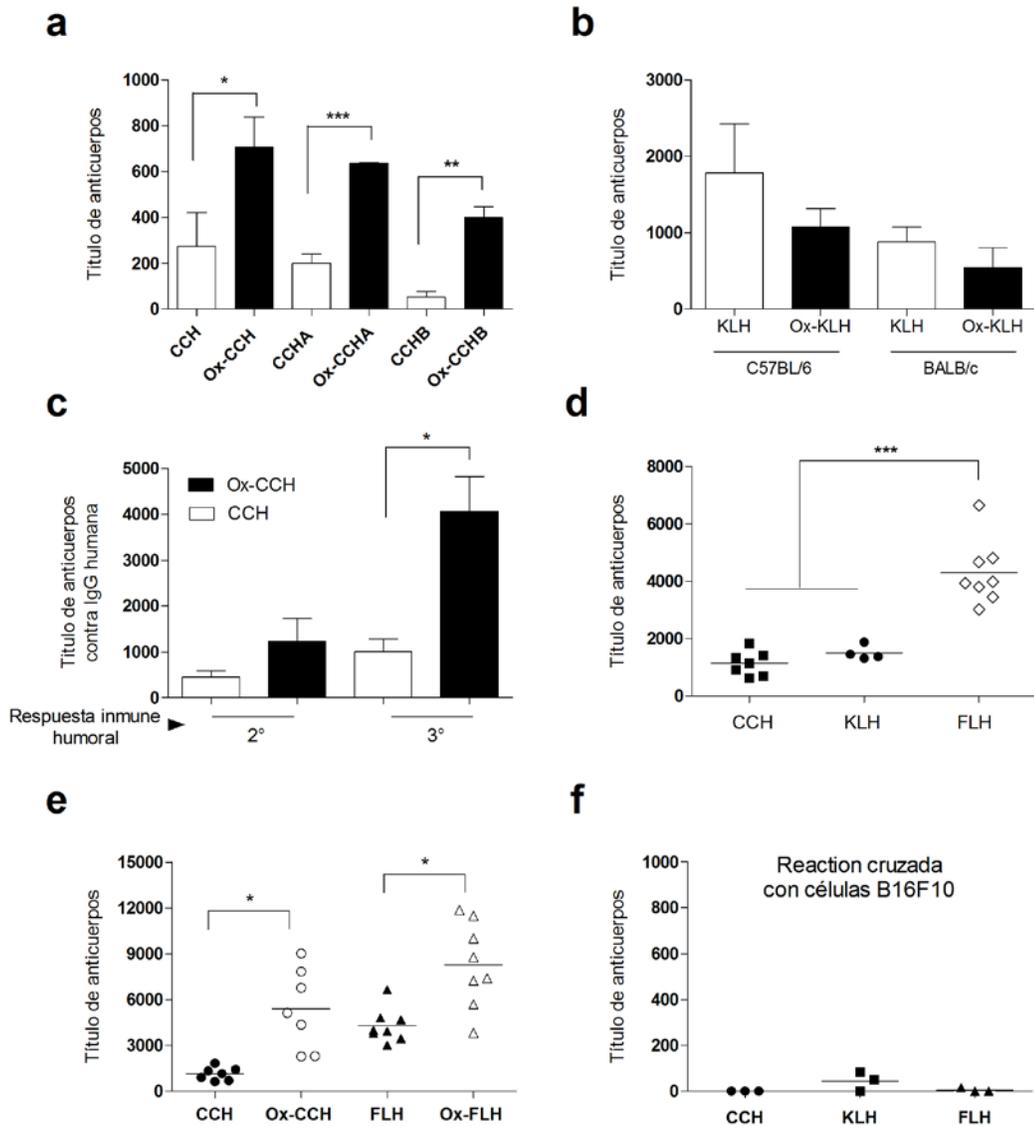


Figura 17. Respuesta inmune humoral contra las hemocianinas en estudio. a) y b) Comparación entre los títulos de hemocianinas nativas y desglucosiladas de sueros de ratón que fueron inmunizados con 200 ug de cada hemocianina vía i.p. (n=3). **c)** Determinación de la propiedad como proteína carrier. CCH nativa y desglucosilada (300 ug) fueron acopladas a IgG humana (100 ug) y luego mezcladas con coadyuvante de Freud's completo e incompleto y fueron inyectadas a ratones Balb/c vía i.p. Posteriormente, los ratones fueron sangrados y se determinó el título contra la IgG humana. **d) y e)** Títulos de sueros de ratones del bioensayo que fueron inmunizados con las hemocianinas en estudio. Se utilizó un pool de sueros de 3-5 ratones. **f)** Evaluación de la respuesta cruzada mediante un ensayo de ELISA con células B16F10 adheridas a la placa e incubadas con sueros de ratones sensibilizados con CCH, KLH y FLH. Pool de sueros de 2 ratones.

9.9 Maduración y activación de DCs por CCH

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (Del Campo M., et al., 2009) señalan que DCs tratadas con CCH entre 24 y 72 h no aumentan la expresión de marcadores de maduración (MHC-II, CD40, CD80, CD86), ya sea *in vivo* o *in vitro*, indicando que las hemocianinas no inducen cambios en el fenotipo de DCs (Figura 18). Es posible que el gran tamaño de estas proteínas y su lento procesamiento intracelular sean los responsables de que las DCs demoren más tiempo del habitual en madurar de acuerdo a lo descrito en la literatura usando proteínas modelo como OVA [25].

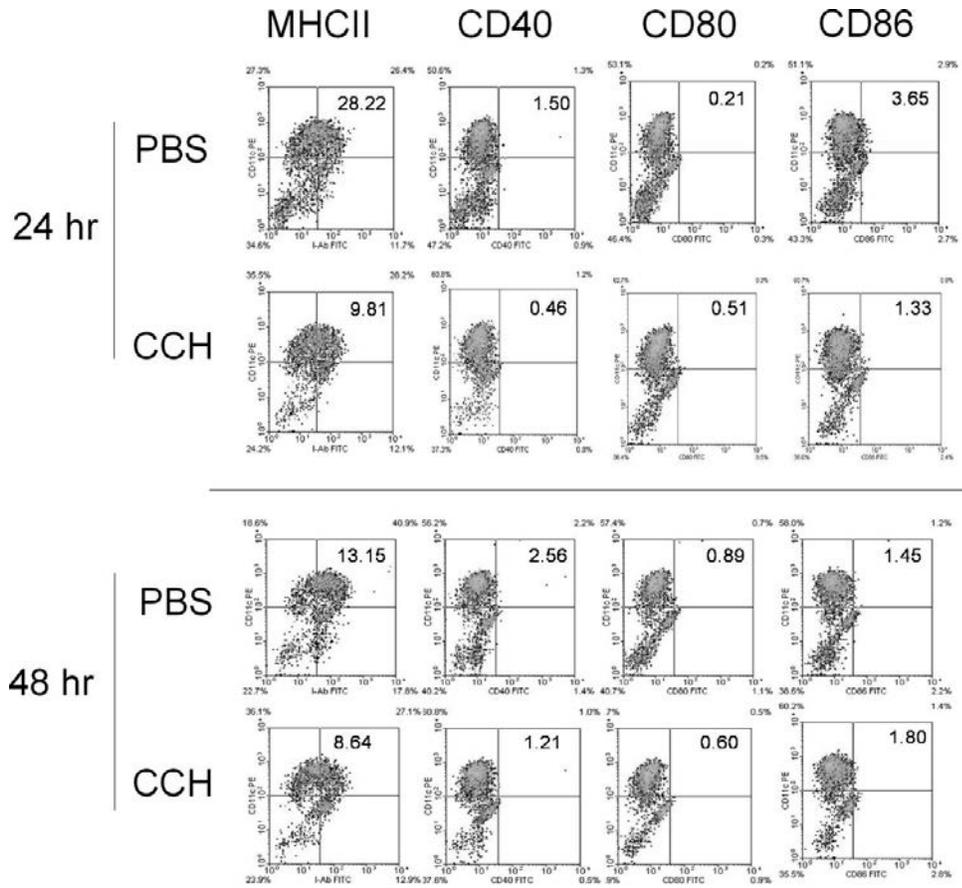


Figura 18. Maduración de células dendríticas por CCH. a) Ratones C57BL/6 fueron inmunizados e.v. con CCH (1 mg) por 24 y 48 h, *in vivo*. DCs de bazo fueron obtenidas (CD11c+) y teñidas con anticuerpos anti marcadores de maduración de DCs (MHC-II, CD40, CD80, CD86 conjugados a FITC). Los valores del cuadrante superior derecho de cada *density plot* corresponden a la intensidad de la fluorescencia de la población de ese sector (Figura representativa de al menos 10 experimentos independientes).

9.9.1 Activación de células NK

Por otra parte, quisimos investigar el papel de CCH en la activación de células NK y su participación en el inicio de la respuesta innata antitumoral. Para responder esta interrogante se realizaron ensayos de liberación de $^{51}\text{Cromo}$, porque permiten medir la activación de células NK (obtenidas de una suspensión de células de bazo de ratones *naïve*) a través de la lisis de células YAC-1 (células que no expresan MHC-I). Los resultados indicaron que a las 24 h de tratamiento ni CCH o Ox-CCH activaron las células NK a diferencia del control positivo con Poly I:C (ligando del receptor tipo Toll 3 [32] que provoca un aumento significativo de la actividad lítica de dichas células (Figura 19). En experimentos de tiempos tempranos (6 h) y tardíos (36 h) tampoco se observó activación de las células NK.

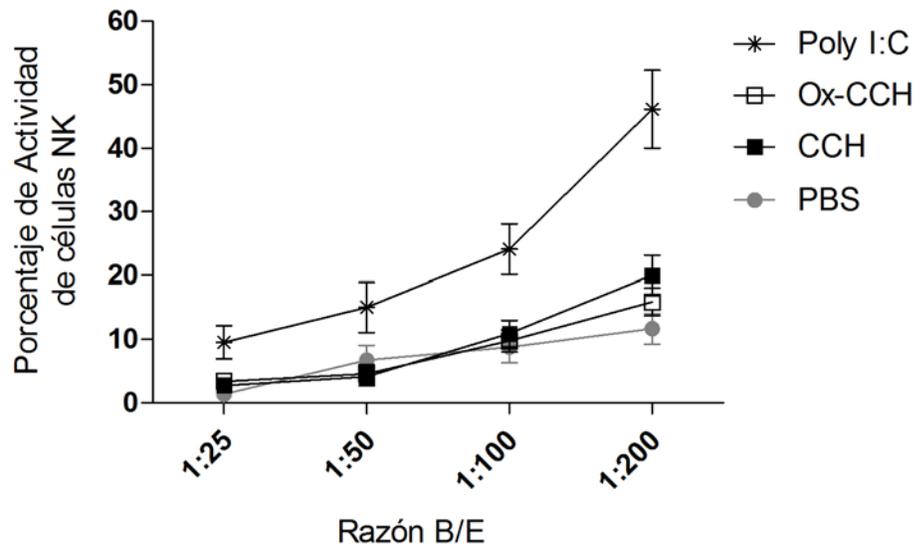


Figura 19. Actividad de células NK de ratones *naive* mediante un ensayo de liberación de ^{51}Cr .
a) Ratones C57BL/6 fueron inyectados e.v. con CCH nativa y desglucosilada. A las 24 h células mononucleares de bazo fueron extraídas y purificadas por Ficoll-Hypaque y co-cultivadas con células YAC-1 que previamente fueron incubadas con 100 μCi de ^{51}Cr . La liberación de cromo fue medida en un contador gama ($n=3$, dos ratones por grupo).

9.9.2 Producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos estimulados con hemocianinas

En la búsqueda del tipo celular que inicia la respuesta inmune antitumoral de las hemocianinas durante la respuesta innata, quisimos investigar la función que cumplirían los macrófagos. Además de las DCs, los macrófagos son otro tipo de células presentadoras de antígeno profesionales que participan en el reconocimiento de antígenos extraños. Para responder nuestra pregunta utilizamos dos tipos de ensayos que permiten visualizar el grado de activación de los macrófagos; por un lado el ensayo de Griess (que mide la formación de óxido nítrico (NO) vía la determinación de la concentración de nitritos en el medio de cultivo) y por otro lado, la expresión de marcadores de maduración por citometría de flujo.

En una primera aproximación, para el ensayo de Griess usamos dos líneas celulares tipo monocito/macrófagos; las RAW264.7 y las J774.2 porque expresan altos niveles de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), ambas provenientes de ratones BALB/c. Los resultados indicaron que ambas líneas celulares no aumentaron la producción de NO cuando fueron incubadas con las diferentes hemocianinas en estudio a diferencia del LPS, usado como control positivo y que produjo un aumento significativo de la generación de NO (Figura 20a y b).

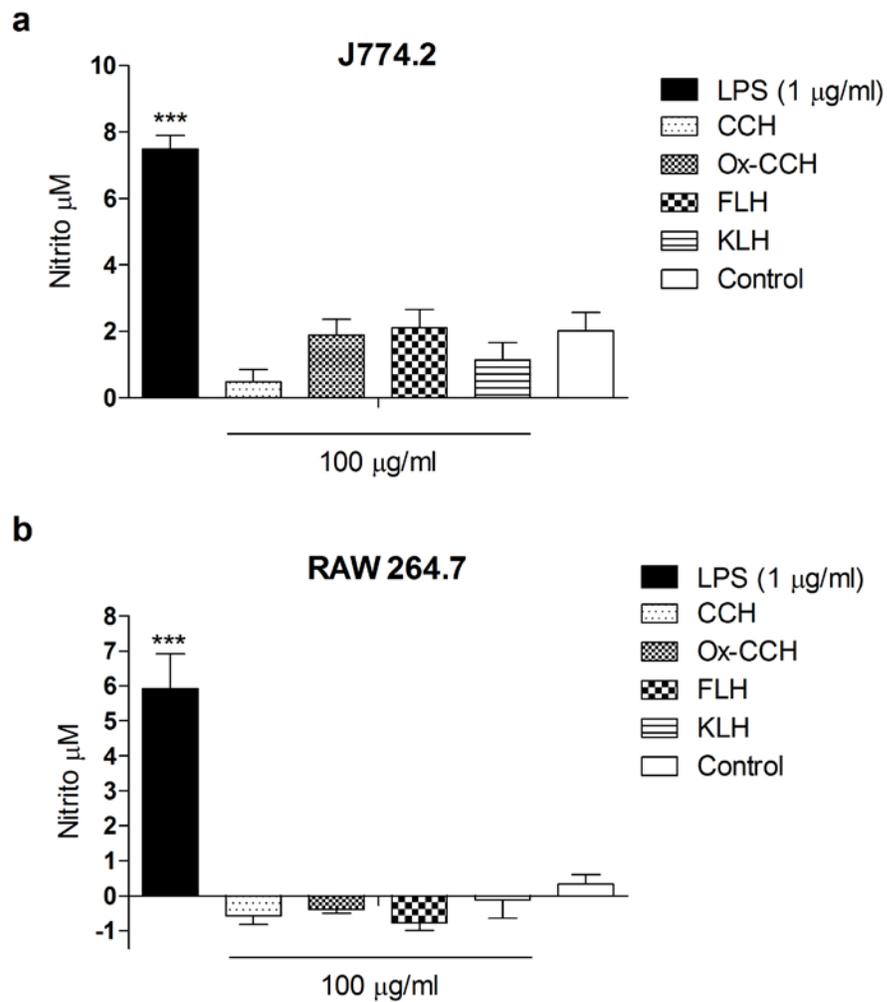


Figura 20. Activación de macrófagos por hemocianinas. a) y b) Ensayos de Griess de células J774.2 y RAW 264.7 tratadas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de cada hemocianina por 24 h ($n=3$, *** = $p<0,001$ – one-way ANOVA, Bonferroni post-test).

9.9.3 Producción de citoquinas pro-inflamatorias en DCs

El sistema inmune innato posee células especializadas que reconocen partículas extrañas u organismos patógenos alertando al organismo a través de la generación de un cuadro inflamatorio controlado generado por la liberación de pequeños mediadores inflamatorios denominados citoquinas. De esta manera quisimos determinar si las hemocianinas promovían la generación de citoquinas pro-inflamatorias en DCs.

Los resultados indicaron que FLH estimuló la producción de diversos mediadores pro-inflamatorios tales como TNF- α , IL-12p40, IL-6 e IL-23, a diferencia de KLH y CCH que no generaron ningún tipo de respuesta inflamatoria (Figura 21). En la figura 15e se demostró que la oxidación con peryodato de los azúcares de FLH disminuyó significativamente la sobrevivencia de los ratones en comparación con la proteína nativa, sin embargo en este tipo de experimento nos fue imposible conocer si este efecto se debía a la falta de azúcares o al cambio en la estructura de la hemocianina. Es así que quisimos estudiar si la secreción de citoquinas pro-inflamatorias se debía a los azúcares de la proteína o al cambio de estructura de ésta. Para comprobar estas hipótesis los azúcares de FLH fueron oxidados con peryodato de sodio y la estructura de la proteína fue proteolizada con tripsina-agarosa. Los resultados señalaron que la remoción de los azúcares de FLH eliminó casi completamente la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias (Figura 22a). Por otra parte, la estructura de la proteína no es determinante en la generación de estos mediadores inflamatorios, ya que al ser proteolizada el efecto no variaba (Figura 22b). Estos resultados nos impulsaron a profundizar en las posibles vías de señalización involucradas en la liberación de estas citoquinas. Debido a que no conocemos el o los receptores involucrados en este proceso y suponiendo que algún receptor de tipo lectina estuviese ejerciendo dicho efecto, se utilizó el inhibidor farmacológico piceatannol que impide la función de una proteína vital en la vía de señalización de la mayoría de los receptores de lectina de tipo-C denominada *spleen tyrosine kinase* (syk) [113, 114]. Al pre-incubar las DCs con el inhibidor de syk la secreción de citoquinas disminuyó significativamente (Figura 23). En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que el efecto antitumoral observado con FLH es mediado por sus azúcares.

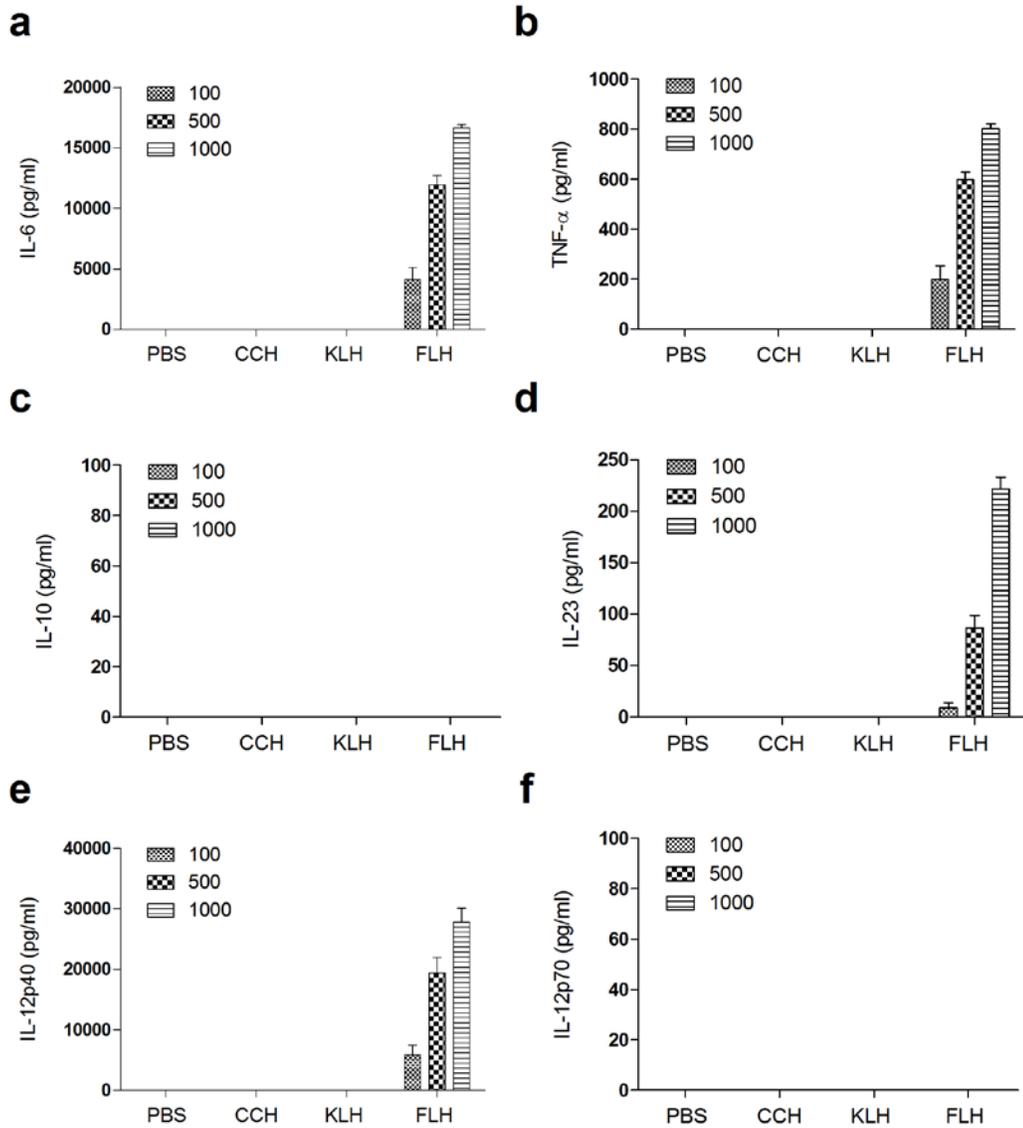


Figura 21. FLH induce la secreción de varias citoquinas pro-inflamatorias. DCs derivadas de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron sembradas en placas de 96 pocillos ($7,5 \times 10^5$ /ml) y estimuladas con distintas concentraciones de CCH, KLH y FLH. Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas de los sobrenadantes 24 h posterior a la incubación con las proteínas (n= 3 a 4 experimentos independientes).

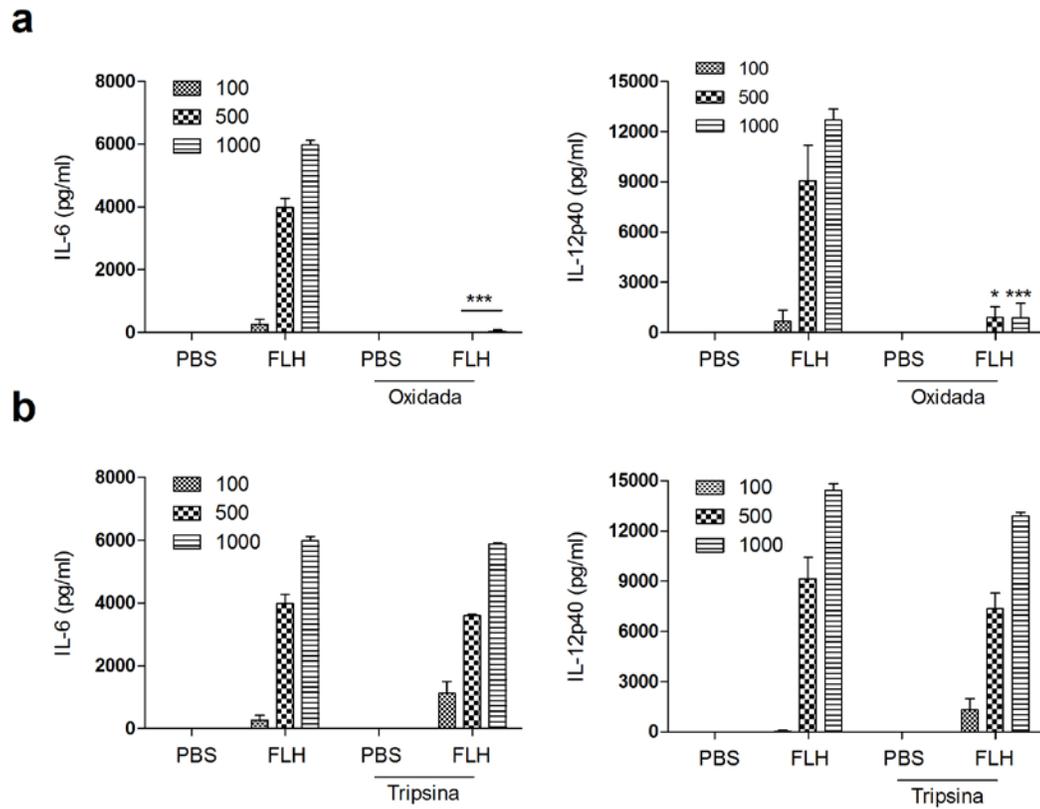


Figura 22. Los azúcares de FLH son fundamentales para la secreción IL-6 e IL-12p40. **a)** BMDCs de ratones C57BL/6 fueron sembradas en placas de 96 pocillos ($7,5 \times 10^5$ /ml) y estimuladas con distintas concentraciones de FLH nativa u Ox-FLH. **b)** BMDCs de ratones C57BL/6 fueron sembradas en placas de 96 pocillos ($7,5 \times 10^5$ /ml) y estimuladas con distintas concentraciones de FLH nativa u FLH digerida con tripsina (2 h a 37°C). Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas de los sobrenadantes 24 h posterior a la incubación con la proteína. (n=2 experimentos independientes, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ y $p < 0,001 = ***$, t test student no pareado).

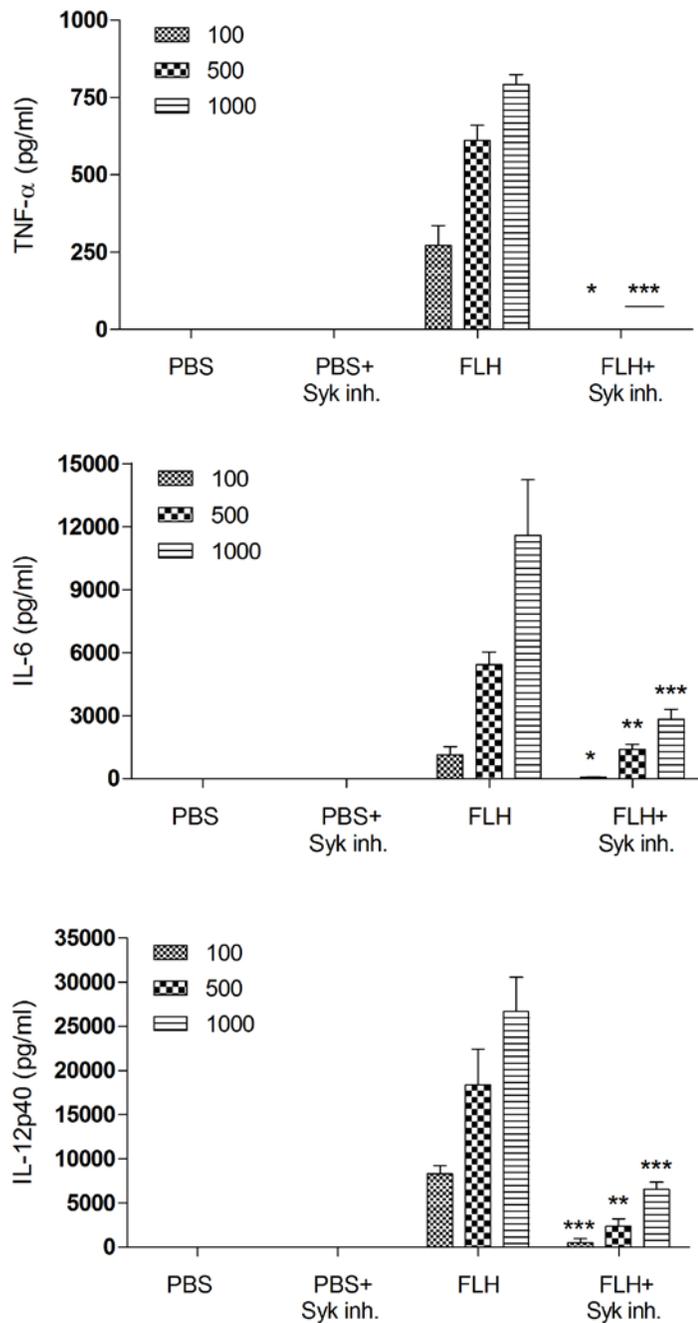


Figura 23. La liberación de citoquinas pro-inflamatorias por FLH es dependiente de Syk quinasa. BMDCs de ratones C57BL/6 fueron sembradas en placas de 96 pocillos ($7,5 \times 10^5$ /ml), pre-incubadas por 30 min con piceatannol ($10 \mu\text{M}$) y luego estimuladas con distintas concentraciones de FLH. Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas de los sobrenadantes 24 h posterior a la incubación con la proteína. (n=3 experimentos independientes, $p < 0,05 = *$, $p < 0,01 = **$ y $p < 0,001 = ***$, test student no pareado).

9.9.4 Activación del inflamasoma

El inflamasoma es un complejo multi-proteico ubicado en el citoplasma de algunas células del sistema inmune, que participa en el inicio de la respuesta inmune promoviendo la maduración de la pro-forma de interleuquina 1 beta (pro-IL-1 β) e interleuquina 18 (pro-IL-18) a sus formas activas, IL-1 β e IL-18. Esta plataforma multi-proteica está compuesta por la proteína asociada a apoptosis tipo speck (ASP), caspasa 1 u 11 y un receptor de tipo dominio de oligomerización nucleotídico (NLRs) [115, 116].

Se ha descrito que gran parte de los adyuvantes convencionales promueven la secreción de IL-1 β por medio de la activación del inflamasoma [117, 118]. Es así que quisimos estudiar si la adyuvantividad intrínseca de las hemocianinas estaba relacionada con la activación de este complejo. Para comprobar esta hipótesis se utilizaron macrófagos peritoneales pre-activados con una solución de tioglicolato y DCs derivadas de médula ósea. Los resultados indicaron que KLH promueve una mayor secreción de IL-1 β que FLH, y que CCH no induce la secreción de esta citoquina. La activación del inflamasoma fue dependiente de una proteína de la familia de los NLRs denominada NALP3, ya que al usar ratones *knock out* (KO) para ésta las células no produjeron IL-1 β (Figura 24a). Siguiendo un patrón de secreción similar al de IL-1 β , KLH promovió una mayor liberación de IL-1 α que FLH, en cambio CCH no generó respuesta por parte de DCs. Sin embargo, la secreción de esta citoquina no fue dependiente de la activación del inflamasoma NALP3 ya que los ratones KO respondieron de una forma similar que los silvestres (*wild type*, WT) (Figura 24b).

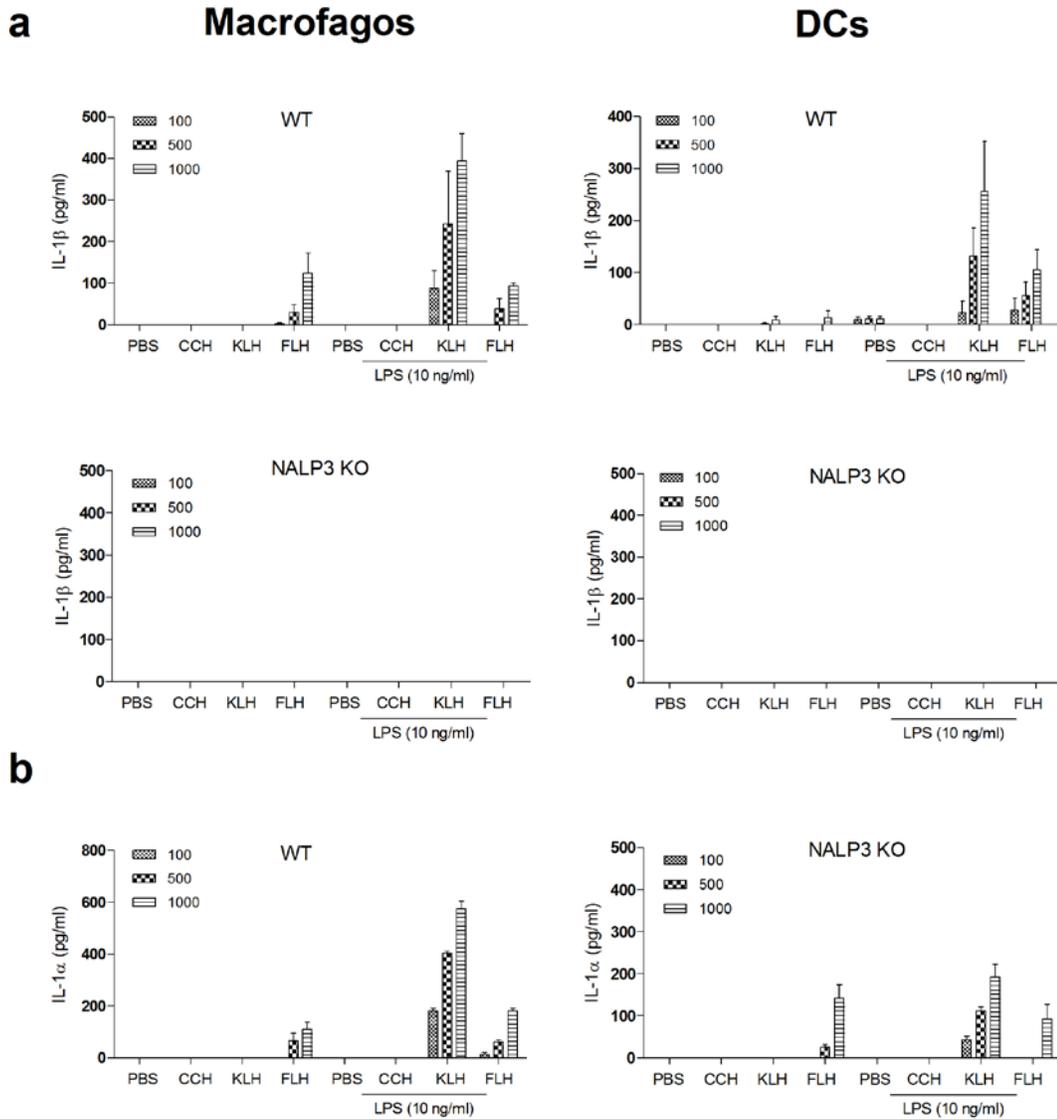


Figura 24. KLH y FLH inducen la secreción de IL-1 α e IL-1 β . **a)** y **b)** Macrófagos activados por tioglicolato o BMDCs de ratones C57BL/6 wt ó NALP3^{-/-} fueron pre-incubadas por 1 h con LPS (10 ng/ml) y luego estimuladas con distintas concentraciones de las hemocianinas (100, 500 y 1000 μ g/ml). Las concentraciones de citoquinas fueron determinadas de los sobrenadantes 24 h posterior a la incubación con las hemocianinas. (n= 3 a 4 experimentos independientes).

10. DISCUSIÓN

Hace más de 40 años que se describió la gran inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos y específicamente la de *M. crenulata*, conocida como KLH [119, 120]. Es así que desde ese tiempo, y por esta propiedad, ha sido habitualmente utilizada para una amplia gama de requerimientos biomédicos y biotecnológicos [104, 121]. Más recientemente, nuestro grupo de investigación encontró que otra hemocianina de molusco, de una especie y estructura diferente, como es la hemocianina de *C. concholepas*, tenía propiedades antitumorales similares a KLH [122]. Sin embargo, paradójicamente, estas proteínas han sido muy poco estudiadas desde el punto de vista de los mecanismos inmunológicos que ellas desencadenan *per se* en el caso de su uso como inmunoestimulantes no específicos en la terapia de ciertos tipos de cáncer.

En la literatura, KLH ha sido utilizada como un modelo experimental de antígeno timo-dependiente y su inmunogenicidad se atribuye en gran medida a su carácter xenogénico, a su gran tamaño y compleja estructura cuaternaria con epítomos repetidos hasta 60 veces, y además, a su contenido de azúcares. Sin embargo, trabajos de nuestro grupo de investigación con CCH [91] y de otros investigadores utilizando la hemocianina de *Rapana thomasi* (RTh) [59] han demostrado que ni el tamaño, ni la estructura cuaternaria son relevantes para entender esta propiedad porque las subunidades aisladas también son igualmente inmunogénicas y en el caso de CCH, las subunidades por sí solas tienen efecto antitumoral no específico en un modelo murino de cáncer superficial de vejiga. En este sentido entonces, se desconoce que parte de la hemocianina es la responsable del efecto antitumoral en mamíferos, y solo nos resta develar el papel que tendrían la estructura primaria y los azúcares en dicha propiedad. Curiosamente, se conoce con gran precisión las cadenas oligosacáridos presentes en KLH y como se ha señalado anteriormente en este documento, se han invocado para explicar el efecto antitumoral de estas proteínas, sin embargo no existen estudios experimentales que pongan a prueba esta hipótesis ampliamente divulgada en la literatura del tema [2].

Por las razones anteriormente señaladas, en esta tesis quisimos abordar experimentalmente la participación de los carbohidratos en la inmunogenicidad y especialmente en las propiedades antitumorales de las hemocianinas de moluscos usando como modelos CCH, KLH y una hemocianina recientemente descubierta en nuestro laboratorio como es FLH, porque ha demostrado tener propiedades inmunogénicas a nivel de la respuesta humoral únicas dentro de las hemocianinas conocidas a la fecha [90, 123].

10.1 Efecto de la desglicosilación sobre la estructura de las hemocianinas de moluscos

La primera parte de este trabajo consistió en caracterizar los azúcares de las hemocianinas más arriba señaladas, utilizando lectinas biotiniladas que se unen a residuos expuestos en forma relativamente específica, y posteriormente, nos avocamos a buscar una manera reproducible y confiable de eliminar los azúcares en forma total o selectiva. En el primer caso se recurrió a métodos químicos y en el segundo a métodos enzimáticos. Finalmente, las hemocianinas desglicosiladas fueron caracterizadas bioquímicamente, aspecto fundamental para proyectar la aplicación de este conocimiento, y también, para poder conocer los factores involucrados en los mecanismos inmunológicos que estas enormes proteínas estimulan.

La caracterización de los residuos oligosacáridos de las hemocianinas mostró diferencias cualitativas significativas en el patrón de cada una, especialmente en CCH, que reveló ser positiva solo a ConA y no a PNA, a diferencia de las hemocianinas de lapas que si lo fueron [124]. PNA es una lectina importante porque reconoce el disacárido Gal-(β 1-3)-GalNAc denominado Antígeno T o de Thomsen-Friedenreich, que normalmente se expresa en criptas celulares haciéndolos inaccesibles a los espacios extracelulares y por ende indetectables en tejidos normales. Ha sido demostrado que muchos tipos de cánceres expresan este antígeno expuesto al espacio extracelular y por lo tanto se hace detectable por distintos mecanismos, tales como anticuerpos monoclonales y PNA [125]. Por otra parte también, se considera un

antígeno tumoral y hoy día es blanco de inmunoterapia en vacunas terapéuticas que usan este antígeno unido a KLH [126-128]. Se ha invocado que la existencia de este disacárido en KLH es en parte responsable de su efecto antitumoral debido a una respuesta cruzada entre los anticuerpos anti-KLH y los dirigidos contra glico-antígenos de la superficie de las células tumorales. Sin embargo, CCH, que no posee este disacárido, al menos no expuesto en su superficie y tiene una capacidad antitumoral similar a KLH que si lo tiene para interactuar con PNA, lo cual indica fuertemente que este tipo de estructuras oligosacáridas no jugaría un papel determinante en el efecto antitumoral observado en cáncer superficial de vejiga murino y humano, ni tampoco en melanoma, como se desprende de esta tesis.

Por otra parte, los análisis mediante *dot blot* señalaron que todas las hemocianinas en estudio tienen estructuras oligosacáridas ricas en α -D-manosa terminal, debido a que éstas resultaron positivas a ConA. Al respecto se ha descrito que numerosos organismos patógenos poseen organizaciones de carbohidratos manosilados y que en algunos casos los utilizan para invadir al huésped y aumentar la infección [129, 130]. Sin embargo, el sistema inmune posee receptores como los de lectinas de tipo C que reconocen estas estructuras manosiladas e inician una respuesta contra dichos agentes infecciosos [131]. Es así que el sistema inmune podría reconocer a las hemocianinas como un agente extraño e infeccioso altamente manosilado y que a través de estos receptores inicie una potente descarga inmunológica.

En consecuencia, para demostrar que los azúcares manosilados son relevantes en el efecto antitumoral de las hemocianinas, realizamos desglicosilaciones químicas y enzimáticas tomando principalmente como modelo a CCH, porque como se mencionó anteriormente, es muy soluble y estable, y disponemos de ella en forma abundante para cualquier estudio experimental, como así mismo disponemos de información sobre su estructura, incluyendo el clonamiento parcial de los genes que codifican para sus subunidades [106, 132]. Los resultados indicaron que el método de desglicosilación enzimática usando PNGasa sobre CCH nativa, no funcionó de la manera esperada ya que las enzimas utilizadas no removieron totalmente los azúcares blanco al hacer una tinción de PAS o con lectinas (Figura 4a). Una explicación posible

es que el protocolo utilizado fue el descrito para KLH, que tiene una estructura homodidecamérica diferente a CCH, que es heterodecamérica [3]. Pensamos que se requieran condiciones diferentes de reacción, especialmente los tiempos de incubación. En consecuencia, consideramos en ese momento, en que recién la tesis comenzaba, que estandarizar un protocolo para CCH no era viable por la gran cantidad de enzima requerida y el elevado costo de la misma. Sin embargo, estudios recientes de nuestro laboratorio utilizando PNGasa sobre CCH desnaturada para obviar el problema de la exposición de los azúcares y por lo tanto, hacer accesible la enzima a su blanco, han mostrado un rendimiento extremadamente bajo debido a que gran parte de la proteína precipita. Por lo tanto, una solución posible a este problema, sería producir CCH en un sistema heterólogo que no glicosile, pero esto se ve poco factible, ya que a la fecha no se ha expresado ninguna hemocianina ni alguna de sus partes en forma heteróloga. En conclusión, para abordar este problema, los métodos de desglicosilación química son los más plausibles y es lo que constituyó el grueso de esta tesis.

Dado lo anterior, se utilizó un método químico tradicionalmente usado para estos propósitos y que emplea como reactivo peryodato de sodio, el cual actúa sobre los grupos hidroxilos de carbonos adyacentes rompiendo el enlace C-C, en un medio tamponado con acetato a pH ácido [54, 133]. Este procedimiento sí logró remover todos los oligosacáridos de CCH como se puede observar en la Figura 4a. Sin embargo, cuando se quiso resolver la proteína desglicosilada químicamente en un gel SDS-PAGE en condiciones desnaturalantes y reductoras, se observó que no migraba y se retenía en la porción concentradora del gel, por ende no se distinguían sus bandas características. A la luz de estos resultados pensamos que el método de desglicosilación con peryodato al ser fuertemente oxidante provocó entrecruzamientos inter- e intra-moleculares (debido a la formación de bases de Schiff). Este proceso de desglicosilación química produce una escasa cantidad de agregados moleculares, los cuales prácticamente no se observaron por microscopía electrónica pero en cambio sí se observaron mediante geles nativos de agarosa.

Además, las modificaciones al interior de la proteína quedaron demostradas en los experimentos en que se comparó el patrón de digestión con tripsina -que actúa sobre los residuos de lisina y arginina- de CCH nativa y desglicosilada, encontrándose que esta última fue pobremente digerida. En cambio, proteinasa K digirió fácilmente Ox-CCH debido a que sus blancos de acción son los grupos carbonilos de aminoácidos alifáticos y aromáticos. La explicación de este fenómeno, es que la reacción de oxidación con peryodato rompe los dioles de los azúcares de las proteínas generando aldehídos reactivos libres que reaccionarían con lisinas o argininas de la cadena peptídica de la proteína formando uniones covalentes reversibles como son las bases de Schiff. De esta forma, proponemos que dichas uniones le conferirían a la proteína resistencia frente a agentes desnaturantes y proteolíticos (tripsina). Además, se ha observado que la presencia de aldehídos libres aumenta la inmunogenicidad de los antígenos, situación que ha sido demostrada utilizando glico-antígenos oxidados con peryodato ó con moléculas orgánicas sintéticas tales como tucaresol [54, 134-137].

En conclusión, se confirmó que el procedimiento de desglicosilación química no solo elimina los azúcares de la proteína si no que también afecta su estructura.

10.2 Efecto antitumoral *per se* de las hemocianinas de moluscos

Riggs y cols han demostrado que KLH posee propiedades antitumorales *per se* sobre varias líneas tumorales cultivadas *in vitro* [96-98]. Sin embargo, se desconocía si este efecto era exclusivo de KLH o era una propiedad intrínseca extensiva a otras hemocianinas de moluscos. Un efecto así sobre las células tumorales debería ser considerado y analizado debido a que la expresión de MHC-I asociado a antígenos tumorales es fundamental para iniciar una respuesta citotóxica efectiva y duradera por linfocitos T CD8+ en contra de las células tumorales [138]. En este contexto, los ensayos realizados demuestran que las células de melanoma murino incorporan CCH, sin embargo no se observó cambios en la expresión de MHC-I.

Los resultados de viabilidad celular corroboraron los trabajos publicados por Riggs y cols y además demostraron que las hemocianinas de moluscos, y en particular KLH, poseen capacidades antitumorales por sí mismas sobre distintas líneas celulares, en este caso líneas de melanoma murino (B16F10) y de cáncer superficial de vejiga (MBT-2).

10.3 Reconocimiento y procesamiento de hemocianinas por el sistema inmune

En esta tesis hemos demostrado que hemocianinas de moluscos diferentes de KLH poseen un efecto antitumoral *per se* sobre varias líneas celulares, sin embargo es sabido que las hemocianinas, además, poseen la capacidad de activar potentemente el sistema inmune de los mamíferos. De acuerdo a esto, el siguiente paso fue evaluar si los oligosacáridos jugaban algún papel al momento de activar células del sistema inmune, principalmente células dendríticas. Los primeros resultados que obtuvimos indicaron que las DCs estarían utilizando parcialmente algún receptor de lectinas, ya que al pre-incubar las células con el monosacárido D-manosa la incorporación de CCH disminuye significativamente.

Existen varios tipos de receptores que podrían estar involucrados en este fenómeno, tales como MR, DC-SIGN y Dectina-2 [33, 40, 139]. Sin embargo, resultados posteriores evidenciaron que tanto CCH nativa como desglucosilada, eran igualmente endocitadas por DCs (Figuras 10d y 11a). Estos resultados fueron sorprendentes y contradictorios, por cuanto habíamos hipotetizado que Ox-CCH presentaría un retardo en su incorporación o simplemente no sería endocitada. Relacionado con esto, numerosos autores han señalado que los azúcares le confieren a las proteínas mejor accesibilidad a las células y mayor estabilidad en solución [140, 141]. Sin embargo, ha sido descrito que DCs son altamente especializadas en el reconocimiento de diversos tipos de antígenos utilizando para ello distintas formas de endocitosis [42, 142]. Por medio de la microscopía electrónica determinamos que CCH

nativa y desglicosilada ingresan en DCs preferentemente vía macropinocitosis y en menor medida por vesículas recubiertas de clatrina. Siendo esta última forma de endocitosis la que refuerza la hipótesis del ingreso vía receptores de lectinas, ya que se sabe que en los sectores donde se forman dichas vesículas se agrupa un alto número y diversidad de receptores [143, 144]. En conclusión, los resultados señalan que DCs pueden endocitar distintos tipos de antígenos, los cuales inclusive podrían ser segregados a diferentes compartimentos endo-lisosomas, y como hemos visto, este proceso no depende de la presencia de oligosacáridos [145].

Una vez que los antígenos son endocitados comienzan a ser procesados para ser presentados bajo el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II). El siguiente aspecto que estudiamos fue seguir el procesamiento de ambas hemocianinas en el tiempo. Los resultados indicaron que CCH nativa y desglicosilada son procesadas de igual manera por las células dendríticas obteniéndose a las 24 h una banda de alrededor de 50 KDa (que posiblemente corresponderían a una FU) que se mantiene aún a las 72 h. Estos resultados señalan que no existen diferencias en el nivel de procesamiento antigénico entre CCH nativa y desglicosilada. Como se señaló anteriormente, es posible que para dichas formas de CCH ocurran distintos tipos de endocitosis no obstante ambas deberían llegar al lisosoma para ser procesadas y presentadas. Este concepto nos llevó a comparar la proteólisis de dos proteínas distintas (OVA y CCH, supuestamente de procesamiento “rápido” y “lento”, respectivamente) en DCs. Con este propósito, las células dendríticas fueron pulsadas por 3 h con los antígenos, luego lavadas y mantenidas durante distintos tiempos en cultivo *in vitro*, realizándose posteriormente un análisis mediante *Western blot*. Los resultados fueron categóricos por cuanto mostraron que CCH nativa permanece por varios días al interior de la célula en una forma proteica de alrededor de 50 KDa, a diferencia de OVA que a las 24 h fue totalmente proteolizada. Por lo tanto, es posible que el lento procesamiento de CCH nativa, que se traduce en una mantención de la presentación antigénica por un tiempo mayor que el habitual, sea uno de los factores que explican en gran medida la inmunogenicidad per se de las hemocianinas.

La idea anteriormente señalada, tiene sustento en trabajos publicados por el grupo de Mellman [109, 146] quienes demostraron que el retardo en la proteólisis de un antígeno mejora su inmunogenicidad, la presentación antigénica y su capacidad de permanecer por más tiempo en células presentadoras localizadas en los nódulos linfáticos, para así diseminar sistémicamente el antígeno y estimular por un mayor período de tiempo a linfocitos T [109, 146]. Concordantemente con estas observaciones, nuestros resultados indicaron que Ox-CCH permanece por más tiempo en el sistema como molécula intacta, ya sea unida a la membrana plasmática de APCs o en estructuras de tipo endosomal.

Se concluye así que el efecto de estabilización de la estructura de CCH generado por las bases de Schiff le permite a la molécula permanecer por más tiempo en las células presentadoras de antígeno induciendo un aumento significativo de su inmunogenicidad.

Una vez que los antígenos endocitados y procesados son convertidos en péptidos que comienzan a ser presentados vía MHC-I ó II, provocando una activación y maduración de la célula presentadora de antígenos. Es importante recalcar que KLH ha sido utilizada por más de 40 años, sin embargo, es muy poco conocido el mecanismo por el cual activa las células del sistema inmune innato para iniciar la respuesta antitumoral. La mayoría de los estudios indican que KLH o CCH no activan tempranamente DCs murinas, ni humanas *in vivo* e *in vitro* [99, 147, 148]. Sin embargo, Presicce y cols publicaron que KLH induce la maduración y activación de DCs humanas cultivadas *in vitro* y que en este proceso está parcialmente involucrado el receptor de manosa [62].

En consecuencia, quisimos evaluar la capacidad de las hemocianinas de moluscos para activar células del sistema inmune innato, tales como DCs, NK y macrófagos. En conjunto, los resultados señalaron que CCH, KLH y FLH no inducen la activación de estas células *in vitro* ó *in vivo* en animales *naive*. Este fenómeno puede explicarse por el lento procesamiento que tienen estas proteínas en DCs y, principalmente, a la falta de señales inflamatorias que induzcan su activación, tales como los ligandos de los

receptores tipo Toll [145, 149], lo que conduciría a una mayor lentitud en la presentación de antígenos y, posiblemente, a una activación no canónica de la respuesta inmunológica. De hecho, solamente cuando CCH es contaminada con LPS se observa activación de DCs durante la respuesta primaria [99].

10.4 Respuesta antitumoral de hemocianinas en un modelo murino de melanoma

Ha sido demostrado que la recurrencia del cáncer superficial de vejiga es significativamente reducida cuando a los pacientes se les sensibiliza con una dosis de 5 mg de KLH para luego ser inmunizados nuevamente con una dosis menor de 200 µg [150]. Posteriormente, este efecto se confirmó en un modelo murino controlado usando células MBT-2 [151]. Estos resultados fueron sorprendentes ya que demostraron que KLH poseía propiedades antitumorales no específicas clínicamente efectivas, abriendo una amplia gama de posibilidades terapéuticas. Sin embargo, se desconocía si este efecto era exclusivo de KLH o si era una propiedad intrínseca de las hemocianinas y, si este fenómeno solo se producía en el cáncer superficial de vejiga. En esta tesis estudiamos estas dos incógnitas usando KLH, CCH y FLH en un modelo murino de melanoma, evaluando además la participación de los azúcares en este efecto. Es importante destacar que desde este punto de vista las células de melanoma son un buen modelo para poner a prueba la hipótesis general de esta tesis porque en este tumor los antígenos tumorales blanco de la inmunoterapia son azúcares. Más aun, se encuentran en desarrollo varios estudios clínicos que evalúan vacunas terapéuticas que utilizan diferentes gangliósidos unidos a KLH [11, 77]. Los resultados señalaron que la capacidad antitumoral de las hemocianinas de gastrópodos estaría relacionada con una propiedad intrínseca de CCH y FLH, puesto que también generaron un potente efecto antitumoral, al igual que KLH. A su vez, demostramos que esta propiedad es extensiva a otros tipos de tumores, ya que por primera vez se presentan evidencias de que las hemocianinas, por sí solas, exhiben propiedades antitumorales en un modelo murino de melanoma. Sin embargo, para CCH y KLH, este efecto requiere que el organismo sea previamente sensibilizado con la proteína terapéutica, indicando que el

sistema inmune adaptativo y la generación de memoria son cruciales en este efecto [122].

El análisis de los sueros obtenidos en el día 13, posterior a la implantación de las células tumorales, señalaron que las hemocianinas inducen una alta producción de IFN- γ sistémico, de igual forma lo presentaron las hemocianinas desglicosiladas. Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos en los bioensayos, sin embargo queda en evidencia que para el efecto obtenido con FLH nativa esta citoquina no juega un papel determinante. En la respuesta humoral anti-hemocianinas observamos que FLH nativa induce una mayor liberación de anticuerpos que las otras hemocianinas. Además, observamos que las hemocianinas desglicosiladas son más inmunogénicas que las nativas en lo que se refiere a la secreción de anticuerpos. Este fenómeno se puede deber a que durante el proceso de desglicosilación se revelan nuevos epítopos y además la modificación estructural que sufre la proteína la hace más resistente a proteólisis (*in vitro* e *in vivo*) permaneciendo por más tiempo en el sistema. De esta manera se aumenta su inmunogenicidad, supuestamente al permanecer más tiempo las APC en los ganglios regionales periféricos presentando a linfocitos T CD4+ y a su vez estos, activando a linfocitos B específicos para que secreten anticuerpos. En todo caso, es importante mencionar también que cuando se eliminan los oligosacáridos de CCH, se observa un aumento de la reactividad de anticuerpos monoclonales anti-CCH con la proteína desglicosilada, señalando que la respuesta adaptativa es contra la proteína y que al eliminar los azúcares los anticuerpos tienen mejor acceso a ella [13].

Por otra parte demostramos que no existen reacciones cruzadas entre los oligosacáridos de las hemocianinas en estudio y los glico-antígenos de las células B16F10. Así, es importante señalar que la diferencia entre FLH nativa y desglicosilada no está relacionada con la formación de anticuerpos anti-hemocianina que puedan incidir en la respuesta antitumoral anti-células B16F10

De los resultados de los bioensayos se concluye que CCH y KLH presentan un efecto antitumoral similar, tanto a nivel del crecimiento del tumor como de la sobrevivencia del ratón. Sin embargo, el estudio de las propiedades antitumorales de FLH mostró un

resultado sorprendente, ya que en los bioensayos de actividad antitumoral fue significativamente más efectiva que KLH y CCH. Este resultado abre nuevas rutas de investigación y desarrollo de productos, ya que pensábamos que las hemocianinas en general poseían un efecto inmunológico similar, por la gran semejanza en la respuesta obtenida con KLH y CCH, pero, como demostramos en esta tesis, existen hemocianinas como FLH, con una inmunogenicidad superior.

Interesantemente, cuando evaluamos la participación de los azúcares en el efecto antitumoral de CCH y FLH, se encontró que los oligosacáridos de CCH no contribuyen mayormente en su capacidad antitumoral, tanto a nivel del volumen tumoral así como en la supervivencia de los ratones, a diferencia de Ox-FLH, en la cual se observa un efecto similar a FLH nativa en cuanto al efecto sobre el volumen tumoral. No obstante, la supervivencia no es mejor que FLH nativa sin embargo es significativamente mejor que los controles. En un principio pensamos que este resultado se explicaba en parte por los cambios intra-moleculares que sufre la proteína al ser desglicosilada, como fue demostrado anteriormente. Sin embargo, también era posible que el mejor efecto de FLH se deba a estructuras oligosacáridas que participan en la respuesta antitumoral y que la proteína al ser desglicosilada pierda dicho efecto. Es así que, los resultados obtenidos al incubar BMDCs con las hemocianinas fueron categóricos ya que pudimos observar que FLH induce una potente liberación de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α , IL-23 e IL-12p40) a diferencia de KLH y CCH que no lo hicieron. Además, demostramos que este efecto se debía a los azúcares que posee FLH, los cuales estarían activando algún receptor de lectina de tipo-C. Estos receptores se encuentran ubicados principalmente en APCs y están entre los principales medios de reconocimiento de antígenos extraños y de microorganismos patógenos, en conjunto con otros receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) [113, 152].

Por otra parte, descubrimos que KLH y FLH parcialmente promueven la activación del inflammasoma, a diferencia de CCH que no lo hace. Estos resultados fueron sorprendentes ya que *a priori*, esperábamos que las tres hemocianinas en estudio activaran este complejo, debido a que la mayoría de los adyuvantes de uso común lo hacen, incluyendo sales de alúmina, adyuvantes particulados, etc [117, 118]. Sin

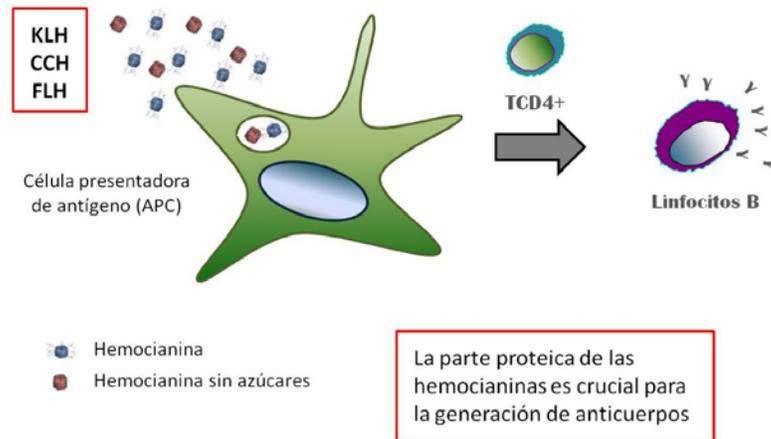
embargo, es interesante destacar que estas proteínas son más complejas de lo que se pensaba ya que dentro de sus semejanzas como proteínas *carrier* (respuesta humoral), cada una posee características moleculares distintas promoviendo diversas reacciones inmunológicas de tipo celular y, como ha quedado demostrado en este trabajo, que hemocianinas diferentes pueden inducir vías de activación inmunológica diferentes, por el hecho que la eliminación de sus azúcares afecta diferencialmente sus propiedades inmunogénicas y antitumorales.

10.5 Modelo de activación del sistema inmune por hemocianinas

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis se formularon dos modelos de activación del sistema inmune por hemocianinas, los cuales se han esquematizado en la Figura 25. En la Figura 25a se concluye que la inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos *in vivo* depende en mayor medida de su estructura proteica. En este sentido, observamos que la secreción de anticuerpos anti-hemocianinas no disminuyó cuando estas fueron desglicosiladas a través del mecanismo químico de oxidación de sus azúcares, si no que al contrario, la estabilización de la estructura proteica por el procedimiento de desglicosilación promovió una mayor secreción anticuerpos en comparación con la proteína nativa. Aun queda por dilucidar cuál es el mecanismo molecular que explica este fenómeno.

Por otra parte, en la Figura 25b se representa el efecto que tienen las hemocianinas de moluscos sobre la respuesta inmune innata simbolizado por la activación y maduración de células presentadoras de antígenos. Se demuestra que las DCs cultivadas *in vitro* se activan y maduran parcialmente cuando son enfrentadas a FLH induciendo la secreción de distintas citoquinas pro-inflamatorias. En contraste, CCH y KLH no activaron en el mismo periodo de observación, no descartándose que este efecto ocurra más tardíamente. No obstante lo anterior, CCH, KLH y FLH promueven un perfil de activación inmune de tipo Th1 caracterizado por la liberación de IFN- γ e IL-10.

a Respuesta humoral de las hemocianinas



b Las hemocianinas utilizan distintas vías de la respuesta inmune innata para iniciar la respuesta adaptativa celular

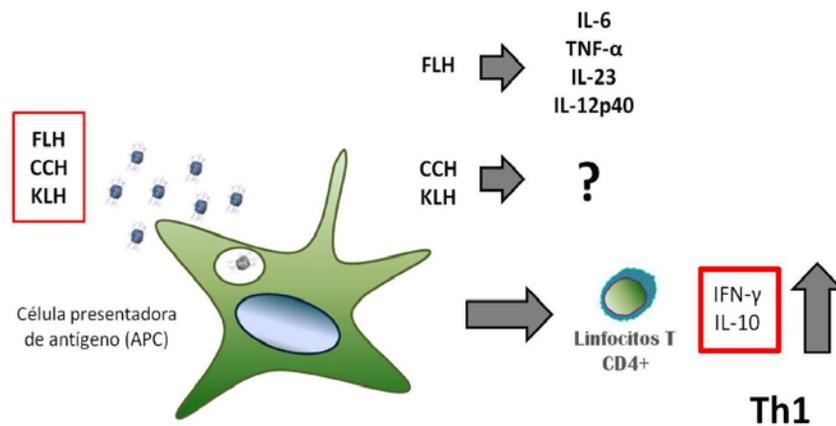


Figura 25. Modelo de activación del sistema inmune por las hemocianinas. a) Respuesta humoral de las hemocianinas de moluscos. **b)** Diferencias en la activación de la respuesta inmune innata por las hemocianinas.

11. CONCLUSIONES

11.1 **En relación a la composición de oligosacáridos de las hemocianinas de moluscos modelo utilizadas (CCH, KLH y FLH) y sobre el efecto de su remoción en su estructura:**

11.1.1 Se encontraron diferencias cualitativas significativas en la composición de azúcares expuestos en las hemocianinas provenientes de las especies de la familia *Fisurellidae* (KLH y FLH) y de la familia *Muricidae* (CCH). Sin embargo, todas las hemocianinas estudiadas presentaron en común estructuras oligosacáridas ricas en α -D-manosa terminal.

11.2.1 La remoción parcial de los azúcares de CCH y FLH usando glicosidasas no fue efectiva, a diferencia del procedimiento químico que los eliminó totalmente, sin embargo contra lo esperado este tratamiento modificó su estructura. El proceso de oxidación de los azúcares generó la formación de bases de Schiff que condujeron a un aumento en la estabilidad de las hemocianinas. Dichos cambios fueron demostrados mediante experimentos que revelaron diferencias en la migración electroforética de las formas nativas y desglicosiladas de estas proteínas, así como por las diferencias en el patrón de cortes con enzimas proteolíticas.

11.2 **En relación a la participación de los oligosacáridos de las hemocianinas en su incorporación por células presentadoras de antígenos:**

11.2.1 Las células dendríticas obtenidas de precursores de médula ósea y cultivadas *in vitro*, reconocen, endocitan y procesan CCH nativa y desglicosilada, siendo esta última internalizada más rápidamente vía macropinocitosis y en menor extensión vía vesículas recubiertas de clatrina. Además, la estabilización de la estructura de CCH por la oxidación de sus azúcares la hizo más resistente a la degradación intracelular permitiéndole permanecer por mucho más tiempo

adherida a la membrana plasmática y en estructuras de tipo endosomal, resultado que fue corroborado mediante *Western-blot* utilizando otro antígeno modelo como es Ovoalbúmina.

11.2.2 Se sabe que CCH y KLH estimulan la capacidad lítica de células NK en ratones previamente sensibilizados con ellas. Sin embargo, se encontró que dichas proteínas no activan células NK de ratones *naïve* durante la respuesta inmune innata, señalando de esta forma, la importancia de la respuesta inmune adaptativa en el efecto antitumoral de las hemocianinas.

11.3 En relación al efecto antitumoral de las hemocianinas de moluscos en un modelo de melanoma murino:

11.3.1 El análisis del efecto *in vitro* de las hemocianinas sobre líneas tumorales de melanoma murino (B16F10) y de cáncer superficial de vejiga (MBT-2), mostró que KLH a diferencia de CCH y FLH, presenta un efecto citotóxico significativamente superior.

11.3.2 Se demuestran por primera vez un efecto antitumoral de CCH y KLH en un modelo murino de melanoma (B16F10) tanto sobre el crecimiento del tumor como en la supervivencia de ratones. Además, en este mismo modelo, se demostró que FLH presenta un efecto antitumoral superior que CCH y KLH.

11.3.2 Los carbohidratos asociados a CCH no son determinantes en su efecto antitumoral, indicando que la secuencia peptídica y por ende, su naturaleza xenogénica son cruciales en dicho fenómeno. Sin embargo, las estructuras oligosacáridas de FLH incrementaron significativamente su efecto antitumoral no-específico.

11.4 En relación a los mecanismos inmunológicos involucrados en el efecto antitumoral de las hemocianinas:

- 11.4.1 No se encontró reacción cruzada de los anticuerpos anti-hemocianina y antígenos de la superficie de las células tumorales, descartándose por el momento, que el efecto antitumoral observado sea mediado por reacciones del tipo ADCC.
- 11.4.2 La respuesta inmune de los ratones portadores de melanoma está caracterizada por una alta secreción de citoquinas de tipo Th1, principalmente IFN- γ . No obstante, CCH y FLH (formas nativas y desglicosiladas) presentaron concentraciones sanguíneas similares entre sí, indicando que esta citoquina no es el factor principal que explica el potente efecto antitumoral de FLH.
- 11.4.3 Los azúcares de FLH actúan activando algún tipo de receptor de lectina de tipo-C ubicado en BMDCs, promoviendo la liberación de varias citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α . Esta potente estimulación del sistema inmune innato estaría dando cuenta del sorprendente efecto antitumoral de esta hemocianina en comparación con las clásicamente utilizadas como son KLH y CCH.
- 11.4.4 KLH y, en menor medida, FLH activan el inflamasoma NALP3 e inducen la secreción de IL-1 β . Además, ambas inducen la producción de IL-1 α , no obstante el mecanismo molecular por el cual esta citoquina es secretada es independiente del inflamasoma NALP3, porque los ratones KO respondieron de una forma similar que los silvestres.

12 REFERENCIAS

- 1 Arancibia, S., Del Campo, M., Nova, E., Salazar, F. and Becker, M. I., Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur J Immunol.* 2011. doi: 10.1002/eji.201142011.
- 2 Harris, J. R. and Markl, J., Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* 1999. 30: 597-623.
- 3 De Ioannes, P., Moltedo, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A. E. and Becker, M. I., Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J Biol Chem* 2004. 279: 26134-26142.
- 4 Moltedo, B., Faunes, F., Haussmann, D., De Ioannes, P., De Ioannes, A. E., Puente, J. and Becker, M. I., Immunotherapeutic effect of *Concholepas hemocyanin* in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol* 2006. 176: 2690-2695.
- 5 Espinoza, C., De Ioannes, A. E. and Becker, M. I., Caracterización bioquímica e inmunológica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la Familia Fissurellidae. *XXIX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile.* Biol. Res., Chillán 2006.
- 6 González A., Análisis de la unión de oxígeno a hemocianina de *Concholepas concholepas* mediante polarografía. Tesis de Grado de Bioquímica. Pontificia Universidad Católica de Chile, 2008.
- 7 van Holde, K. E. and Miller, K. I., Hemocyanins. *Adv Protein Chem* 1995. 47: 1-81.
- 8 Idakieva, K., Nikolov, P., Chakarska, I., Genov, N. and Shnyrov, V. L., Spectroscopic Properties and Conformational Stability of *Concholepas concholepas* Hemocyanin. *J Fluoresc* 2008.
- 9 Frost, P. and Lance, E. M., On the mechanism of action of adjuvants. *Immunology* 1978. 35: 63-68.
- 10 Arancibia, S., Salazar, F. and Becker, M. I., Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer *Bladder Cancer.* Intech 2012.
- 11 Del Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., Gonzalez, A., Moltedo, B., De Ioannis, P., Ferreira, J., Manubens, A. and Becker, M. I., [Hemocyanins as immunostimulants]. *Rev Med Chil* 2011. 139: 236-246.
- 12 Swerdlow, R. D., Ebert, R. F., Lee, P., Bonaventura, C. and Miller, K. I., Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996. 113: 537-548.
- 13 Oliva, H., Moltedo, B., De Ioannes, P., Faunes, F., De Ioannes, A. E. and Becker, M. I., Monoclonal antibodies to molluscan hemocyanin from *Concholepas concholepas* demonstrate common and specific epitopes among subunits. *Hybrid Hybridomics* 2002. 21: 365-374.
- 14 Manosalva, H., De Ioannes, A. E. and 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* 2004. 23: 45-54.
- 15 Gravotta, D., Deora, A., Perret, E., Oyanadel, C., Soza, A., Schreiner, R., Gonzalez, A. and Rodriguez-Boulan, E., APIB sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104: 1564-1569.
- 16 Matus, S., Burgos, P. V., Bravo-Zehnder, M., Kraft, R., Porras, O. H., Farias, P., Barros, L. F., Torrealba, F., Massardo, L., Jacobelli, S. and Gonzalez, A., Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exp Med* 2007. 204: 3221-3234.

- 17 Corvalan, L. A., Araya, R., Branes, M. C., Saez, P. J., Kalergis, A. M., Tobar, J. A., Theis, M., Willecke, K. and Saez, J. C., Injury of skeletal muscle and specific cytokines induce the expression of gap junction channels in mouse dendritic cells. *J Cell Physiol* 2007. 211: 649-660.
- 18 Becker, M. I., De Ioannes, A. E., Leon, C. and Ebensperger, L. A., Females of the communally breeding rodent, *Octodon degus*, transfer antibodies to their offspring during pregnancy and lactation. *J Reprod Immunol* 2007. 74: 68-77.
- 19 Pilon, J., Loiacono, C., Okeson, D., Lund, S., Vercauteren, K., Rhyan, J. and Miller, L., Anti-prion activity generated by a novel vaccine formulation. *Neurosci Lett* 2007. 429: 161-164.
- 20 Del Campo M., Efecto de hemocianinas de moluscos en la maduración de células dendríticas murinas. Tesis de Grado de Bioquímica. Universidad de Chile 2007.
- 21 Trombetta, E. S. and Mellman, I., Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2005. 23: 975-1028.
- 22 Steinman, R. M., Dendritic cells: understanding immunogenicity. *Eur J Immunol* 2007. 37 Suppl 1: S53-60.
- 23 Rossi, M. and Young, J. W., Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 2005. 175: 1373-1381.
- 24 Belz, G. T., Heath, W. R. and Carbone, F. R., The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* 2002. 80: 463-468.
- 25 Lipscomb, M. F. and Masten, B. J., Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002. 82: 97-130.
- 26 Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A. and Dwek, R. A., Glycosylation and the immune system. *Science* 2001. 291: 2370-2376.
- 27 Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993. 3: 97-130.
- 28 Zhang, X. L., Roles of glycans and glycopeptides in immune system and immune-related diseases. *Curr Med Chem* 2006. 13: 1141-1147.
- 29 Bishop, J. R. and Gagneux, P., Evolution of carbohydrate antigens--microbial forces shaping host glycomes? *Glycobiology* 2007. 17: 23R-34R.
- 30 Takeda, K. and Akira, S., Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001. 6: 733-742.
- 31 Geijtenbeek, T. B., Engering, A. and Van Kooyk, Y., DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol* 2002. 71: 921-931.
- 32 Arancibia, S. A., Beltran, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F. and Hermoso, M. A., Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007. 40: 97-112.
- 33 McGreal, E. P., Rosas, M., Brown, G. D., Zamze, S., Wong, S. Y., Gordon, S., Martinez-Pomares, L. and Taylor, P. R., The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* 2006. 16: 422-430.
- 34 Pilatte, Y., Bignon, J. and Lambre, C. R., Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 1993. 3: 201-218.
- 35 Pangburn, M. K., Pangburn, K. L., Koistinen, V., Meri, S. and Sharma, A. K., Molecular mechanisms of target recognition in an innate immune system: interactions among factor H, C3b, and target in the alternative pathway of human complement. *J Immunol* 2000. 164: 4742-4751.
- 36 Porat, N., Apicella, M. A. and Blake, M. S., *Neisseria gonorrhoeae* utilizes and enhances the biosynthesis of the asialoglycoprotein receptor expressed on the surface of the hepatic HepG2 cell line. *Infect Immun* 1995. 63: 1498-1506.
- 37 Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. and Lam, J. S., Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999. 63: 523-553.

- 38 Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. and Warner, A., Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990. 172: 1785-1794.
- 39 Syme, R. M., Spurrell, J. C., Amankwah, E. K., Green, F. H. and Mody, C. H., Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc γ receptor II for presentation to T lymphocytes. *Infect Immun* 2002. 70: 5972-5981.
- 40 East, L. and Isacke, C. M., The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002. 1572: 364-386.
- 41 Pond, L., Kuhn, L. A., Teyton, L., Schutze, M. P., Tainer, J. A., Jackson, M. R. and Peterson, P. A., A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 1995. 270: 19989-19997.
- 42 Mellman, I., Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996. 12: 575-625.
- 43 Howard, M. J. and Isacke, C. M., The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family. *J Biol Chem* 2002. 277: 32320-32331.
- 44 Wileman, T. E., Lennartz, M. R. and Stahl, P. D., Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986. 83: 2501-2505.
- 45 Lennartz, M. R., Cole, F. S. and Stahl, P. D., Biosynthesis and processing of the mannose receptor in human macrophages. *J Biol Chem* 1989. 264: 2385-2390.
- 46 Fiete, D. J., Beranek, M. C. and Baenziger, J. U., A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO₄ binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95: 2089-2093.
- 47 Shepherd, V. L. and Hoidal, J. R., Clearance of neutrophil-derived myeloperoxidase by the macrophage mannose receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1990. 2: 335-340.
- 48 Capon, C., Wieruszkeski, J. M., Lemoine, J., Byrd, J. C., Leffler, H. and Kim, Y. S., Sulfated lewis X determinants as a major structural motif in glycans from LS174T-HM7 human colon carcinoma mucin. *J Biol Chem* 1997. 272: 31957-31968.
- 49 Ezekowitz, R. A., Williams, D. J., Koziel, H., Armstrong, M. Y., Warner, A., Richards, F. F. and Rose, R. M., Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 1991. 351: 155-158.
- 50 Chakraborty, P. and Das, P. K., Role of mannose/N-acetylglucosamine receptors in blood clearance and cellular attachment of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 1988. 28: 55-62.
- 51 Zamze, S., Martinez-Pomares, L., Jones, H., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Gordon, S. and Wong, S. Y., Recognition of bacterial capsular polysaccharides and lipopolysaccharides by the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem* 2002. 277: 41613-41623.
- 52 Tan, M. C., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C., Ottenhoff, T. H., Tulp, A., Neefjes, J. J. and Koning, F., Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells. *Eur J Immunol* 1997. 27: 2426-2435.
- 53 Agnes, M. C., Tan, A., Jordens, R., Geluk, A., Roep, B. O., Ottenhoff, T., Drijfhout, J. W. and Koning, F., Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation. *Int Immunol* 1998. 10: 1299-1304.
- 54 Apostolopoulos, V., Pietersz, G. A., Loveland, B. E., Sandrin, M. S. and McKenzie, I. F., Oxidative/reductive conjugation of mannan to antigen selects for T1 or T2 immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. 92: 10128-10132.
- 55 Apostolopoulos, V., Barnes, N., Pietersz, G. A. and McKenzie, I. F., Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses. *Vaccine* 2000. 18: 3174-3184.

- 56 Schlesinger, L. S., Hull, S. R. and Kaufman, T. M., Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 1994. 152: 4070-4079.
- 57 Martinez-Pomares, L., Reid, D. M., Brown, G. D., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Linehan, S. A., Zamze, S., Gordon, S. and Wong, S. Y., Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* 2003. 73: 604-613.
- 58 Schreiber, S., Perkins, S. L., Teitelbaum, S. L., Chappel, J., Stahl, P. D. and Blum, J. S., Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma. *J Immunol* 1993. 151: 4973-4981.
- 59 Tchorbanov, A., Idakieva, K., Mihaylova, N. and Doumanova, L., Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Int Immunopharmacol* 2008. 8: 1033-1038.
- 60 Becker M.I., F. A., Del Campo M., Manubens A., Nova E., Oliva H., Faunes F., Valenzuela M.A., Campos-Vallette M., Aliaga A., Ferreira J., De Ioannes A.E., De Ioannes P., Moltedo B., Immunodominant Role of CCHA Subunit in *Concholepas Hemocyanin* is Associated with Unique Biochemical Properties. *en preparación*. 2008.
- 61 Hall, R. L. and Wood, E. J., The carbohydrate content of gastropod haemocyanins. *Biochem Soc Trans* 1976. 4: 307-309.
- 62 Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M. L. and Della Bella, S., Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol* 2008. 45: 1136-1145.
- 63 Idakieva, K., Stoeva, S., Voelter, W. and Gielens, C., Glycosylation of *Rapana thomasiana* hemocyanin. Comparison with other prosobranch (gastropod) hemocyanins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004. 138: 221-228.
- 64 Geyer, H., Wuhler, M., Resemann, A. and Geyer, R., Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 2005. 280: 40731-40748.
- 65 Siddiqui, N. I., Idakieva, K., Demarsin, B., Doumanova, L., Compernelle, F. and Gielens, C., Involvement of glycan chains in the antigenicity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochem Biophys Res Commun* 2007. 361: 705-711.
- 66 Hakomori, S., Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 1985. 45: 2405-2414.
- 67 Nuck, R., Paul, C., Wieland, B., Heidrich, C., Geilen, C. C. and Reutter, W., Comparative study of high-mannose-type oligosaccharides in membrane glycoproteins of rat hepatocytes and different rat hepatoma cell lines. *Eur J Biochem* 1993. 216: 215-221.
- 68 Guo, H. B., Randolph, M. and Pierce, M., Inhibition of a specific N-glycosylation activity results in attenuation of breast carcinoma cell invasiveness-related phenotypes: inhibition of epidermal growth factor-induced dephosphorylation of focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2007. 282: 22150-22162.
- 69 Gendler, S. J., Spicer, A. P., Lalani, E. N., Duhig, T., Peat, N., Burchell, J., Pemberton, L., Boshell, M. and Taylor-Papadimitriou, J., Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1. *Am Rev Respir Dis* 1991. 144: S42-47.
- 70 Lloyd, K. O., Burchell, J., Kudryashov, V., Yin, B. W. and Taylor-Papadimitriou, J., Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem* 1996. 271: 33325-33334.
- 71 Devine, P. L., Clark, B. A., Birrell, G. W., Layton, G. T., Ward, B. G., Alewood, P. F. and McKenzie, I. F., The breast tumor-associated epitope defined by monoclonal antibody 3E1.2 is an O-linked mucin carbohydrate containing N-glycolylneuraminic acid. *Cancer Res* 1991. 51: 5826-5836.

- 72 Keler, T., He, L., Ramakrishna, V. and Champion, B., Antibody-targeted vaccines. *Oncogene* 2007. 26: 3758-3767.
- 73 Dasgupta, S., Navarrete, A. M., Bayry, J., Delignat, S., Wootla, B., Andre, S., Christophe, O., Nascimbeni, M., Jacquemin, M., Martinez-Pomares, L., Geijtenbeek, T. B., Moris, A., Saint-Remy, J. M., Kazatchkine, M. D., Kaveri, S. V. and Lacroix-Desmazes, S., A role for exposed mannosylations in presentation of human therapeutic self-proteins to CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104: 8965-8970.
- 74 Irache, J. M., Salman, H. H., Gamazo, C. and Espuelas, S., Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin Drug Deliv* 2008. 5: 703-724.
- 75 Hattori, Y., Kawakami, S., Lu, Y., Nakamura, K., Yamashita, F. and Hashida, M., Enhanced DNA vaccine potency by mannosylated lipoplex after intraperitoneal administration. *J Gene Med* 2006. 8: 824-834.
- 76 Linn, J. F., Black, P., Derksen, K., Rubben, H. and Thuroff, J. W., Keyhole limpet haemocyanin in experimental bladder cancer: literature review and own results. *Eur Urol* 2000. 37 Suppl 3: 34-40.
- 77 Musselli, C., Livingston, P. O. and Ragupathi, G., Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001. 127 Suppl 2: R20-26.
- 78 Holtl, L., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Papesh, C., Ramoner, R., Bartsch, G., Rogatsch, H., Barsoum, A. L., Coggin, J. H., Jr. and Thurnher, M., Immunotherapy of metastatic renal cell carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells. *Clin Cancer Res* 2002. 8: 3369-3376.
- 79 Gilewski, T., Ragupathi, G., Bhuta, S., Williams, L. J., Musselli, C., Zhang, X. F., Bornmann, W. G., Spassova, M., Bencsath, K. P., Panageas, K. S., Chin, J., Hudis, C. A., Norton, L., Houghton, A. N., Livingston, P. O. and Danishefsky, S. J., Immunization of metastatic breast cancer patients with a fully synthetic globo H conjugate: a phase I trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98: 3270-3275.
- 80 Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. and Steinman, R. M., Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992. 176: 1693-1702.
- 81 Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983. 65: 55-63.
- 82 R. Beynon, J. B., *Proteolytic enzymes a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press: 1989.
- 83 Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227: 680-685.
- 84 Towbin, H. and Gordon, J., Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods* 1984. 72: 313-340.
- 85 Thomsen, L. L., Ching, L. M. and Baguley, B. C., Evidence for the production of nitric oxide by activated macrophages treated with the antitumor agents flavone-8-acetic acid and xanthenone-4-acetic acid. *Cancer Res* 1990. 50: 6966-6970.
- 86 Puente, J., Salas, M. A., Canon, C., Miranda, D., Wolf, M. E. and Mosnaim, A. D., Activation of protein tyrosine kinase: a possible requirement for fixed-bacteria and lipopolysaccharide-induced increase in human natural killer cell activity. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996. 34: 212-218.
- 87 Fernandez-Moran, H., High-resolution electron microscopy with superconducting lenses at liquid helium temperatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966. 56: 801-808.
- 88 Luft, J. H., Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961. 9: 409-414.
- 89 Reynolds, E. S., The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 1963. 17: 208-212.

- 90 Espinoza, C., Caracterización bioquímica e inmunogénica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la familia *Fissurellidae*: *Fissurella latimarginata* (Lapa Negra), *Fissurella cummingi* (Lapa Frutilla), *Fissurella maxima* (Lapa Reina). *Facultad de Ciencias Biológicas*. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 2007.
- 91 Becker, M. I., Fuentes, A., Del Campo, M., Manubens, A., Nova, E., Oliva, H., Faunes, F., Valenzuela, M. A., Campos-Vallette, M., Aliaga, A., Ferreira, J., De Ioannes, A. E., De Ioannes, P. and Moltedo, B., Immunodominant role of CCHA subunit of Concholepas hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *Int Immunopharmacol* 2009. 9: 330-339.
- 92 Baenziger, J. U. and Fiete, D., Structure of the complex oligosaccharides of fetuin. *J Biol Chem* 1979. 254: 789-795.
- 93 Green, E. D., Adelt, G., Baenziger, J. U., Wilson, S. and Van Halbeek, H., The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *J Biol Chem* 1988. 263: 18253-18268.
- 94 Dolashka-Angelova, P., Beck, A., Dolashki, A., Stevanovic, S., Beltramini, M., Salvato, B., Hristova, R., Velkova, L. and Voelter, W., Carbohydrate moieties of molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Micron* 2004. 35: 101-104.
- 95 Benson, R. J. and Bond, J. S., *Proteolytic enzymes: a practical approach*. IRL Press - Oxford University Press, Oxford: 1989.
- 96 Riggs, D. R., Jackson, B., Vona-Davis, L. and McFadden, D., In vitro anticancer effects of a novel immunostimulant: keyhole limpet hemocyanin. *J Surg Res* 2002. 108: 279-284.
- 97 Somasundar, P., Riggs, D. R., Jackson, B. J. and McFadden, D. W., Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. *Am J Surg* 2005. 190: 713-716.
- 98 McFadden, D. W., Riggs, D. R., Jackson, B. J. and Vona-Davis, L., Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Am J Surg* 2003. 186: 552-555.
- 99 Moltedo, B., Lopez, C. B., Pazos, M., Becker, M. I., Hermesh, T. and Moran, T. M., Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity. *J Immunol* 2009. 183: 3569-3573.
- 100 Igney, F. H. and Krammer, P. H., Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 2002. 71: 907-920.
- 101 Abele, R. and Tampe, R., The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* 2004. 19: 216-224.
- 102 Gewirtz, D. A., A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999. 57: 727-741.
- 103 Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G. and Gianni, L., Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004. 56: 185-229.
- 104 Lamm, D. L., Dehaven, J. I. and Riggs, D. R., Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. *Eur Urol* 2000. 37 Suppl 3: 41-44.
- 105 LEYTON, P., LIZAMA-VERGARA, P. A., CAMPOS-VALLETTE, M. M., BECKER, M. I., CLAVIJO, E., CÓRDOVA REYES, I., VERA, M. and JEREZ, C. A., SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTRUM OF NANOMETRIC MOLECULAR SYSTEMS. *J. Chil. Chem. Soc.* 2005. 50: 725-730.
- 106 Manubens, A., Salazar, F., Haussmann, D., Figueroa, J., Del Campo, M., Pinto, J. M., Huaquin, L., Venegas, A. and Becker, M. I., Concholepas hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas, with hemocytes being involved in its metabolism. *Cell Tissue Res* 2010. 342: 423-435.

- 107 Shepherd, V. L., Lee, Y. C., Schlesinger, P. H. and Stahl, P. D., L-Fucose-terminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981. 78: 1019-1022.
- 108 Unanue, E. R., Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 1984. 2: 395-428.
- 109 Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I. and Trombetta, E. S., Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* 2006. 203: 2049-2055.
- 110 Lamm, D. L., DeHaven, J. I., Riggs, D. R., Delgra, C. and Burrell, R., Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of murine bladder cancer. *Urol Res* 1993. 21: 33-37.
- 111 Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T. and Hume, D. A., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004. 75: 163-189.
- 112 Slovin, S. F., Keding, S. J. and Ragupathi, G., Carbohydrate vaccines as immunotherapy for cancer. *Immunol Cell Biol* 2005. 83: 418-428.
- 113 Geijtenbeek, T. B. and Gringhuis, S. I., Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009. 9: 465-479.
- 114 Kerrigan, A. M. and Brown, G. D., Syk-coupled C-type lectins in immunity. *Trends Immunol* 2011. 32: 151-156.
- 115 Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J., The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002. 10: 417-426.
- 116 Schroder, K., Zhou, R. and Tschopp, J., The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 2010. 327: 296-300.
- 117 Eisenbarth, S. C., Colegio, O. R., O'Connor, W., Sutterwala, F. S. and Flavell, R. A., Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature* 2008. 453: 1122-1126.
- 118 Sharp, F. A., Ruane, D., Claass, B., Creagh, E., Harris, J., Malyala, P., Singh, M., O'Hagan, D. T., Petrilli, V., Tschopp, J., O'Neill, L. A. and Lavelle, E. C., Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. 106: 870-875.
- 119 Amkraut, A. A., Malley, A. and Begley, D., Immunogenicity of hemocyanins and their subunits. *J Immunol* 1969. 103: 1301-1310.
- 120 Malley, A., Saha, A. and Halliday, W. J., Immunochemical Studies of Hemocyanin from the Giant Keyhole Limpet (*Megathura Crenulata*) and the Horseshoe Crab (*Limulus Polyhemus*). *J Immunol* 1965. 95: 141-147.
- 121 Gilewski, T. A., Ragupathi, G., Dickler, M., Powell, S., Bhuta, S., Panageas, K., Koganty, R. R., Chin-Eng, J., Hudis, C., Norton, L., Houghton, A. N. and Livingston, P. O., Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res* 2007. 13: 2977-2985.
- 122 Trumpfheller, C., Finke, J. S., Lopez, C. B., Moran, T. M., Moltedo, B., Soares, H., Huang, Y., Schlesinger, S. J., Park, C. G., Nussenzweig, M. C., Granelli-Piperno, A. and Steinman, R. M., Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 2006. 203: 607-617.
- 123 Arancibia, S., Del Campo, M., Nova, E. and Becker, M. I., Novel hemocyanin from *Fissurella latimarginata* exhibit a superior immunogenicity and antitumor effect 2010.
- 124 Wirguin, I., Suturkova-Milosevic, L., Briani, C. and Latov, N., Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1995. 40: 307-310.
- 125 Wolf, M. F., Koerner, U. and Schumacher, K., Specificity of reagents directed to the Thomsen-Friedenreich antigen and their capacity to bind to the surface of human carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1986. 46: 1779-1782.
- 126 Slovin, S. F., Ragupathi, G., Musselli, C., Fernandez, C., Diani, M., Verbel, D., Danishefsky, S., Livingston, P. and Scher, H. I., Thomsen-Friedenreich (TF) antigen as a target for

- prostate cancer vaccine: clinical trial results with TF cluster (c)-KLH plus QS21 conjugate vaccine in patients with biochemically relapsed prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005. 54: 694-702.
- 127 MacLean, G. D., Bowen-Yacyshyn, M. B., Samuel, J., Meikle, A., Stuart, G., Nation, J., Poppema, S., Jerry, M., Koganty, R., Wong, T. and et al., Active immunization of human ovarian cancer patients against a common carcinoma (Thomsen-Friedenreich) determinant using a synthetic carbohydrate antigen. *J Immunother (1991)* 1992. 11: 292-305.
- 128 Adluri, S., Helling, F., Ogata, S., Zhang, S., Itzkowitz, S. H., Lloyd, K. O. and Livingston, P. O., Immunogenicity of synthetic TF-KLH (keyhole limpet hemocyanin) and sTn-KLH conjugates in colorectal carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 1995. 41: 185-192.
- 129 Rivera-Marrero, C. A., Schuyler, W., Roser, S., Ritzenthaler, J. D., Newburn, S. A. and Roman, J., M. tuberculosis induction of matrix metalloproteinase-9: the role of mannose and receptor-mediated mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002. 282: L546-555.
- 130 Lee, S. J., Zheng, N. Y., Clavijo, M. and Nussenzweig, M. C., Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* 2003. 71: 437-445.
- 131 van Vliet, S. J., Garcia-Vallejo, J. J. and van Kooyk, Y., Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol* 2008. 86: 580-587.
- 132 Manubens, A., Haussmann, D., Fuentes, A., Figueroa, J., Huaquin, L., Martínez, J., De Ioannes, A., Venegas, A., De Ioannes, P., Becker, M.I., Clonamiento parcial de dos secuencias cDNA de la hemocianina del gastrópodo chileno *Concholepas concholepas* y localización del órgano responsable de su biosíntesis XXX Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile, Chillán, Chile. 2007.
- 133 Sussich, F. and Cesaro, A., The kinetics of periodate oxidation of carbohydrates: a calorimetric approach. *Carbohydr Res* 2000. 329: 87-95.
- 134 Dvorch, W., Fletcher, H., 3rd, Gregory, F. J., Healy, E. M., Warren, G. H. and Alburn, H. E., Antitumor activity of periodate-oxidation products of carbohydrates and their derivatives. *Cancer Res* 1966. 26: 2386-2389.
- 135 Bell, J. P., Faures, M. L., LePage, G. A. and Kimball, A. P., Immunosuppressive and antitumor activity of periodate oxidation product of beta-D-ribose-6-methylthiopurine. *Cancer Res* 1968. 28: 782-787.
- 136 Chen, H. and Rhodes, J., Schiff base forming drugs: mechanisms of immune potentiation and therapeutic potential. *J Mol Med* 1996. 74: 497-504.
- 137 Rhodes, J., Chen, H., Hall, S. R., Beesley, J. E., Jenkins, D. C., Collins, P. and Zheng, B., Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 1995. 377: 71-75.
- 138 Leen, A. M., Rooney, C. M. and Foster, A. E., Improving T cell therapy for cancer. *Annu Rev Immunol* 2007. 25: 243-265.
- 139 Azad, A. K., Torrelles, J. B. and Schlesinger, L. S., Mutation in the DC-SIGN cytoplasmic triacidic cluster motif markedly attenuates receptor activity for phagocytosis and endocytosis of mannose-containing ligands by human myeloid cells. *J Leukoc Biol* 2008. 84: 1594-1603.
- 140 Weigel, P. H. and Yik, J. H., Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim Biophys Acta* 2002. 1572: 341-363.
- 141 Altschuler, Y., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Bruns, J. B., Apodaca, G., Weisz, O. A. and Hughey, R. P., Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell* 2000. 11: 819-831.
- 142 Steinman, R. M. and Swanson, J., The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 1995. 182: 283-288.

- 143 Pearse, B. M. and Robinson, M. S., Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol* 1990. 6: 151-171.
- 144 Schmid, S. L., Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* 1997. 66: 511-548.
- 145 Blander, J. M. and Medzhitov, R., Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* 2006. 440: 808-812.
- 146 Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. and Trombetta, E. S., Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* 2005. 307: 1630-1634.
- 147 Teitz-Tennenbaum, S., Li, Q., Davis, M. A. and Chang, A. E., Dendritic cells pulsed with keyhole limpet hemocyanin and cryopreserved maintain anti-tumor activity in a murine melanoma model. *Clin Immunol* 2008. 129: 482-491.
- 148 Salazar-Onfray, F., KLH no activa células dendríticas humanas 2009.
- 149 Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I. and Steinman, R. M., The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 2000. 191: 927-936.
- 150 Olsson, C. A., Chute, R. and Rao, C. N., Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J Urol* 1974. 111: 173-176.
- 151 Lamm, D. L., Reyna, J. A. and Reichert, D. F., Keyhole-limpet haemocyanin and immune ribonucleic acid immunotherapy of murine transitional cell carcinoma. *Urol Res* 1981. 9: 227-230.
- 152 Kawai, T. and Akira, S., The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010. 11: 373-384.