



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y
FARMACEUTICAS
DPTO. DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR**

**PARTICIPACION DE CELULAS NATURAL KILLER (NK) EN EL
EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE HEMOCIANINAS**

Memoria para optar al Título de Bioquímico

LEIDY XIMENA LAGOS ROJAS

Profesor Patrocinante:
Dr. Javier Puente Ph. D.
Dpto. De Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Cs. Qcas. Y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Tesis:
Dra. María Inés Becker Ph. D.
Dpto. Investigación y Desarrollo
Biosonda S. A.

Santiago de Chile, 2007

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a la doctora María Inés Becker, por haber confiado en mi, en mis capacidades y permitirme realizar mi memoria de título bajo su tutela. Gracias por la dedicación y apoyo incondicional que sentí en todo momento, por las herramientas entregadas, que comprenden no sólo el área intelectual, sino también herramientas de desarrollo personal, que estoy segura, me acompañaran de por vida.

Gracias a todas las personas que conforman Biosonda S. A. Al doctor Alfredo de Ioannes, Augusto Manubens, Alejandra Fuentes, por sus opiniones críticas y sabias que me permitieron mejorar día a día. A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron, con una palabra de aliento o simplemente una sonrisa de ánimo, Marcela Cabezas, Lorena Macaya, Jonathan Martinez y cariñosamente a Don José.

A todas mis amigas y amigos, por su incondicionalidad y afecto. A Miguel del Campo, gran amigo y compañero de trabajo. A Enrique Oliva, por ser un pilar importante en mi vida por varios años, por darme su apoyo y cariño en los momentos que más lo necesité.

Finalmente debo agradecer a las personas que me formaron, apoyaron y permitieron ser de mi una profesional: Mis padres, gracias por todo el esfuerzo y sacrificio que ha significado esta gran odisea, a mi tía Emperatriz Muñoz y su familia, por acogerme en su casa y en su corazón, a mi hermana, por ser mi luz, mi conciencia y mi cable a tierra, es decir, todas las personas que yo considero Mi Familia, con especial énfasis en mi Madre, que aunque estuvo ausente físicamente, toda mi vida he sentido su apoyo y amor.

Es muy difícil nombrar a todas las personas que me acompañaron en este largo y gratificante camino, ya que son muchas. Espero no olvidar a nadie, de corazón, muchas gracias por todo y a todos.

*Ciencia,
es arar la más profunda tierra, con las manos del intelecto,
la fuerza del corazón y la luz de la perseverancia.*

Dedicada a mi familia con mucho cariño.....

Esta Tesis forma parte del proyecto FONDECYT 105-0150 titulado “Estudio de la estructura de la hemocianina de moluscos en relación a sus mecanismos de inmunoestimulación en mamíferos” y percibió apoyo parcial de la Fundación COPEC-PUC proyecto SC0014 titulado “Desarrollo de productos inmunoestimulantes en base a hemocianina de *C. concholepas*”

Los resultados fueron presentados en los siguientes Congresos:

- **Immunomodulatory effect of CCH and KLH, members of the hemocyanin family, on the maturation of dendritic cells** M. I. Becker, M. Del Campo, L. Lagos, A. Fuentes, A. Manubens, A. E. De Ioannes, B. Moltedo. 9th International Conference on Dendritic Cells. September 16-20 2006. Edinburgh, England. Abstract P3.103, pp: 84.
- **Hemocyanins from *C. concholepas* (CCH) and *M. crenulata* (KLH), which broadly differ in their origin and subunit organization, display similar immunomodulatory properties.** M. I. Becker, B. Moltedo, P. De Ioannes, A. Fuentes, H. Oliva, F. Faunes, L. Lagos, C. Espinoza, D. Laporte, A. Manubens, J. Ferreira, A. De Ioannes. 16th European Congress of Immunology. September 6-9, 2006. Paris, Francia. Abstract PD-3922, pp: 600.
- **Participación de células Natural Killer (NK) en el efecto inmunoestimulante de hemocianinas.** L. Lagos, M. I. Becker, J. Puente, De Ioannes A. E., XLIX Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile; XXIX Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile; XVIII Reunión Anual Sociedad de Botánica de Chile; XXXVIII Reunión Anual de Genética de Chile. Noviembre, Pucón, Chile, 2006. Resumen Biol. Res. 39: R-137.

INDICE

	Página
ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	4
INTRODUCCION	6
MATERIALES	15
1. Biológicos	15
2. Reactivos	15
3. Soluciones	17
4. Material plástico y otros	17
5. Equipos	18

METODOS	18
1. Establecimiento y Caracterización de un cultivo <i>in vitro</i> de células NK murinas	18
2. Efecto de CCH sobre células NK cultivadas <i>in vitro</i>	21
3. Efecto de CCH sobre células NK <i>in vivo</i>	22
4. Determinación del efecto de hemocianinas sobre la citotoxicidad de células NK	23
5. Marcación de proteínas con AlexaFluor488	24
RESULTADOS	25
1. Caracterización de un cultivo <i>in vitro</i> de células NK	25
2. Efecto de CCH sobre células NK cultivadas <i>in vitro</i>	27
3. Incorporación de CCH por células NK <i>in vitro</i>	33
4. Incorporación de CCH por células NK <i>in vivo</i>	38
DISCUSION	46
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS	55

INDICE FIGURAS

	Página
Figura 1 : Estructura de las hemocianinas de moluscos y comparación de KLH y CCH	7
Figura 2 : Activación y expresión de marcadores de células NK	10
Figura 3 : Caracterización de un cultivo <i>in vitro</i> de células NK murinas	26
Figura 4 : Efecto de CCH sobre células NK murinas cultivadas <i>in vitro</i>	28
Figura 5 : Microscopía electrónica de transmisión de células NK cultivadas <i>in vitro</i> en presencia de CCH	29
Figura 6 : Microscopía electrónica de transmisión de células NK cultivadas <i>in vitro</i> mostrando la presencia de CCH	30
Figura 7 : Expresión de marcadores característicos de células NK en cultivo <i>in vitro</i>	32
Figura 8 : Incorporación de CCH en células NK cultivadas <i>in vitro</i> mediante citometría de flujo	34
Figura 9 : Incorporación de CCH en células NK cultivadas <i>in vitro</i> , analizado mediante microscopía confocal	35
Figura 10 : Actividad citotóxica de células NK cultivadas <i>in vitro</i>	37
Figura 11 : Incorporación <i>in vivo</i> de CCH por diferentes poblaciones linfoides extraídas de bazo	39

Figura 12	: Incorporación de CCH <i>in vivo</i> por diferentes poblaciones linfoides extraídas de peritoneo	41
Figura 13	: Incorporación de CCH <i>in vivo</i> por células peritoneales y analizado mediante microscopía confocal	43
Figura 14	: Efecto de CCH <i>in vivo</i> sobre la citotoxicidad de células NK esplénicas de ratones <i>naive</i>	45
Tabla 1	: Incorporación de CCH <i>in vivo</i> , mediante inyección endovenosa o intraperitoneal en las diferentes poblaciones linfoides, tanto esplénicas como peritoneales	42

RESUMEN

Las hemocianinas de moluscos son metaloglicoproteínas que transportan Oxígeno, son conocidas por su gran inmunogenicidad en los mamíferos, debida en parte a su naturaleza xenogénica, a su compleja estructura cuaternaria con epitopos repetidos y a su enorme tamaño, en torno a los 8 MDa. La hemocianina más utilizada en Biomedicina durante casi 40 años como proteína transportadora para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos, como adyuvante en vacunas y como inmunoestimulante no específico en la terapia de ciertos tumores, se conoce como **KLH** y proviene del molusco californiano comúnmente llamado Keyhole limpet (*Megathura crenulata*).

En los años recientes, nuestro laboratorio ha demostrado que **CCH**, la hemocianina del gastrópodo chileno *Concholepas concholepas* (Loco) tiene propiedades inmunomestimulantes similares a KLH como proteína transportadora, adyuvante y como agente antitumoral no específico. Con respecto a los mecanismos inmunológicos involucrados, hemos encontrado que en ratones sensibilizados con KLH o CCH, se produce un aumento de la actividad de las células NK y un perfil de citoquinas del tipo Th1, con el concomitante cambio de subclases de IgG1 a IgG2a, sugiriendo por primera vez que el sistema inmune de los mamíferos reconoce un patrón-hemocianina, independientemente de la especie y de su organización, ya que KLH y CCH difieren en su estructura cuaternaria.

Sorprendentemente, el efecto inmunomodulador de las hemocianinas no requiere de adyuvantes adicionales, lo que nos lleva a plantear en este trabajo la hipótesis que las hemocianinas inducen señales que promueven inflamación a nivel de la inmunidad innata. Es así que en este trabajo se estudió el efecto de hemocianinas *per se* sobre células NK de ratones *naive*, evaluando cambios fenotípicos y funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diversas técnicas de microscopía de luz y electrónica, citometría de flujo y ensayos de citotoxicidad, con hemocianina sola o conjugada el fluorocromo AlexaFluor 488.

Los resultados muestran que se estableció la metodología para cultivar células NK de ratón *in vitro*, mediante selección negativa de esplenocitos con esferas magnéticas, encontrándose que en torno a los 10 días alcanzan el estado de mayor madurez. Su caracterización fenotípica mostró que ellas expresan los marcadores propios de dichas

células (CDNK1.1+ CD49+ CD11c-) y desde el punto de vista funcional, secretan IFN γ . Los estudios con diferentes dosis de CCH, no mostraron variaciones en la expresión de dichos marcadores, ni en la intensidad de su expresión, pero sí se encontró un efecto a nivel de la maduración, reflejado por el predominio de células de mayor tamaño con respecto al cultivo control, algunas de las cuales mostraron vacuolas con CCH en su interior. Sin embargo, se determinó que CCH no ejerce efecto alguno sobre la capacidad humoral (secreción de IFN γ) y citotóxica de las células NK cultivadas *in vitro*.

Los experimentos *in vivo*, al igual que *in vitro*, mostraron por primera vez, que existe una subpoblación de células NK que incorporan CCH al igual que otras células linfoides analizadas y entre ellas células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Sin embargo, a diferencia de los resultados *in vitro*, si se encontró por primera vez, que CCH induce un aumento en la actividad de células NK a las 24 horas de inyectada en animales *naive* con respecto a los controles, resultado que abre numerosas interrogantes sobre los mecanismos de inmunoestimulación de estas facinantes proteínas.

SUMMARY

The hemocyanins from mollusk are metallo-glycoproteins that transport Oxygen. They are known for their immunogenicity in the mammals, due to their xenogenic nature, its complex quaternary structure with repeated epitopes, and their enormous size, around to 8 MDa. The hemocyanin used in Biomedicine, during almost 40 years, as carrier protein to produce antibodies against haptens and peptides, as adjuvant in vaccines, and as nonspecific immunoestimulant in the therapy of some tumors, is known as **KLH**, and is obtained from the Californian mollusk Keyhole limpet (*Megathura crenulata*).

In the recent years, our laboratory has demonstrated that **CCH**, the hemocyanin from the Chilean gastropod *Concholepas concholepas* (Loco) has immunostimulant properties similar to KLH, as carrier protein, adjuvant, and as non specific antitumor agent. With respect to the immunological mechanisms involved, we found that in mice sensitized with KLH or CCH, an increase of the activity of cells NK occurs, a profile of cytokines of the Th1 type is produced, with a concomitant change of subclasses of IgG1 to IgG2a, suggesting for the first time, that the mammal immune system recognizes a pattern-hemocyanin, independently of the species and its organization, since KLH and CCH differ in their quaternary structure.

Interestingly, the immunomodulatory effect of the hemocyanins does not require the additional adjuvants, thus, in this work the hypothesis is that the hemocyanins induce signals that promote inflammation at level of the innate immunity. In this work, the effect of hemocyanin is studied on NK cells of *naive* mice, evaluating phenotypic and functional changes both *in vitro* and *in vivo*. With this aim, we use diverse techniques of light and electron microscopy, flow cytometry, and cytotoxicity assay, with CCH and CCH conjugated with the fluorochrome AlexaFluor 488.

The results show that we established the methodology to culture mouse NK cells *in vitro*, by means of negative selection of spleen cells with magnetic beads. The NK culture around day 10, reach the state of greater maturity. Their phenotypic characterization showed that the cells express the markers-cell surface antigens of these cells (CDNK1.1+ CD49+ CD11c-), and from the functional point of view, they secrete IFN γ . The studies with different

doses from CCH did not shown variations either in the level expression of these markers or in their intensity, however an effect in the maturation was observed: the predominance of cells of greater size with respect to the control culture, some of which showed vacuoles containing CCH. Nevertheless, we determined that CCH exerts no effect on the humoral capacity (release of IFN γ) and cytotoxic of the NK cells cultured *in vitro*.

The experiments *in vivo*, like *in vitro*, showed for the first time that a subpopulation of cells NK incorporate CCH, in addition to other linfoid cells as dendritic cells, macrophages and lymphocytes B. Unlike the results *in vitro*, we found for the first time, that CCH induces an increase in the activity of NK cells after 24 hours of injected in animals *naive* with respect to the control, result that opens numerous questions on the immunostimulating mechanism of these fascinating proteins.

INTRODUCCIÓN

Hemocianinas

Las hemocianinas son glicoproteínas que tienen cobre en su estructura para unir y transportar oxígeno en una variedad de artrópodos y moluscos. Típicamente las hemocianinas poseen alto peso molecular y múltiples subunidades que les otorgan una compleja estructura cuaternaria. Las subunidades de hemocianinas tienden a agregarse debido a que la molécula no está encapsulada en células sanguíneas y de esta forma, presentan una alta concentración sin el correspondiente aumento de osmolaridad en la hemolinfa (Van Hole *et al.*, 1997).

Las hemocianinas de moluscos difieren de la de artrópodos en su peso, estructura y organización de las subunidades así como en la capacidad de unir oxígeno, sin embargo en este trabajo estas diferencias no serán analizadas, porque el foco de interés son las hemocianinas de moluscos y dentro de este *Phylum* interesa la Clase de los gastrópodos, por las aplicaciones de su hemocianina en Biomedicina.

Las hemocianinas de moluscos se ensamblan en capas de moléculas cilíndricas huecas formadas por 10 subunidades, organización que recibe el nombre de decámero. Cada subunidad pesa entre 350 y 450 kDa y está formada por siete u ocho dominios globulares conocidos como unidades funcionales (FUs), las cuales se encuentran ordenadas como un collar de perlas y enlazadas covalentemente por pequeñas regiones flexibles de 10-15 residuos aminoacídicos. Cada una de las FUs es capaz de unir reversiblemente una molécula de oxígeno a través de un par de átomos de cobre, lo que confiere su principal función como molécula transportadora de oxígeno. Los decámeros pueden alcanzar una masa molecular de 3.5-4.5 MDa y en bivalvos y gastrópodos, ellos pueden autoensamblarse como dímeros estables. Esta asociación se debe a una interacción cara-cara asimétrica entre decámeros, resultando grandes estructuras, cuyo rango de peso molecular va de 8 a 9 MDa (De Ioannes *et al.*, 2004). En la **Figura 1A** se presenta una imagen de moléculas de hemocianina de gastrópodos teñidas mediante tinción negativa y observadas al microscopio electrónico de transmisión (MET), además se muestra un esquema que resume la organización de estas gigantescas proteínas (**1B**).

Estructura de las hemocianinas de moluscos y comparación de KLH y CCH.

A.



B.

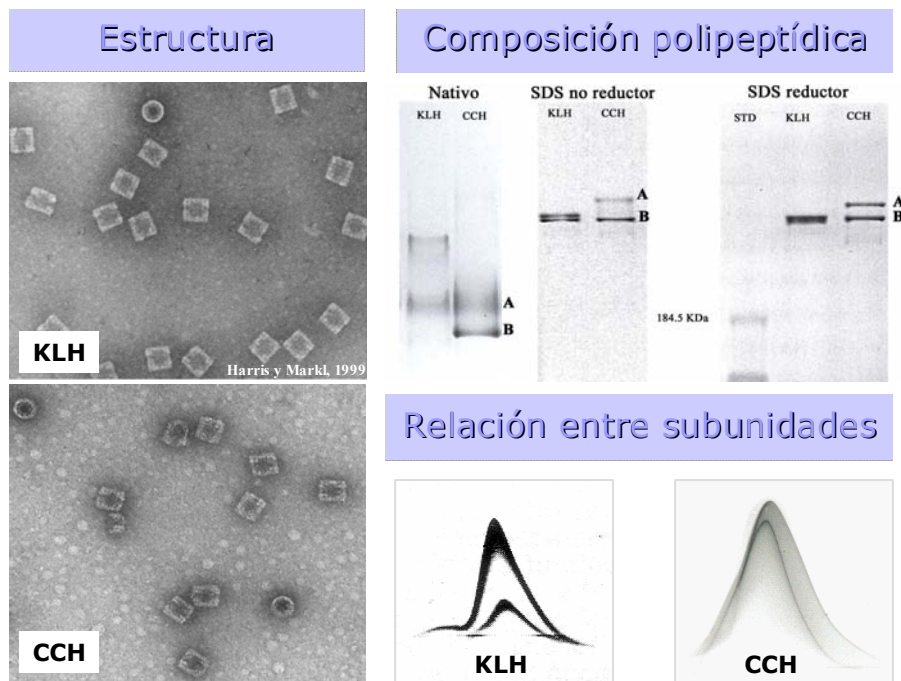


Figura 1. Estructura y características generales de hemocianinas. **A.** Microscopía electrónica con tinción negativa de moléculas de hemocianina, donde se muestra claramente la estructura didecamérica con forma de cilindro hueco. Modelo de la conformación del didecámero. **B.** Aspecto de hemocianinas vistas por MET. Análisis electroforético en condiciones nativas, SDS no reductoras y SDS reductoras, donde se observa las subunidades de KLH y CCH. Inmunolectroforesis 2-D, que muestra reacción cruzada entre las subunidades de CCH y la ausencia de ellas en KLH.

En el campo de la Inmunología, son ampliamente conocidas por su gran inmunogenicidad, debida en parte a su naturaleza xenogénica, a su gran tamaño y a su compleja estructura cuaternaria, lo que permite el reconocimiento de múltiples epítomos por parte de linfocitos T y B (Oliva *et al.*, 2002). En este contexto, la hemocianina mejor caracterizada y profusamente utilizada como proteína transportadora de haptenos y péptidos para desarrollar anticuerpos y vacunas, así como inmunoestimulante no específico en la terapia de algunos tumores, proviene del molusco californiano Keyhole limpet (*Megathura crenulata*) y su hemocianina conocida como **KLH** (Harris y Markl, 1999).

El uso creciente de KLH en Biomedicina ha estimulado la búsqueda de proteínas con similares propiedades inmunoestimulantes, no obstante, los mecanismos inmunológicos que las hemocianinas involucran, son escasamente conocidos. Investigaciones recientes han demostrado que la hemocianina obtenida del molusco *Concholepas concholepas* (Loco), denominada **CCH**, tiene características inmunoestimulantes comparables a KLH, tanto como proteína transportadora para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos (Manosalva *et al.*, 2004), así como agente antitumoral en la terapia del cáncer superficial de vejiga (Molledo *et al.*, 2006), sin embargo su estructura es diferente a la de KLH. Ambas hemocianinas están compuestas de dos subunidades, en el caso de KLH (denominadas KLH1 y KLH2) forman homodécámeros y no tienen epítomos compartidos, en cambio en CCH (denominadas CCHA y CCHB) forman heterodécámeros y tienen epítomos compartidos y también específicos. La hemocianina de *C. concholepas* no requiere de cationes bivalentes adicionales para estabilizar su estructura cuaternaria, en cambio KLH sí los requiere, probablemente esta diferencia se explica por el mayor contenido de aminoácidos hidrofóbicos de CCH, los cuales darían mayor estabilidad a su estructura cuaternaria (Leyton *et al.*, 2005). Un rasgo característico de CCH es que la subunidad CCH-A sufre un autoclivaje a medida que envejece, resultando dos polipéptidos denominados CCH-A1 y CCH-A2 mientras que la subunidad CCH-B se mantiene inalterada. No obstante, estas grandes diferencias, al mirar la forma de CCH y KLH mediante MET, son indistinguibles, como se observa en la **Figura 1B** (Markl *et al.*, 2001; De Ioannes *et al.*, 2004).

La Respuesta del Sistema Inmune

Como es sabido, el éxito en la defensa inmunológica de los mamíferos es el resultado de un mecanismo complejo de resistencia que involucra células tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa. Los linfocitos especializados del sistema inmune adaptativo, tales como los linfocitos T son cruciales para una respuesta inmune exitosa, sin embargo ellos necesitan tiempo para ser instruidos (reconocimiento del complejo antígeno-MHC), reclución del número suficiente (después de la expansión clonal) y adquirir función efectora. Por el contrario, las células de la inmunidad innata, tales como las células NK (*Natural Killer*), están prácticamente listas para atacar a células tumorales o células infectadas con virus, debido a que no necesitan de expansión clonal ni adquisición de función efectora, ya que la poseen (Smyth *et al.*, 2005).

Las células NK tienen una variada gama de receptores de superficie específicos para los complejos de histocompatibilidad de clase I (MHC I), que se han agrupado en tres familias: KIR (*killer cell Ig like receptors*) en humanos, Ly49 (*lectin like receptors*) en ratones y CD94/NKG2A (*lectin like receptors*) compartida por humanos y ratones. Además posee receptores de muerte celular como TRAIL y FasL, junto con moléculas coestimuladoras, tales como: CD27, cuyo ligando es CD70 (Kelly *et al.*, 2002); CD28, que interactúa con CD80 y CD86 (Azuma *et al.*, 1992) y CD28 expresado en células tumorales (Geldhoft *et al.*, 1995). Se ha visto que la expresión de estas moléculas coestimuladoras aumenta considerablemente en presencia de IL-12. Todos estos receptores se han identificado mediante estudios *in vivo*, como se muestra en un esquema en la **Figura 2A** (Yokoyama W. *et al.*, 2004). Las células NK censuran la expresión de moléculas MHC I propias en potenciales células blanco usando receptores de superficie específicos para MHC I, tales como los KIR y el heterodímero CD94-NKG2A, el cual una vez unido a su ligando específico, inhibe la citotoxicidad mediada por NK. En ausencia de éste reconocimiento, la célula NK ataca la célula blanco usando una serie de receptores de superficie activadores que actúan con diferentes ligandos. Por lo tanto, una baja en el nivel de MHC I, estrategia usada por células tumorales y virus para evadir el sistema adaptativo, es señal inmediata para el ataque de las células NK (**Figura 2B**) (Das y Saxena, 2004).

Activación y expresión de marcadores de células NK

A.

Etapas	Adquisición de CD94-NKG2 Ly-49			Etapa expansión	Maduración de células NK
	I	II	III	IV	V
CD122	+	+	+	+	+
NK1.1	-	+	+	+	+
CD94-NKG2	-	+	+	+	+
Ly49	-	-	+	+	+
c-Kit	NA	-	+	+	+/-
α	NA	alta	alta	baja	alta
DX5(CD49b)	NA	baja	baja	alta	alta
Mac-1	NA	baja	baja	baja	alta
CD43	NA	baja	baja	baja	alta
Citotoxicidad	NA	NA	NA	baja	alta
IFN- γ	NA	NA	NA	baja	alta

Etapas de maduración desde el precursor (etapa I) hasta la célula nK madura (etapa V).

En cada etapa la expresión del marcador es designó "+", mientras que la ausencia de expresión es indicada por "-". Para algunos marcadores, la intensidad de expresión se expresa como "alta" y "baja". NA, no aplicable.

B.

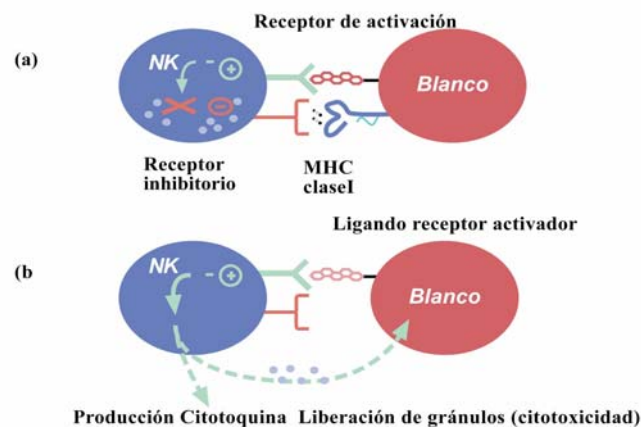


Figura 2. Activación de células NK. **A.** Etapas de maduración *in vivo* de células NK murinas. En el cuadro se muestra la expresión de marcadores y capacidad funcional de cada etapa. Modificado de Yokoyama *et al.*, 2004¹³. **B.** La activación de células NK es controlada por un balance entre señales proveniente de receptores de activación e inhibición. **a)** receptor inhibitorio de NK que reconoce MHC I propio e impide su activación; **b)** cuando el receptor inhibitorio no reconoce su ligando (ausencia o baja expresión de MHC I), la unión del receptor de activación a su ligando en la célula blanco resulta en la activación de célula NK (producción de citoquinas y liberación de gránulos). Modificado de: <http://arthritis-research.com/content/6/1/8/figure/F1>

El hecho que las células NK posean una potente actividad citolítica contra células tumorales y la identificación de mecanismos moleculares involucrados en su función, replantean el papel de éstas células en el contexto de la respuesta inmune, ya que ahora se sabe que no sólo son importantes para la inmunidad innata, sino que también son importantes reguladores de la respuesta adaptativa, lo que se evidencia en la secreción de citoquinas y la expresión de ligando reconocidos por linfocitos T y B.

Las funciones efectoras de las células NK incluyen citotoxicidad y la capacidad de producir una gran variedad de citoquinas, incluyendo IFN γ , que son señales activadoras de importancia patofisiológica. La exocitosis de gránulos conteniendo enzimas líticas es el principal mecanismo de agresión de las células NK además de citoquinas de la superfamilia TNF. La función de las células NK es fuertemente regulada por un balance entre señales positivas y negativas provistas por diversos receptores de superficie (Cerwenka y Lanier, 2001). La activación requiere la acción de citoquinas proinflamatorias en combinación con receptores de superficie. En especial, citoquinas como, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 e IFN $\alpha\beta$ pueden producir proliferación de células NK como también promover la citotoxicidad y/o producción de IFN γ (Biron *et al*, 1999). El IFN γ secretado por las células NK es clave en la detención de angiogénesis, neutralización de patógenos y en la comunicación y activación de las células del sistema adaptativo (Cerwenka *et al.*, 2001).

Debido a todos los antecedentes mencionados anteriormente, es el especial interés que concitan las células NK como iniciadoras de una potente y exitosa respuesta inmune.

Hemocianinas y células NK

En la actualidad se usan diferentes sustancias como inmunoestimulantes no específicos que actúan como agentes antitumorales efectivos, es el caso del Bacillus Calmette-Guérin, empleado en la vacuna contra la tuberculosis, conocido como BCG. La BCG es utilizada en la terapia del carcinoma superficial de vejiga, sin embargo sus efectos secundarios han llevado a una búsqueda permanente de nuevas alternativas terapéuticas (Lamm *et al.*, 2000).

En este caso específico, numerosos estudios en humanos y usando modelos animales murinos, respaldan la efectividad de la actividad antitumoral de KLH (Markl *et al.*, 2001).

Los estudio pioneros de Olsson *et al.*, 1974 en pacientes con carcinoma superficial de vejiga recurrente, que estaban siendo evaluados para determinar su grado de inmunosupresión con diferentes antígenos y entre ellos KLH, demostró que en los pacientes que recibieron 5 mg de KLH periódicamente, la recurrencia de los tumores disminuía. Estos resultados llevaron a la evaluación de esta proteína en modelos murinos (Linn *et al.*, 2000) y en forma paralela se continuó con pruebas en humanos (Wishahi *et al.*, 1995) iniciándose estudios para determinar su mecanismo de acción. Es así como el grupo de Molto *et al.*, 1991 reportó que KLH aumentaba la actividad de células NK en pacientes con cáncer superficial de vejiga. Nuestros estudios recientes, utilizando CCH han confirmado estos resultados y es así como hemos demostrado que en ratones previamente sensibilizados con hemocianina de *C. concholepas*, aumenta la actividad de las células NK, como también los niveles de IFN γ en el suero (Molledo *et al.*, 2006) El mecanismo por el cual las células NK estarían siendo activadas es por citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), ya que las células NK poseen receptores Fc, que al unirse con la porción constante de los anticuerpos dirigidos contra las células tumorales (secretados gracias a la acción inmunoestimulante de hemocianina) activan la capacidad citolítica de las células NK y permiten la lisis de dichas células, disminuyendo el volumen tumoral y por ende aumentando la sobrevivencia de los animales. Además, junto con ello, se promueve el cambio de subclase de IgG1a a IgG2a, característico de la respuesta tipo Th1 (Molledo *et al.*, 2006).

Teniendo presente lo anterior es que surge la siguiente interrogante: Cómo dos hemocianinas, tales como KLH y CCH, que difieren tanto en su origen como en la organización de sus subunidades, pueden presentar efectos inmunoestimulantes y antitumorales similares. Nosotros proponemos que estos efectos se deberían a la organización de las hemocianinas *per se*, esto significa que ellas actuarían a nivel de inmunidad innata y adaptativa con un patrón de reconocimiento y procesamiento antigénico inusual, debido a secuencias peptídicas específicas y probablemente, repetidas en la molécula, como consecuencia de su simetría de tipo D5 (Orlova *et al.*, 1997). Considerando además que el efecto inmunoestimulante no requiere del uso de coadyudantes adicionales, nos hace pensar

que éstas proteínas, debido a su estructura, inducen señales que promueven inflamación, por lo que su reconocimiento podría estar a cargo de células de la inmunidad innata y entre ellas las NK, que al activarse secretan IFN γ , uno de los principales nexos con la respuesta inmune adaptativa.

Es importante señalar que las células que participan en la respuesta inmune innata, reconocen los patógenos mediante receptores que no tiene la especificidad de los de la inmunidad adaptativa (TCR y BCR para linfocitos T y B, respectivamente) entre los cuales se encuentran los receptores pertenecientes a la familia Toll. Los receptores del tipo Toll en vez de epítomos reconocen los llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) localizados ya sea en su superficie o secretadas desde su interior; su estimulación activa el sistema inmune porque los reconoce como señales de inflamación o peligro (Medzhitov *et al.*, 1997; Akira *et al.*, 2001). Estos hallazgos han permitido identificar la naturaleza química de los adyuvantes y los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las respuestas inmunológicas que ellos desencadenan (Sivori S. *et al.*, 2004).

En este trabajo se estudió la participación de células NK en el efecto inmunoestimulante de hemocianina (CCH), pero a diferencia de trabajos anteriores, en este caso se utilizó animales *naive*, es decir, sin previa sensibilización con hemocianina, por ende, todos los efectos que se producen en el animal son debido exclusivamente a la molécula *per se*. El propósito de este trabajo fue dilucidar si las células NK, pertenecientes a la inmunidad innata, son las primeras en reconocer y desencadenar una respuesta contra hemocianina, con la potencial presencia de un receptor específico o putativo para hemocianinas o si su rol se limita sólo a la citotoxicidad mediada por anticuerpos con la necesaria acción previa de la inmunidad adaptativa.

HIPOTESIS

Las hemocianinas de moluscos, debido a su estructura, inducen señales que promueven inflamación, lo que conlleva a la estimulación de las células NK y por ende la activación de la Inmunidad Innata.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de las células NK en el efecto inmunoestimulante de la hemocianina de *C. concholepas*, a nivel de respuesta primaria usando modelos murinos tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estudiar el efecto, a nivel morfológico, de hemocianinas en células NK cultivadas *in vitro* obtenidas de animales *naive*, mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión.
- Estudiar efecto a nivel de expresión e intensidad de marcadores de superficie característicos de células NK, como son NK1.1 y CD49b, mediante citometría de flujo.
- Evaluar la incorporación de CCH, por parte de células NK cultivadas *in vitro*, mediante microscopía electrónica de transmisión y utilizando CCH unida a fluorocromos y observadas mediante citometría de flujo y microscopía confocal.
- Estudiar el efecto de CCH sobre la capacidad humoral de células NK *in vitro*, mediante medición de IFN γ de sobrenadantes de dichos cultivos por ELISA.
- Evaluar el efecto de CCH sobre la capacidad citotóxica de células NK cultivadas *in vitro*, mediante el ensayo de liberación de Cr radioactivo, por parte de células YAC-1.
- Estudiar si existe incorporación de CCH por parte células NK *in vivo*, utilizando CCH unida a fluorocromos y analizadas mediante citometría de flujo y microscopía confocal.
- Evaluar el efecto de CCH sobre la capacidad citotóxica de células NK *in vivo*, mediante el ensayo de liberación de Cr radioactivo, por parte de células YAC-1.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

1. BIOLÓGICOS

1.1 Animales de experimentación

- Ratones Balb/c, C57BL/6 y C3H/HeJ, adquiridos en Jackson Laboratory (Bar Harbor USA) mantenidos en el bioterio de Biosonda S.A.
- Ratones C57BL/6, Departamento de Biología Celular, Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Los animales de experimentación, de 8-12 semanas de edad fueron mantenidos en un área de acceso restringido a 22-24°C, con ciclos de 12 hr. de luz y 12 hr. de oscuridad, agua y alimento *ad libitum*.

1.2 Líneas Celulares

- YAC-1, deficientes en MHC de clase I, que son sensibles a células NK murinas (proporcionadas por Dr. J. Ortaldo, University of the Health Sciences, Bethesda, USA).

2. REACTIVOS

2.1. Cultivo celular

D-MEM; aminoácidos no esenciales; penicilina 20x; streptomycin 50x; L-Glutamina 100x; Piruvato de Na de Gibco, USA; Suero fetal de bovino (SFB) de Hyclon, USA; 2-ME; DMSO (Dimetil sulfoxido) de Merck, Alemania; IL-2 de BD Pharmingen, USA; CFS (Carboxiluorsceína Diacetato Succimidil ester) de Invitrogen, USA; Poli I:C 10mg/ml; Ficoll-Hypaque 1083 de Sigma, USA.

2.2. Proteínas

Hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH); hemocianina de *Fissurella latimarginata* (FLH); hemocianina de *Fissurella máxima* (FMH); hemocianina de *Fissurella cumingi* (FCH) de Biosonda S. A.; hemocianina de *Keyhole limpet* (KLH) y Albúmina de suero de bovino (BSA) de Pierce, USA;

2.3. Reactivos inmunológicos

2.3.1. Aislamiento Celular: Kit aislamiento células NK; columnas magnéticas (MACS, magnetic cell sorting) de Miltenyi Biotec, Alemania.

2.3.2. Determinación interleuquinas: Mouse IFN γ Screening Set (Pierce, USA); Mouse Total IL-12 ELISA Kit (Endogen, USA).

2.3.3. Marcación de proteínas: Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit (Molecular Probes, USA).

2.3.4. Marcadores de subpoblaciones linfoides: Marcadores de superficie asociados a fluoróforos, anti-CD49b-PE (células NK); anti-CD19-PE (Linfocitos B); anti-CD14-PE (macrófagos); anti- CD8-PE (Linfocitos T); anti-CD11c-PE (Células Dendríticas); anti-NK1.1-Cy5.5 (células NK); anti-CD11c-FITC (Células Dendríticas) de BD Biosciences Pharmingen, USA.

PE: Phycoerythrin, espectro de absorción de 566 nm (luz verde) y espectro de emisión de 575 nm (luz roja).

PerCP-Cy 5.5: proteína clorofílica peridina, espectro de absorción de 683 nm y espectro de emisión de 707 nm (luz naranja)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína, espectro de absorción de 488 nm y espectro de emisión de 530 nm.

2.4. Reactivos Radioactivos

Na₂⁵¹CrO₄ (Perkin Elmer, USA)

3. SOLUCIONES

3.1. Medios de cultivo y soluciones estériles

Medio de cultivo Dulbecco: (D-MEM)

Medio D-MEM completo: 10% SFB; 1% aminoácidos no esenciales; 1%

Glutamina; 1% antibióticos; $2 \cdot 10^{-5}$ M 2-ME y D- MEM.

Solución lisis de glóbulos Rojos: NH_4Cl (0.15M); KHCO_3 (10Mm); NaEDTA (0.1Mm)

PBS: Amortiguador Fosfato Salino pH 7.2

PBS-SFB: PBS y suero fetal de bovino al 2%

Equithesian: 8.5 g clorhidrato, 4.25 g MgSO_4 , 1.96 g pentobarbital de sodio en 200 ml agua.

3.2. Soluciones no estériles

PBS: Buffer fosfato salino pH 7.2 (Pierce, USA)

3.3. Soluciones de fijación de células y medio de montaje para microscopía

Para microscopía electrónica: Solución de Glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato de sodio pH 7.4

Para citometría de flujo: PBS-Paraformaldehído, 3.7%

Montaje de células para inmunofluorescencia: DABCO 1,4-diazobicyclo[2.2.2]octano 5 gr; glicerol (45 ml); tampón fosfato salino (5 ml, pH 7.2); azida de 20 mg.

4. MATERIAL PLASTICO Y OTROS

Material de cultivo: tubos cónicos de 15 y 50 ml (Axygen, USA); pipetas de 1, 2, 5, 10 y 25 ml; placas de Petri y tubos Eppendorf, botellas 50, 75 ml, placas 24 pocillos; placas de ELISA de 96 pocillos de poliestireno fondo curvo de Nunclon, Dinamarca; Cámara de Neubauer. Material quirúrgico estéril. Jeringas de 1,5 y 20 ml de Terumo, USA. Tubos Khan. Porta y cubre objetos.

5. EQUIPOS

Lector ELISA 7520 con filtros de absorción a 405 nm, 450 nm, 490 nm y 600 nm (**Cambridge Technology, Inc**). Estufa de cultivo de células, con regulación de CO₂ y temperatura (**Nuaire**). Campana de flujo laminar (**Clean Room Procusts, Inc**). Baño termoregulado (**Lab-Line**). Microscopio de contraste de fase (**Nikon**). Estufa refrigerada de sobremesa (**IEC Centra-7R**). Freezer de -80°C (**Forma Scientific**). Estanque para mantener líneas celulares en N₂ (**Unión Carbide**). pH metro (**Orion 3 Star**). Balanza analítica; Balanza granataria electrónica (**Sartorius**). Microcentrifuga (**Eppendorff**). Citómetro de flujo laminar (**Beckton Dickinson, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile**). Microscopio de Fluorescencia (**Zeiss. Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago**). Microscopio Electrónico de Transmisión (**Phillips Tecnai 12, Servicio Microscopía Electrónica Pontificia Universidad Católica**). Lavador de placas ELISA (**Bio-Tek**). Separador Magnético (**MACS**); Microscopio de luz invertido. Contador de radiación γ (**Packard, USA**); Agitador de células (**Labnet, USA**); Amicon (**Millipore, USA**).

METODOS

1. ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS NK MURINAS.

1.1. Aislamiento y cultivo de células NK

1.1.1. Extracción de células mononucleares

Ratones de la cepa C57BL/6 de alrededor dos meses de edad, fueron sacrificados por dislocación cervical, se les extrajo quirúrgicamente el bazo y se depositó sobre una placas de Petri conteniendo 5 ml de medio (D-MEM). Se perfundieron cuidadosamente y se colectó las células con pipeta Pasteur, luego se centrifugó por 20 min. a 1.800 rpm. Los glóbulos rojos fueron lisados agregando a cada bazo 1 ml de solución de lisis de glóbulos rojos durante 2 min. y luego se agregó 10 ml de medio D-MEM completo y se centrifugó nuevamente por 20 min. a 1.800 rpm. Finalmente se eliminó el sobrenadante y las células se

resuspendieron en medio D-MEM completo. Se contaron las células en un microscopio de luz con la ayuda de una cámara de Neubauer.

1.1.2. Aislamiento de células NK

Una vez contabilizadas las células se centrifugaron durante 10 min. a 1.200 rpm y se prosiguió al aislamiento de las células NK según las indicaciones del Kit de aislamiento de células NK de Miltenyi Biotec. Este procedimiento consiste en el aislamiento por selección negativa mediante esferas magnéticas que tienen unidos anticuerpos anti-CD contra diferentes poblaciones linfoides, excepto células NK, de esta manera, al aplicar un campo magnético, todas las células quedan retenidas en la columna y las células NK eluyen, ya que las esferas no poseen un anti-CD que las retenga.

1.1.3. Cultivo de células NK

Se cultivaron aproximadamente 1×10^6 células en 2 ml de medio cultivo en placas de 24 pozos, de acuerdo al procedimiento descrito en “Natural Killer Cell Protocols” con leves modificaciones. El medio completo de cultivo para células NK consistió en 2 ml de medio D-MEM completo suplementado con 10.000 U IL-2 y 2×10^{-5} M 2-ME. Se cultivaron en una estufa a 37°C y en un ambiente 10% CO₂ y 100% humedad. Las células se mantuvieron en estas condiciones durante 7 días sin cambio del medio de cultivo.

1.2. Caracterización de células NK en cultivo

1.2.1 Caracterización de las células mediante citometría de flujo

Las células NK se estudiaron en diferentes estados de maduración entre los días 0 (al momento de sembrarse) y 10 del cultivo.

i) Marcación de las células: Las células sembradas en cada pozo se resuspendieron y recolectaron en tubos Ependorff y se centrifugaron a 6.000 rpm por 3 min. El sobrenadante se eliminó y el pellet fue resuspendido en 100 µl de PBS-SFB 2% a razón de 5×10^5 a 1×10^6 células. Se agregó 1 µl del marcador asociado a fluoróforo (CD49b y/o NK1.1), según correspondía. Se incubó 20 min. a 4°C con agitación y luego se centrifugó a 6.000 rpm durante 3 min., se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con PBS-SFB 2%, para eliminar el exceso de fluoróforo. Luego se resuspendió en 300 µl de PBS-

Paraformaldehído 3.7% y se traspasó a los tubos Khan. De esta manera las células quedaron fijadas para ser analizadas por citometría de flujo.

ii) *Criterio de selección de población NK*: Los datos obtenidos por citometría de flujo fueron analizados con el programa computacional WINMDI. En éste programa se definió las poblaciones por gráficos del tipo *dot plot* y *density plot*. En primer lugar se hizo una región de una población homogénea tanto en tamaño como en granularidad (SSC *v/s* FSC, *size scatter v/s forward scatter*), luego se hizo otra región, dentro de la región anterior, para observar el grupo de células que era positivo para el marcador de interés, haciendo el gráfico de FSC *v/s* FL2 o *v/s* el láser en el cual emite el fluoróforo de interés. Luego se prosiguió haciendo regiones con el resto de los láser, para discriminar entre la autofluorescencia propia de la células y la fluorescencia correspondiente al marcador observado. Todos estos parámetros se estandarizaron con los correspondientes controles de autofluorescencia.

De esta manera, los porcentajes que se muestran en los resultados, corresponden a una población homogénea y positiva para los marcadores que se quería observar, en el caso de la cepa C57BL/6, la población NK⁺ se definió como CD49b⁺, CD11c⁻ y CDNK1.1⁺. Para las cepas BALB/c y C3H/HeJ la población de células NK se designó como CD49b⁺, CD11c⁻.

1.2.2. Caracterización de células NK mediante microscopía de luz con contraste de fase.

Las células NK cultivadas en placas de 24 pocillos fueron fotografiadas directamente en los pozos, durante todo el tiempo que duró el cultivo, al momento de ser sembradas y a los días 4, 7 y 10. Se utilizó un microscopio de luz invertido Zeiss equipado con contraste de fase y fluorescencia.

1.2.3. Caracterización de células NK mediante microscopía electrónica de transmisión

Las células NK contenidas en los pozos de placas de 24, fueron divididos en dos, de manera que la mitad de las células fueron analizadas por citometría de flujo y el resto fueron cosechadas mediante centrifugación y procesadas para microscopía electrónica de transmisión (Edwards A. *et al.*, 1999). Brevemente, las células fueron fijadas con glutaraldehído al 2 % en buffer cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4 y luego postfijadas con OsO₄, deshidratadas y embebidas en Epon (Poliscience, USA). Estos cortes fueron teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo y observados en un microscopio electrónico

Phillips Tecnai 12 en el Servicio de Microscopía Electrónica, Pontificia Universidad Católica de Chile.

1.2.4. Medición de secreción de IFN γ

Se tomó muestras de aproximadamente 200 μ l de sobrenadante de medio de cultivo al momento de sembrar y a los días 4, 7 y 10 del cultivo de células NK, se guardó congelado a -80°C hasta su uso. La concentración de IFN γ se midió directamente en los sobrenadantes mediante un ELISA de captura comercial, según las instrucciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron en triplicado y con una curva estándar en un rango de 0-3000 pg/ml de IFN γ . La lectura de la reacción se realizó a 450 nm.

2. EFECTO DE CCH SOBRE CELULAS NK CULTIVADAS *IN VITRO*.

2.1. Efectos sobre proliferación

La proliferación de células NK se midió por el método de CFSE (Bisikirska *et al.*, 2005). Brevemente las células NK, aproximadamente 20×10^6 células, se resuspendieron en 1 ml de medio D-MEM y se agregó 2.5 μM de CFSE disuelto en DMSO, se incubó por 10 min. a 37°C y luego se lavó dos veces con 1 ml de medio D-MEM completo y se cultivó de la forma antes señalada.

El análisis se realizó por citometría de flujo mediante gráficos del tipo histograma, donde la proliferación se observa como la aparición de nuevos picos con menor intensidad en la fluorescencia del CFSE (verde).

2.1. Incorporación de CCH-AlexaFluor488 por células NK mediante microscopia confocal

Los cultivos de células NK que fueron tratados con CCH-AlexaFluor488 y sus respectivos controles fueron centrifugados a 6.000 rpm por 3 min. y luego se resuspendieron en un mínimo de volúmen de PBS-Paraformaldehído. Posteriormente, se traspasaron a portaobjetos que contenían una gota de DABCO en una relación 1:1, se cubrieron con un cubreobjeto y se observaron al microscopio confocal Zeiss. El registro fotográfico se realizó en un sistema digital.

3. EFECTO DE CCH SOBRE CELULAS NK *IN VIVO*

3.1. Administración de CCH, PBS y OVO en animales de experimentación

Se constituyeron grupos de 2 ratones de las cepas Balb/c, C57BL/6 y C3H/He y posteriormente se les administró el antígeno (CCH, PBS u OVO) por vía endovenosa (endv) o vía intraperitoneal (ip).

i) *Vía endovenosa:* Los animales fueron anestesiados con 50 μ l de Equitesian inyectado ip, y luego se agregó el antígeno de interés con una jeringa de tuberculina. Se trabajó bajo una luz de 100 watts para dilatar los vasos sanguíneos, inyectando directamente a cualquiera de las cuatro venas de la cola.

ii) *Vía intraperitoneal:* Los animales sin anestesiarse, se inyectaron con el antígeno en el cuadrante inferior de la cavidad abdominal.

3.2. Extracción de células peritoneales

Para extraer las células peritoneales de los animales de experimentación, se inyectaron intraperitonealmente 3-4ml de PBS estéril, se masajeó el abdomen, luego se sacrificó el animal mediante dislocación cervical y se extrajo el exudado peritoneal, evitando la hemólisis. Luego se centrifugó a 1.800 rpm por 20 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de solución de lisis de glóbulos rojos y se dejó actuar por 2 min., posteriormente se agregó 10 ml de medio D-MEM y se volvió a centrifugar a 1.800 rpm por 20 min. Finalmente las células fueron marcadas para citometría siguiendo el protocolo antes mencionado (punto 1.2.2).

3.3 Determinación de la incorporación de CCH-AlexaFluor488 por células peritoneales *in vivo* mediante citometría de flujo y microscopia confocal

Para determinar la incorporación de la proteína marcada con AlexaFluor 488 por parte de las células peritoneales *in vivo*, una vez extraídas y marcadas con CD49b y NK1.1, se centrifugaron a 6.000 rpm por 3 min. y se resuspendieron en 300 μ l de PBS-Paraformaldehído, luego se traspasaron 270 μ l a tubos de citometría para ser observadas en

el citómetro. Los 30 µl restantes se mezclaron 1:1 con DABCO y se traspasaron a portaobjetos para ser observadas en un microscopio confocal Zeiss.

4. DETERMINACION DEL EFECTO DE HEMOCIANINAS SOBRE LA CITOTOXICIDAD DE CELULAS NK.

La actividad de células NK se midió por medio del ensayo de liberación de ^{51}Cr , como está descrito por Puente *et al.*, 1996. Las células YAC-1, blanco de células NK, debido a que son deficientes en MHCI, fueron cultivadas en DMEM completo a 37°C en una atmósfera 10% CO_2 . Las células YAC-1 fueron marcadas incubando 3×10^6 células /ml con 100 µCi de $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}$ por 1,5 hr. a 37°C, luego fueron lavadas dos veces con medio D-MEM y se resuspendieron en medio D-MEM completo. Como células efectoras, se usó células mononucleares esplénicas obtenidas de los animales de experimentación, purificadas por Ficoll-Hypaque (Sigma) y resuspendidas (10^7 células /ml) en medio completo o células NK cultivadas *in vitro*. Luego, 100 µl de medio que contenía 5×10^5 células YAC-1 fueron mezclados con 100 µl de células efectoras diluidas de acuerdo a la relación célula efector : célula blanco deseada, en caso de experimentos *in vivo* (25:1, 50:1, 100:1, 200:1) y en experimentos *in vitro* (100:1, 1000:1, 10000:1). Las placas de fondo curvo conteniendo las células fueron incubadas por 4 hr. a 37°C, 5% CO_2 y 100% humedad, se centrifugaron y 100 µl de cada sobrenadante fue recolectado y medido en un contador de radiación γ . Como control positivo se tomó las células mononucleares obtenidas de ratones tratados 48 y 24 hr antes con 100 µg de Poli I:C. Todos los ensayos se realizan por triplicado y el valor de lisis específica fue calculado de acuerdo a la fórmula: % Actividad NK = 100 (Lisis Experimental – Lisis espontánea) / (Lisis Total – Lisis espontánea). Para los controles, las células blanco fueron incubadas con medio D-MEM completo (Lisis espontánea) o con detergente (Tritón 1%) (Lisis Total).

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

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

A_0 = radioactividad el día de la calibración

λ = $\ln 2$ /tiempo de vida media

t = días que han pasado con respecto a la calibración

5. MARCACION DE PROTEINAS CON ALEXAFLUOR488

Se utilizó el procedimiento descrito por el fabricante. Brevemente, se tomó 1 ml de CCH o BSA y se agregó 100 µl de Bicarbonato. Paralelamente se disolvió un vial del fluoróforo en Dimetilformamida y se dejó agitando por 1 hr. Se neutralizó por 30 min. con 100 µl de Hidroxilamina y se dializó para eliminar el exceso de Alexa y mantener la proteína libre de endotoxina. Se usó un equipo Amicon Ultra Free para eliminar agregados y esterilizar la preparación.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DE UN CULTIVO *IN VITRO* DE CELULAS NK

1.1 Morfología

Dado la escasa información sobre las características morfofuncionales de las células NK cultivadas *in vitro*, en primer lugar se hizo una caracterización del cultivo, entre los días 0 (momento del aislamiento) y 13. Como se observa en la **Figura 3 A**, mediante microscopía de luz (A-E) y electrónica (F-J), entre el día 1 y 4 predomina la muerte celular, principalmente de células que no corresponden al fenotipo NK (CD49b+, NK1.1+). Sin embargo, en el transcurso entre los 4 y 7 días, se evidencia un notable incremento de la proliferación con un concomitante aumento en el número de células y modificaciones del fenotipo celular. Las células que originalmente eran redondas se transforman en alargadas (A-C y F-H, respectivamente). Por otro lado, entre los 7 y 10 días las células empiezan a madurar, predominando las células de gran tamaño (flechas en D) y las que denominamos maduras, con un mayor % de células que expresan ambos marcadores, como se describe a continuación. Luego, entre los días 10 y 13 el cultivo empieza a envejecer lo que se evidencia en la aparición de numerosas células de aspecto apoptótico, por el estado de su cromatina (J).

1.2. Funcionalidad sobre la base de la expresión de marcadores de células NK y secreción de IFN γ

Además de la caracterización morfológica se realizó una caracterización funcional del cultivo de células NK, la cual consistió en la medición de la expresión de los marcadores de superficie CD49b y NK1.1. En la **Figura 3B** se muestra que entre los días 1 y 4 la expresión de ambos marcadores se mantienen constante, sin embargo, a partir del día 4 hasta el 7, se produce un notable incremento en el porcentaje de células que expresan ambos marcadores y luego su expresión se mantiene constante hasta los 13 días que duró la observación. Por otro lado, se midió IFN γ , expresado en pg/ml, en el sobrenadante de los cultivos en diferentes días, por ELISA. Se encontró que entre el día 1 y 4, hay un aumento progresivo de la secreción de IFN γ , sin embargo, entre el día 4 y 7, el nivel tiende a mantenerse relativamente constante, para luego volver a subir hasta el día 13, que es cuando el cultivo alcanza su estado de mayor madurez (**Figura 3 C**).

Caracterización de un cultivo *in vitro* de células NK murinas

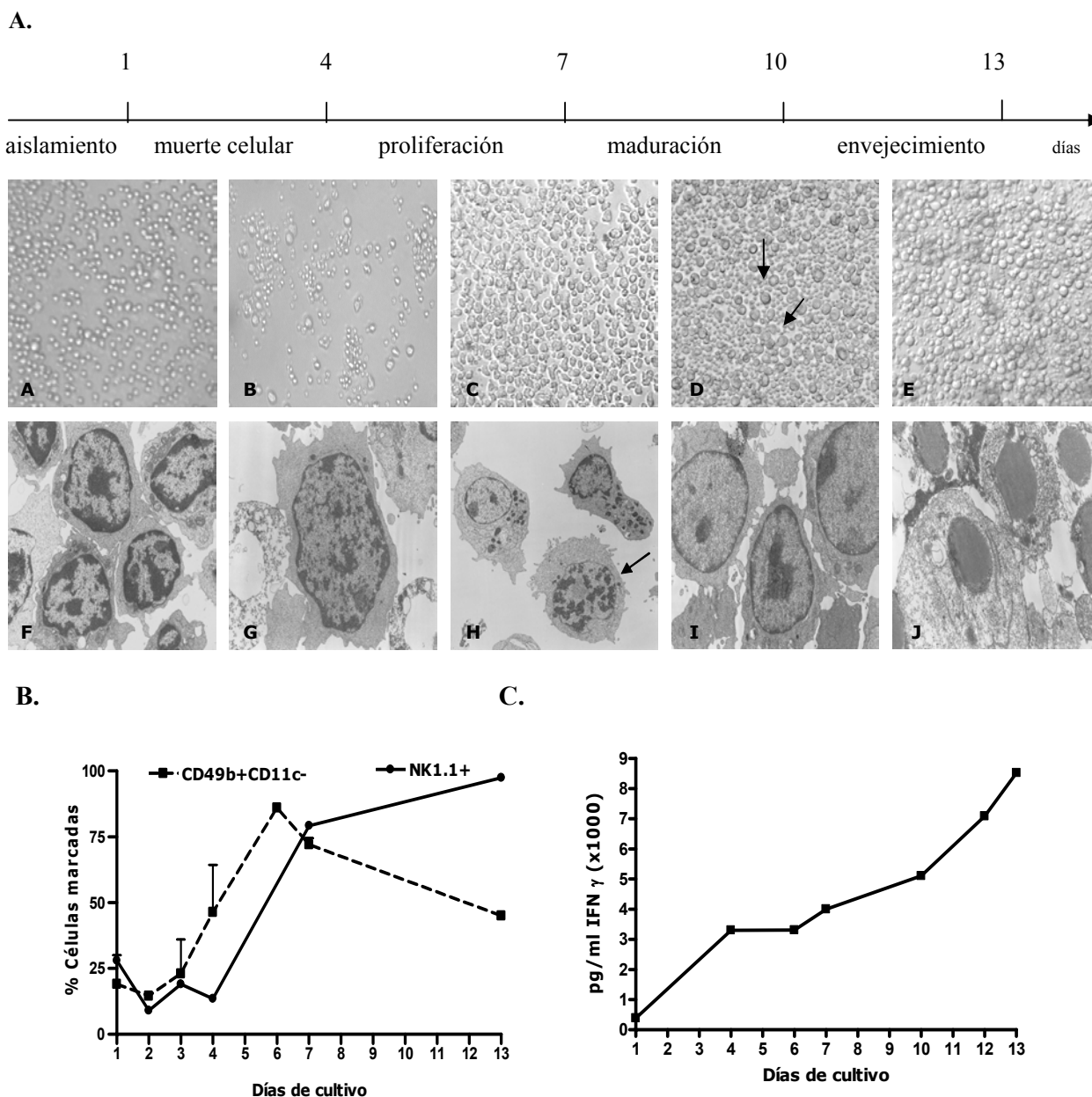


Figura 3. Establecimiento de las propiedades generales de un cultivo *in vitro* de células NK. **A.** Caracterización morfológica al microscopio de luz (A-E) y al microscopio electrónico (F-J) de las principales etapas, esquematizadas en el cronograma, del cultivo *in vitro* de células NK, obtenidas de bazo de ratones C57BL/6. Aumento de A-E de 20x; F-J DE 4.800x. **B.** Expresión de marcadores característicos de células NK de ratón C57BL/6. En la ordenada se grafica el porcentaje de células marcadas con anti-CD49b+CD11c- y NK1.1+ determinadas mediante citometría de flujo. En la abcisa se grafica los días transcurridos del cultivo. Los datos representan el promedio de tres experimentos independientes y las barras el error estándar. **C.** Secreción de IFN γ del cultivo *in vitro* de células NK. En la ordenada se grafica la concentración de IFN γ determinada mediante ELISA y en la abcisa, los días de cultivo. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independiente.

2. EFECTO DE CCH SOBRE CELULAS NK CULTIVADAS *IN VITRO*

2.1. Efecto de CCH a nivel de la morfología de células NK

De acuerdo a los resultados anteriores, decidimos trabajar con los cultivos de células NK de 4 y 7 días, ya que a los 4 días, los marcadores y la secreción de IFN γ están en ascenso y a los 7 días ambos parámetros tienden a mantenerse constantes. Con este propósito se agregó 100 $\mu\text{g/ml}$ de CCH y se dejó actuar por 3 hr., 3 y 6 días, luego de lo cual, las células fueron fotografiadas directamente de las placas de cultivo en un microscopio de contraste de fase. En la **Figura 4** se presentan los resultados y se observa que a las 3 hr. y 3 días de estimulación en los cultivos de 4 días de edad, prácticamente no se ve un efecto significativo en comparación con los controles, sin embargo, cuando se estimulan por 6 días se observa un predominio de la población más madura (más grandes y redondas) por efecto de CCH, aunque los controles también presentan este tipo celular, pero en menor proporción.

El mismo tratamiento se hizo a las células NK cultivadas *in vitro* de 7 días, sin embargo no se observó un efecto, ya que en todos los tiempos las células tratadas con CCH y los controles presentaron una apariencia similar (**Figura 4 B**). Esto podría deberse a que el cultivo ya ha alcanzado el estado máximo de maduración, por lo que no responde a este tipo de estímulo.

De modo de corroborar los resultados anteriormente observados por microscopía de luz, las mismas muestras fueron analizadas por MET. En la **Figura 5** se presentan los resultados a diferentes días de cultivo con los diferentes tiempos de estimulación. Se observó que las células NK estimuladas por 3 días tanto a los 4 como a los 7 días de cultivo, muestran diferencias morfológicas con las células controles, caracterizada por un aumento de los gránulos electrón-denso que corresponderían a gránulos citotóxicos, indicados con flechas en la **figura C e I**.

En células NK de 4 días que fueron estimuladas durante 3 días con CCH se observó vacuolas de contenido claro con moléculas aparentemente intactas de CCH, evidenciando que dichas células estarían incorporando esta proteína (**Figura 6**).

Efecto de CCH sobre células NK murinas cultivadas *in vitro*

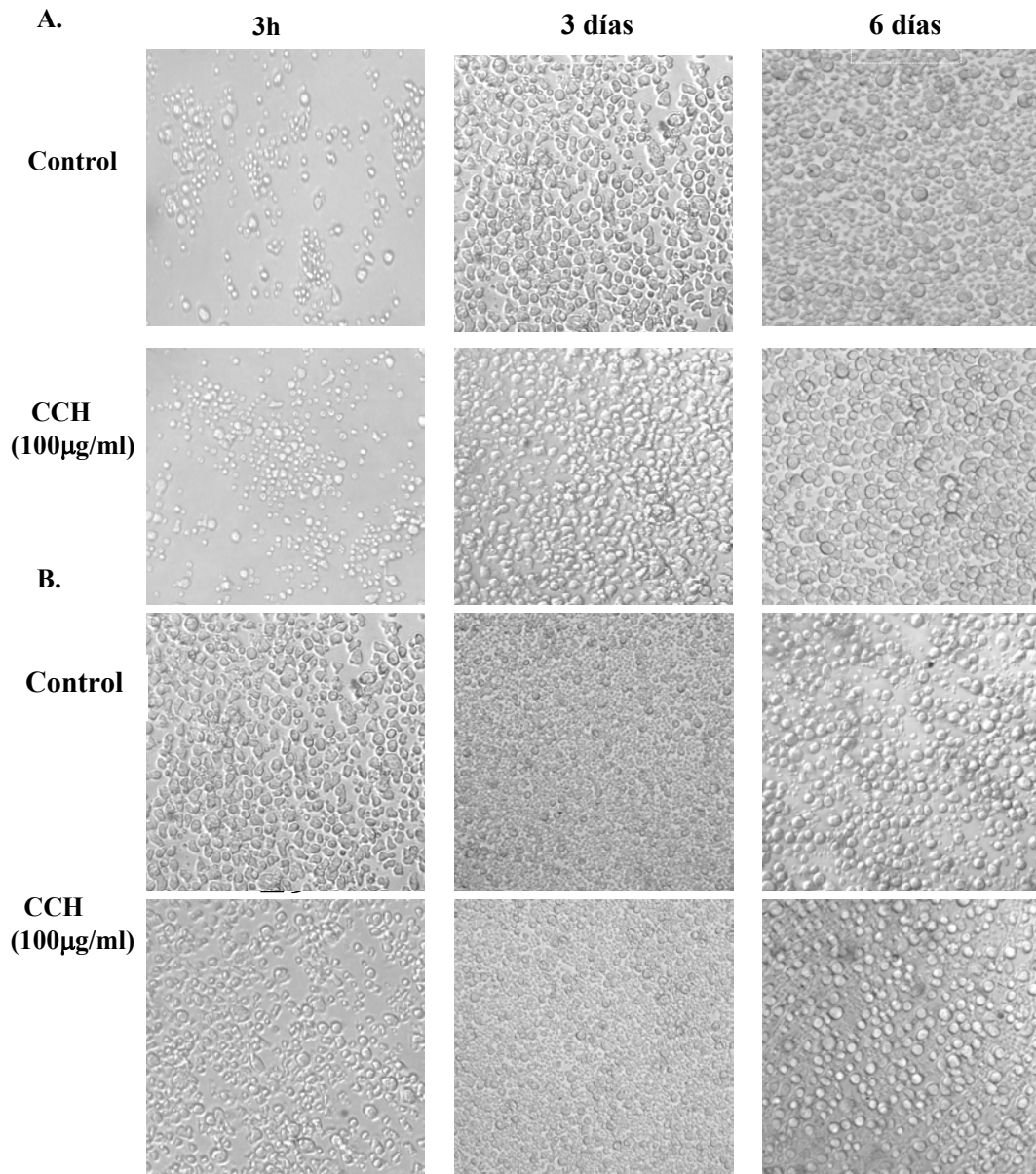


Figura 4. Microscopía de luz de células NK tratadas con CCH durante diferentes tiempos. Las fotografías fueron tomadas directamente de los microcultivos. **A.** Células NK de 4 días estimuladas con 100 µg/ml de CCH durante 3 horas, 3 y 6 días. **B.** Células NK de 7 días, estimuladas de igual manera que A. Aumento de 20x.

**Microscopía electrónica de transmisión de células NK cultivadas *in vitro*
en presencia de CCH**

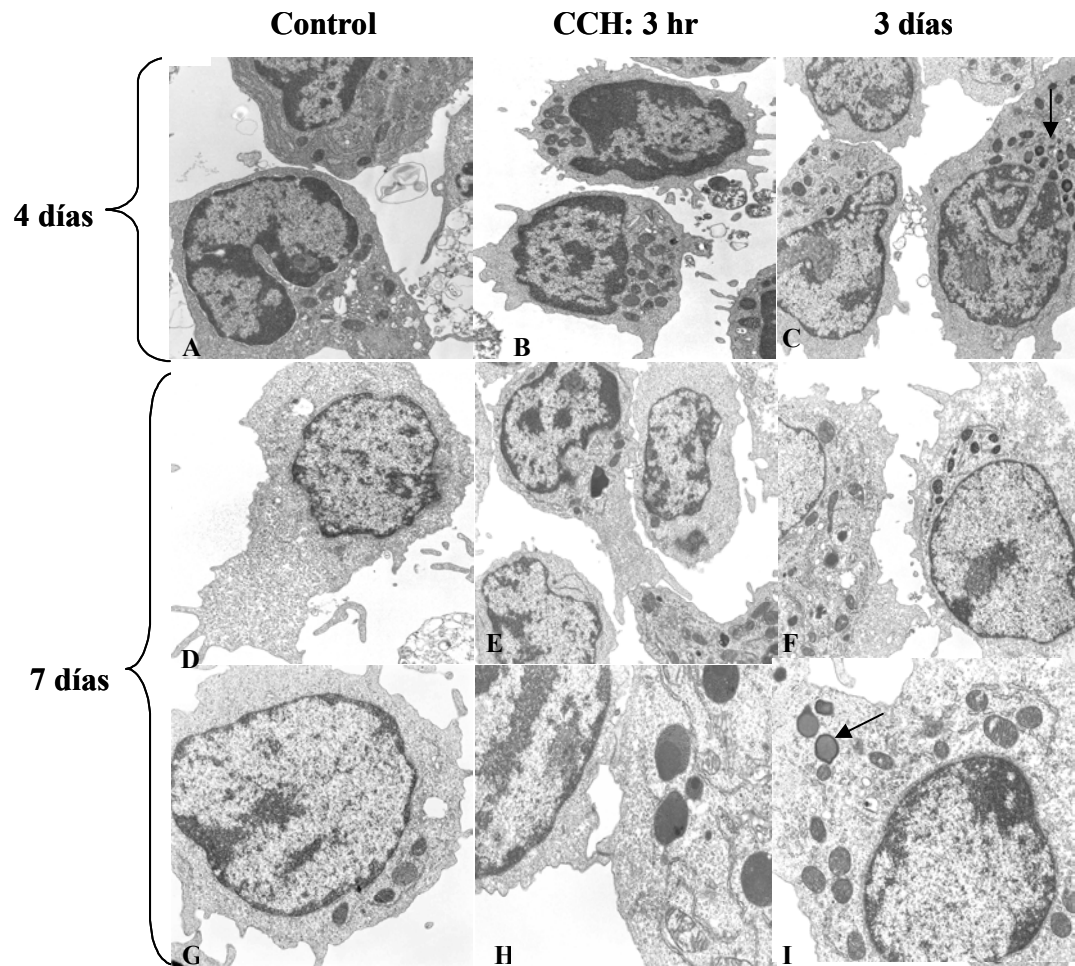


Figura 5. Aspecto y forma de las células NK de ratón C57BL76 cultivadas *in vitro* en presencia de CCH. Al momento del tratamiento las células tenían 4 y 7 días de cultivo y fueron estimuladas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de CCH durante 3 hr. y 3 días. Las fotografías fueron tomadas con un aumento de 4.800x (A-F) y 9.300x (G-H).

**Microscopía electrónica de transmisión de células NK cultivadas *in vitro*
mostrando la presencia de CCH**

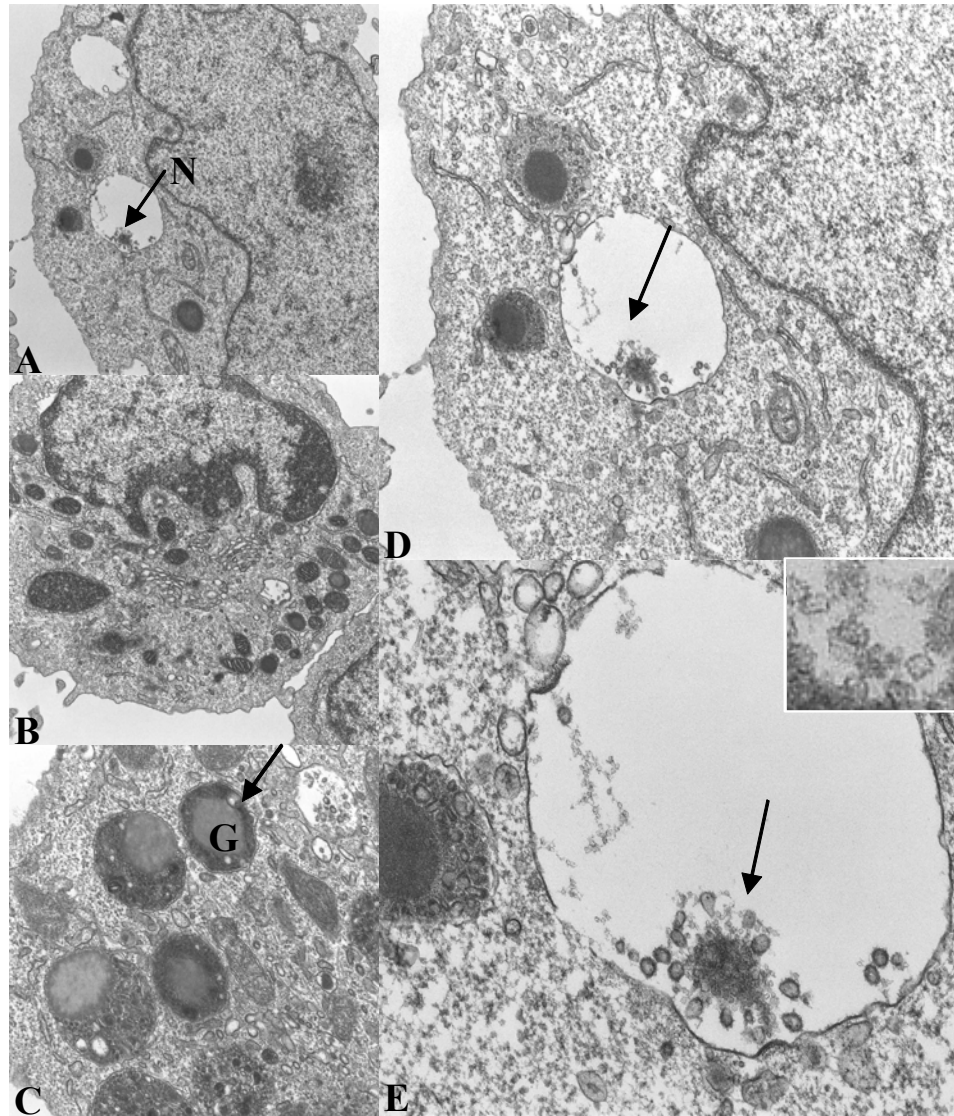


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión de células NK de ratón C57BL/6 cultivadas *in vitro* durante 4 días y estimuladas con 100 $\mu\text{g/ml}$ de CCH durante 3 días. A, D y E corresponden a la misma fotografía con diferentes aumentos. La flecha en E indica una vacuola conteniendo estructuras que semejan moléculas de hemocianina, que se observan con mayor nitidez en el inserto, arriba a la derecha. Aumento: A = 6.800x, B = 9.300x, C = 18.500x, D = 11.000x y E = 30.000x. La flecha en C indica los gránulos electrón-densos (G).

2.2. Efecto de CCH sobre marcadores de superficie y secreción de IFN γ

Con el propósito de evaluar si CCH inhibía o estimulaba la expresión de algunos marcadores de superficie característicos de las células NK se realizaron estudios con diferentes dosis de CCH (10 y 100 $\mu\text{g/ml}$) y mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células NK que expresaban CD49b y NK1.1. en diferentes momentos del cultivo (3, 4, 7, 8 y 12 días) En la **Figura 7 A** se graficó la intensidad de células marcadas v/s la forma (grupo celular que es positivo para el marcador observado y presenta la forma y tamaño del grupo celular a observar). Se observa que el porcentaje de células que expresan CD49b no se ve afectado por CCH en ninguna de las dos dosis utilizadas y lo mismo ocurre para la intensidad de expresión, comportamiento que no varió con la edad del cultivo. En el caso del marcador NK1.1, se observó que al agregar 10 $\mu\text{g/ml}$ de CCH a los 7 días, hay una disminución del porcentaje de células NK que expresan tal marcador con respecto al control sin CCH, pero no así en el resto de los días y con la otra dosis. Además, no se observó efecto sobre la intensidad de expresión de NK1.1, por lo que el efecto neto de CCH sobre la expresión e intensidad de ambos marcadores parece ser nula (**Figura 7 B**).

Con el objetivo de ver si CCH afectaba la capacidad humoral de las células NK, se midió la secreción de IFN γ a los 2, 4 y 7 días de cultivo con dosis de 50 y 150 $\mu\text{g/ml}$ de CCH u OVO-LPS, incorporada como una proteína control no relacionada con LPS, que se sabe induce la generación de ésta citoquina en numerosas células linfoides que expresan TLR4 (Akira *et al.*, 2001²⁵). En la **Figura 7 C**, se puede observar que a los 2 y 4 días de cultivo no hay respuesta alguna frente a dichas proteínas, sin embargo a los 7 días, las células NK muestran un aumento en la secreción de esta citoquina, tanto en los controles como en los diferentes tratamientos.

Expresión de marcadores característicos de células NK en cultivo *in vitro*

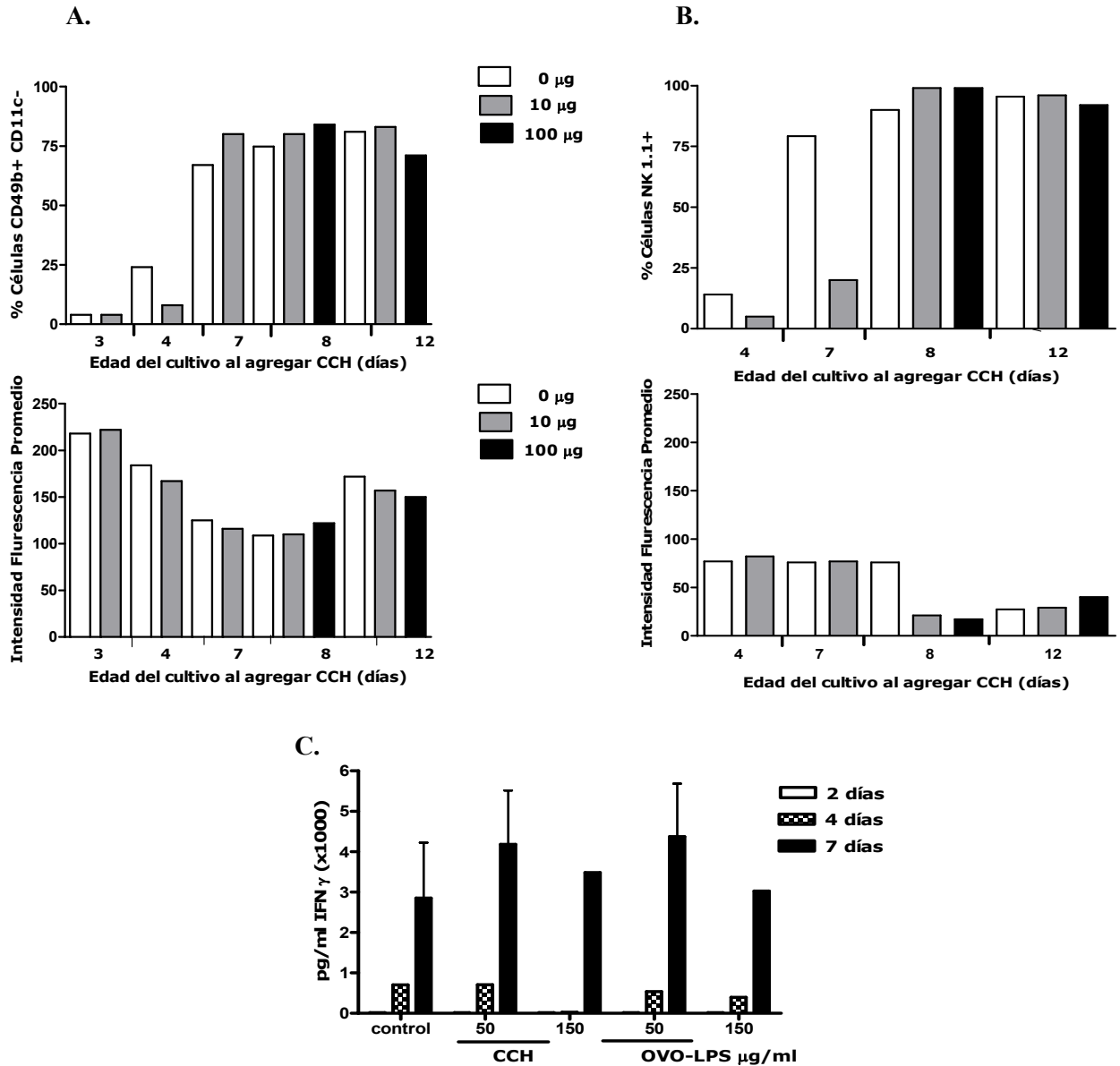


Figura 7. Expresión de marcadores característicos de células NK de ratón C57BL/6 *in vitro*. **A.** Se grafica el porcentaje e intensidad de la expresión del marcador de superficie CD49b+, donde el eje x corresponde a los días transcurridos de cultivo y el eje y al porcentaje e intensidad respectivamente. **B.** Porcentaje e intensidad de la expresión del marcador NK1.1. **C.** Secreción de IFN γ de células NK cultivadas *in vitro* estimuladas durante 2, 4 y 7 días con 50 y 100 µg/ml de CCH y OVO-LPS como control. Los datos corresponden a un experimento y los datos de IFN γ corresponden a 3 experimentos independientes, excepto el de OVO-LPS con 150µg/ml que un experimento de tres experimentos independientes.

3. INCORPORACIÓN DE CCH POR CELULAS NK *IN VITRO*

3.1. Evaluación utilizando CCH marcada con un fluoróforo

Para corroborar la incorporación de CCH, observada mediante MET (punto 2.1 de resultados) en las células NK, se utilizó CCH-AlexaFluor488, que al estar asociada a un fluoróforo se puede observar mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Previamente se determinó la incorporación de AlexaFluor488 a CCH mediante electroforesis (datos no mostrados).

Cuando se agregó 100 µg/ml de CCH a los cultivos de NK de 4 días y se dejó estimular durante 24 horas, se observó que un pequeño porcentaje de las células NK CD49b+ NK1.1+ (1,6%) incorporaron CCH-AlexaFluor488 (cuadrante derecho). Como control, en este caso, se utilizó cultivos similares de células NK, pero tratados con CCH sin marcar, ya que CCH *per se* aumenta la autofluorescencia de las células, de modo que determinamos los ejes de autofluorescencia basal en estas condiciones. La incorporación de CCH-AlexaFluor488 se observa en el cuadrante superior derecho de las figuras (**Figura 8 A**). Al estimular los cultivos de células NK de 7 días, en las mismas condiciones que a los 4 días, se observa claramente una subpoblación de células NK que sí incorporan CCH-AlexaFluor488 (3,6%) resultado significativo con respecto a la de los 4 días, ya que la intensidad es mayor (**Figura 8 B**).

Para corroborar los resultados anteriores y confirmar que la subpoblación de células NK observadas por MET que contenían vesículas con moléculas de CCH (células NK de 4 días, que fueron estimuladas durante 3 días con 100 µg/ml de CCH, (véase en punto 2.1 resultados), estarían incorporando CCH, las mismas muestras se observaron por microscopía confocal, donde se usó como control negativo CCH sin marcar.

Los resultados se muestran en la **Figura 9**, donde **A** corresponde a células NK tratadas con CCH sin marcar y **B** a las tratadas con CCH-AlexaFluor488. Se observa las células NK marcadas con CD49b en rojo, que es positivo en ambos casos, ya que es un marcador de superficie específico de células NK; CCH-AlexaFluor488 se observa en verde, es positivo solo en algunas células NK.

Incorporación de CCH en células NK cultivadas *in vitro* mediante citometría de flujo

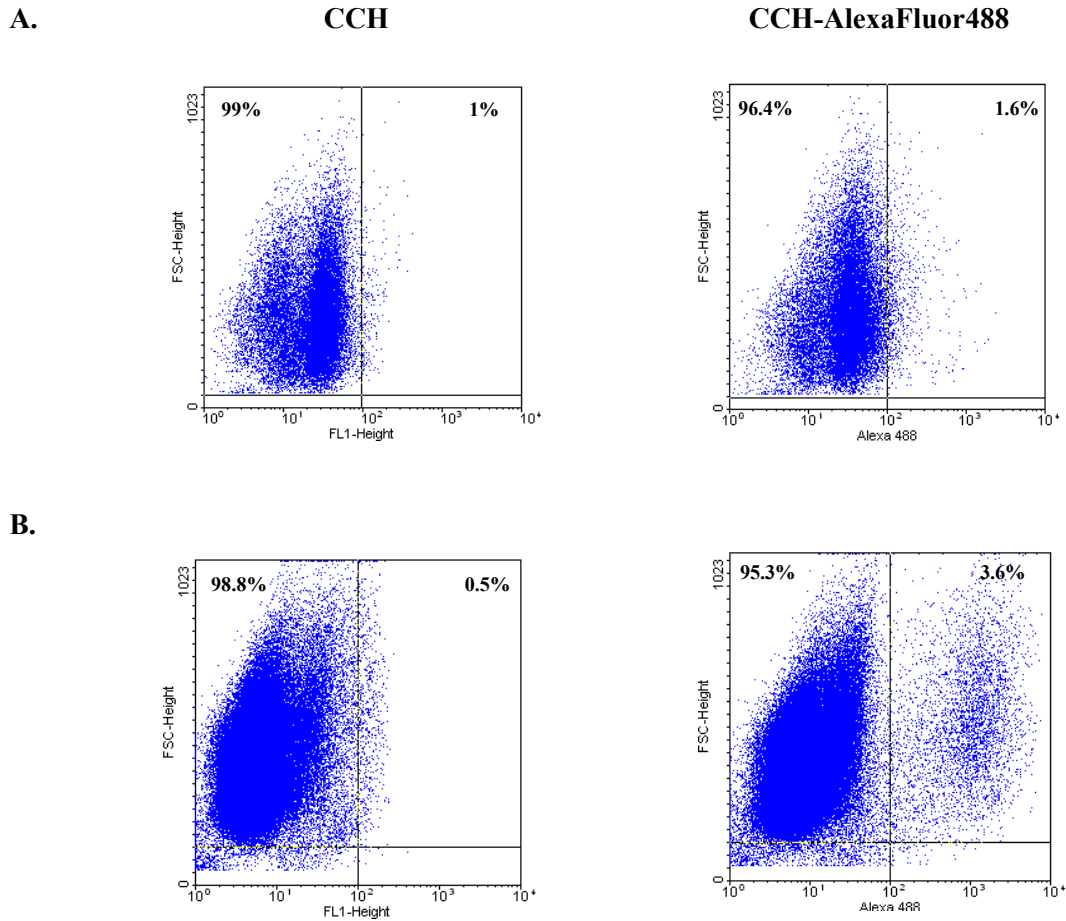


Figura 8. Incorporación de CCH por células NK cultivadas *in vitro*, mediante citometría de flujo. La región analizada corresponde a células CD49b⁺ y NK1.1⁺. **A.** Incorporación de CCH por células NK de 4 días, estimuladas durante 24 hr con 100 μ g/ml de CCH y CCH-AlexaFluor488. **B.** Incorporación de CCH por células NK de 7 días estimuladas durante 24 hr., de manera similar a la anterior.

Incorporación de CCH en células NK cultivadas *in vitro*, analizado mediante microscopía confocal.

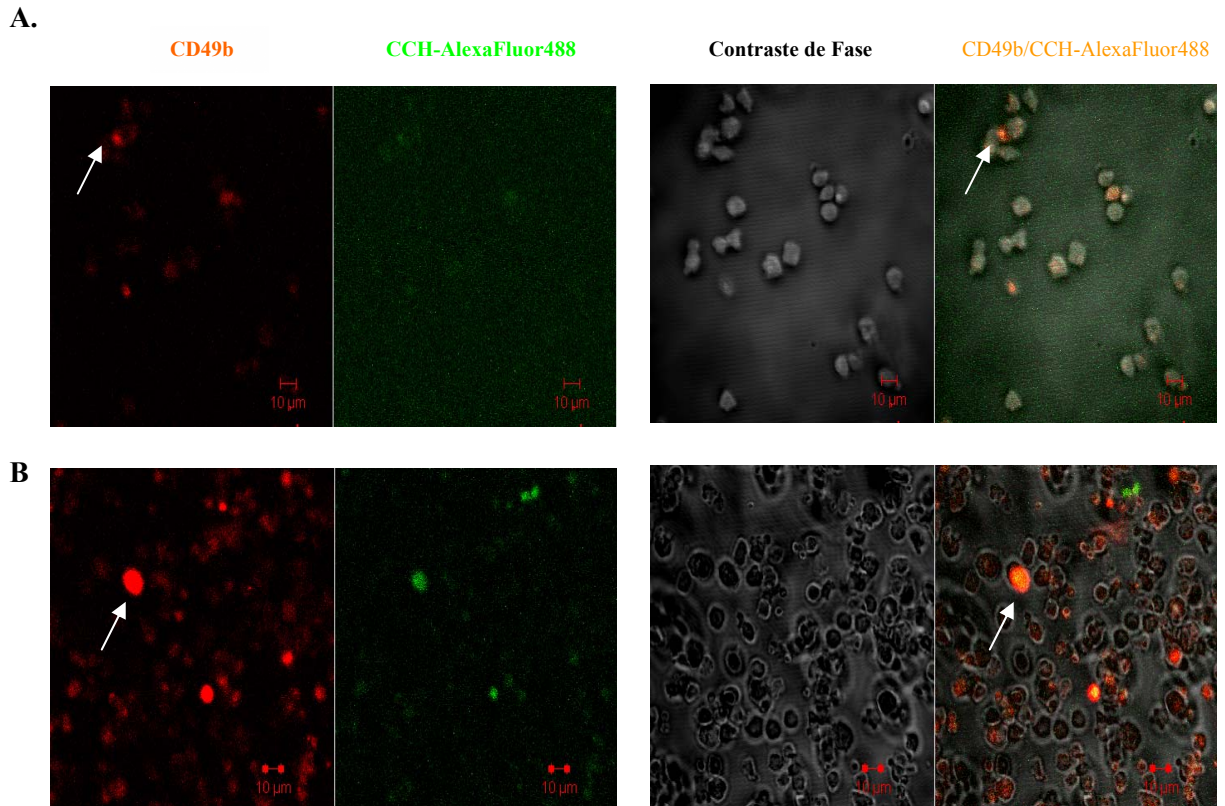


Figura 9. Microscopía confocal de cultivo *in vitro* de células NK de ratón C57BL/6 de 4 días estimuladas durante 3 días con CCH o CCH-AlexaFluor488. Las imágenes muestran las células CD49b+, CCH-AlexaFluor488+, contraste de fase y colocalización de ambos marcadores, respectivamente. **A.** Microscopía confocal de células NK tratadas con CCH. **B.** Microscopía confocal de células NK tratadas con CCH-AlexaFluor488.

En la **Figura 9 B** se observa que las células NK estarían incorporando CCH-AlexaFluor488, ya que da positivo al excitar en la longitud de onda de Alexa-Fluor488 y además al colocarlo con el marcador de células NK da positivo. Estos resultados correlacionan los datos obtenidos por citometría de flujo, ya que muestran que aproximadamente un 4% de las células NK (CD49b+, CD11c-, NK1.1+) incorporan CCH.

3.2. Efecto de CCH sobre citotoxicidad de células NK *in vitro*

Finalmente, para estudiar el efecto de CCH sobre la capacidad citotóxica de células NK *in vitro*, se realizó el ensayo de liberación de Cr⁵¹ a los 2 días de cultivo, realizando la estimulación de dos maneras: en forma continua y como un pulso de 12 hr. La estimulación continua se realizó agregando dos dosis diferentes de CCH (50 y 250 µg/ml) y OVO-LPS al momento de sembrar las células (**Figura 10 A**). La estimulación por pulso se realizó de la misma forma pero agregando CCH u OVO-LPS durante 12 hr. al cultivo (**Figura 10 B**). Los datos medidos bajo las condiciones mencionadas no muestran un efecto positivo sobre la citotoxicidad de células NK. Para corroborar que la ausencia de respuesta no se debía a la edad del cultivo, probamos a los 6 días de cultivo con estimulación continua (datos no se muestran) y tampoco se observó un aumento en la capacidad citotóxica de las células NK sobre las células YAC-1 por efecto de CCH.

Actividad citotóxica de células NK cultivadas *in vitro*

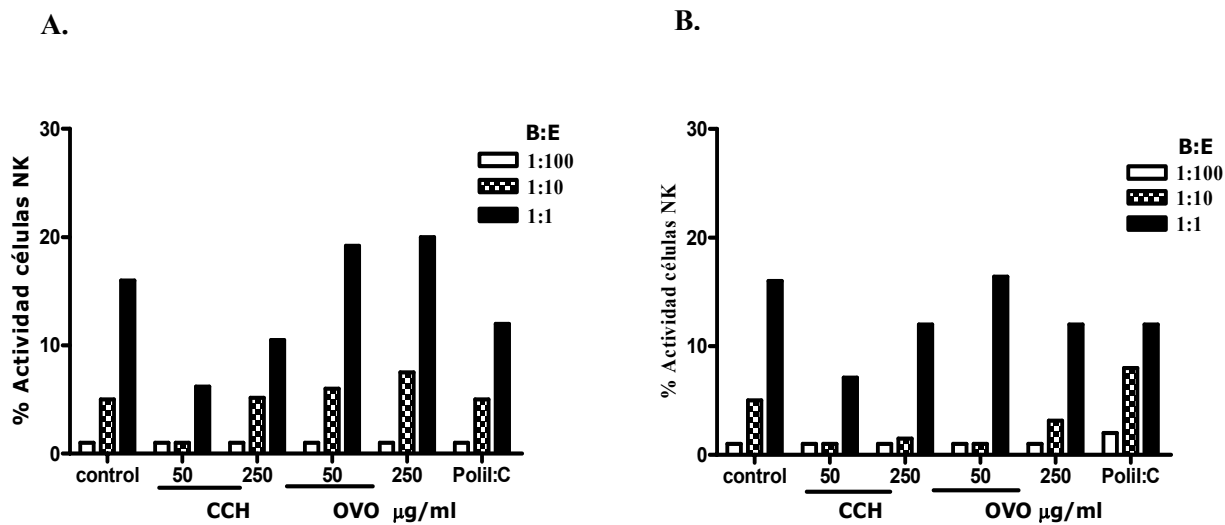


Figura 10. Actividad citotóxica de células NK de 2 días cultivadas *in vitro* sobre células YAC-1 cargadas con CR⁵¹. **A.** Células NK *in vitro* de 2 días estimuladas con un pulso de 12 hr. con 50 y 250 µg/ml de CCH y OVO-LPS. En la abcisa se grafica el porcentaje de actividad de células NK y en las ordenada se grafica el control y las diferentes dosis de CCH y OVO-LPS. **B.** Células NK de 2 días estimuladas de forma continua, en las mismas condiciones que en A. En los gráficos se señala la relación células blanco (B, células YAC-1) v/s células efectoras (E, células esplénicas).

4. INCORPORACIÓN DE CCH POR CELULAS NK *IN VIVO*

4.1. Análisis de diferentes poblaciones linfoides mediante citometría de flujo y microscopía confocal

Paralelamente a los estudios *in vitro*, se realizaron estudios *in vivo*, en los cuales ratones C57BL/6 y Balb/C fueron inyectados con CCH y CCH-AlexaFluor488 para evidenciar la incorporación de CCH mediante citometría de flujo por parte de diferentes poblaciones linfoides. Se estudiaron células extraídas de bazo y de peritoneo.

En la **Figura 11** se muestran las citometrías de flujo correspondiente a células extraídas de bazo de animales inyectados intraperitonealmente con 500 µg /animal de CCH o CCH-AlexaFluor488 durante 24 hr. En la **Figura 11 A** se presenta el grupo de células CD49b+ correspondiente al fenotipo NK, **Figura 11 B** células CD14+, correspondiente a macrófagos, **Figura 11 C** células CD3+ que son linfocitos T, **Figura 11 D** células CD11c+ que corresponden a células dendríticas y en la **Figura 11 E** se muestra las células CD19+ correspondiente a linfocitos B. Las células del cuadrante izquierdo corresponde a las células positivas para los marcadores mencionados anteriormente y el cuadrante derecho muestra las células positivas para el marcador correspondiente y positivas para CCH-AlexaFluor488, es decir que estarían incorporando CCH. En la **Figura 11** no se ve que ningún grupo celular que esté incorporando CCH, comparado con su control (CCH sin marcar).

Debido a estos resultados es que nos preguntamos qué grupo celular estaría incorporando la CCH marcada, ya que cuando se inyectaron los animales intraperitonealmente las células del bazo no incorporan CCH, de la misma forma inyectamos a los animales endovenosamente y observamos las células esplénicas y las peritoneales y ningún grupo celular tenía incorporado CCH, por esta razón, finalmente inyectamos CCH intraperitonealmente y observamos las células peritoneales.

Incorporación *in vivo* de CCH por diferentes poblaciones linfoides extraídas de bazo

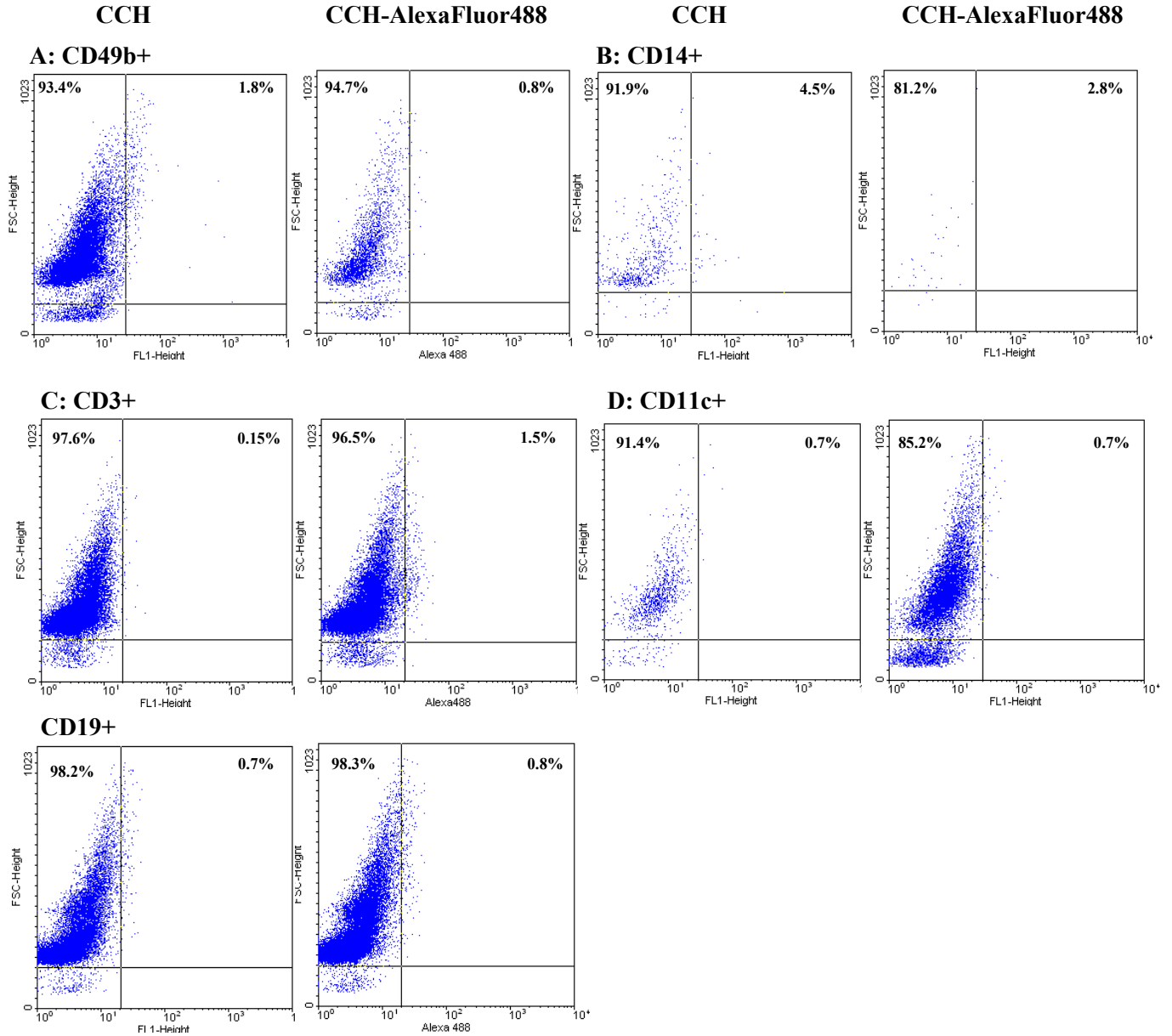


Figura 11. Citometría de flujo expresada en gráficos del tipo *dot -plot*, de células extraídas de bazo de ratones C57BL/6 inyectados intraperitonealmente durante 24 horas con 500 μg / animal de CCH o CCH-AlexaFluor488. En el cuadrante superior derecho se expresa el porcentaje de células positivas para CCH-AlexaFluor488, por ende, las células que incorporan CCH. **A.** Población CD49b+, correspondiente a células NK. **B.** población CD14+, correspondiente a macrófagos. **C.** población CD3+, correspondiente a linfocitos T. **D.** población CD11c+, correspondiente a células dendríticas. **E.** población CD19+, correspondiente a linfocitos B.

En la **Figura 12** se muestra la citometría de flujo correspondiente a las células peritoneales extraídas de animales inyectados intraperitonealmente con 500 µg /animal durante 48 hr. donde **A** corresponde a células CD49b+ (NK), **B** corresponde a células CD14+ (macrófagos), **C** corresponde a células CD11c+ (células dendríticas), **D** corresponde a células CD19+ (linfocitos B) y **E** corresponde a células CD49B+ NK1.1+ (aisladas mediante kit para NK).

En estos resultados se ve que todos los grupos celulares incorporaron CCH, lo que nos llevó a concluir la importancia de la vía de administración del antígeno y la dosis para observar que grupo celular está siendo afectado, como se analizará más adelante en la discusión. Además, para ver la cinética de incorporación, estudiamos las dos vías de administración y las células tanto de bazo como peritoneales a diferentes tiempos (24, 48 y 72 hr.) para todos los grupos celulares antes mencionados. Se observó que el mayor porcentaje de células que incorporan CCH y especialmente en células NK, ocurre a las 48 hr. post-inmunización. Como se resumen en la **Tabla 1**, en que se registró la vía y grupo celular que incorporan CCH a los diferentes tiempos de estimulación.

Para confirmar la incorporación de CCH por parte de células NK peritoneales extraídas de animales inyectados intraperitonealmente, se analizó las mismas muestras por microscopía confocal (**Figura 13**). Se observa en **A** el control inyectados con PBS donde el marcador de células NK CD49b (1) que está conjugado con PE emite en la luz roja, confirmando el fenotipo NK. De manera análoga, la emisión basal para el láser que excita CCH-AlexaFluor488 se ve en luz verde (2). En **B** se observan las células de animales que han sido inyectados con CCH, las cuales muestran un patrón de emisión similar al observado con PBS. En **C** se muestran las células NK de animales inyectados con CCH-AlexaFluor488 y se observa una colocalización de color amarillo dada por el marcador de células NK y CCH-AlexaFluor488 (4), corroborando los datos obtenidos por citometría de flujo. Estos resultados nos llevaron a concluir que las células NK peritoneales extraídas de animales inyectados vía intraperitoneal incorporan CCH, lo que se corresponde con los resultados de células NK cultivadas *in vitro*.

Incorporación de CCH *in vivo* por diferentes poblaciones linfoides extraídas de peritoneo

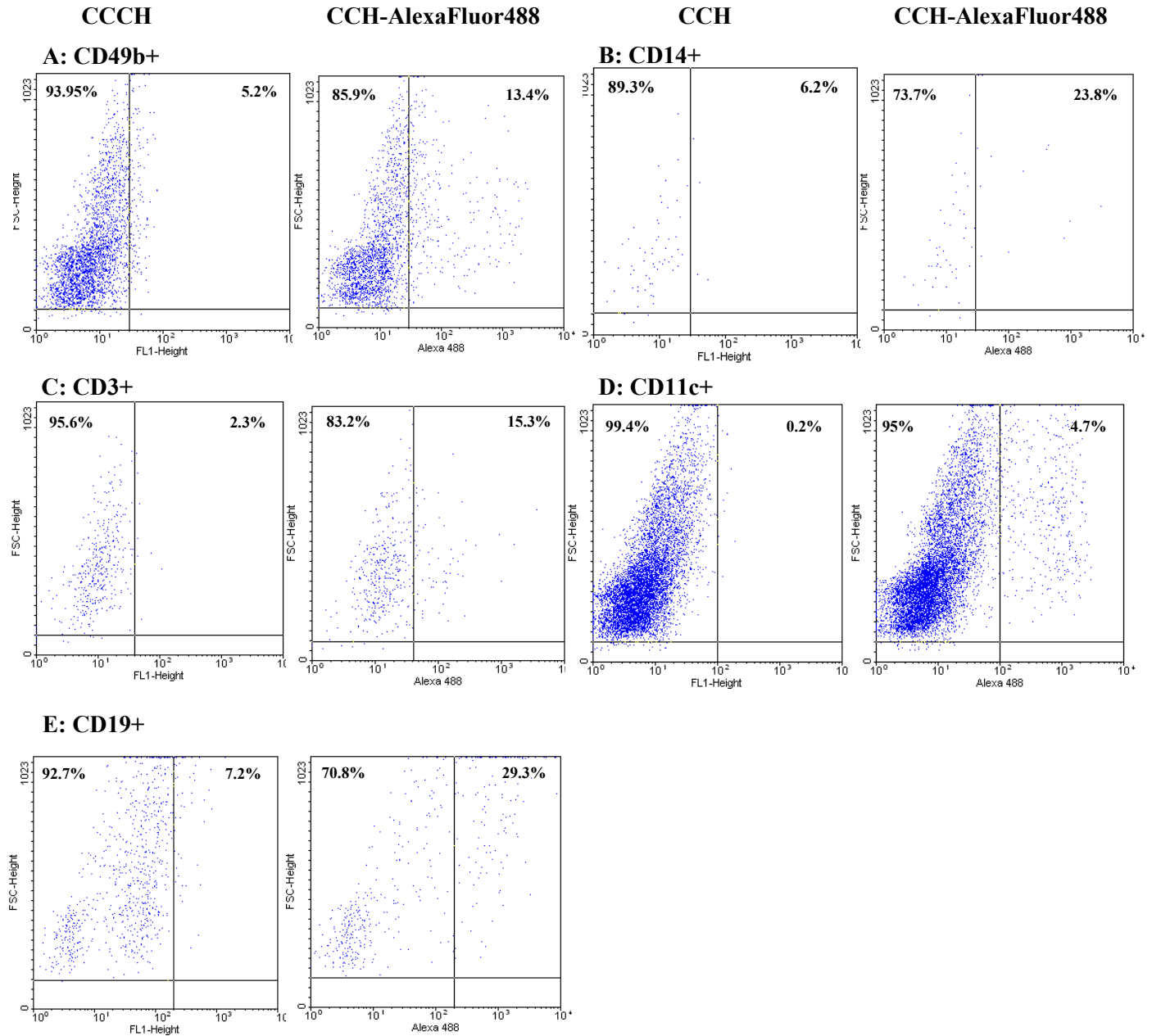


Figura 12. Citometría de flujo expresada en gráficos del tipo dot-plot, correspondiente a células peritoneales de ratones Balb/C inmunizados durante 48 hr. con 500 μ g/animal de CCH o CCH-AlexaFluor488. **A.** población CD49b+ (NK). **B.** población CD14+ (macrófagos). **C.** población CD11c+ (células dendríticas). **D.** población CD19+ (linfocitos B). **E.** población CD49b+ NK1.1+, correspondiente a células NK peritoneales extraídas de ratones C57BL/6 inmunizados durante 24 hr. con CCH o CCH-AlexaFluor488. Esta población de células NK fue aislada mediante kit de aislamiento de células NK, como se describe en Materiales y Métodos en el punto 1.1.2.

Incorporación de CCH *in vivo*, mediante inyección endovenosa o intraperitoneal en las diferentes poblaciones linfoides, tanto esplénicas como peritoneales

Tratamiento	Tipo celular	Observación en el Tiempo(hr)		
		24	48	72
- CCH* ip observación en células bazo	DC	0.32 %	1.3 %	0.08 %
	Macrófagos	0.15 %	0 %	0.2 %
	Linfocitos B	0.06 %	0.24 %	0.04 %
	NK	0.7 %	0.6 %	0.01 %
- CCH* ip observación en células peritoneales	DC	9.4 %	8.9 %	9 %
	Macrófagos	10.37 %	25.2 %	16.3 %
	Linfocitos B	1.94 %	4.8 %	3.3 %
	NK	2 %	7.7 %	3.6 %
- CCH* end. observación en células bazo	DC	1.12 %	0.25 %	0.08 %
	Macrófagos	0 %	0 %	0.14 %
	Linfocitos B	0.06 %	0.26 %	0.01 %
	NK	0.1 %	0.5 %	0.01 %
- CCH* end. observación en células peritoneales	DC	0 %	0.12 %	0.06 %
	Macrófagos	0 %	0.1 %	0.1 %
	Linfocitos B	0.7 %	0.3 %	0.05 %
	NK	0.5 %	0 %	0.6 %

Tabla 1. Resumen de los porcentajes de células que incorporan CCH *in vivo*, cuando se inyecta endovenosa o intraperitonealmente, analizado mediante citometría de flujo con marcadores específicos de diferentes poblaciones linfoides, extraídas tanto de bazo como del peritoneo y a diferentes tiempos post-inyección de los animales de experimentación (24,48 y 72 hr).

**Incorporación de CCH *in vivo* por células peritoneales y analizado mediante
microscopía confocal**

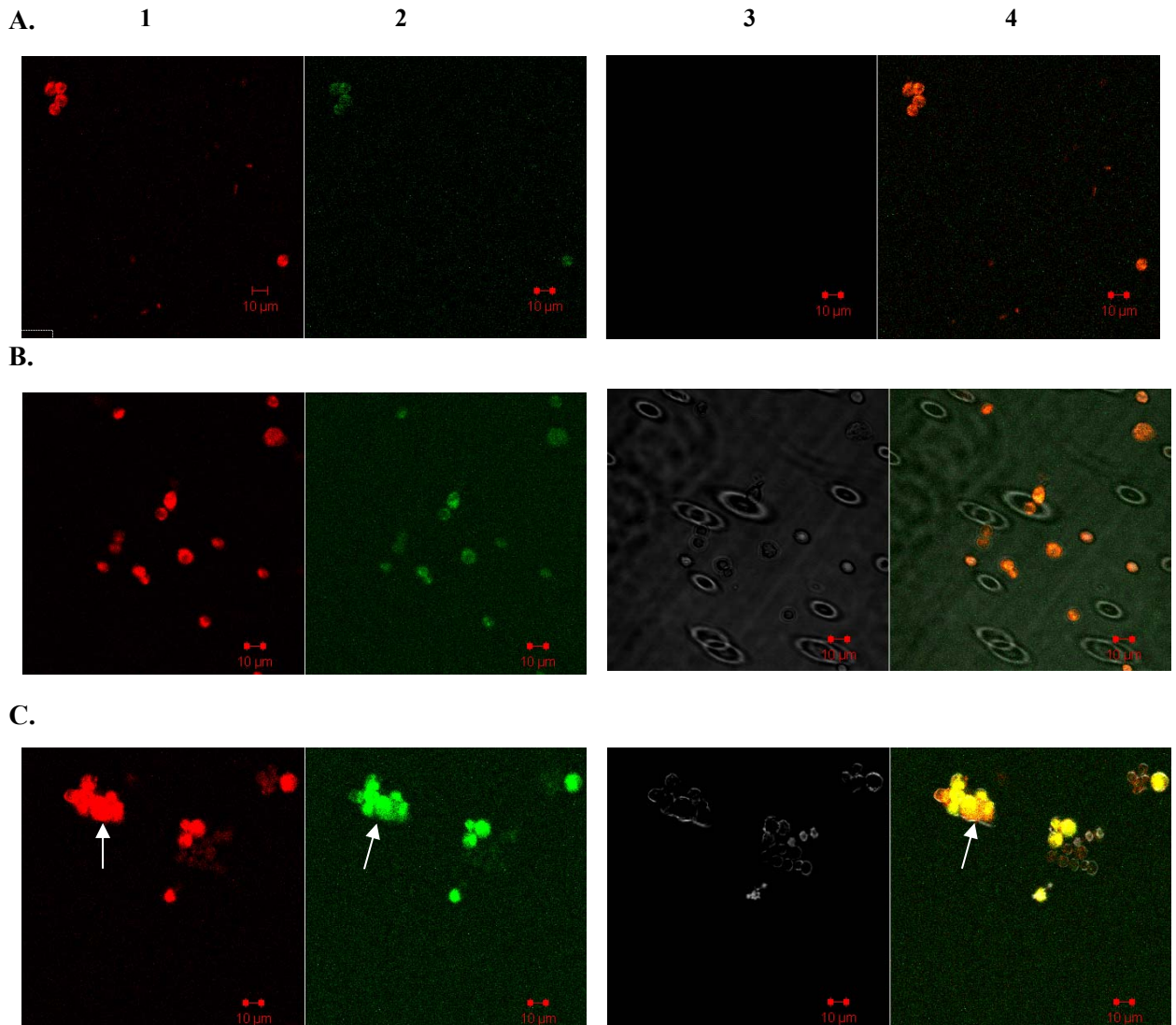


Figura 13. Microscopía confocal de células NK peritoneales de ratones BALB/c que fueron inyectados intraperitonealmente durante 24 hr con 500 μg /animal de CCH o CCH-AlexaFluor 488. Control negativo, animales inyectados con PBS (100 μl). **A.** Microscopía confocal de células NK de ratones inyectados con PBS. **B.** células NK de ratones inyectados con CCH. **C.** Células NK de ratones inyectados con CCH-AlexaFluor488. Las fotografías muestran en 1, marcador de superficie de células NK CD49b+ (asociado a PE, que emite en luz roja), 2 muestra CCH-AlexaFluor488 que emite en luz verde, 3 muestra contraste de fase de células NK y 4 muestra la colocalización de CD49b y CCH-AlexaFluor488.

4.2. Efecto de CCH sobre la acción citotóxica de células NK *in vivo*

Una vez confirmado que las células NK incorporan CCH, evaluamos su efecto sobre la capacidad citotóxica de células NK esplénicas mediante el ensayo de liberación de Cr⁵¹ de células YAC-1 enfrentadas a células NK, de manera similar al ensayo realizado con las células NK *in vitro*. El ensayo se realizó a diferentes tiempos de estimulación y con diferentes relaciones célula blanco: célula efectora. Es importante mencionar que este ensayo también se realizó con células NK peritoneales, pero debido al bajo número de recuperación de células NK los datos no son confiables.

En la **Figura 14** se muestra los datos obtenidos a los diferentes tiempos de estimulación, con los diferentes antígenos, donde se puede ver que CCH aumenta la citotoxicidad de las células NK de animales *naive* a las 24 hr de estimulación comparada con los controles positivos que corresponden a las células extraídas de animales inyectados con Poli I:C y OVO-LPS (**A**), efecto que decae rápidamente, como lo demuestran las mediciones a las 48 hr. (**B**) y 72 hr. (**C**). A este último tiempo se realizó un experimento con KLH (**D**), pero al igual que con CCH, no hubo efecto. En **E** se muestra un gráfico que resume éstos experimentos y en el que se observa que CCH y la proteína control OVO-LPS producen un aumento de la actividad citotóxica de células NK a las 24 hr. post-inyección de dichas proteínas, con respecto al control que tiende a mantenerse constante en los tiempos de observación.

**Efecto de CCH *in vivo* sobre la citotoxicidad de células NK esplénicas
de ratones *naive***

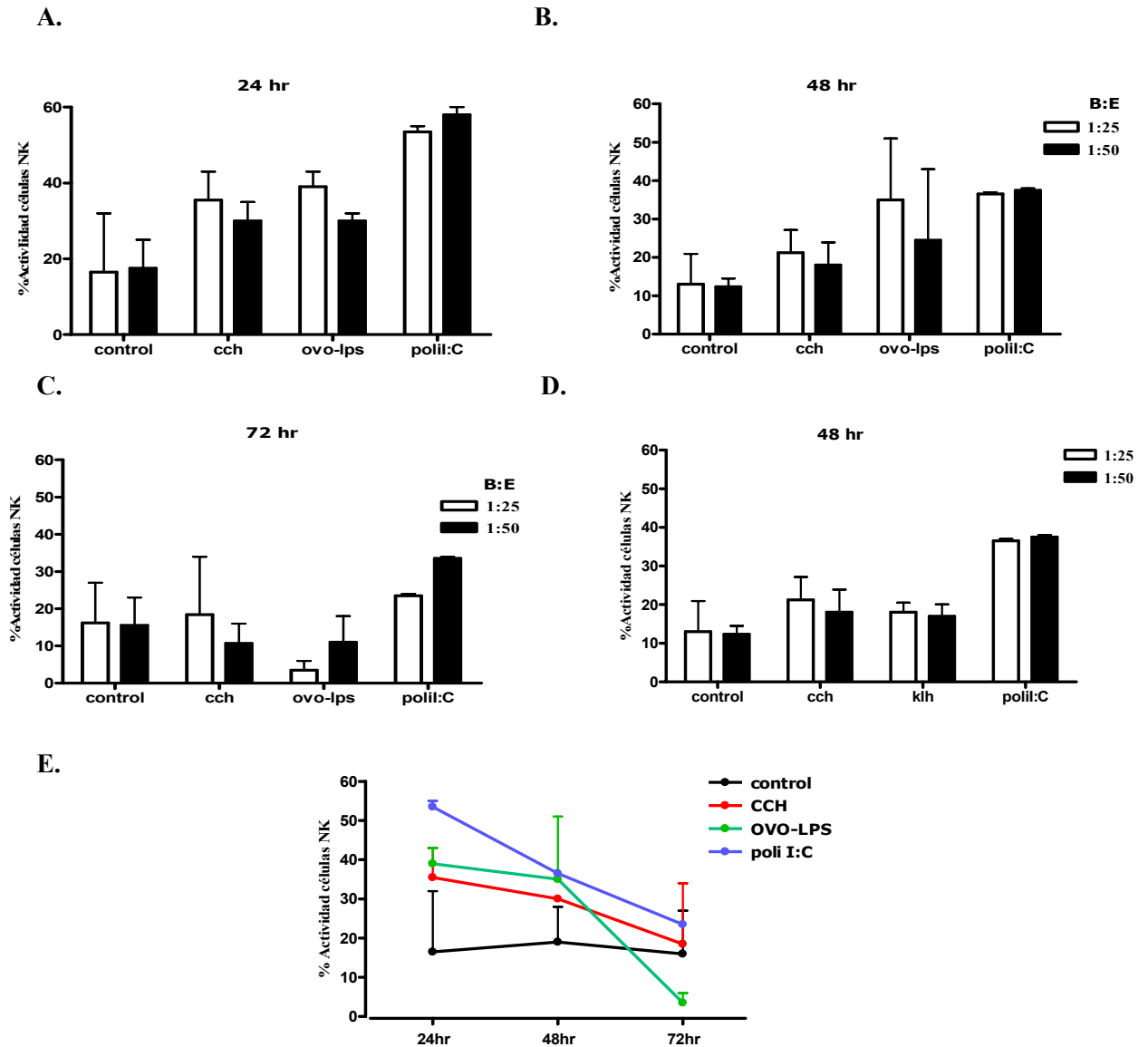


Figura 14. Efecto de CCH sobre la capacidad citotóxica de células NK frente a células YAC-1 marcadas con Cr51, en una relación blanco:efector de 1:25 y 1:50. **A.** Efecto de CCH sobre células NK *in vivo* de ratones Balb/C estimulados durante 24 hr con 500 µg de CCH, OVO y 100 µg de Poli I:C. En el eje de las abscisas se grafica el porcentaje de actividad citotóxica de células NK y en el de las ordenadas se muestran los diferentes estímulos. **B.** se grafica lo mismo que en A, pero con una estimulación de 48 hr. **C.** estimulación durante 72 hr. **D.** comparación del efecto sobre la capacidad citotóxica de células NK de CCH y KLH, junto con el control positivo. **E.** Gráfico resumen de comparación de las actividades citotóxicas de células NK en diferentes tiempos y con diferentes estímulos en una relación blanco:efector de 1:25. Las barras corresponden el error estándar de tres experimentos independientes.

DISCUSION

En la actualidad muchas investigaciones buscan alternativas más eficaces y menos invasivas para tratar diferentes tipos de cáncer y entre ellos el de tipo recurrente como es el caso del cáncer superficial de vejiga. En este contexto es que se sitúa el creciente interés en la búsqueda de moléculas fuertemente inmunoestimulantes que presenten bajos efectos colaterales como es el caso de las hemocianinas de moluscos, que ha sido utilizada exitosamente en este tipo de terapia (Lamm *et al.*, 2000).

Las hemocianinas, como se mencionó anteriormente, son moléculas gigantescas con gran poder inmunogénico que permiten la optimización de la respuesta inmune frente a diversos patógenos o situaciones patológicas para el organismo. Su uso inicial como proteína transportadora de haptenos y péptidos para producir anticuerpos, se ha ampliado a adyudantes en la terapia de melanoma maligno con células dendríticas cargadas con extracto de melanomas, que se coadministra con KLH (Escobar *et al.*, 2005) y también su uso directamente como agente terapéutico una vez extraído quirúrgicamente el cáncer de vejiga (Jurincic-Winkler *et al.*, 1995)

Pese al amplio uso de estas proteínas en el campo de la Biomedicina, es muy poco lo que se sabe acerca de su funcionamiento y mecanismos específico a través de los cual la hemocianina es capaz de desencadenar tan potente respuesta. La inmunogenicidad de una molécula depende de varios factores: carácter extraño al organismo, dotación genética del individuo, propiedades químicas de la molécula (los mejores inmunógenos son proteínas y polisacáridos), tamaño, dosis y vía de administración, características que la hemocianina cumple casi en su totalidad, ya que es una glicoproteína xenogénica de gran tamaño, de ahí que sea *per se* un antígeno timo dependiente. Lo sorprendente es que a diferencia de otros antígenos proteicos, no necesita un coadyudante para producir la respuesta del sistema inmune y ser reconocida por linfocitos T y B, previo procesamiento y presentación por células presentadoras de antígeno como macrófagos y/o células dendríticas.

El hecho que las hemocianinas tengan efecto inmunomodulador sin adyudantes adicionales, nos llevó a plantear en esta tesis que las hemocianinas, por sus peculiares características estructurales, podría inducir inflamación, la cual es fundamental para

desencadenar la respuesta inmune que parte con componentes de la inmunidad innata y entre ellos, por los antecedentes entregados en la introducción, que se señalan también más adelante, nos propusimos estudiar la participación de uno de los actores de la respuesta innata, como son las células NK.

Las células NK son protagonistas claves de la respuesta inmune contra patógenos y tumores y poseen receptores tanto de activación como de inhibición. Participan en numerosos procesos de la respuesta inmune como en la regulación de secreción de anticuerpos, aumentando su secreción, ya sea por contacto directo con linfocitos B o mediante secreción de citoquinas *helper*, como es el caso de IFN γ (Wilder *et al.*, 1996), señalando la vasta comunicación que existe entre los componentes de todo el sistema inmune. En la activación de células NK se ha demostrado la participación activa de células dendríticas, ya que células dendríticas y células NK se pueden activar unas a otras recíprocamente, lo que se evidencia en el hecho que la actividad antitumoral de células NK aumenta gracias a la acción de las DC *in vivo* y también, induce la secreción de IFN γ de las células NK, vía secreción de IL-12, entre otras citoquinas (Hamerman *et al.*, 2005). De ahí la importancia de ésta células como principal componente de la inmunidad innata y activo nexo con la inmunidad adaptativa.

En este trabajo, se estudia el papel de células NK en el efecto inmunoestimulante de hemocianinas, utilizando CCH como modelo. El por qué nos centramos en estas células radica en la base de estudios previos que demuestran que animales previamente sensibilizados, con diferentes dosis de CCH, disminuyen el volumen de tumores, aumentan la tasa de sobrevivencia y aumentan la capacidad citotóxica de células NK conjuntamente con el aumento en la secreción de IFN γ (Molledo *et al.*, 2006). Esto nos llevó a pensar, lo señalado anteriormente, que las hemocianinas al ser moléculas tan alejadas filogenéticamente de los mamíferos, podrían ser reconocidas por las células NK, porque poseen una variedad de receptores del tipo Toll que reconoce patrones moleculares asociados a patógenos como por ejemplo LPS, RNA lineal, DNA bacteriano, entre otros (Smyth *et al.*, 2005). Por otra parte, se sabe que el reconocimiento de algunos receptores de las células NK es mediado, en algunos casos, por carbohidratos (Brennan *et al.*, 1995) y al ser las hemocianinas glicoproteínas, es plausible pensar que podría existir un receptor específico o putativo para hemocianina en células NK.

Con el propósito de sentar las bases para buscar este posible receptor, es que establecimos el cultivo *in vitro* de células NK, ya que de esta manera, se simplifica el estudio al tener una población homogénea y purificada, pero sin olvidar la observación de los efectos *in vivo*, ya que es posible que las células NK por si solas no sean suficientes para desencadenar la respuesta inmune y necesiten de otras células linfoides directa o indirectamente. Debido a esto, es que el presente trabajo se divide en dos grandes temas, los estudios realizados en células NK cultivadas *in vitro* y los estudios realizados sobre células NK *in vivo*. En el corto plazo, nuestro laboratorio espera complementar estos estudios, evaluando el efecto de hemocianinas sobre co-cultivos de células NK y DCs.

EFFECTO DE CCH SOBRE CELULAS NK CULTIVADAS IN VITRO

En primer lugar estandarizamos y caracterizamos un cultivo de células NK *in vitro*, de ratones *naive*, ya que los datos sistemáticos al respecto presentes en la literatura son escasos.

Los estudios para la obtención de células NK se iniciaron con el objetivo de obtener células LAK (células NK activadas por linfoquinas) que son más citotóxicas que células NK, pero presentan un fenotipo adherente y expresan marcadores que las células NK no poseen (Gunji *et al.*, 1989). Teniendo presente lo anterior, es que muchos investigadores se centraron en el estudio de células NK cultivadas *in vitro* y ya no células LAK. En tales estudios se observó que desafortunadamente las células NK esplénicas de ratón en cultivo, disminuyen rápidamente su función citolítica, (Hebert *et al.*, 2001), de ahí que las células NK cultivadas *in vitro* necesiten de citoquinas presentes en el cultivo para que este sea viable, principalmente IL-2 (Toomey *et al.*, 2003).

Al lograr estandarizar el cultivo observamos que éstas células en condiciones *in vitro* son dependientes de IL-2, como se mencionó anteriormente, ya que de lo contrario sufren apoptosis y el cultivo no es viable. En estudios realizados con aislados frescos de células NK humanas, se observó que IL-2 activa a células NK mediante la vía de transducción de señales MKK/ERK activando a las células NK para expresar al menos cuatro de las funciones biológicas conocidas: generación de LAK, secreción de IFN γ y expresión de CD25 y CD69 (Yu *et al.*, 2000). En células NK murinas no se ha descrito

con tal precisión la vía de activación que es utilizada por IL-2 para activar células NK, pero se sabe que es imprescindible en el cultivo, al igual que en células NK humanas.

Teniendo presente lo anterior y dado que IL-2 induce la maduración de células NK, fue necesario estudiar el tiempo en el cual incubáramos las células NK con el inmunoestimulante de interés, ya que como se mostró en la **Figura 3**, el estado de maduración depende directamente de la edad del cultivo. Una vez determinado este lapso comenzamos el estudio del efecto de CCH sobre las células NK *in vitro*. Es importante mencionar que tales estudios se realizaron con células NK extraídas de animales *naive*, es decir, sin estimulación previa y con la molécula de CCH sin adyuvante, de esta manera estudiamos los efectos debidos exclusivamente a la molécula *per se* sobre este actor de la inmunidad innata. Por otra parte, controles realizados en nuestro laboratorio y por otros investigadores, confirmaron que la CCH utilizada en este trabajo es libre de endotoxina (LPS) detectable por ELISA y bioensayos en células dendríticas, por lo tanto cualquier efecto debe ser atribuido a la molécula *per se*.

Lo primero que evaluamos fue si se producían cambios morfológicos en las células NK debido a CCH; como se muestra mediante microscopía de luz en la **Figura 4**, el cultivo experimenta una maduración por sí solo (debido a IL-2), por lo que no se observaron cambios notables con respecto al control, salvo un aumento, por efecto de CCH, de células del tipo maduro (mayor tamaño). Sin embargo, el análisis mediante MET mostró que las células NK de 4 días tratadas durante 3 días con CCH presentaron un aumento en el tamaño y granularidad, evidenciando el aumento de gránulos electrón-densos. Al observar las células con mayor aumento (**Figura 6**), se observó vacuolas transparentes con moléculas de CCH aparentemente intactas, lo que sugirió que CCH estaba siendo incorporada por células NK, sin embargo, no fue posible determinar, por esta metodología, si las moléculas fueron endocitadas como cualquier proteína o si esto era mediado por un receptor, no obstante este es un resultado de gran relevancia para esta línea de investigación.

Además de la evaluación morfológica, analizamos el efecto de CCH sobre la expresión de algunos marcadores de superficie específicos de células NK, que corresponden a CD49b y NK1.1. Estos marcadores fueron seleccionados desde una amplia gama de moléculas de superficie, ya que NK1.1 está presente sólo en células NK

desde etapas muy tempranas de su diferenciación y CD49b es un marcador que se mantiene en niveles bajos de expresión y sólo se sobreexpresa en las etapas de expansión y maduración de células NK, efectos que nosotros quisimos evaluar por adición de hemocianina (Yokohama *et al.*, 2004). Sin embargo, no encontramos efecto alguno de CCH en la expresión e intensidad de ambos receptores de la superficie celular. También medimos la secreción de IFN γ por parte de células NK estimuladas con CCH y se introdujo como control la proteína OVO, contaminada con LPS por el fabricante (OVO-LPS) y se observó que al aumentar la dosis de antígeno, pareciera disminuir levemente la secreción de tal citoquina, especialmente con OVO-LPS, con la menor dosis, lo cual interpretamos como que con la dosis de 50 μ g/ml la cantidad de LPS sería suficiente para activar al máximo la capacidad humoral de células NK. Sin embargo, esto es poco probable o requiere ser evaluado con mayor detalle, ya que no conocíamos la cantidad exacta de LPS contaminante que tiene incorporada la OVO.

Como no se observaron efectos sobre la expresión e intensidad de los dos marcadores evaluados y tampoco en la secreción de IFN γ , nos preguntamos si las vacuolas que contenían CCH observadas por MET, en realidad correspondían a moléculas de CCH incorporadas por células NK. Para responderlo, trabajamos con CCH unida a un fluoróforo y medimos su presencia mediante citometría de flujo (**Figura 8**). Como se analizó en resultados, se observó claramente que existe una subpoblación de células NK que muestran CCH, sobre todo en cultivos de 7 días estimulados durante 24 hr., lo que concuerda con los datos obtenidos por MET y que fueron también confirmados por microscopía confocal.

Entonces, con los datos obtenidos hasta el momento, podríamos decir que se obtuvo una subpoblación de células NK que estarían incorporando CCH, pero que tal fenómeno no afecta la expresión ni intensidad de dos marcadores de superficie importantes de células NK (CD49b+ y NK1.1), ni tampoco la secreción de IFN γ , por lo que pensamos que era posible que CCH pudiera afectar la capacidad citotóxica de estas células. Para resolver tal interrogante realizamos el ensayo de liberación de Cr⁵¹. Los datos mostrados en la **Figura 10**, muestran que no hay ningún efecto de CCH sobre la capacidad lítica de células NK cultivadas *in vitro*.

Con el conjunto de datos obtenidos podemos concluir parcialmente, que las células NK cultivadas *in vitro* por sí solas son capaces de incorporar CCH, pero que ésta no ejerce ningún efecto sobre las capacidades funcionales de las células NK. Esto puede deberse a la importancia de otros grupos celulares para desencadenar la capacidad citotóxica de células NK, ya que puede ser que éstas células reconozcan solo una parte de la molécula y no la molécula entera, por lo que necesitaría la acción de otros componentes inmunes, quizás macrófagos que degraden de alguna manera la proteína dejando expuestos sitios que sí serían reconocidos y causen la activación de células NK. Por otro lado, es probable que al tratarse de células cultivadas *in vitro*, en condiciones bastante diferentes a las fisiológicas y además tratadas con IL-2 a grandes dosis, las células se hayan activado en tiempos más tempranos, que los estudiados, logrando su activación máxima, por lo que se hacen insensibles a cualquier estímulo extra que se le agregue, ya que en estos casos, tampoco fueron sensibles a Poli I:C que es un conocido inductor de la actividad citotóxica de células NK (Dong *et al.*, 2004) utilizado como control positivo.

EFFECTO DE CCH SOBRE CELULAS NK IN VIVO

Paralelamente al cultivo *in vitro* de células NK, comenzamos a trabajar con células NK *in vivo*, para estudiar el papel que desempeñan en la respuesta primaria a CCH, pero esta vez en su medio fisiológico. Lo primero que quisimos corroborar, es que si al igual que *in vitro*, las células NK *in vivo* eran capaces de incorporar CCH. Para esto estudiamos diferentes vías de administración y dosis del antígeno. Los resultados de todos los ensayos efectuados en los diferentes tiempos, en las diferentes células linfoides analizadas, se resumen en la **Tabla 1**, donde se observa que la única forma en la cual se obtienen grupos celulares que incorporan CCH es usando la vía de inyección intraperitoneal y analizando células linfoides peritoneales. Como esto no era concordante con lo obtenido por otros autores en que inmunizan vía endovenosa y a las 3 hr. recuperan células esplénicas marcadas (Delamarre *et al.*, 2006), indagamos la causa y lo que fue evidente, es que en esos casos, la forma de obtener células linfoides positivas desde el bazo para un antígeno dado, es utilizando dosis muy elevadas del antígeno, en torno a 8 mg, hecho que difiere enormemente con nuestra aproximación experimental, ya que las dosis utilizadas en este trabajo son dosis terapéuticas (0,5-1 mg), lo que puede explicar la ausencia de células esplénicas marcadas. Por otra parte, al tratarse de una

proteína tan grande, puede ser que al inyectar CCH endovenosamente, la velocidad del torrente sanguíneo, junto a la presencia de otras proteínas que impidan su llegada como tal hasta el bazo, podría ser retenida o dispersada en otros órganos o tejidos antes de llegar al bazo. Debido a esto, es que concluimos que tanto la vía de administración como la dosis de antígeno son muy importantes a la hora de estudiar el efecto de antígenos como la hemocianina sobre células inmunes. En nuestro caso, se corroboró que células inmunes peritoneales y especialmente células NK, incorporan CCH cuando es inyectada intraperitonealmente en dosis terapéuticas, como fue confirmado mediante microscopía confocal.

Al igual que en los estudios realizados *in vitro*, una vez confirmado que células NK incorporan CCH *in vivo*, estudiamos el efecto de CCH sobre la citotoxicidad de células NK, con el mismo ensayo mencionado anteriormente. En la **Figura 14** se observa el efecto de CCH y OVO-LPS en diferentes tiempos y a diferentes relaciones células blanco: célula efectora. Se observó que CCH aumenta la capacidad citolítica de células NK con respecto al control, pero que este efecto no responde de forma dosis-respuesta, ya que al aumentar el número de células NK la citotoxicidad de estas no aumentó e incluso disminuye levemente. Es probable que este efecto se deba a un exceso de células, más que a un fenómeno específico, porque ocurre tanto en los controles como en los tratados con CCH u OVO-LPS. En este último caso, este efecto perfectamente podría ser mediado por DCs que al ser cultivadas con LPS inducen la secreción de IL-12 y ésta activa a las células NK.

Podemos concluir que bajo las condiciones descritas anteriormente, CCH aumenta la capacidad citotóxica de células NK *in vivo*, efecto que no se evidencia en las células NK cultivadas *in vitro*.

En consecuencia, las células NK incorporan CCH tanto *in vitro* como *in vivo*, pero la CCH incorporada ejerce un efecto positivo en la capacidad funcional solamente *in vivo*. Es importante hacer notar que los efectos de CCH sobre células NK medidos en este trabajo son muy parciales, ya que medimos capacidad citotóxica y secreción de citoquinas, pero no podemos descartar que CCH esté activando la expresión de otras proteínas vitales quizás para una respuesta secundaria, o la activación de otras células inmunes, que en su conjunto permiten el desarrollo de la respuesta inmune. Además es

importante recordar que el papel que ejerce las células NK a través del mecanismo ADCC en el efecto inmunoestimulante de hemocianinas, está estudiado y lo que nosotros evaluamos es el papel que ejercen éstas células en la inmunidad innata, tema que posee varias aristas, ya que el Sistema Inmune es, como su nombre lo dice, un sistema formado por varios componentes, en donde una respuesta inmune exitosa es el resultado de la activación y comunicación de diferentes grupos celulares. Por ejemplo, es de vital importancia el Sistema del Complemento, que en este trabajo no se estudió y en general su participación no ha sido evaluada y podría ser crucial para el inicio de la respuesta inmune inducida por hemocianinas.

En conclusión, en este trabajo se determinó por primera vez, que una subpoblación de células NK incorporan hemocianina *in vitro* e *in vivo* y que CCH induce la activación de células NK de animales *naive* a las 24 hr. de inyectada. El hecho que sea sólo un porcentaje de las células NK las que incorporan CCH y no todas, es tal vez por la existencia de subpoblaciones dentro de las células NK que cumplen roles distintos, es decir, que existe un población de células NK con mayor capacidad citotóxica y otras con un rol más bien regulador, mediante secreción de citoquinas.

La subpoblación de células NK que está incorporando CCH, no la podemos discernir con los estudios presentados y tampoco la relevancia fisiológica de este hallazgo, pero son interrogantes que esperamos dilucidar en el transcurso de la investigación de nuestro laboratorio.

CONCLUSION

1. Se logró establecer las condiciones para cultivar células NK murinas *in vitro*, obtenidas desde esplenocitos de ratones *naive*. El cultivo es viable hasta los 10 días, mostrando cambios fenotípicos caracterizados por un aumento del tamaño de las células, la expresión de los marcadores propios de células NK (CD49b+ NK1.1+) y secreción de IFN γ .
2. *In vitro*, CCH induce un efecto a nivel de la maduración de la población de células, caracterizado por el predominio de células de mayor tamaño con respecto al control. Mediante microscopía electrónica de transmisión y confocal, se demostró que algunas de estas células muestran CCH en vacuolas citoplasmáticas y un aumento en el número de gránulos electrón-densos. Sin embargo, CCH no afecta la expresión ni intensidad de los marcadores CD49b y NK1.1, ni tampoco la capacidad humoral y citotóxica de las células NK en cultivo.
3. *In vivo*, CCH es incorporada por varias células linfoides, incluyendo células NK extraídas desde el peritoneo de animales inyectados durante 24 hr. intraperitonealmente con CCH-AlexaFluor 488. A diferencia de lo observado *in vitro*, se determinó por primera vez, que en este mismo período, CCH produce un aumento en la capacidad citotóxica de células NK esplénicas de ratones *naive*.

BIBLIOGRAFIA

- **Akira S., Takeda K., Kaisho T.** (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. "Nature Immunol." **2** (675-678).
- **Azuma M., Cayabyab M., Buck D., Phillips J. H., Lanier L. L.** (1992). Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. "J. Immunol." **149** (1115-1123).
- **Biron C., Nguyen K., Pien G., Cousens L., Salazar-Mather T.** (1999). Natural Killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. "Annu. Rev. Immunol." **17** (189-220).
- **Bisikirska B., Colgan J., Luban J., Bluestone J., Herold K.** (2005). TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. "J. Clin. Invest." **115** (2904-2913).
- **Brennan J., Takei F., Wong S., Mager D. L.** (1995). Carbohydrate recognition by a Natural Killer cell receptor, Ly-49C. "J. Biol. Chem." **270** (9691-9694).
- **Campbell K., Colonna M.** (2000). Natural Killer Cell Protocols Cellular and Molecular Methods. Human Press, Totowa, New Jersey, USA. **121**.
- **Cerwenka A., Lanier L.** (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. "Nature Rev. Immunol." **1** (41-49).
- **Das A., Saxena R.** (2004). Role of interaction between Ly49 inhibitory receptors and cognate MHC I molecules in IL-2 induced development of NK cells in murine bone marrow cell cultures. "Immunol. Letters" **94** (209-214).
- **De Ioannes P., Moltedo B., Oliva H., Pacheco R., Faunes F., De Ioannes A. E., Becker M.I.** (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. "J. Biol. Chem." **279** (26134-26142).

- **Delamarre L., Couture R., Mellaman I., Trombetta E. S.** (2006). Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. "J. Exp. Med." **203** (2049-2055).
- **Dong Z., Wei H., Sun R., Gao B., Tian Z.** (2004). Isolation of murine hepatic lymphocytes using mechanical dissection for phenotypic and functional analysis of NK1.1+ cells. "J. Gastroenterol." **10** (1928-1933).
- **Edwards A. M., Barredo F., Silva E., De Ioannes A. E., Becker M. I.** (1999). Apoptosis induction in nonirradiated human HL-60 and murine NSO/2 tumor cells by photoproducts of indole-3-acetic acid and riboflavin. "Photochem. Photobiol." **70** (645-645).
- **Escobar A., Lopez M., Serrano A., Ramirez M., Perez C., Aguirre A., Gonzalez R., Alfaro J., Larrondo M., Fodor M., Ferrada C., Salazar-Onfray F.** (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 specific immune responses in melanoma patients. "Clin. Exp. Immunol." **142** (555-568).
- **Geldhof A. B., Raes G., Bakkus M., Devos S., Thielemans K., De Baetselier P.** (1995). Expression of B7-1 by highly metastatic mouse T lymphomas induces optimal natural killer cell-mediated cytotoxicity. "J. Cancer Res." **55** (2730-2733).
- **Gunji Y., Vujanovic N. L., Hiserodt J. C., Herberman R. B., Gorelik E.** (1989). Generation and characterization of purified adherent lymphokine-activated killer cells in mice. "J. Immunol." **142** (1748-1754).
- **Hamerman J. A., Ogasawara K., Lanier L. L.** (2005). NK cells in innate immunity. "Curr. Opin. Immunol" **17** (29-35).
- **Harris J. R., Mark J.** (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. "Micron" **30** (597-623).

- **Hebert P., Pruett S.** (2001). Selective loss of viability of mouse NK cells in culture is associated with decreased NK cell lytic function. "In vitro Mol. Toxicol." **14** (71-82).
- **Jurincic-Winkler C., Metz K. A., Beuth J., Engelmanns U., Klippel K. F.** (1995). Immunohistological findings in patients with superficial bladder carcinoma after intravesical instillation of keyhole limpet hemocyanin. "British J. Urol." **76** (702-707).
- **Kelly J. M., Darcy P. K., Yaguita H., Smyth M. J.** (2002). A role for IFN-gamma in primary and secondary immunity generated by NK cell-sensitive tumor-expressing CD80 *in vivo*. "J. Immunol." **168** (4472-4479).
- **Lamm D., Dehaven J. I., Riggs D. R.** (2000). Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. "Eur. Urol." **3** (41-44).
- **Leyton P., Lizama P. A., Campos-Vallette M. M., Becker M. I., Clavijo E., Cordova I., Vera M., Jerez C.** (2005). Surface enhanced raman spectrum of nanometric molecular systems. "J. Chil. Chem. Soc." **4** (725-730).
- **Linn J., Black P., Derksen K., Rübber H.** (2000). Keyhole Limpet hemocyanin in experimental bladder cancer. "Eur. Urol." **37** (34-40).
- **Manosalva H., De Ioannes A., Becker M. I.** (2004). Development of monoclonal antibodies bearing the internal image of Gizzerosine epitope and application in a competitive ELISA for fish meal. "Hybridoma Hybridom." **23** (45-54).
- **Markl J., Lieb B., Gebauer W.** (2001). Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanin KLH and HtH. "J. Cancer Clin. Oncol." **127** (R3-R9).

- **Medzhitov R., Janeway C.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. "Cell" **91** (295-298).
- **Moltedo B., Faunes F., Haussmann D., De Ioannes P., De Ioannes A. E., Puente J., Becker M.I.** (2006). Immunotherapeutic effect of the *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: Evidence for conserved anti-tumor properties among hemocyanins. "J. Urol." **176** (2690-2695).
- **Molto L. M., Carballido J., Jurincic C., Lapena P., Manzano L., Salmeron I., Alvarez-Mon M.** (1991). Keyhole limpet hemocyanine can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. "Eur. Urol." **19** (74-78).
- **Oliva H., Moltedo B., De Ioannes P., Faunes F., De Ioannes A. E., Becker M.I.** (2002). Monoclonal antibodies to molluscan hemocyanin from *Concholepas concholepas* demonstrate common and specific epitopes among subunits. "Hybridoma Hybridom." **21** (365-374).
- **Olsson C., Chute R., Roa C.** (1974). Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. "J. Urol." **111** (173-177).
- **Orlova E., Dube P., Harris J. R., Beckman E., Zemlin F., Markl J., Van Heel M.** (1997). Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH 1) at 15 Å resolution by electron crymicroscopy and angular reconstitution. "J. Mol. Biol." **271** (417-437).
- **Puente J., Salas M. A., Canon C., Miranda D., Wolf M.E., Mosnaim A.D.** (1996). 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." **34** (212).

- **Sivori S., Falco M., Chiesa M., Carlomagno S., Vitale M., Moretta L., Moretta A.** (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. "Proc. Nat. Acad. Scienc." **101** (10116-10121).
- **Smyth M., Cretney E., Kelly J., Westwood J., Street S., Yagita H., Takeda K., van Dommelen S., Degli-Esposti M., Hayakawa Y.** (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. "Molec. Immunol." **42** (501-510).
- **Tommey J. A., Gays F., Don Foster, Brooks C. G.** (2003). Cytokine requirements for the growth and development of mouse NK cells in vitro. "J. Leukocyte Biol." **74** (233-242).
- **Van Hole K. E., Miller K. I.** (1995). Hemocyanins. "Adv. Protein Chem." **47** (1-81).
- **Wilder J. A., Crystal Y., Yuan D.** (1996). The role of NK cells during in vivo antigen-specific antibody responses. "J. Immunol." **156** (146-152).
- **Wishahi M., Ismail I., Ruebben H., Otto T.** (1995). Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy in the bilharzial bladder: a new treatment modality? Phase II trial: superficial bladder cancer. "J. Urol." **153** (926-928).
- **Yokoyama W., Kim S., French A.** (2004). The dynamic life of natural killer cells. "Annu. Rev. Immunol." **22** (405-429).
- **Yu T., Caudell E. G., Smid C., Grimm E. A.** (2000). IL-2 activation of NK cells: involvement of MKK1/2/ERK but not p38 kinase pathway. "J. Immunol." **164** (6244-6251).