

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEÚTICAS**



**PATRÓN DE EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y QUIMIOQUINAS  
DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO MURINAS EN  
RESPUESTA A ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON  
HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS**

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas y Biotecnología, y Memoria para optar al título de Bioquímico por:

**TA-YING ZHONG HU**

Director de Tesis  
María Inés Becker C., Ph.D.

Santiago de Chile, 2013

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por el candidato:

**TA-YING ZHONG HU**

Ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas y Biotecnología y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de tesis rendido el día 27 de Noviembre del 2013

Director de Tesis:

Dra. María Inés Becker Ph.D

\_\_\_\_\_

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Arturo Ferreira Ph.D.

\_\_\_\_\_

Dr. Dante Miranda Ph.D.

\_\_\_\_\_

Dr. Javier Puente Ph.D.

\_\_\_\_\_

*“Gravitation cannot be held responsible for people falling in love. How on earth can you explain in terms of chemistry and physics so important a biological phenomenon as first love? Put your hand on a stove for a minute and it seems like an hour. Sit with that special girl for an hour and it seems like a minute. That's relativity.”*  
Albert Einstein

*“Our greatest glory consists not in never falling, but in rising every time we fall..”*  
Oliver Goldsmith

Dedicado a ti, Jennylee, por tu incondicional amor, sostén y apoyo en cada uno de mis proyectos y etapas de la vida.  
Gracias por creer en mí.

## AGRADECIMIENTO

Antes que todo quiero agradecer inmensamente a la Doctora María Inés Becker, por su cariño, constante apoyo y sobretodo confianza; quién no solo me guió durante todo este proceso sino que ayudó forjar la persona en que me he convertido; por las conversaciones, historias, consejos y enseñanzas que me acompañarán de aquí en adelante. “*Gracias Profesora, como siempre muy agradecido*”.

Quiero agradecer a todo el equipo de Biosonsa, a Marcela, Lorena, Bernarda, Cynthia, Oscar, Felipe y a Dr. De Ioannes, por las risas, las buenas conversas, su tiempo y por su puesto, su ayuda cuando la he necesitado. También quiero agradecer al Dr. Augusto Manubens, por su ayuda desinteresada durante la tesis, por su escaso tiempo, críticas constructivas y comentarios que me ayudaron en la construcción de este y otros escritos. A Fabián Salazar, por presentarme el laboratorio e introducirme en la Familia de Biosonda/FUCITED y legar su línea de trabajo. A los compañeros de laboratorio y amigos, Ricardo Tampe, Miguel del Campo, José Jiménez, Sergio Arancibia, Raimundo Born, Miriam Palacios y Cristóbal Dünner, por su buena onda, sesiones de pool, tallas, consejos, críticas y ayuda tanto en el laboratorio como en los seminarios. También a Don José y a Fabián por su labor en mantener las cosas en su lugar dentro del laboratorio.

A todos los profesores de esta gran institución que es la Universidad de Chile, a los profesores integrantes de mi comisión evaluadora, Dr. Javier Puente, Dr. Dante Miranda y Dr. Arturo Ferreira, gracias por hacer de mí un gran profesional.

Finalmente, no habría podido llegar al final de este camino sin el apoyo de mi familia, aquí en Chile, en Australia y en China; de mis amigos por las buenas juntas y ayudar a darme cuenta que “*shit happens all the time*”; y mi amiga, confidente y amor, por los coscorriones, paciencia, compañía y aliento para seguir adelante a pesar de todo.

*Gracias a todos.*

## FINANCIAMIENTO Y PRESENTACIONES

Esta Tesis fue financiada parcialmente por el Proyecto FONDECYT 1110651.

Además, se recibió el apoyo de BIOSONDA S.A. y de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

### Presentaciones a Congresos Nacionales

**Zhong, T.**, Arancibia, S., Born, R., Manubens, A., Becker, M.I. *Perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas en células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estimulación in vitro con hemocianinas de moluscos*. LV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Puerto Varas, Chile. Noviembre, 2012. Biol Res 45: pág. R-63 (2012) Abstract.

### Presentaciones a Congresos Internacionales

**Zhong, T.**, Arancibia, S., Del Campo, M., Tampe, R., Manubens, A., Becker, M. *Murine macrophages stimulated in vitro with mollusk hemocyanins (KLH, CCH and FLH) present a different expression profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines*. XII PABMB congress, Puerto Varas, Chile. Noviembre, 2013. Libro de resúmenes, pág. 191.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>DEDICATORIA</b>	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>III</b>
<b>FINANCIAMIENTO Y PRESENTACIONES</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>XII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1. Estructura de las hemocianinas de moluscos	<b>7</b>
2. Sistema inmune innato	<b>11</b>
2.1. Presentación antigénica y células presentadoras de antígenos	<b>12</b>
2.2. Células presentadoras de antígeno y hemocianinas	<b>15</b>
3. Mediadores del sistema inmune: Citoquinas y quimioquinas	<b>16</b>
3.1. Citoquinas	<b>17</b>
3.2. Quimioquinas	<b>20</b>
4. Planteamiento del problema	<b>21</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>23</b>
1. Objetivo general	<b>23</b>
2. Objetivos específicos	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>

<b>1. Materiales biológicos</b>	<b>26</b>
1.1. Hemocianinas	26
1.2. Animales de experimentación	26
1.3. Cepas bacterianas para clonamiento	27
<b>2. Reactivos</b>	<b>27</b>
2.1. Citometría de flujo	27
2.2. Cultivo celular	27
2.3. Clonamiento de productos de PCR	28
2.4. Electroforesis	28
2.5. Reacción de RT-PCR convencional y en tiempo real	28
2.6. PCR-Array	28
2.7. Reacción de ELISA	29
2.8. ELISA-Array	29
2.9. Oligos para las reacciones de PCR	29
<b>3. Soluciones</b>	<b>29</b>
3.1. Microscopía electrónica de transmisión:	29
3.2. Citometría de flujo	29
3.3. Obtención de macrófagos peritoneales y células de médula ósea murina	30
3.4. Cultivo celular:	30
3.5. Electroforesis	31
3.6. Clonamiento de productos de PCR	31
3.7. Reacción de ELISA	31
<b>4. Equipos</b>	<b>32</b>
4.1. Área de cultivo celular	32
4.2. Área de microbiología	32
4.3. Área de biología molecular	33
4.4. Otro equipos	33
<b>5. Servicios</b>	<b>34</b>
5.1. Síntesis de partidores para PCR	34
5.2. Cuantificación de citoquinas y quimioquinas	34
5.3. Análisis de glúcidos de hemocianinas	34
<b>6. Métodos</b>	<b>35</b>
6.1. Estandarización de los cultivos primarios de células presentadoras de antígeno e incubación con hemocianinas	35
6.1.1. Extracción de macrófagos peritoneales	35
6.1.2. Incubación de macrófagos con hemocianinas de moluscos	36
6.2. Citometría de flujo	36
6.3. Microscopía electrónica de transmisión	37

6.4.	Electroforesis	38
6.4.1.	Gel de agarosa en tampón tris acetato-EDTA (TAE)	38
6.4.2.	Gel de agarosa-formaldehído en tampón ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS)	38
6.5.	Clonamiento de productos de PCR	39
6.5.1.	Preparación de bacterias competentes	39
6.5.2.	Transformación bacteriana	40
6.5.3.	Extracción de plasmidios	40
6.6.	RT-PCR convencional y en tiempo real	41
6.7.	PCR-Array	42
6.8.	Ensayos de ELISA y ELISA-Array	43
6.9.	Análisis de oligosacárido por espectrometría de masa (MADI-TOF-MS)	45
6.10.	Análisis estadísticos	45
<b>RESULTADOS</b>		<b>47</b>
1.	Caracterización morfofuncional del cultivo <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales murinos	47
2.	RT-PCR convencional de un panel de 4 citoquinas proinflamatorias características	53
	– IL-1 $\beta$	54
	– IL-6	54
	– IL-12p40	55
	– TNF- $\alpha$	55
3.	RT-PCR en tiempo real y determinación de las 4 citoquinas proinflamatorias características mediante ELISA	59
	– IL-1 $\beta$	61
	– IL-6	65
	– TNF- $\alpha$	67
	– IL-12p40	70
4.	PCR-Array y ELISA-Array de un panel de 84 citoquinas y quimioquinas de macrófagos murinos estimulados <i>in vitro</i> con CCH, KLH, FLH por 24 horas	76
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>87</b>
1.	Caracterización de cultivo de macrófagos peritoneales de ratón y ensayo dosis respuesta con CCH, KLH y FLH	92
2.	Perfil cinético de la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ en macrófagos peritoneales cultivados con CCH, KLH, FLH	94
3.	PCR-Array y ELISA-Array: Patrón de expresión de	97

citoquinas y quimioquinas en macrófagos estimulados con CCH, KLH y FLH.

<b>PROYECCIONES FUTURAS</b>	<b>108</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>110</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>125</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b> Estructura de la hemocianina de moluscos.	<b>10</b>
<b>Figura 2</b> La inducción de macrófagos con tioglicolato permite obtener una población homogénea de células funcionales, que expresan sus marcadores fenotípicos característicos (F4/80, MHCII, CD40, CD86 y CD80).	<b>51</b>
<b>Figura 3</b> Las hemocianinas son incorporadas por macrófagos peritoneales.	<b>52</b>
<b>Figura 4</b> Efecto diferencial de tres hemocianinas sobre los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ .	<b>57</b>
<b>Figura 5</b> Esquema experimental de estimulación de macrófagos peritoneales con las hemocianinas modelo (CCH, KLH y FLH) y con LPS.	<b>63</b>
<b>Figura 6</b> Las hemocianinas no estimulan la secreción de IL-1 $\beta$ por sí mismas.	<b>64</b>
<b>Figura 7</b> Tanto FLH como KLH regulan al alza el nivel relativo de mRNA de IL-6.	<b>66</b>
<b>Figura 8</b> FLH al igual que KLH, estimula la secreción temprana de TNF- $\alpha$ .	<b>69</b>
<b>Figura 9</b> CCH, a diferencia de FLH y KLH no estimula de manera significativa la expresión de IL-12p40.	<b>73</b>
<b>Figura 10</b> Las hemocianinas de moluscos estimulan a distintos tiempos e intensidades la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ e IL-12p40.	<b>74</b>
<b>Figura 11</b> FLH y KLH inducen la secreción máxima de IL-6 y IL-12p40 a las 24 horas.	<b>75</b>

<b>Figura 12</b>	Tanto KLH como FLH promueven el aumento del nivel relativo de genes de citoquinas y quimioquinas luego de 24 horas de estimulación.	<b>81</b>
<b>Figura 13</b>	FLH es más inmunogénica al inducir una mayor regulación al alza de mRNA de genes citoquinas y quimioquinas luego de 24 horas de estimulación.	<b>82</b>
<b>Figura 14</b>	FLH induce de manera significativa, la secreción de quimioquinas claves en el proceso de extravasación de neutrófilos luego de 24 horas de estimulación.	<b>85</b>
<b>Figura 15</b>	Las diversas funciones de los macrófagos.	<b>91</b>
<b>Figura 16</b>	Fórmula de la cuantificación relativa, método $\Delta\Delta Ct$ .	<b>94</b>
<b>Figura 17</b>	CCH, KLH y FLH analizados por MALDI-TOF-MS, presentan una diferente composición de azúcares.	<b>104</b>
<b>Figura 18</b>	Las hemocianinas son incorporadas por macrófagos y promueven tempranamente la generación de un ambiente de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.	<b>107</b>

## ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1</b>	Genes y secuencias de partidores utilizados para RT-PCR y RT-qPCR.	<b>Pág. 10</b>
<b>Tabla 2</b>	Cuantificación relativa de resultados de PCR-Array de macrófagos estimulados con hemocianinas por 24 horas, usando como control positivo LPS.	<b>80</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>APCs</b>	<i>Antigen presenting cells</i> /Células presentadoras de antígenos
<b>ARE</b>	<i>AU-rich elements</i> /Regiones ricos en AU
<b>BCG</b>	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i> /Bacilo Calmette-Guérin
<b>BMDCs</b>	<i>Bone derived dendritic cells</i> /Células dendríticas derivadas de la médula ósea
<b>CCH</b>	<i>Concholepas concholepas hemocyanin</i> /Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CCHA</b>	<i>Concholepas concholepas hemocyanin subunit A</i> /Subunidad A de la hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CCHB</b>	<i>Concholepas concholepas hemocyanin subunit B</i> /Subunidad B de la hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
<b>CCLs</b>	<i>CC-chemokine ligands</i> /Quimioquinas de la familia CC
<b>CDs</b>	<i>Cluster of differentiation</i> /Grupos de diferenciación
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> /DNA complementario
<b>CSFs</b>	<i>Colony stimulating factors</i> /Factores de estimulación de colonia
<b>CSV</b>	Cáncer superficial de vejiga
<b>CXCLs</b>	<i>CXC-chemokine ligands</i> /Quimioquinas de la familia CXC
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular patterns</i> /Patrones moleculares asociados a daño
<b>DCs</b>	<i>Dendritic cells</i> /Células dendríticas
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i> /Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DNP</b>	<i>2,4-dinitrophenol</i> /2,4-dinitrofenol
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> /Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>FLH</b>	<i>Fissurella latimarginata hemocyanin</i> /Hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>
<b>Fus</b>	<i>Funcional units</i> /Unidades funcionales
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> /Factor estimulante de colonias de granulocitos
<b>GAPDH</b>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> /Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> /Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
<b>HKG</b>	<i>Housekeeping</i>

<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i> /Peroxidasa de rábano
<b>ILs</b>	Interleuquinas
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma ( $\gamma$ )
<b>IPTG</b>	<i>Isopropyl <math>\beta</math>-D-1-thiogalactopyranoside</i> /Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>KC</b>	<i>Keratinocyte chemoattractant</i>
<b>KLH</b>	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> /Hemocianina de Lapa californiana
<b>LB</b>	<i>Luria broth</i> /Caldo Luria
<b>LIX</b>	<i>Lipopolysaccharide-induced CXC chemokine</i>
<b>LPS</b>	<i>Lipopolysaccharide</i> /Lipopolisacárido
<b>M1</b>	Classically activated macrophage/Macrófago activado clásicamente
<b>M2</b>	<i>Alternatively activated macrophage</i> / Macrófago activado alternativamente
<b>MALDI-TOF-MS</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight Mass spectrometer</i> /Espectrometría de masa acoplado a detector de iones
<b>MCP-1</b>	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
<b>MHC II</b>	Major histocompatibility complex class II/Complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
<b>MIG</b>	<i>Monokine induced by interferon-gamma</i>
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	<i>Macrophage inflammatory protein -1 alpha</i>
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<i>Macrophage inflammatory protein -1 beta</i>
<b>MIP-2</b>	<i>Macrophage inflammatory protein -2</i>
<b>MOPS</b>	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> /ARN mensajero
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>PAMP</b>	<i>Pathogens-associated molecular patterns</i> /Patrones moleculares asociados a patógenos
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> /Tampón salino de fosfato
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>pMHC II</b>	Complejos péptido-MHC II
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptors</i> /Receptor de reconocimiento de patrones
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> /PCR cuantitativa o PCR en tiempo real
<b>RANTES</b>	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
<b>rGM-CSF</b>	<i>Recombinant granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive oxygen species</i> /Especies reactivas del oxígeno
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>

<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>TACE</b>	<i>TNF-<math>\alpha</math> converting enzyme/enzima convertidora de TNF-<math>\alpha</math></i>
<b>TAE</b>	<i>Tris-acetate-EDTA buffer</i>
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b>	<i>Tumor growth factor <math>\beta</math>-2</i>
<b>Th1</b>	Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 1
<b>Th17</b>	Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 17
<b>Th2</b>	Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 2
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors/Receptores de tipo Toll</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor alpha/Factor de necrosis tumoral</i>
<b>TNP</b>	2,4,6-trinitrophenol/2,4,6-trinitrofenol
<b>TWEEN</b>	<i>Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, polysorbate 20</i>
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor/Factor de crecimiento endotelial vascular</i>
<b>XGal</b>	Sustrato cromogénico para la $\beta$ -galactosidasa/5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido
<b><math>\Delta\Delta Ct</math></b>	Método de cuantificación relativa delta-delta Ct

## RESUMEN

Las hemocianinas de moluscos son enormes glicoproteínas que al ser inoculadas en mamíferos, generan una potente respuesta inmune del tipo Th1, caracterizada por la secreción de IFN- $\gamma$ . Es así que se han usado como *carrier* en el desarrollo de anticuerpos contra haptenos, como *carrier/adyuvante* en vacunas terapéuticas contra patógenos y cáncer y además, como inmunoestimulante no específico en la inmunoterapia del carcinoma superficial de vejiga. Sin embargo, los mecanismos inmunológicos involucrados en las etapas tempranas de la respuesta inmune anti-hemocianina, conducentes a sus notables propiedades inmunoestimulantes, son muy poco conocidos. Es así que ha sido escasamente abordado su efecto sobre las redes de comunicación coordinadas por citoquinas, las proteínas que median las interacciones entre las células del sistema inmune. Esta información, ampliará no solo el conocimiento básico para comprender los efectos inmunoestimulantes de las hemocianinas en mamíferos, sino que también contribuirá a nuevas aplicaciones.

En esta tesis se propuso estudiar el efecto de tres hemocianinas sobre macrófagos peritoneales murinos, como modelo para entender la respuesta inmune innata que inducen en dichas células presentadoras de antígeno. Específicamente, se estudiaron la hemocianina clásica, originaria de California y conocida como KLH, obtenida de *Megathura crenulata* y dos descubiertas más recientemente que corresponde a CCH de *Concholepas concholepas* y FLH de *Fissurella latimarginata*, especies que habitan las costa de nuestro país. Se propuso que las hemocianinas al ser incorporadas por las células presentadoras de antígenos, inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias, un evento fundamental para dar el inicio a una respuesta inmune. Para demostrarlo, cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos,

previamente caracterizados morfológicamente, fenotípicamente (F4/80<sup>+</sup>) y funcionalmente, fueron incubados con las distintas hemocianinas en concentraciones de hasta 1 mg/ml; LPS y medio de cultivo fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente. Posteriormente, se estudió la correlación entre los niveles de mRNA y los niveles de proteína de un panel de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias mediante dos tipos de PCR y ELISA, respectivamente.

Los principales resultados demuestran que: **1.** Las hemocianinas fueron fagocitadas por los macrófagos peritoneales cultivados *in vitro*. Sin embargo, FLH y KLH estimularon más tempranamente que CCH el aumento en la expresión de quimioquinas claves en la extravasación de leucocitos, tales como MIP-1 $\alpha$  (CCL-3), KC (CXCL-1) y LIX (CXCL-5), las cuales son indicativas de un proceso inflamatorio agudo. **2.** Las hemocianinas estimularon la expresión de IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$  en distintos tiempos e intensidades, como indican los resultados de RT-qPCR y ELISA, sugiriendo la inducción de mecanismos de señalización diferentes, cuya explicación es atribuible a las diferencias estructurales que presentan las hemocianinas entre ellas y especialmente, en aquellas que dicen relación con su composición de oligosacáridos. **3.** Las hemocianinas muestran la inducción de un perfil inmunológico Th1 marcado, al mantener reguladas a la baja citoquinas claves de la respuesta Th2, como son IL-4, IL-5, IL-13 y TGF- $\beta$ 2. Finalmente, los resultados presentados en esta tesis permiten concluir que los macrófagos también participan en los mecanismos inmunológicos tempranos que acompañan el reconocimiento de las hemocianinas, induciendo un ambiente proinflamatorio que puede explicar sus notables propiedades inmunomoduladoras en los mamíferos.

## ABSTRACT

Molluscan hemocyanins are huge glycoproteins capable of induce a potent Th1-dominant immune response, characterized by the secretion of IFN- $\gamma$ , when are inoculated in mammals. By this reason, they have been used as a carrier protein in the development of antibodies against haptens, as a carrier/adjuvant in therapeutics vaccines against pathogens and cancers and also, as non-specific immunostimulant in the immunotherapy of superficial bladder cancer. However, the immunological mechanisms involved in the early phases of the anti-hemocyanin immune response, that leads to its remarkable immunostimulatoryt effects, are scarcely known. Thus, it has been poorly addressed their effects on the communication network coordinated by cytokines, the proteins which mediate interactions between cells from the immune system. This information will allow expand the basic comprehension to understand its immunostimulatory effects, but also will contribute to new applications.

In this thesis, we proposed to examine the effects of three hemocyanins on murine peritoneal macrophages, as a model for understanding the earliest immune responses induced by these antigen presenting cells (APC). Specifically, we studied the classical hemocyanin, native from California and obtained from *Megathura crenulata*, known as KLH and two recently discovered hemocyanins, CCH collected from *Concholepas concholepas* and FLH from *Fissurella latimarginata*, both species natives of our coasts. It was proposed that once hemocyanins are incorporated by APC, would induce the expression of proinflammatory cytokines, a key event in the initiation of an immune response. To demonstrate this, in vitro cultures of murine peritoneal macrophages, previously characterized morphologically, phenotypically (F4/80<sup>+</sup>) and functionally, were incubated with hemocyanins in concentrations up to 1 mg/ml

for different times; as positive and negative control, LPS and culture medium were used, respectively. Subsequently, we studied the correlation between mRNA and protein levels from a panel of proinflammatory cytokines and chemokines using two types of PCR and ELISA, respectively.

The main results show that: **1.** Hemocyanins were endocytosed by peritoneal macrophages cultured *in vitro*, but only FLH and KLH and not CCH can induced an increased in the expression of key chemokines related to leukocyte extravasation, such as MIP-1 $\alpha$  (CCL-3), KC (CXCL-1) and LIX (CXCL-5), which are indicative of an acute inflammatory process. **2.** Hemocyanins stimulated the expression of IL-6, IL-12p40 and TNF- $\alpha$  at different times and intensities, as indicated by the results of RT-qPCR and ELISA, suggesting different signaling pathways of induction, which can be explained by structural differences between them, and specially those concerns to their oligosaccharides composition. **3.** Hemocyanins showed induction of a Th1-dominant immune profile, maintaining downregulated key Th2 cytokines such as IL-4, IL-5, IL-13 and TGF- $\beta$ 2. Finally, the results presented in this thesis, allow to conclude that macrophages are involved in the early phases of immune recognition of hemocyanins, inducing a proinflammatory milieu that may explain its enhanced immunomodulatory properties in mammals.

## INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son glicoproteínas de alto peso molecular que tienen la capacidad de transportar el oxígeno mediante su coordinación con iones  $\text{Cu}^{+1}$  que son oxidados a  $\text{Cu}^{+2}$ , lo que le da la coloración azulada característica<sup>1</sup>. Se encuentran en algunos moluscos y artrópodos, sin embargo a pesar que la proteína de ambos filos comparten el mismo nombre, han evolucionado de forma independiente y difieren enormemente en su tamaño, secuencia primaria y organización estructural<sup>2,3</sup>. Las hemocianinas de moluscos y específicamente las de algunos gastrópodos, tienen la capacidad de generar una poderosa respuesta inmunogénica cuando son administradas en mamíferos, propiedad que ha permitido utilizarlas en aplicaciones tanto biomédicas como biotecnológicas<sup>4</sup>.

Entre las hemocianinas más estudiadas y utilizadas en el área biomédica está KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*), derivada del molusco *Megathura crenulata*, residente en las costas de California. Esta metaloproteína ha sido utilizada como proteína *carrier* de sustancias químicas tales como 2,4-dinitrofenol (DNP) o 2,4,6-trinitrofenol (TNP), hormonas, péptidos, lípidos, polisacáridos y oligonucleótidos, con el fin de generar anticuerpos para su aplicación en el campo de la biomedicina. Otros usos relevantes se encuentran

relacionados con el desarrollo de vacunas experimentales profilácticas contra patógenos, como el virus de papiloma humano<sup>5</sup> o influenza<sup>6</sup> y también vacunas terapéuticas o antitumorales contra melanomas<sup>7,8</sup>, cáncer de próstata<sup>9,10</sup> y contra linfomas y mielomas<sup>11</sup>. No obstante la aplicación más llamativa es su uso como inmunoestimulante no específico por más de 40 años, por sí sola, es decir en ausencia de adyuvantes, en la terapia contra el carcinoma superficial de vejiga (CSV), como alternativa al tratamiento con *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)<sup>12</sup>. Además, hoy se utilizan como adyuvantes en vacunas de células dendríticas cargadas con extractos tumorales para inducir la activación de linfocitos T citotóxicos contra el tumor<sup>13</sup>. Otra hemocianina denominada CCH, descubierta y estudiada por nuestro laboratorio, proveniente del molusco *Concholepas concholepas*, comúnmente conocido como Loco, posee propiedades inmunológicas comparables a KLH<sup>14,15</sup> siendo una buena alternativa como proteína *carrier*<sup>16</sup>, en vacunas experimentales<sup>17</sup> y en el tratamiento contra CSV<sup>18</sup>, no obstante poseer un origen filogenético distinto a la Lapa californiana y tener una organización cuaternaria distinta<sup>15</sup>. Esto último nos ha llevado a postular que entre las hemocianinas existe un patrón conservado que es reconocido por el sistema inmune de mamíferos<sup>18</sup>. Además, recientemente nuestro laboratorio ha descubierto otra hemocianina denominada FLH, proveniente del gastrópodo *Fissurella latimarginata*, comúnmente llamada Lapa negra, perteneciente a la misma familia de la Lapa Californiana (*Fissurellidae*), a diferencia de CCH (*Muricidae*) y que de acuerdo a ensayos en

varias cepas de ratones muestra tener una mayor inmunogenicidad en comparación a KLH y CCH<sup>19</sup>.

## 1. Estructura de las hemocianinas de moluscos

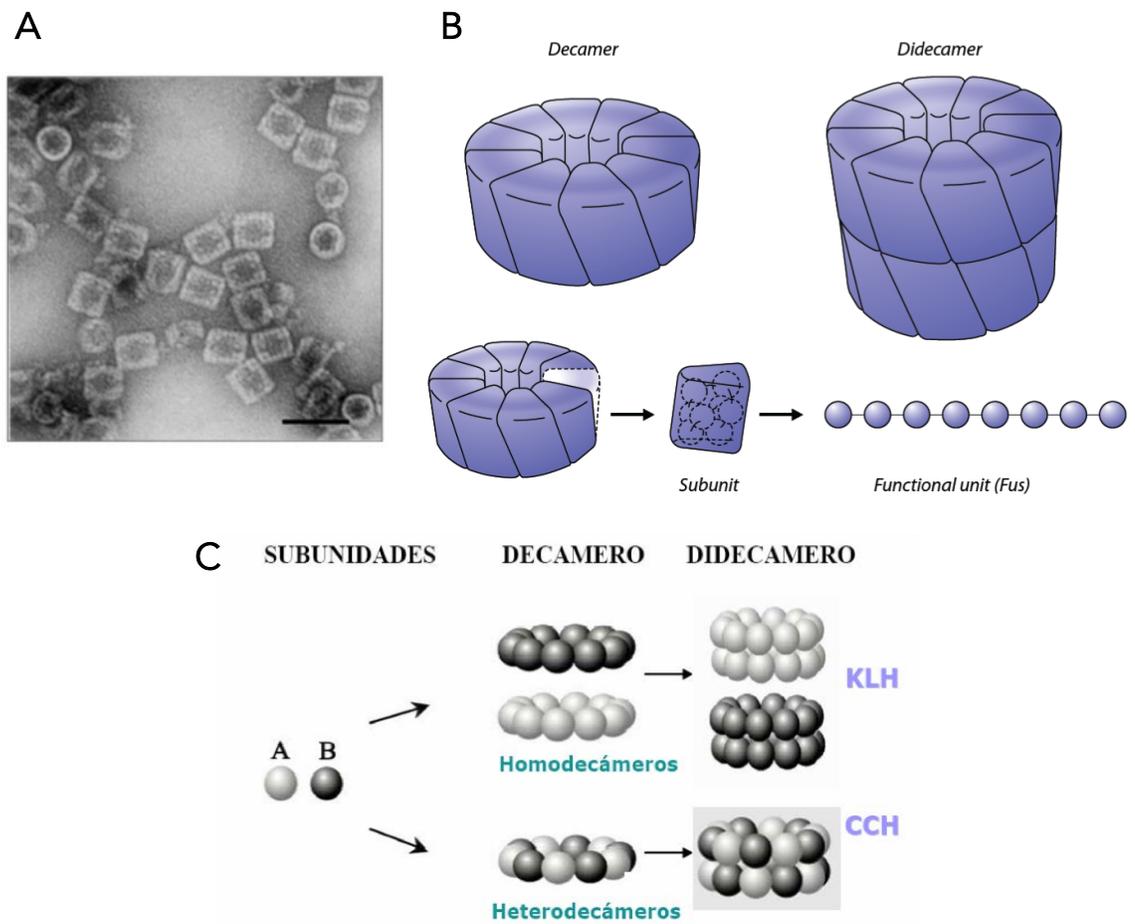
Las hemocianinas de moluscos tienen forma de cilindro hueco (**Figura 1A**); cuya estructura básica es un decámero que, como su nombre indica, está formado por 10 cadenas polipeptídicas o subunidades de 350 a 450 kDa; cada una de ellas a su vez está compuestas por 7 a 8 dominios globulares denominados unidades funcionales (FU) de 45 a 50 kDa<sup>1,20</sup> (**Figura 1B**). Cada cadena polipeptídica toma la conformación de un collar de perlas al unir cada FU mediante un péptido *linker* de 10 a 15 aminoácidos, y en su conjunto, los decámeros pueden llegar a una masa molecular de alrededor de 3,5 a 4,5 MDa. Dependiendo de la especie, estos decámeros se pueden asociar en didecámeros llegando a una masa molecular de 8 MDa como ocurre en gastrópodos, gracias a una interacción estable cara-cara asimétrica entre ellos que se puede observar mediante microscopía electrónica de transmisión (**Figura 1A**). Cada FU tiene la capacidad de unir 2 átomos de cobre que coordinan una molécula de O<sub>2</sub>, lo que le da la coloración azulada característica al pasar el cobre desde el estado de oxidación Cu<sup>+1</sup> a Cu<sup>+2</sup> <sup>15</sup>.

Como se mencionó anteriormente, la diferencia filogenética de los organismos desde donde provienen KLH y CCH también se refleja en su

estructura proteica. La primera se encuentra formada por dos subunidades denominados KLH1 y KLH2, de 390 y 360 kDa respectivamente, que se organizan en dos homodécimeros, es decir estructuras que contienen uno u otro tipo de subunidad, y, que a la vez se ordenan en un homodidécimero, estructura que es dependiente de la presencia de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  en el medio<sup>1,21</sup>. En tanto, CCH también se encuentra formada por dos subunidades, denominadas CCHA y CCHB, pero forman heterodidécimeros<sup>22</sup> (**Figura 1C**), esto es que contienen ambos tipos de subunidades entremezcladas, siendo una estructura estable en soluciones carentes de iones divalentes<sup>15</sup>. Las subunidades de CCH comparten epítomos entre sí de acuerdo a estudios con anticuerpos monoclonales<sup>14</sup>, a diferencia de las subunidades de KLH, que no presentan epítomos comunes. Por otro lado, FLH, está formada por un solo tipo de subunidad y los didécimeros que forman dependen de iones divalentes para preservar su estructura cuaternaria<sup>19</sup>.

Además de constituir un excelente modelo de estudio de proteína en bioquímica, debido a su complejidad estructural, múltiples estados de agregación y capacidad para fijar oxígeno mediante átomos de cobre, las hemocianinas poseen diversas aplicaciones biomédicas a modo de inmunoestimulante no específico como ya se mencionó anteriormente, efectos que han sido atribuidos a su tamaño molecular, presencia de oligosacáridos, xenogenicidad o complejidad cuaternaria. No obstante se ha demostrado para

CCH que ni el tamaño ni la complejidad estructural de la glicoproteína constituye un factor decisivo para generar sus efectos en el sistema inmune de mamíferos<sup>23</sup>. Asimismo, recientemente para esta misma proteína se ha demostrado que la presencia de residuos de carbohidratos tampoco serían causal de su inmunogenicidad, no así para FLH, donde estos residuos serían fundamentales para promover la secreción de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas mieloides murinas<sup>24</sup>. Para el caso de KLH, su acción antitumoral ha sido atribuida principalmente a su contenido de oligosacáridos<sup>21</sup>.



**Figura 1: Estructura de la hemocianina de moluscos.** **A:** Microscopía electrónica de transmisión de moléculas de CCH teñidas con tinción negativa<sup>3</sup>. Se observan moléculas vista desde arriba (círculos) y de lado (rectángulos) **B:** Organización de subunidades y unidades funcionales de hemocianinas de moluscos<sup>22</sup>. **C:** Diferencias en la organización cuaternaria entre CCH y KLH<sup>4</sup>. Dependiendo de especie de molusco, la hemocianina está conformada en homo o heterodidecámero.

## 2. Sistema inmune innato

El estudio de los mecanismos de defensa en mamíferos ante agentes patógenos y/o moléculas no propias (antígenos) ha llevado a establecer dos vías de respuesta: el Sistema Inmune Innato y el Sistema Inmune Adaptativo o Especializado. El reconocimiento de estas moléculas por el sistema inmune innato se encuentra mediado por receptores PRR (*Pattern-recognition receptors*), receptores no clonales codificados en la línea germinal y expresados en las células presentadoras de antígeno (APCs), los cuales tienen como blanco a estructuras asociadas a los patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) y a señales endógenas de daño (*Damage-associated molecular patterns*, DAMP). Por otro lado, la identificación de antígenos por parte del sistema inmune adaptativo está mediado por receptores cuyos genes recombinan de forma somática, generando de esta manera un repertorio diverso de reconocimiento. Estos receptores clonales se encuentran distribuidos entre los linfocitos T y B, de manera tal que cada linfocito expresa receptores específicos para un solo antígeno y se expanden de manera selectiva frente a su blanco, lo cual constituye la base de la memoria inmunológica<sup>25</sup>. En suma, estas diferencias constituyen la clave del éxito del sistema inmune en la defensa ante las amenazas tanto externas como internas, por lo que es vital la coordinación de estos dos tipos de respuestas, evento donde las células presentadoras de antígenos en conjunto con las citoquinas juegan un rol fundamental en el proceso denominado Presentación Antigénica.

## 2.1. Presentación antigénica y células presentadoras de antígenos

La activación del sistema inmune adaptativo es llevado a cabo por el reconocimiento de péptidos presentados por células APC en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y MHC II). En este último caso, las células presentadoras de antígenos internalizan proteínas exógenas, las cuales son procesadas mediante enzimas proteolíticas llamadas catepsinas dentro del lisosoma<sup>26</sup>, lugar donde también ocurre la asociación de estos fragmentos proteicos con las moléculas de MHC II. No obstante, entre los diferentes tipos de células APC, que incluyen **células dendríticas**, **macrófagos** y **linfocitos B**, difieren en su capacidad proteolítica, lo cual hace que algunas sean más adecuadas para presentar antígenos ante linfocitos T. Una menor capacidad de degradación lisosomal permite que la célula pueda conservar los antígenos por más tiempo, hasta que llegue a los órganos linfoides; además de permitir una mayor formación complejos péptido-MHCII (pMHC II)<sup>27</sup>. Sin embargo, este no es el único factor que influye en el procesamiento y presentación antigénica, para el caso de las hemocianinas de moluscos, se ha demostrado que tanto en las células dendríticas<sup>28,29</sup> como en los macrófagos<sup>30</sup> murinos, el procesamiento de estas proteínas es lento al comprobar la existencia de fragmentos proteicos hasta 120 horas después de su incorporación *in vitro*, debido posiblemente a su gran tamaño y complejidad estructural.

Dentro de la familia de células presentadoras de antígeno, los linfocitos B, tienen un rol de presentación antigénica más relacionado con su función secretora de anticuerpos que promover la respuesta en linfocitos T<sup>27</sup>. Por otra parte, los macrófagos son células fagocíticas consideradas células prototipo de APC, derivadas de la extravasación de monocitos desde sangre periférica a tejidos linfoide y no linfoide<sup>31</sup>. Expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y II, moléculas coestimuladoras como CD86, siendo estos inducibles cuando son activados por citoquinas proinflamatoria o productos bacterianos, aunque no a niveles comparables con las células dendríticas, lo cual explicaría parcialmente porque son menos eficientes en la presentación antigénica y estimulación de células T en comparación a los linfocitos B y células dendríticas<sup>27</sup>. De acuerdo al tipo de estimulación, la activación en macrófagos se puede dividir en dos clases: la primera denominada activación clásica, inducida por la exposición a IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , o a inductores tales como ligandos de receptores tipo Toll (TLRs), lipopolisacárido, peptidoglicano y señales endógenas como HSP de 60 y 72 kDa<sup>32,33</sup>. Los macrófagos activados de esta manera, denominados M1, tienen la capacidad de detonar mecanismos efectores: muerte de parásitos intracelulares, lisis de células tumorales, producción y secreción de interleuquinas (IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , entre otros), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON) y cambios fagolisosomales<sup>34,35</sup>. Un segundo grupo de macrófagos activados de manera “alternativa”, denominados M2, comparten propiedades

funcionales generalmente involucradas en respuestas de linfocitos Th2, como inmunorregulación y remodelamiento de tejidos. Esto incluye a tres subtipos: M2a, cuando son estimulados con IL-4 e IL-13; M2b, a la exposición frente complejos inmunes y agonistas de TLRs; y M2c, cuando son inducidos por IL-10 y hormona glucocorticoide<sup>34</sup>.

Junto a los macrófagos, las células dendríticas (DC) son los principales reguladores de la respuesta temprana del sistema inmune. Las DCs corresponden a una población heterogénea de células que puede ser dividida en dos grandes poblaciones: Una compuesta por células no linfoides migratorias y células residentes en órganos linfoides, como las células de Langerhans y las DCs de bazo, respectivamente. Una segunda población se encuentra representada por las células dendríticas plasmocitoides que expresa constitutivamente MHC de clase II, pero carece de la mayoría de los marcadores de linaje como CD-11c, no presentan CD-11b en su superficie celular y expresa bajos niveles de CD45RA/B220 y Ly6C/GR-1<sup>36</sup>. De las dos poblaciones, la primera cumple dos funciones primordiales correspondiente a la mantención de la tolerancia inmunitaria y la inducción de respuesta inmune específica contra patógenos; en tanto que la función principal de las DCs plasmocitoides es la secreción de IFN- $\alpha$  en respuesta a infecciones virales, y la de estimular células T ante antígenos virales<sup>37,38</sup>. Las células dendríticas poseen una estrecha relación con el sistema inmune adaptativo dado que

cumple el papel de puente con el sistema inmune innato al presentar en forma eficiente péptidos procesados en el marco de moléculas MHC I o II, rol esencial en el desarrollo de la inmunidad celular y humoral.

## 2.2. Células presentadoras de antígeno y hemocianinas

Las hemocianinas corresponden a antígenos timo dependientes, en otras palabras, dado su origen proteico, necesitan de la cooperación de células T para la generación de anticuerpos, por esto es fundamental el papel que cumplen las APCs en su presentación antigénica y en la iniciación del efecto inmunoestimulante no específico que ellas inducen por sí solas cuando son inoculadas en mamíferos. Dentro de este marco, se ha estudiado intensamente su efecto en las células dendríticas, como por ejemplo la capacidad proteolítica que ellas presentan frente a CCH<sup>24,28</sup> y la activación celular *in vitro* de células murinas o humanas con resultados controvertidos<sup>24,28,39,40</sup>. No obstante ello, su aplicación en vacunas de células dendríticas con el fin de producir células T reactivas contra tumores está ampliamente documentada<sup>4,8,13,41-44</sup>, a pesar que se conoce poco sobre los mecanismos con los cuales estimula el sistema inmune.

### 3. Mediadores del sistema inmune: Citoquinas y quimioquinas

Como se ha expuesto anteriormente, las células presentadora de antígeno juegan un rol pivotal al ser mediadoras entre ambos tipos de respuesta inmune, labor que es mediada por proteínas denominadas citoquinas o citocinas, que son moléculas que permiten comunicación y coordinación entre las células del sistema inmune y algunas células que no siéndolo, expresan receptores para ellas. Las citoquinas se producen en respuesta a microorganismos y a otros antígenos y, diferentes citoquinas, estimulan diferentes respuestas en las células que participan en la inmunidad y en la inflamación<sup>45</sup>. Su acción con frecuencia es pleiotrópica y redundante, esto se evidencia en que existen más citoquinas que receptores para ellas<sup>46</sup>. Además mucho de estos receptores comparten elementos estructurales, por lo que ciertas citoquinas tienen más afinidad hacia un receptor que hacia otro.

En el presente trabajo se describirán algunas citoquinas relevantes para la investigación propuesta, las cuales se relacionan principalmente con el proceso de la inflamación temprana que ocurre en el encuentro primario de un antígeno con el sistema inmune. Una manera de clasificar las citoquinas es en base a sus acciones biológicas como mediadoras y reguladoras sobre el sistema inmune innato, adaptativo y estimulador de la hematopoyesis. En este último, las citoquinas son necesarias para mantener un normal desarrollo de la hematopoyesis y en ella participan los factores estimuladores de colonias

(CSF), que inducen la diferenciación y expansión de las células progenitoras de los distintos linajes celulares específicos. Ejemplo de estos son el *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) y el *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), citoquinas sintetizadas por linfocitos T activados, macrófagos, células endoteliales y células del estroma de la medula ósea que actúan sobre las células progenitoras con el fin de aumentar la producción de DCs, monocitos y neutrófilos. Para la diferenciación de los linfocitos se requiere la participación de una citoquina fundamental, IL-7, secretada por las células del estroma de numerosos tejidos que estimulan la supervivencia y la expansión de los precursores inmaduros comprometidos a los linajes de los linfocitos B y T. Además es esencial para la supervivencia de los linfocitos T *naïve* y los linfocitos CD4<sup>+</sup> de memoria<sup>47</sup>.

### 3.1. Citoquinas

Entre las citoquinas que regulan el sistema innato se puede mencionar el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que es un importante mediador de la respuesta inflamatoria aguda frente bacterias Gram negativas y otros microorganismos infecciosos. El principal origen celular de esta citoquina son los macrófagos, células dendríticas, linfocito T activados, células NK y mastocitos, y su función consiste en estimular la atracción de neutrófilos y monocitos hasta los focos de infección y activar estas células, lo cual realiza mediante la inducción de expresión de lectinas y ligandos de selectinas en la

células endoteliales vasculares. En forma análoga, la interleuquina 1 $\beta$ , otra citoquina proinflamatoria, inducida por citoquinas como TNF- $\alpha$  y productos bacterias como LPS, media la respuesta inflamatoria en forma local a bajas concentraciones, pero en grandes cantidades ejerce un efecto endocrino sistémico como fiebre y producción de neutrófilos y plaquetas por la médula ósea<sup>48</sup>. La IL-12 constituye un péptido formado por 2 subunidades de 35 (p35) y 40 kDa (p40) unidas por puentes disulfuro, cuya principal fuente son las células dendríticas. Su síntesis durante las reacciones inmunitarias innatas es gatillada por la activación de receptores TLR inducidos por estímulos bacterianos como LPS, infección por bacterias intracelulares (como *Listeria* y micobacterias) e infecciones virales. Además, los linfocitos Th mediante ligando de CD40 también son capaces de inducir la secreción de IL-12 en macrófagos y DCs. De esta manera la IL-12 secretada potencia las funciones citotóxicas de células NK activadas y linfocitos T CD8<sup>+</sup>, y estimula su secreción de IFN- $\gamma$  de manera tal que activen a macrófagos para que destruyan los patógenos fagocitados. Asimismo la presencia de esta interleuquina en conjunto al IFN- $\gamma$  direcciona hacia un perfil inmunológico del tipo Th1<sup>49</sup>. Esta importante citoquina ilustra el nexo comentado anteriormente entre los sistemas inmunes, donde las DCs juegan un rol fundamental.

La síntesis de citoquinas es una de las principales respuestas de los linfocitos T en el reconocimiento del antígeno, así la interleuquina-2 descrita

inicialmente como un factor de crecimiento de los linfocitos T, es sintetizada principalmente por las células T CD4<sup>+</sup>, inducida por el reconocimiento y las moléculas coestimuladoras. La acción biológica de IL-2 es favorecer la supervivencia y expansión clonal de los linfocitos T activados mediante la inducción de la proteína Bcl-2, proteína implicada en el bloqueo de la muerte celular. También favorece la progresión de los ciclos celulares al estimular el aumento de la síntesis de ciclinas y la degradación de la proteína p27, que media señales inhibitoria del crecimiento como la inhibición por contacto. Sin embargo su principal función no redundante es la supresión de los linfocitos T al ser necesaria la diferenciación de los linfocitos T reguladores, ayudando de esta manera a la supresión de la respuesta inmunológica frente a antígenos propios<sup>50,51</sup>. La estimulación de IL-2, induce la secreción de otra citoquina denominada IFN- $\gamma$  o IFN tipo II, característica del perfil inmunológico Th1 y principal activador de macrófagos; es sintetizada por células NK, linfocitos Th1 CD4<sup>+</sup> y linfocitos T citotóxico (LTC). Entre sus funciones está la polarización del ambiente de citoquinas hacia respuesta Th1 al favorecer la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a la subpoblación Th1 e inhibiendo la diferenciación de los linfocitos Th2 mediante la síntesis del factor transcripcional T-bet. Además actúa sobre los linfocitos B favoreciendo el cambio de subclases de IgG, fundamentalmente IgG2a, e inhibiendo el cambio a los isotipos dependientes de IL-4, como IgE e IgG1. Otras funciones incluyen la estimulación de expresión de MHC en células presentadora de antígenos, activación de los macrófagos y

aumento de la actividad microbicida al inducir la transcripción de genes de las enzimas oxidasa y óxido nítrico sintasa<sup>52</sup>.

### 3.2. Quimioquinas

Por otra parte, las quimioquinas son una extensa familia de citoquinas estructuralmente homólogas, entre 8 a 12 kDa, que estimulan el movimiento de los leucocitos y regulan la migración de estos desde la sangre hacia los tejidos. En el ser humano existen alrededor de 50 quimioquinas agrupadas en 4 familias, las cuales se clasifican en relación a la cantidad de residuos de cisteínas que poseen y a cuantos aminoácidos (X) se encuentran separados los primeras dos cisteínas: 1) Quimioquinas C, 2) Quimioquinas CC, 3) Quimioquinas CXC y 4) Quimioquinas CX<sub>3</sub>C. Diferentes quimioquinas actúan sobre diferentes células y lo hacen mediante unión a receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteína G, por ejemplo CCL-11 (eotaxina) actúa principalmente sobre los eosinófilos, mientras que CXCL-9, CXCL-10 y CXCL-11, actúan sobre los linfocitos Th1. Cabe destacar, que en función de su capacidad de reclutar monocitos al sitio de injuria o infección por microorganismos, se pueden agrupar a las quimioquinas CCL-2, 7, 8 y 13. Estas también son capaces atraer a basófilos y eosinófilos por lo que se los relacionan a reacciones alérgicas<sup>45</sup>. La expresión de quimioquinas es parte integral del sistema inmune innato y en una respuesta de inflamación su secreción ocurre luego del reconocimiento por parte de PRR y la liberación de

las primeras citoquinas proinflamatorias como IL-1. De esta manera constituye un nexo entre la detección de patógenos y la infiltración a los tejidos de neutrófilos y monocitos.

#### 4. Planteamiento del problema

Las hemocianinas de moluscos como moléculas poseen características interesante para el estudio de la bioquímica de proteínas. Como inmunoestimulante no específico despierta interés su uso como herramienta biotecnológica en terapias antitumorales, no obstante aún hay poco conocimiento sobre los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos en el sistema inmune de mamíferos. La alta presencia de carbohidratos en su estructura llevó a que nuestro laboratorio postulase la implicancia de un receptor tipo lectina que reconocería estos azúcares y estaría jugando un rol importante en su procesamiento y en la activación de APCs, hecho que sería efectivo para FLH, pero no para CCH<sup>24</sup>.

Es conocida la capacidad de KLH y CCH de producir y dirigir una respuesta inmunológica de perfil tipo Th1<sup>18,53-55</sup>, pero la activación de APCs claves en la coordinación de este tipo de respuesta es controversial<sup>24,28,39,40</sup>. Por lo tanto para una mejor comprensión y de esta manera aprovechar mejor las propiedades de las hemocianinas, es imprescindible conocer de qué manera éstas colosales proteínas inician la respuesta inmune. Una forma de abordar

esto es estudiando el cambio en el tráfico de moléculas esenciales en la comunicación entre células del sistema inmune, como son las citoquinas y quimioquinas, sobretodo al considerar que el dogma actual de la inmunología indica que cualquier señal de peligro comienza con una señal de inflamación. Lo cual constituye una investigación nunca antes realizada y que corresponde a la propuesta de este trabajo.

## HIPÓTESIS

Con el propósito de conocer como las hemocianinas inician la respuesta inmune y con el conocimiento de que en ello las células presentadoras de antígenos son fundamentales, se propone en esta tesis que:

**Las hemocianinas de moluscos gastrópodos al ser incorporadas por células presentadoras de antígeno, son capaces de inducir la expresión citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, evento que es crucial en su efecto inmunoestimulante no específico en mamíferos.**

### 1. Objetivo general

Determinar la cinética de expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatoria en células dendríticas y/o macrófagos murinos cultivados *in vitro*, en respuesta al tratamiento con las hemocianinas CCH, KLH y FLH.

### 2. Objetivos específicos

2.1. Estandarización de las condiciones de incubación de las hemocianinas modelo con células presentadoras de antígeno *in vitro*.

- 2.1.1. Establecer y caracterizar cultivos de macrófagos y células dendríticas de origen murino derivadas de células precursoras de médula ósea mediante microscopía de luz y electrónica de transmisión, mediante citometría de flujo usando algunos marcadores fenotípicos característicos (CD11c, MHCII, CD80, CD86, CD40 y F4/80).
- 2.1.2. Utilizando partidores específicos para un conjunto acotado de genes de citoquinas proinflamatorias características (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12p40), se evaluará su expresión por PCR en tiempo real en células incubadas durante diferentes tiempos y con diferentes concentraciones de las hemocianinas modelo. Se determinará la diferencia en el nivel relativo de mRNA con respecto a dos genes constitutivos (b-actina y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, GAPDH). El análisis se hará mediante el método  $\Delta\Delta C_t$ . Como controles se utilizarán mRNA de células presentadora de antígeno incubadas con LPS (control positivo) y con medio de cultivo solo (control negativo).
- 2.2. Estudiar mediante PCR-Array los niveles de mRNA relativos de los genes que codifican para un panel de 84 citoquinas y quimioquinas centrales de la respuesta inmune, en macrófagos inducidos en

presencia de CCH, KLH y FLH, utilizando el método del  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , en las condiciones que resulten de mayor interés en el punto 2.1.

- 2.3. Evaluar la secreción de algunas citoquinas y quimioquinas solubles identificadas en el punto 2 mediante ELISA, desde cultivos de macrófagos incubadas con CCH, KLH y FLH en las condiciones previamente establecidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales biológicos

- 1.1. Hemocianinas: Hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH; en tampón PBS) y *Fissurella latimarginata* (FLH; en tampón PBS), fueron obtenidos desde la hemolinfa de dichos moluscos de acuerdo a lo establecido por Hercowitz *et al.*<sup>56</sup>, y modificado por De Ioannes *et al.*<sup>15</sup> y Espinoza<sup>19</sup>, respectivamente, bajo condiciones estériles, libre de pirógenos (endotoxinas). En tanto, la hemocianina de *Megathura crenulata* (*Keyhole limpet hemocyanin*, KLH; reconstituido en PBS), fue adquirida en Thermo Scientific (USA).
  
- 1.2. Animales de experimentación: Ratones de la cepa C57BL/6J (H-2k<sup>b</sup>) de 8 a 12 semanas de edad fueron adquiridos a Facultad de Odontología, Universidad de Chile y mantenidos en un área resguardada con control de acceso, entre 22-24°C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 horas cada uno agua y alimento *ad libitum* de acuerdo a la consideraciones bioéticas de mantenimiento y manipulación exigidas por CONICYT.

- 1.3. Cepas bacterianas para clonamiento: Cepas de bacterias *E. coli*, DH5 $\alpha$  (Invitrogen, USA) y NovaBlue (EMD4 Bioscience, USA; gentilmente donadas por la Dra. Ilse Müller, GrupoBios, Chile), fueron utilizadas para el clonamiento de productos de PCR de interleuquinas y genes *housekeeping*.

## 2. Reactivos

- 2.1. Citometría de flujo: Se utilizaron los anticuerpos anti-CD11c-PE, anti-CD11c-PerCP, anti-CD11c-FITC, anti- I-A<sup>b</sup>(MHC II)-FITC, anti-H-2Kb(MHC I)-FITC, anti-CD40-FITC y anti-33D1-F4/80-Alexa Fluor<sup>®</sup>647 que fueron adquiridos a BD Pharmingen (USA); en tanto que los anticuerpos anti-F4/80-Alexa Fluor<sup>®</sup>647 fueron adquiridos a Biolegend (USA).
- 2.2. Cultivo celular: Se usaron los siguiente reactivos obtenidos de Gibco (USA), medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), Piruvato de sodio 100 mM (100x), Aminoácidos no esenciales (100x, MEM NEAA). El suero fetal de bovino caracterizado (SFB) fue obtenido de Hyclone (USA). Medio de cultivo RPMI 1640 con 25 mM de HEPES fue adquirido a Hyclone (USA). Además, factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos recombinante murino (rGM-CSF) 10 ug fue

obtenido de BD Pharmingen (USA). En tanto que penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y L-glutamina (2 mM) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (USA). LPS de *E. coli* tipo 0111.B4, 100 ng/mL (Sigma-Aldrich, USA). Agua libre de pirógenos (Baxter, USA).

- 2.3. Clonamiento de productos de PCR: Los siguientes kit fueron utilizados, MiniElute (QIAGEN, USA), kit QIAprep Miniprep (QIAGEN, Alemania) y el kit pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA). Ampicilina 100 mg/mL, XGal 20 mg/mL e IPTG 0,1M. Agua libre de nucleasas (Promega, USA). Isopropanol, grado biología molecular (Sigma, USA).
- 2.4. Electroforesis: Para la tinción de las bandas se usó GelRed (Biotium, USA). Para los geles se utilizó agarosa obtenido de Invitrogen (USA).
- 2.5. Reacción de RT-PCR convencional y en tiempo real: Los siguientes kit fueron adquiridos a QIAGEN (Alemania), RNeasy mini kit, Sensiscript RT kit y Top Taq Polymerase.
- 2.6. PCR-Array: Los kits necesarios fueron adquiridos a QIAGEN (Alemania), RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays - Cytokines & Chemokines PCR Array, RT<sup>2</sup> First Strand Kit y RT<sup>2</sup> qPCR Master Mixes. Removedor de contaminantes de material genético y nucleasas UltraClean® Lab Cleaner (MOBIO, USA).

- 2.7. Reacción de ELISA: Los kits cuantitativos DuoSet® ELISA Development Systems para IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12p40 comprados a R&D Systems (USA). En tanto que 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate fue obtenido de Thermo (USA).
- 2.8. ELISA-Array: El servicio de análisis de sobrenadante por ELISA-Array fue solicitado a la empresa Eve Technologies (AL, Canadá).
- 2.9. Oligos para las reacciones de PCR: Los partidores utilizados para las reacciones de RT-PCR y RT-qPCR fueron fabricado a pedido por la empresa Eurofins MWG Operon (USA).

### 3. Soluciones

- 3.1. Microscopía electrónica de transmisión:
- Solución de fijación: glutaraldehído al 3% en tampón de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.
- 3.2. Citometría de flujo:
- Solución de tampón fosfato salino (PBS) suplementado con SFB al 2%.

- Solución de tampón fosfato salino (PBS) suplementado con p-formaldehído al 2%.

### 3.3. Obtención de macrófagos peritoneales y células de médula ósea murina:

- ❖ Todas las soluciones fueron preparadas con agua libre de pirógenos.
  - Solución de tioglicolato (para 1 litro): caseína 15 gr., extracto de levadura 5 gr., NaCl 2,5 gr., L-cisteína 0,5 gr., tioglicolato de sodio 0,5 gr., agar, 0,75 gr., dextrosa 5,5 gr., resazurina 1 mg, glucosa 5,5 gr.; autoclavado 2 veces y conservado protegido de la luz por al menos 3 meses.
  - Solución de tampón fosfato salino – PBS (100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7,2; Thermo, USA).
  - Solución de KCl al 0,88% para lisis de eritrocitos.

### 3.4. Cultivo celular:

- ❖ Todas las soluciones fueron preparadas con agua libre de pirógenos.
  - Medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina (100 U/ml) al 1%, estreptomicina (100 mg/ml) al 1%, L-glutamina (2 mM) al 1%, SFB caracterizado descomplementado al 10%.
  - Medio de cultivo RPMI suplementado con penicilina (100 U/ml) al 1%, estreptomicina (100 mg/ml) al 1%, L-glutamina (2 mM) al 1%, SFB

caracterizado descomplementado al 10% y rGM-CSF de ratón (20 ng/mL final).

- Solución de ATP 500 mM.

### 3.5. Electroforesis:

- Solución tampón TAE (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3; Sigma, USA).
- Solución tampón MOPS (0,2 M MOPS, 0,05 M acetato, 0,01 M EDTA, pH 7-7,2).

### 3.6. Clonamiento de productos de PCR:

- Medio de cultivo autoclavado Base Luria Broth (LB) 20 g/L (peptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 5 g/L).
- Solución autoclavada de CaCl<sub>2</sub> 0,1M.
- Solución autoclavada de glicerol al 20%.
- Solución de etanol al 70%.

### 3.7. Reacción de ELISA:

- Solución de PBS-caseína 1%-azida 0,05%.
- Solución de PBS-TWEEN al 0,02%.
- Solución de ácido sulfúrico 2N.

## 4. Equipos

### 4.1. Área de cultivo celular:

- Microscopio Electrónico Philips TECNAI 12 Bio Twin (Philips, Holanda), Microscopio de Contraste de Fase ELWD 0.3 (Nikon, Japón), Cámara de Neubauer (Fisher Scientific, USA).
- Campana de flujo laminar (Clean Room Products Inc., USA).
- Centrífuga refrigerada Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Alemania).
- Microcentrífuga 5417C (Eppendorf, Alemania).
- Esterilizador Steri 250 (Keller, Suiza).
- Propipeta eléctrica Powerpette Plus (Jencons, UK).
- Estufa de cultivo de células con regulación de temperatura y CO<sub>2</sub> (Nuaire, USA).

### 4.2. Área de microbiología:

- Soplete portátil Providus
- Shaking Incubator HZQ-X100A (China)
- Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instrument, USA).

4.3. Área de biología molecular:

- Termociclador Rotor Gene Q 100 (QIAGEN, Alemania).
- Fuente de poder 3000P (Thermo Electron Corporation, USA).
- Cámara de electroforesis vertical (Biorad, USA).
- Termociclador PTC-200 Peltier Thermal Cyclers (MJ Research, USA).
- Sellador Rotor-Disc heat sealer (QIAGEN, Alemania).
- Transiluminador UV ECX-20.M (Vilber Lourmat, Francia).
- Espectrofotómetro Lambda 25 (PerkinElmer, USA).

4.4. Otro equipos:

- Balanza granataria eléctrica (Sartorius, Alemania).
- pHmetro Orion 3 start (Thermo Electron Corporation, USA).
- Agitador magnético termorregulado Nuova II (Thermolyne, USA),  
Agitador magnético termorregulado Nuova (Thermolyne, USA),  
Agitador magnético termorregulado Equilab (Velp Scientifica, Italia).
- Vortex Type 37600 Mixer (Thermolyne, USA).
- Lector de ELISA 7520 con filtros de absorción a 405 nm, 450 nm,  
480 nm, 570 nm y 600 nm (Cambridge Technology Inc., USA).
- Micropipetas 20, 100, 200, 1.000, 10.000 µl (Gilson, Francia; Axygen  
USA), Multicanales 10, 100 µl (Costar, USA).
- Cámara Digital Nex-C3 16 Megapixels (Sony, Japón).
- Vitrina Refrigerada (Mimet, Chile), Refrigerador (Fensa, Chile).

## 5. Servicios

- 5.1. Síntesis de partidores para PCR: Los experimentos de RT-PCR y RT-qPCR se utilizaron partidores encargados a la empresa Eurofins MWG Operon (USA) [www.operon.com](http://www.operon.com).
- 5.2. Cuantificación de citoquinas y quimioquinas: La medición de citoquinas y quimioquinas del sobrenadante de los cultivos de macrófagos mediante una plataforma citometría y ELISA paralelamente fue encargada a la empresa Eve Technologies (Canadá) [www.evetechologies.com](http://www.evetechologies.com).
- 5.3. Análisis de glúcidos de hemocianinas: El estudio del perfil de N- linked y O –linked oligosacáridos en CCH, FLH y KLH mediante espectrometría de masas MALDI-TOF fue encargada a la empresa Glyco Solutions (USA) [glycosolutions.com](http://glycosolutions.com).

## 6. Métodos

### 6.1. Estandarización de los cultivos primarios de células presentadoras de antígeno e incubación con hemocianinas

6.1.1. Extracción de macrófagos peritoneales: Células del peritoneo de ratones C57BL/6J de 8 a 12 semanas de edad, fueron extraídas de acuerdo a lo descrito por Arancibia<sup>24</sup> utilizando una solución de tioglicolato. Brevemente, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y de inmediato se lavó suavemente la cavidad intraperitoneal con 6 mL de PBS estéril para extraer las células libres y evitando el rompimiento de vasos sanguíneos. En seguida, la solución con células se centrifugó a 1.500 rpm por 10 min a 25°C, se descartó el sobrenadante y se agregó solución de lisis (0,88% KCl) para eliminar los eritrocitos. Para detener la lisis se agregó un volumen de medio DMEM suplementado y luego se centrifugó y resuspendió las células en medio DMEM suplementado (10% de SFB descomplementado, 1% de aminoácido no esenciales, 1% de L-glutamina y 1% de penicilina-estreptomicina) para su conteo en una cámara de Neubauer. La selección de los macrófagos se realizó mediante su propiedad de adherencia al material plástico de la placa cultivo, para lo cual se sembraron en placas de Petri de

cultivo en medio DMEM suplementado por 1 hora y posteriormente, se lavaron con PBS estéril.

6.1.2. Incubación de macrófagos con hemocianinas de moluscos: Para determinar la concentración óptima de hemocianina, se realizó una curva de dosis respuesta con las hemocianinas modelo en un rango de 100, 500 y 1000 µg/mL por 24 horas. La incubación se realizó en una estufa de cultivo a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad. Como control positivo, las células se estimularon con LPS de *E. coli* tipo 0111.B4 y LPS más ATP (5 mM). Como control negativo se utilizó medio de cultivo suplementado.

6.2. Citometría de flujo: Macrófagos peritoneales sin tratar y tratados con LPS y las diferentes hemocianinas (FLH, CCH y KLH) durante tiempos pre-definidos para cada condición, fueron recolectados de cada pozo de cultivo con PBS, centrifugados a 2.000 rpm por 7 min y resuspendidos en PBS suplementado con SFB al 2%. Posteriormente, se incubó por 30 minutos a 4°C y en oscuridad con el anticuerpo anti-CD de interés diluido 1:200 (anti-CD11c, anti-CD86, anti-CD80, anti-Mouse MHC clase II (I-A<sup>b</sup>), anti-F4/80, anti-CD40 y anti-33D1). Luego las células se lavaron con PBS dos veces, centrifugando a 2.000 rpm por 7 min y lavando el pellet con PBS suplementado con SFB al 2%. Para fijar las células, se

agregó PBS-p-formaldehído al 2% a 4°C en oscuridad; posteriormente, esta misma solución se utilizó para mantener las células hasta el momento de su lectura en el citómetro de flujo. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro FACSort de Becton Dickinson (Servicio de Citometría de Flujo, dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y analizadas usando el programa Weasel (<http://tiny.cc/4ot35w>). Como controles se utilizaron células sin tratar y tratadas con LPS sometidas a todo el procedimiento pero sin los anticuerpos anti-CD.

- 6.3. Microscopía electrónica de transmisión: Cultivos de macrófagos incubados con y sin CCH según el procedimiento descrito por Arancibia<sup>24</sup> durante 10 y 60 min fueron lavados 2 veces con PBS y se agregó directamente a la placa el fijador (3% de glutaraldehído en tampón 0.1M cacodilato, pH 7,4) y luego de 2 a 3 minutos se removieron cuidadosamente las células con una espátula de teflón. La suspensión de células se centrifugó 5 minutos a 5.000 rpm y los pellet fueron procesados en la Unidad de Microscopía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Allí, las muestras fueron post-fijadas con OsO<sub>4</sub>, deshidratadas con concentraciones crecientes de acetona y embebidas en una resina de Epon (Poliscience, USA), de acuerdo a Luft *et al.*<sup>57</sup>. Luego, la resina se polimerizó a 60°C durante 48 h y se realizaron cortes finos de 400-

500 Å de grosor. Los cortes se recogieron en grillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en 50% metanol durante 1-5 min; se lavaron con 50% etanol frío y luego, se tiñeron con citrato de plomo de acuerdo al método descrito por Reynolds *et al.*<sup>58</sup>. Finalmente, se lavaron con agua destilada y se observaron en un microscopio electrónico Phillips Tecnai 12 a 80 KV.

#### 6.4. Electroforesis

6.4.1. Gel de agarosa en tampón tris acetato-EDTA (TAE): Se realizó geles de agarosa al 2% en tampón TAE (40 mM Tris acetato, 1 mM EDTA, pH 8.3; Sigma, USA) para visualizar DNA. Las condiciones de corridas fueron 75 minutos a 90V y su visualización se realizó mediante el uso del agente intercalante GelRed en presencia de luz UV.

6.4.2. Gel de agarosa-formaldehído en tampón ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS): Para comprobar la integridad y calidad de RNA extraídos, se realizaron geles de agarosa-formaldehído al 1% en tampón MOPS (0,2 M MOPS, 0,05 M acetato, 0,01 M EDTA, pH 7-7,2) de acuerdo a lo descrito por Southern<sup>64</sup>. Previamente se corrió el gel sin muestras a 70V por 20

minutos para eliminar impurezas y posteriormente, las muestras fueron corridas a 70V por 40 minutos. La visualización del material genético se realizó por medio del uso de bromuro de etidio en luz UV.

## 6.5. Clonamiento de productos de PCR

Con el fin de obtener estándares para las reacciones de PCR en tiempo real, se clonaron (en bacterias competentes DH5 $\alpha$  o NovaBlue) amplicones de PCR de los genes de las siguientes citoquinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12p40, IL-1 $\beta$ ,  $\beta$ -actina y GAPDH. Para ello, se purificaron los productos de PCR mediante el kit MiniElute y el kit pGEM $^{\circ}$ -T Easy Vector para el posterior clonamiento, todo de acuerdo a lo indicado por el fabricante.

6.5.1. Preparación de bacterias competentes: Pre-inóculos de bacterias DH5 $\alpha$  y NovaBlue fueron cultivadas, a partir del respaldo bacteriano guardado a -20 $^{\circ}$ C, en medio Base Luria Broth (LB) 20 g/L, incubando a 37 $^{\circ}$ C por toda la noche (16 horas), con agitación intensa (200 rpm/min.). Posteriormente, se tomó una alícuota de este cultivo saturado y se cultivó en caldo LB estéril hasta alcanzar una OD600 de 0,5-0,6. Luego se centrifugó el cultivo a 5.000 rpm por 10 minutos entre 0-4 $^{\circ}$ C y se resuspendió suavemente las

bacterias con una solución estéril y fría de  $\text{CaCl}_2$  0,1M. Se dejó en hielo durante 2 horas y seguidamente se centrifugó a 3.000 rpm por 10 min. Las bacterias competentes se resuspendieron en una solución estéril y fría de  $\text{CaCl}_2$  0,1M con glicerol al 20%, y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

6.5.2. Transformación bacteriana: Bacterias competentes se incubaron con alícuotas de ligación de vector con los distintos productos de PCR de interleuquina o gen *housekeeping* en hielo durante 30 minutos. Al cabo de esto, se sometieron a un shock térmico de 42°C por 90 segundos y 5 min en hielo. Luego, las células se cultivaron en medio líquido LB a 37°C y agitación intensa por 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a 10.500 rpm por 5 min y se sembraron en placas de agar LB con ampicilina 100 mg/mL, XGal 20 mg/mL e IPTG 0,1M. Las placas se dejaron incubando a 37°C por toda la noche.

6.5.3. Extracción de plasmidios: La obtención de plasmidios desde las bacterias transformantes se realizó mediante la utilización del kit QIAprep Miniprep con algunas modificaciones. Brevemente, se cultivó un pre-inóculo de bacterias transformantes en medio LB y ampicilina 100 mg/mL, a 37°C y con agitación intensa durante toda la noche. Posteriormente, procedió de acuerdo a lo indicado por el

fabricante, con la salvedad de utilizar 10 veces más de las soluciones contenidas en el kit. Se precipitó el material genético con 0,7 volúmenes de isopropanol. Se incubó a -20°C por 1 hora y se centrifugó a 11.000 rpm por 10 min. Se lavó el precipitado con una solución fría de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se descartó y se dejó secar el precipitado a temperatura de ambiente por 30 minutos. La resuspensión se realizó con agua libre de DNA/RNasa.

- 6.6. RT-PCR convencional y en tiempo real: Se adaptaron los procedimientos descritos por Barksby *et al.*<sup>59</sup> y Schmid *et al.*<sup>60</sup>. El RNA total fue extraído y purificado de BMDCs y macrófagos utilizando RNeasy mini kit (Qiagen, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El total de RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y su calidad fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa-formaldehído y teñido con bromuro de etidio y visualizados mediante luz UV. Para la síntesis de cDNA se tomó 100 ng de RNA total y se utilizó el reactivo Sensiscript RT kit de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Los niveles de mRNA de las siguientes citoquinas proinflamatorias fueron evaluadas mediante PCR convencional, utilizando partidores descritos en la literatura (véase Tabla 1): TNF- $\alpha$ <sup>61</sup>, IL-6<sup>62</sup>, IL-12p40<sup>63</sup> e IL-1 $\beta$ <sup>64</sup>. Se utilizaron dos genes *housekeeping* como

normalizadores: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa<sup>65</sup> y  $\beta$ -actina<sup>66</sup>. La validación de los partidores se realizó estudiando la diferencia del nivel de mRNA vistos en geles de agarosa al incubar las células con 100 ng/mL de LPS de *E. coli* tipo 0111.B4 (Sigma-Aldrich, USA) por 24 horas. Para la metodología de PCR convencional, se utilizó el kit de reacción Top Taq Polymerase. La metodología de PCR en tiempo real se basó en la amplificación de cDNA y la utilización de datos adquiridos por la incorporación del fluoróforo SYBERGREEN detectados por el equipo. El nivel de expresión de los genes fue evaluado mediante el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Brevemente, la cantidad de transcritos se normalizaron con los niveles de mRNA de genes *housekeeping* usando la siguiente fórmula:  $2^{-(Ct \text{ de citoquina o quimioquina} - Ct \text{ de gen } housekeeping)}$ . Para la determinación de valores relativos, el  $\Delta Ct$  fue normalizado con macrófagos no inducidos con hemocianina, usando la ecuación  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{grupo 2}) - \Delta Ct (\text{grupo 1})$ , de acuerdo a lo descrito en RT2 Profiler™ PCR Array System Handbook (SABIOSCIENCES, Alemania).

- 6.7. PCR-Array: Todos los mesones e instrumentos fueron descontaminados de cualquier material genético y nucleasas antes y después de cada procedimiento. Las reacciones se hicieron de acuerdo a lo indicado por el fabricante. Brevemente, por cada anillo de reacción se utilizó 1  $\mu$ g de RNA guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , el que fue sometido a reacción de transcripción

inversa (RT) con el kit RT<sup>2</sup> First Strand según instrucciones adjunta. Para cada réplica se hizo un reacción RT independiente. Posteriormente estos cDNA fueron guardados a -20°C y utilizados como material genético para las reacción de PCR en tiempo real del kit RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays - Cytokines & Chemokines PCR Array. El protocolo de PCR usado fue el sugerido por el fabricante.

- 6.8. Ensayos de ELISA y ELISA-Array: Para medir las citoquinas y quimioquinas de interés, se tomaron 40 µL de sobrenadante de medio de cultivo de macrófagos, tratados a diferentes tiempos de incubación con las hemocianinas. La concentración de citoquinas proinflamatorias fue medido utilizando los kits cuantitativos DuoSet® ELISA Development Systems para IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-12p40, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se activaron las placas de polietileno de 96 pocillos con 40 uL de anticuerpo de captura a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, los pozos en las placas fueron lavados con una solución de PBS-TWEEN al 0,02% y bloqueados con 100 uL de una solución de PBS-caseína 1%-azida 0,05% a temperatura de ambiente por 1 hora. Posteriormente, fueron lavados nuevamente e incubados con los sobrenadantes de los cultivos celulares por 2 horas a 37°C. Luego, se lavaron las placas una vez y se incubaron con el anticuerpo de detección a 37°C por 2 horas. Posteriormente, se lavó y se incubó

durante 37°C por 30 min con estreptavidina acoplada a la enzima HRP. Se lavaron las placas una vez y se agregó 40 uL de la solución 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate por 10-15 minutos. La reacción fue detenida con ácido sulfúrico 2N y la lectura se realizó a 450nm. Como control negativo y positivo se utilizó medio de cultivo o LPS (100 ng/mL), respectivamente. Las determinaciones de cada experimento se realizaron en triplicado. El servicio de análisis de ELISA-Array fue suministrado por la empresa Eve Technologies (Alberta, Canada). Se utilizó el ensayo Cytokine Array / Chemokine Array 32-Plex Panel para muestras de ratón que abarca las citoquinas: Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MIP-2, RANTES, TNF- $\alpha$  y VEGF. Las muestras (160  $\mu$ L por condición) fueron debidamente rotuladas y enviadas de acuerdo a las condiciones indicadas por el empresa, conservando la cadena de frío en todo el trayecto que no duró más de 5 días hasta su recepción en el laboratorio. Todas muestras fueron centrifugadas a 3000g por 10 minutos a 4°C y filtradas por 0,22  $\mu$ m previo a ser utilizadas en los kits según las indicaciones de los fabricantes.

6.9. Análisis de oligosacárido por espectrometría de masa (MADI-TOF-MS):

El análisis del contenido de oligosacáridos de las 3 hemocianinas fue encargada a la empresa Glyco Solution (USA). Las muestras suministradas fueron debidamente enviada, manteniendo la cadena frío durante todo el trayecto que no superó más de 7 días hasta su recepción en el laboratorio. La metodología utilizada para el procesamiento de las muestra y su posterior análisis se describe brevemente: Oligosacáridos tipo N y O fueron obtenidos a partir de la beta-eliminación en condiciones no reductora de 1 mg de hemocianina, posteriormente estos fragmentos fueron desalinizados y marcado de manera fluorescente con ácido antranílico (2-aminobenzoico). El exceso de ácido fue eliminado por precipitación con acetona, y los oligosacáridos marcados fue fijados en una matriz de DHB (ácido 2,5-dihidroxibenzoico) en un objetivo de acero inoxidable para su análisis en un espectrómetro de masa MALDI-TOF-MS en modo negativo. Los resultados obtenidos fueron procesados con el programa GlycoMod. Una tolerancia de  $\pm 3$  daltons fue utilizada. La masa derivatizada del ácido antranílico fue de 137 g/mol.

6.10. Análisis estadísticos: Para el análisis de los resultados de los ensayos de ELISA y ELISA-Array, los datos fueron transformados mediante la raíz cuadrada para amortiguar la variabilidad y ajustarlos a un

comportamiento. Como prueba de estadístico se utilizó *t-student* de una cola. Para el caso de los resultados de PCR en tiempo real, se usó la misma herramienta estadística en datos con comportamiento normal, para aquellos que no los tuvieran se usó la prueba Kruskal-Wallis. Los resultados de los PCR-Array fueron analizados con las planillas otorgadas por el fabricante. Todos los análisis fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6 (<http://www.graphpad.com/>).

## RESULTADOS

Para desarrollar esta tesis, se consideró fundamental en su primera etapa, establecer las condiciones de cultivo de las células presentadoras de antígeno. Originalmente, se consideró utilizar en forma paralela macrófagos y células dendríticas, para así poder evaluar en forma confiable y reproducible el efecto de las hemocianinas sobre ellas. Sin embargo, luego de numerosos intentos para optimizar el cultivo de células dendríticas, dado que se requerían en alta cantidad, no tuvimos resultados satisfactorios. Por esta razón, se decidió trabajar solo con macrófagos obtenidos desde exudados peritoneales, porque, como se describe a continuación con detalle, las condiciones establecidas permitieron contar con células en la cantidad, morfología y funcionalidad requeridas.

### 1. Caracterización morfofuncional del cultivo *in vitro* de macrófagos peritoneales murinos

El método utilizado para la extracción y purificación de macrófagos peritoneales, permitió obtener una densidad de células por ratón de entre  $1,5$  a  $2 \times 10^7$  al cuarto día post-inyección de la solución de tioglicolato. Estas células fueron cultivadas en medio DMEM completo por 24 horas y analizadas

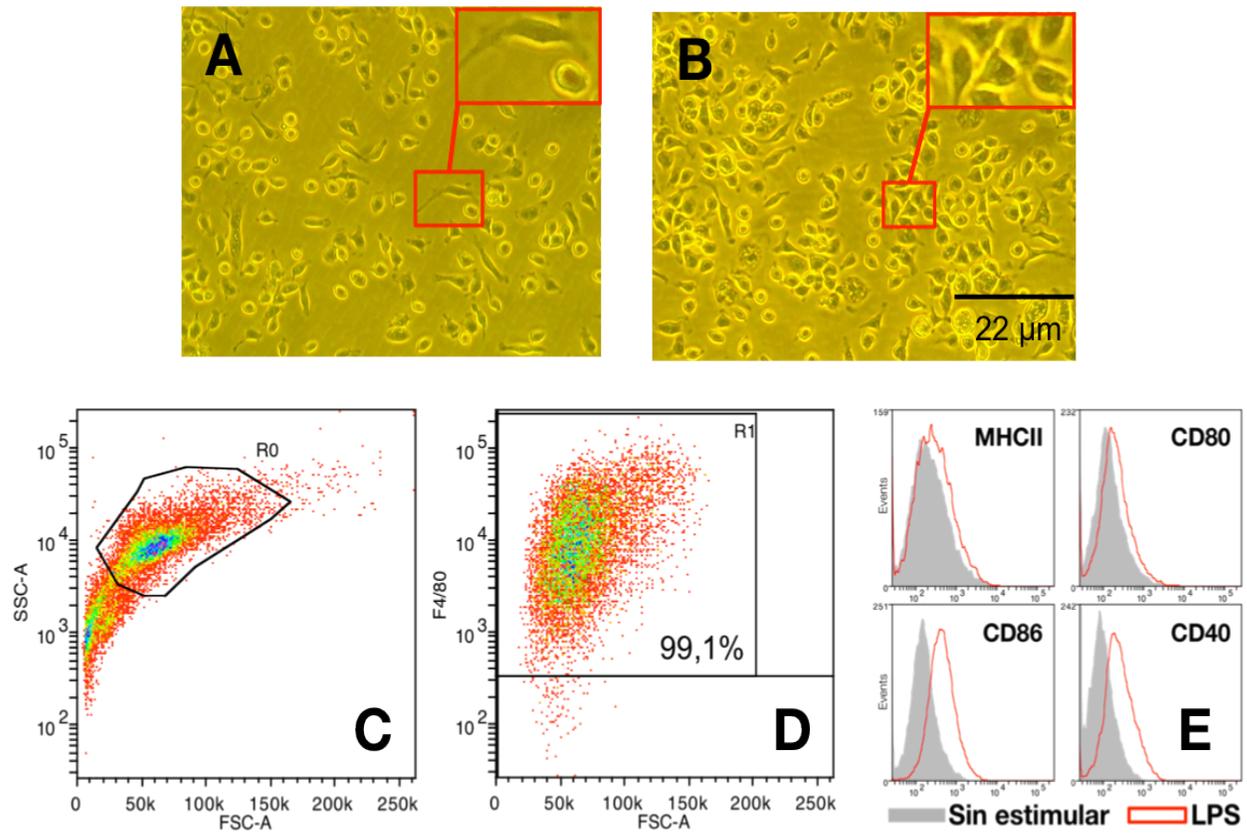
mediante inspección directa de la placa de cultivo y sin tinción, por microscopía de luz con contraste de fase (**Figura 2A**). Se observó que las células adherentes presentaron los dos tipos de morfología característicos descritos para este tipo de cultivo, células esféricas y fibroblastoides, atendiendo a un menor o mayor grado de adherencia a la superficie de la placa, respectivamente. El análisis por citometría de flujo de estas mismas células, mostró que correspondían a una población homogénea, compuesta casi en su totalidad (99,1%) por macrófagos; al expresar la proteína de membrana F4/80 (**Figura 2C y 2D**), demostrando así la efectividad del método experimental utilizado para obtener dicha estirpe celular. Cuando estas células fueron estimuladas con LPS (100 ng/mL) durante el mismo lapso de tiempo, mostraron una morfología predominantemente fibroblastoide, con una mayor extensión de su citoplasma (**Figura 2B**), que mostraba gran cantidad de gránulos pigmentados, posiblemente debido al aumento de proteínas fagolisosomales<sup>67</sup>. Estas características morfológicas han sido previamente atribuidas a macrófagos activados<sup>68-70</sup>. Se suma a ello lo observado por citometría de flujo, al pesquisar un aumento de moléculas propias de activación por LPS (**Figura 2E**), tales como moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC II). De esta manera, se concluyó que los macrófagos obtenidos respondían a estímulos proinflamatorios y, por lo tanto, se disponía con una metodología apropiada de obtención de macrófagos para evaluar el efecto de hemocianinas.

A continuación, se procedió a incubar *in vitro* los macrófagos peritoneales con cada una de las distintas hemocianinas y con LPS como control positivo, con el fin de determinar la mejor concentración con la cual posteriormente, serían estimuladas las células para extraer mRNA para su análisis por qPCR. Con este propósito, las células fueron incubadas por 24 horas con 3 concentraciones de cada hemocianina (100, 500 y 1000 ng/mL). En las **Figuras 3A, 3B y 3C** se muestran cultivos de macrófagos con CCH, KLH y FLH a la concentración más alta, la cual no produjo toxicidad alguna a las células al no observarse células en suspensión, ni produjo cambios morfológicos apreciables en una simple observación por microscopía luz, en comparación con las células control, solo cultivadas con medio de cultivo.

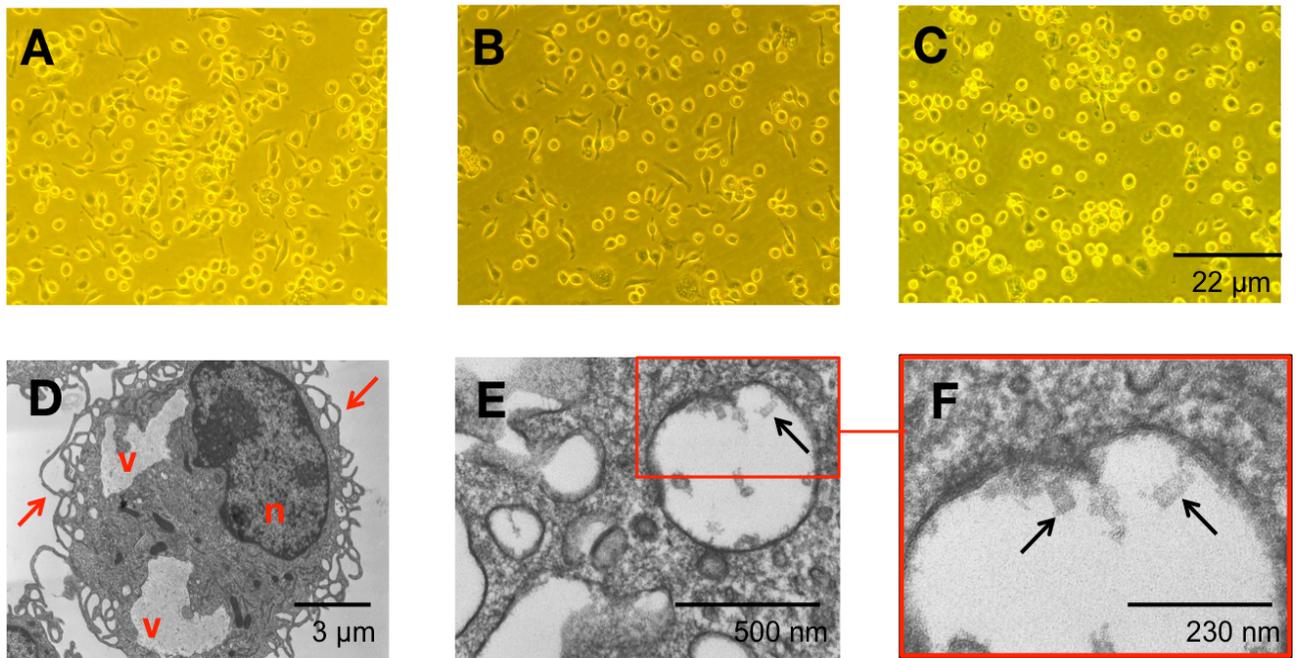
Para determinar que efectivamente los macrófagos en estas condiciones de cultivo incorporaban hemocianina, se realizaron análisis mediante microscopía electrónica de transmisión aprovechando que el gran tamaño de las hemocianinas (alrededor de 350Å) y su forma de cilindro hueco característica, permite identificarlas fácilmente sin la necesidad de utilizar técnicas ultraimunocitoquímicas. Los resultados se muestran en la **Figura 3D** donde se observa en primer lugar un macrófago de un cultivo control, sin la proteína. Se destaca una célula de gran tamaño con numerosas prolongaciones citoplasmáticas en su superficie. El núcleo se presenta polarizado y con un nucléolo prominente. En el citoplasma se observa la presencia de grandes

vacuolas heterofágicas<sup>71</sup>, típicas de este estirpe celular<sup>72</sup>. En tanto, en la **Figura 3E** se observa un corte de una preparación de macrófagos incubados con CCH por 1 hora, mostrando vacuolas que poseen doble membrana y aspecto claro que contienen en su interior dicha proteína, dando cuenta que efectivamente, la hemocianina es incorporada, ya sea por macropinocitosis o endocitosis de dichas células presentadoras a las concentraciones evaluadas. Análisis similares realizados en nuestro laboratorio con FLH mostraron similares resultados<sup>30</sup>.

Se concluye de estos experimentos que las hemocianinas pueden ser fagocitadas por los macrófagos y permanecen reconocibles en el interior de vacuolas localizadas en el citoplasma por al menos una hora, sugiriendo fuertemente que, al igual que lo reportado previamente en células dendríticas<sup>28,29</sup>, éstas colosales proteínas se procesan lentamente, como ha sido demostrado recientemente por Born<sup>30</sup>, fenómeno que evidentemente contribuye a su gran inmunogenicidad<sup>73,74</sup>.



**Figura 2:** La inducción de macrófagos con tioglicolato permite obtener una población homogénea de células funcionales, que expresan sus marcadores fenotípicos característicos (F4/80, MHCII, CD40, CD86 y CD80). A y B corresponden a imágenes de las células en las placas observadas mediante microscopía de luz con contraste de fase. Se muestran la apariencia de los cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales sin estimular y estimulados con LPS (100 ng/mL) por 24 horas, respectivamente. En A se observa células adheridas, con morfología ya sea de tipo fibroblastoide o esférica (recuadro). En cambio, con LPS las células presentan un citoplasma más extendido y con una morfología caracterizada por procesos celulares (B, recuadro). C y D corresponden a gráficos de *dotplot* donde se enmarca en una región R0, una población celular cuya totalidad corresponde a macrófagos, porque expresan el marcador fenotípico F4/80 (B). E corresponde a histograma donde se muestra que el tratamiento de estas células con LPS (100 ng/mL) por 24 horas induce una sobre-expresión de moléculas asociadas a activación celular, tales como la molécula de presentación antigénica MHCII y moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40.



**Figura 3: Las hemocianinas son incorporadas por macrófagos peritoneales.** A, B y C corresponden a vistas de microscopía de luz con contraste de fase, cultivos de macrófagos peritoneales con 1 mg/mL de CCH, KLH y FLH, respectivamente. Las hemocianinas no generaron ni toxicidad ni cambios morfológicos apreciables en las tres concentraciones ensayadas. En D se muestra el aspecto característico de la superficie de un macrófago incubado con PBS. Se destacan múltiples procesos celulares (flechas rojas) y vacuolas heterofágicas de gran tamaño (v). En E se muestra un corte de una preparación de macrófagos incubados con CCH por 1 hora, observándose vacuolas que han incorporado la proteína (recuadro rojo). F corresponde a una ampliación de las moléculas de hemocianinas de la vacuola mostrada en E, donde se aprecia su forma cilíndrica característica.

## 2. RT-PCR convencional de un panel de 4 citoquinas proinflamatorias características

En cultivos de macrófagos estimulados durante 24 hrs. con cada una de las hemocianinas en paralelo con los cultivos controles, se procedió a tomar muestras de los sobrenadantes y almacenarlos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriormente determinar la presencia de las 4 diferentes citoquinas de interés, seleccionadas por promover inflamación, a saber IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ . En tanto, el RNA total fue extraído desde cultivos de macrófagos. La calidad del RNA total fue analizada mediante electroforesis en geles de agarosa y visualizada por luz UV; detectando la presencia de las bandas correspondiente a las subunidades ribosomales 18s y 28s; además, el RNA fue cuantificado mediante espectrofotometría, obteniéndose concentraciones desde 80 a 920 ng/uL, lo que se consideró apropiado para los estudios posteriores.

Los antecedentes y secuencias de los partidores utilizados para la reacción de RT-PCR para IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$  se presentan en la **Tabla 1** y los resultados en la **Figura 4**, los cuales se describen a continuación para cada una de ellas.

- **IL-1 $\beta$** : Su presencia se evidenció por la presencia de una banda única de un tamaño esperado de 153 pb. Se ha reportado que los niveles de mRNA de esta citoquina son dependientes de estímulos proinflamatorios como LPS<sup>75-77</sup>, por lo que no esperábamos encontrar bandas en la condición control y sin embargo se obtuvieron. Una explicación posible es atribuible a que producto del método de extracción las células se hayan activado. Entre las hemocianinas, solamente las que provienen de especies emparentadas filogenéticamente, a saber FLH y KLH, fueron capaces de provocar un aumento en los niveles de mRNA, aunque es posible que las bandas vistas para KLH fueran un efecto de la presencia de trazas de pirógenos de la preparación ya que es comercial y no fue preparada en las mismas condiciones de ambiente estéril de CCH y FLH. Por otra parte, no se debe olvidar que en los reactivos de cultivo celular hay trazas de LPS, como es el caso del suero fetal de bovino.
- **IL-6**: Al igual que IL-1 $\beta$ , IL-6 es otra citoquina relacionada con la activación de macrófagos e inducida bajo estímulos bacterianos como el LPS<sup>70,78,79</sup>. Una banda clara, de un peso esperado de 142 pb se observó en el carril correspondiente al cultivo estimulado con LPS, así como también en aquellas estimuladas con FLH. No así para las condiciones de cultivo con CCH y KLH.

- **IL-12p40:** Esta citoquina constituye el principal puente entre el sistema inmune innato con el adaptativo, siendo sus más importantes fuentes los macrófagos y las células dendríticas, encontrándose regulada a nivel transcripcional<sup>80</sup> y, a diferencia del fragmento p35, éste solamente es inducido seguido de la activación por antígenos de origen bacteriano<sup>81</sup>. En nuestra experiencia, no se observó la banda de 101 pb en la condición control, salvo bajo estimulación con LPS o FLH, lo que está de acuerdo con lo informado en la literatura para LPS<sup>70,75,78</sup>.
- **TNF- $\alpha$ :** La obtención del amplicón de 128 pb, evidenció la presencia del cDNA de TNF- $\alpha$  que se observó en todas las condiciones, tanto experimentales como controles, lo que refleja la existencia constitutiva del mensajero en macrófagos. El aumento en el nivel de esta interleuquina por el LPS<sup>82-85</sup> o las hemocianinas no fue apreciable en el gel. Una explicación posible es debido a la baja resolución de la técnica, no obstante está descrito que la estimulación con LPS aumenta los niveles celulares de su mRNA. Esta citoquina se encuentra altamente regulada, tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional<sup>86,87</sup> y una estimulación como el LPS es capaz de aumentar más de 100 veces tanto el nivel de mRNA como de proteína<sup>82,88</sup>.

**Tabla 1**  
**Genes y secuencias de partidores utilizados para RT-PCR y RT-qPCR**

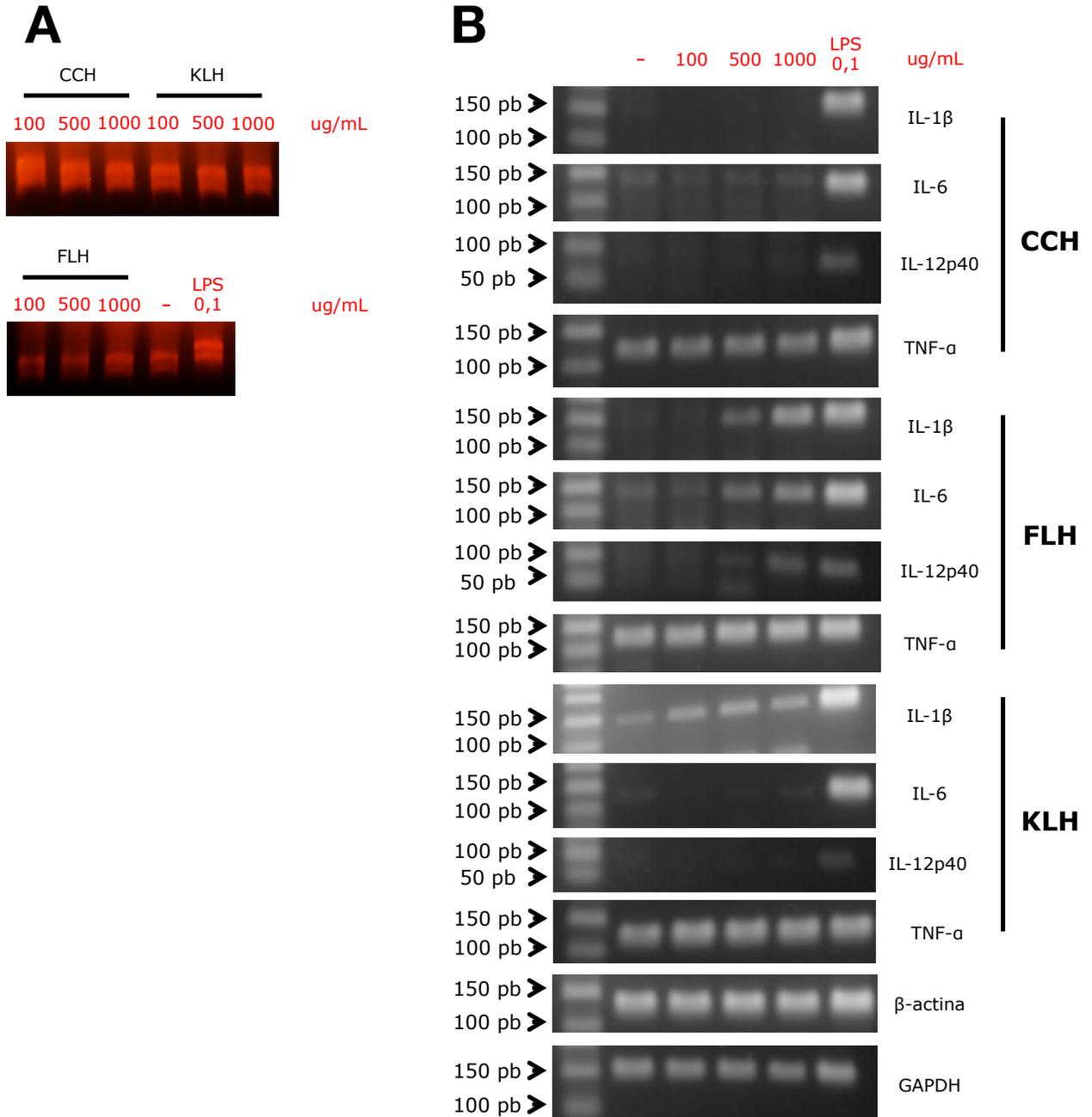
<b>Citoquina</b>	<b>Gen (<i>Mus musculus</i>)</b>	<b>Localización en el gen</b>	<b>Secuencia de partidores 5'-3'</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>	<b>Referencia</b>
IL-1 $\beta$	Il1b	527-678	<b>FW</b> CAACCAACAAGTG ATATTCTCCATG	152	Giulietti <i>et al.</i> <sup>89</sup>
			<b>RV</b> GATCCACACTCTC CAGCTGCA		
IL-6	Il6	140-280	<b>FW</b> GAGGATACCACTC CCAACAGACC	141	Wang <i>et al.</i> <sup>90</sup>
			<b>RV</b> AAGTGCATCATCG TTGTTCATACA		
IL-12p40*	Il12b	180-280	<b>FW</b> AACCATCTCCTGG TTTGCCA	101	Jayakumar <i>et al.</i> <sup>63</sup>
			<b>RV</b> CGGGAGTCCAGTC CACCTC		
IL-12p40**	Il12b	792-971	<b>FW</b> GGAAGCACGGCA GCAGAATA	180	Giulietti <i>et al.</i> <sup>89</sup>
			<b>RV</b> AACTTGAGGGAGA AGTAGGAATGG		
TNF- $\alpha$	Tnf	1115-1242	<b>FW</b> CACTGGAGCCTCG AATGTC	128	Fan <i>et al.</i> <sup>62</sup>
			<b>RV</b> CAGGGAAGAATCT GGAAAGGT		
GAPDH	Gapdh	912-1022	<b>FW</b> TCCCACTCTTCCA CCTTCGA	111	Edgar <i>et al.</i> <sup>65</sup>
			<b>RV</b> GTCCACCACCCTG TTGCTGTA		
$\beta$ -actina	Actb	693-830	<b>FW</b> AGAGGGAAATCGT GCGTGAC	138	Giulietti <i>et al.</i> <sup>89</sup>
			<b>RV</b> CAATAGTGATGAC CTGGCCGT		

\*: Partidores utilizado en reacción de PCR convencional

\*\* : Partidores utilizado en reacción de PCR en tiempo real.

**FW**: Partidor sentido (*forward*)

**RV**: Partidor anti-sentido (*reverse*)



**Figura 4: Efecto diferencial de tres hemocianinas sobre los niveles de mRNA de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ .** Macrófagos peritoneal fueron estimulados con tres concentraciones (100, 500 y 1000 ng/mL) de CCH, KLH y FLH. Como control positivo se utilizó LPS (100 ng/mL) y negativo medio de cultivo solo. Luego les fueron extraídos RNA. **A** corresponde a geles de agarosa-formaldehído al 1% en tampón MOPS corridos a 70V por 25 minutos. En ellos se puede aseverar la buena integridad del RNA extraído, al observar, claramente las dos bandas correspondiente a los fragmentos ribosomales 28S y 18S respectivamente. Posterior a la reacción de RT-PCR. Luego los amplicones fueron visualizados en geles de agarosa al 2% corridos en tampón TAE a 90V por 75 minutos. Solo para FLH se pudo ver una efecto dosis respuesta para IL-1, IL-6 e IL-12p40; Para TNF- $\alpha$  se observa una banda constante en todas condiciones y concentraciones de proteína.

Pesos moleculares: IL-1 – 152 pb; IL-6 – 142 pb; IL-12p40 – 101 pb; TNF- $\alpha$  - 128 pb; GAPDH – 111 pb;  $\beta$ -actina – 138 pb.

Dependiendo de la hemocianina, en algunas se observó un efecto dosis-respuesta como es el caso de FLH, en tanto que para CCH no se observaron bandas ni aún a la concentración más alta; no obstante ello no indica que no exista un nivel basal del transcrito dado que el gel de agarosa tiene un límite de detección alrededor de 20-50 ng. De las tres hemocianinas, FLH fue la única que generó un efecto dosis respuesta para IL-1 $\beta$ , IL-6, e IL-12p40, detectable por electroforesis. Estas diferencias nos permiten inferir que existen distintos mecanismos involucrados para cada hemocianina en la regulación de estas citoquinas. Por otra parte, es importante señalar que debido a la características de la reacción del PCR, en que se visualiza los productos al final de la reacción, no se puede relacionar directamente el producto final, con los niveles reales de transcrito en las células y, sumado a la baja capacidad resolución del gel de agarosa, es probable que no se puede detectar diferencias reales entre la condición LPS y/o las diferentes concentraciones de hemocianinas. Por esta razón y dada la posibilidad de cuantificar los niveles de mRNA, se recurrió a una técnica mucho más sensible y adecuada como es el PCR en tiempo real.

A partir de estos resultados se concluye que: 1) La metodología utilizada es adecuada para obtener RNA de buena calidad y por ende pesquisar mRNA de las citoquinas estudiadas; 2) No todas las hemocianinas generan la misma respuesta en los macrófagos, por lo que es factible que existan mecanismos regulatorios inherentes a cada una de ellas; 3) No es posible determinar si

efectivamente las hemocianinas producen cambios en los niveles de mRNA de las distintas citoquinas, en comparación con el control o la estimulación con LPS, debido a las limitaciones del análisis mediante PCR convencional o de “punto final”; 4) Se determinó que la concentración óptima a utilizar para las sucesivas estimulaciones con hemocianinas sería de 1 mg/mL, dado que fue la que permitió observar el mayor cambio en los niveles de mRNA de las citoquinas estudiadas en presencia de la proteína. 5) Fue validado el uso del LPS como control positivo y el protocolo de reacción de PCR.

### 3. RT-PCR en tiempo real y determinación de las 4 citoquinas proinflamatorias características mediante ELISA

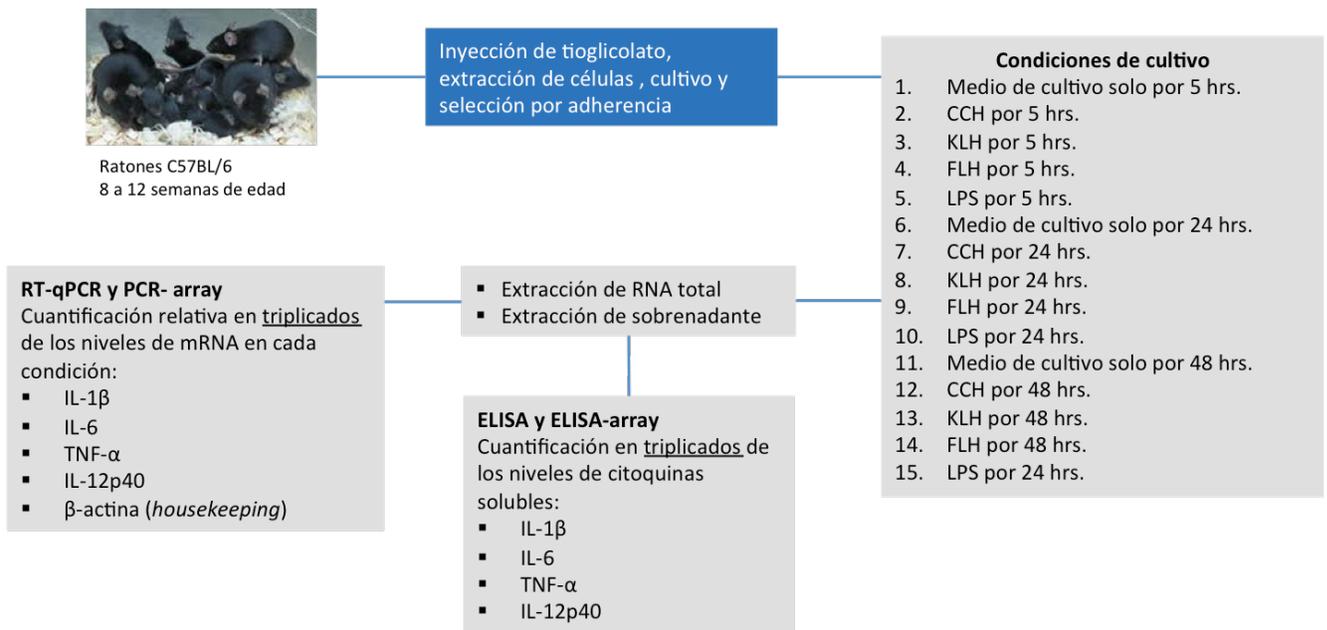
A ratones C57BL/6, tratados con tioglicolato, les fueron extraídos sus macrófagos peritoneales y tratados con las hemocianinas modelo (CCH, KLH y FLH) a la concentración determinada anteriormente (1 mg/mL) y LPS (100 ng/mL), y solo con medio de cultivo como control positivo y negativo, respectivamente. En la **Figura 5**, se resume la estrategia experimental utilizada. Al cabo de los períodos de estimulación, el RNA total fue extraído y analizado mediante electroforesis (datos no mostrados). Posteriormente, se procedió a realizar la reacción de transcripción reversa para cada una de las muestras; para obtener los cDNA. El método de análisis usado fue la cuantificación relativa  $\Delta\Delta Ct$ . Esta técnica hoy día ampliamente utilizada para la cuantificación relativa

de los niveles de transcritos en estudios de expresión, tiene dos requisitos: 1) la eficiencia de amplificación debe ser cercana al 100% y 2) la eficiencia de amplificación de los cDNAs en estudio deben ser iguales a los cDNAs del gen de referencia (en este caso, un gen *housekeeping*). Al igual que en los PCRs convencionales mostrados anteriormente, en los qPCRs se utilizaron los mismos partidores para la mayoría de las citoquinas a excepción de IL-12p40 que fue reemplazado por otro par (**Tabla 1**), cuya especificidad se ajustaba mejor a la sensibilidad del método.

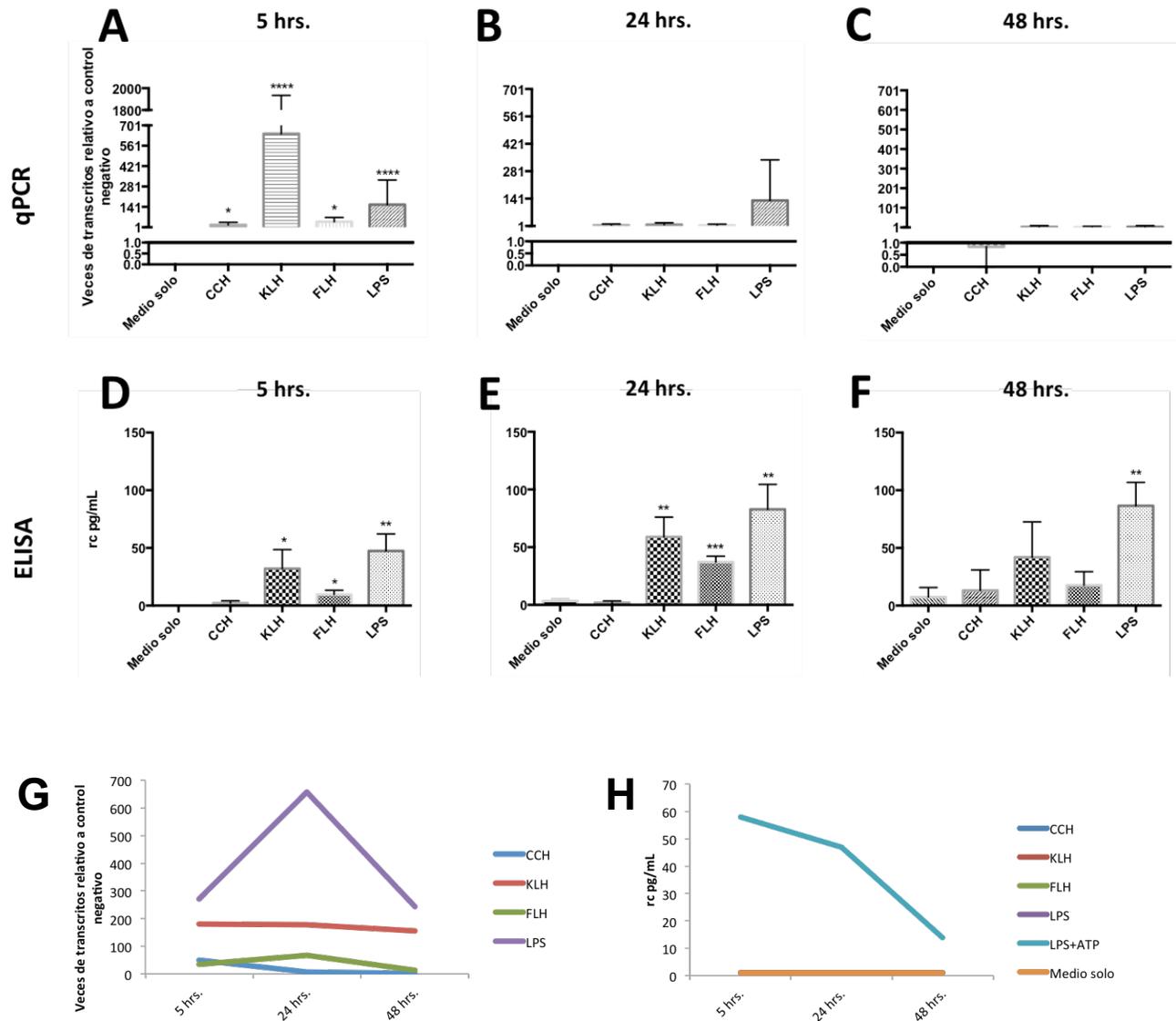
Para llevar a cabo la cuantificación y calcular la eficiencia de amplificación, se clonaron amplicones específicos de cada citoquina en bacterias, los que luego fueron seleccionados y amplificados. Más tarde los vectores de clonamiento fueron extraídos y purificados para la confección de curvas estándar de regresión lineal. Como indica la **Figura 5**, en cada experimento se trabajó con macrófagos provenientes de un conjunto de ratones, los cuales fueron sometidos a los distintos tratamientos indicados anteriormente y, se obtuvieron los cDNAs correspondientes, que fueron utilizados en las reacciones de qPCR. Para cada tratamiento se hizo la reacción de qPCR en triplicado. Con los resultados obtenidos se aplicó la fórmula de  $\Delta\Delta C_t$  para la cuantificación relativa, dicha cuantificación se hizo en relación a la condición sin tratamiento (células cultivadas solo con medio de cultivo) y normalizado respecto al gen *housekeeping* (HKG)  $\beta$ -actina.

- **IL-1 $\beta$** : En la **Figura 6A, B y C** se presentan los resultados de las cuantificaciones relativa de mRNA de IL-1 $\beta$  de macrófagos sin tratar (medio solo), tratados con 1 mg/mL de CCH, KLH o FLH, y 100 ng/mL de LPS por 5, 24 y 48 horas. Estos datos corresponden a mediciones de 3 experimentos independientes. Se observa que las diferentes hemocianinas aumentaron en el estadio temprano (5 hrs.) la cantidad relativa de mRNA de IL-1 $\beta$  para luego regresar a los niveles basales en el caso de CCH, tanto KLH como FLH alcanza el *peak* a las 24 horas de estimulación. Referente al control positivo LPS, se observó también un alza temprana a las 5 horas con un máximo a las 24 horas, para luego descender nuevamente. Otra manera de visualizar estos resultados se muestra en la **Figura 6G y H**, donde se representa la cinética de estimulación en el nivel de mRNA de IL-1 $\beta$ . Estos resultados de qPCR fueron complementados investigando el nivel de proteína secretada al medio de cultivo, como indicativo del efecto fisiológico que estarían ejerciendo las hemocianinas sobre el sistema inmune innato. Las **Figura 6D, E y F** muestran los resultados de la determinación por ELISA de 3 experimentos independientes, transformados mediante la raíz cuadrada para aminorar la asimetría de los datos y para ajustar la normalidad<sup>91</sup>. En ellas se observa claramente que tanto las hemocianinas como el control LPS, no fueron capaces por sí mismos de ocasionar la liberación de IL-1 $\beta$  en macrófagos cultivados *in vitro*. Este resultado está de acuerdo al

conocimiento actual que dice que para que se libere IL-1 $\beta$  se necesita de una segunda señal para activar el inflamosoma y de esta manera a la caspasa-1, que produce la maduración de la proteína desde la forma de 31 kDa a la de 17kDa<sup>47,92,93</sup>. Esto se evidenció con la adición de 5 mM de ATP por 30 minutos a los cultivos que ya tenían LPS, previo a la recolección de los sobrenadantes. Gracias a esto se observó que la secreción de la proteína madura se secreta en grandes cantidades a tiempos tempranos (5 hrs.) y que luego va decayendo hasta niveles basales (48 hrs.).

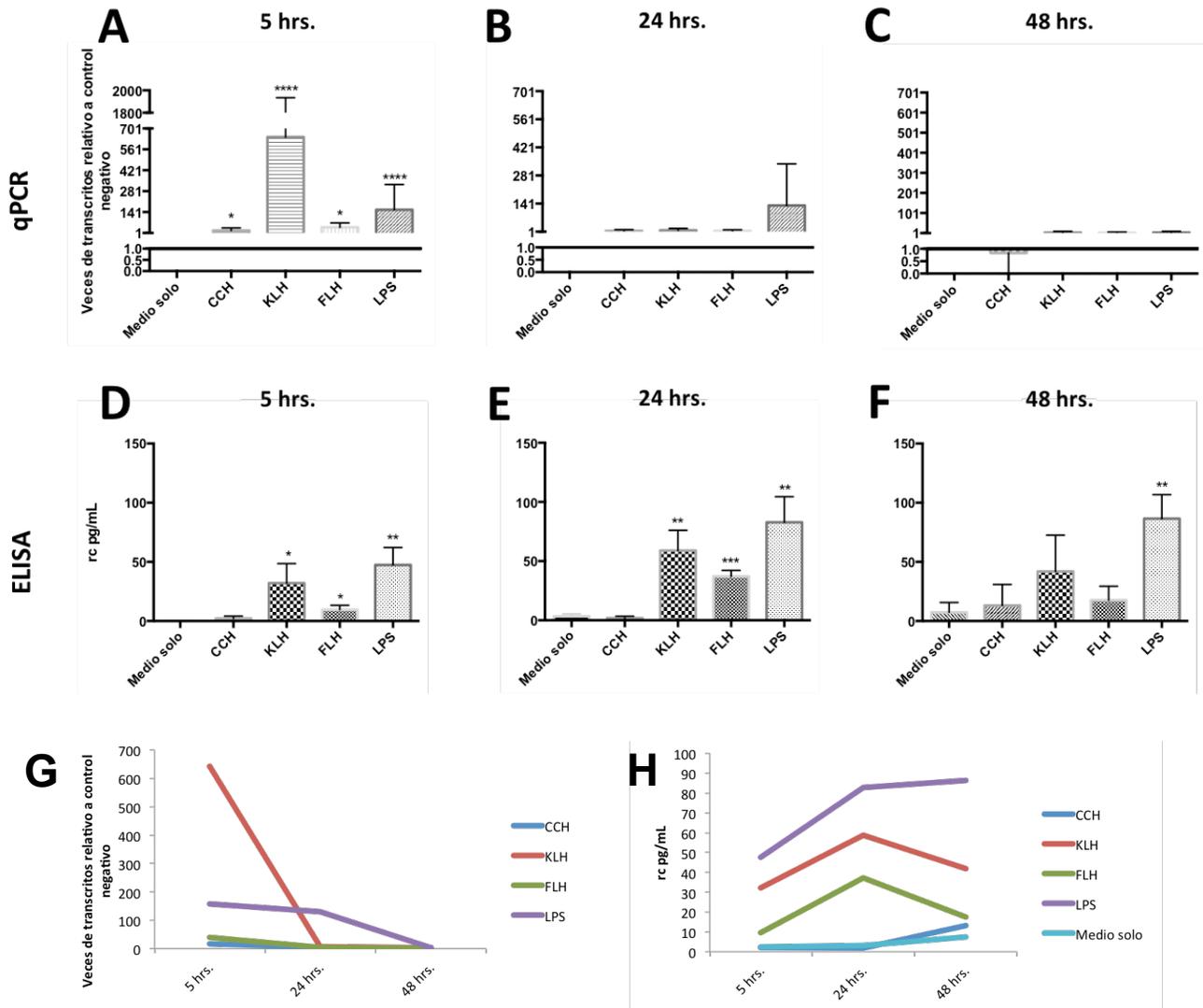


**Figura 5: Esquema experimental de estimulación de macrófagos peritoneales con las hemocianinas modelo (CCH, KLH y FLH) y con LPS.** En cada experimento se les extrajeron los macrófagos a un conjunto de 10-14 ratones tratados intraperitonealmente con tioglicolato y posteriormente, luego de la selección de las células, fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^6$  de células por mL de medio de cultivo y tratadas con las diferentes condiciones. Las concentraciones utilizadas de hemocianinas fueron 1 mg/mL, en tanto que para LPS fue de 100 ng/mL. Al término de cada condición, el sobrenadante de cada placa de cultivo fue recogido y guardado a  $-20^\circ\text{C}$  para su posterior análisis por ELISA. Por otro lado, las células fueron utilizadas para la extracción de mRNA y posteriormente para la reacción de RT-PCR en tiempo real. Las cuantificaciones tanto de los niveles de mRNA por RT-PCR en tiempo real como por la reacción de ELISA se hicieron por triplicado.



**Figura 6: Las hemocianinas no estimulan la secreción de IL-1 $\beta$  por sí mismas.** Resultados de cuantificaciones relativas a la condición control negativo (medio solo), provenientes de 3 experimentos independientes y utilizando a  $\beta$ -actina como gen *housekeeping*, se muestran en **A**, **B** y **C**. En **D**, **E** y **F** se muestran los resultados de la reacción de ELISA para IL-1 $\beta$  de 3 experimentos independiente. Para aminorar la asimetría de los datos, fueron transformados mediante la raíz cuadrada, en ausencia de una señal que genere influjo de K<sup>+</sup>, independiente del tratamiento los macrófagos, no fueron capaces de secretar la citoquina al medio extracelular. Situación que se revierte al incubar los macrófagos tratados con LPS (100 ng/mL) con 5 mM de ATP por 30 minutos, previos a la recolección de los sobrenadantes de cultivo. En **G** y **H**, se presenta las curvas de cinéticas de las medias de los resultados de mRNA y de proteínas, respectivamente, en respuesta de los distintos estímulos. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,005; \*\*\*\*: p=0,0001; \*\*\*\*\*: p<0,0001.

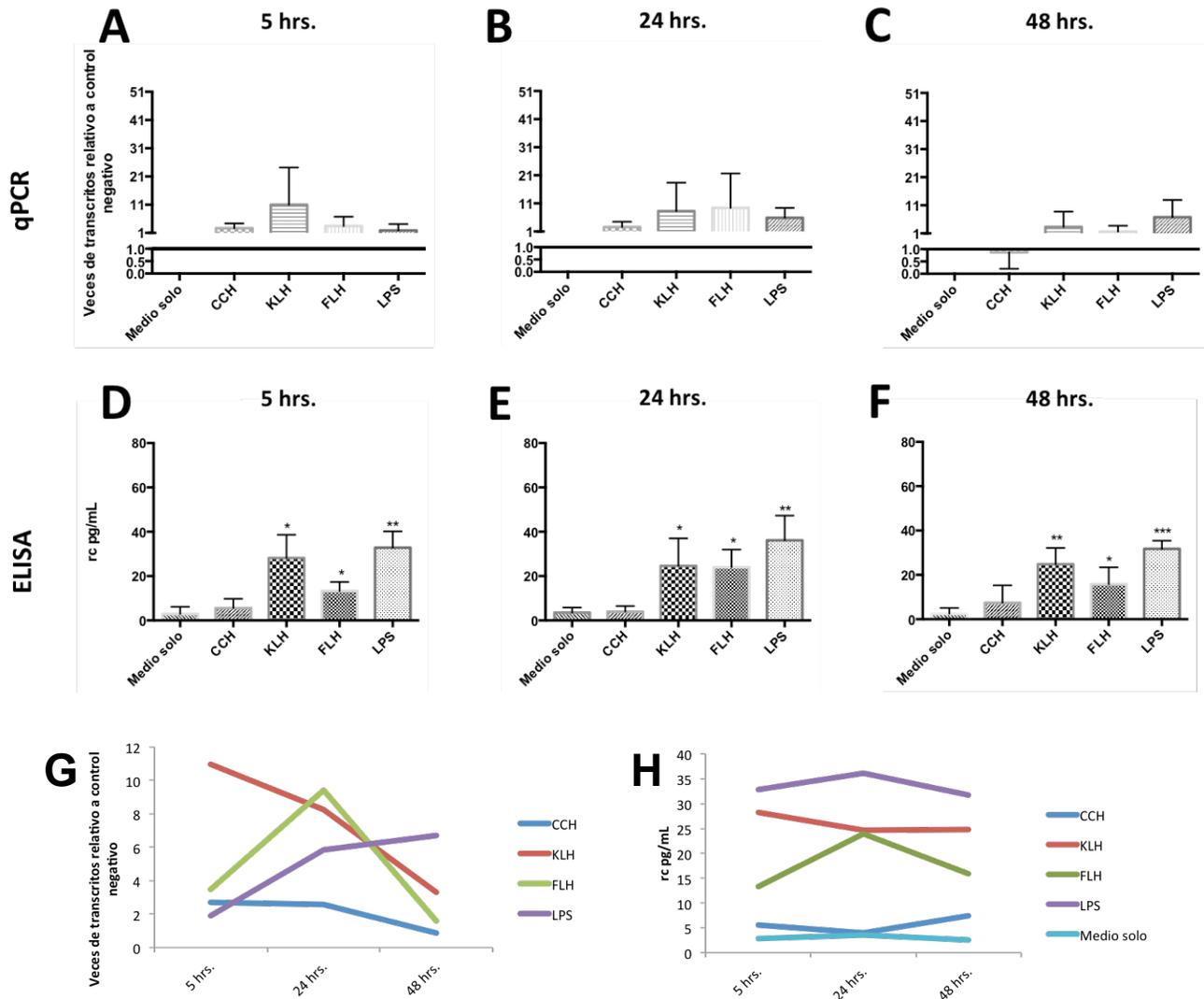
- **IL-6:** Para esta citoquina, CCH solo generó un discreto aumento en el nivel de mRNA a las 5 horas de estimulación (**Figura 7A, B y C; Figura 6G**), hecho que se reflejó también en la baja secreción de IL-6 al medio (**Figura 7D, E y F; Figura 7B**), indicando la baja estimulación sobre esta citoquina. Por otro lado, se observa un aumento de los niveles de mRNA en presencia de KLH a las 5 horas, incluso mayores a los provocados por LPS, para luego regresar rápidamente a sus niveles basales a las 24 horas post-estimulación (**Figura 7G**). Este aumento temprano en el número de mRNA no se reflejó en el patrón temporal de secreción de la proteína, que se alcanza a las 24 horas, fenómeno que se explica porque su regulación ocurre a nivel transcripcional y puede ser gatillada por infecciones virales, LPS, u otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e incluso por ella misma<sup>94</sup>. FLH estaría ejerciendo un efecto similar a KLH tanto a nivel del mRNA como de la secreción proteica, aunque en un menor grado (**Figura 7G y H**). Un hecho relevante a destacar es la acción que estaría ejerciendo la hemocianina en comparación al LPS en el número de copias de mRNA, ya que al parecer, a pesar que KLH provoque una mayor alza de estos, la cantidad de IL-6 secretada es inferior a cuando los macrófagos son tratados con LPS.



**Figura 7: Tanto FLH como KLH regulan al alza el nivel relativo de mRNA de IL-6.** En A, B y C se muestran los resultados de cuantificaciones relativas para IL-6 provenientes de 3 experimentos independientes, al igual que en D, E y F cuyos resultados corresponden a ensayos de ELISA; en tanto, G y H representan a curvas de cinéticas de las medias de los resultados de qPCR y ELISA. De las 3 hemocianinas, se puede inferir que tanto KLH como FLH estarían afectando al alza el número de transcrito a las 5 horas post-inducción para luego bajar a niveles basales. Sin embargo, estos mismos estímulos generaron una cinética diferente en la secreción de la proteína, cuyo pico de liberación fue a las 24 horas. Por otro lado, CCH no fue capaz de estimular a los macrófagos para expresar IL-6. Los valores obtenidos de los ensayos de ELISA fueron transformados mediante raíz cuadrada.\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*:  $p = 0,0001$ .

- **TNF- $\alpha$** : Como se muestra en la **Figura 8**, CCH nuevamente no fue capaz de estimular de manera significativa el nivel de mRNA de la citoquinas hasta las 48 horas de cultivo, mientras que para KLH se observa una tendencia al aumento tempranamente, incrementando tanto el nivel de transcrito como la secreción de la proteína al medio de cultivo, cuyo efecto fue comparable a cultivos tratados con LPS (**Figura 8G y H**). Por otra parte, se observó que en los cultivos tratados con FLH, se incrementó los niveles de transcrito posterior a las 5 horas de estimulación con un máximo a las 24 horas (**Figura 8G**). Siendo TNF- $\alpha$  una de las principales citoquinas proinflamatorias, su regulación radica principalmente a nivel post-transcripcional donde el fragmento 3'-UTR del mRNA ricos en AU (ARE) cobra un rol importantísimo en la estabilidad del mensajero y en el transporte de éste hacia el citoplasma<sup>87,95,96</sup>, donde posteriormente su transporte hacia la membrana es regulado, para su posterior liberación, gracias a la enzima convertidora de TNF (TACE)<sup>97</sup>. Estos mecanismos de control son activados por agentes, tales como LPS, por lo cual es comprensible que los niveles de mRNA no aumentaran inmediatamente en presencia de LPS (**Figura 8G**), no así el de la proteína secretada. Los resultados obtenidos del PCR en tiempo real difieren a los descritos en otros trabajos<sup>75,82,84,98</sup>, lo cual es atribuible a diferencias en la metodología utilizada. Es así que los macrófagos peritoneales y derivados de precursores de médula ósea de ratones

BALB/c, estimulados con 1 µg/mL de LPS, presentan niveles máximos de mRNA al cabo de 3-6 horas de incubación. Sin embargo existen diferencias en la metodología de extracción celular, el tipo celular, cepa de ratón y el tipo de LPS utilizado. Además de acuerdo a Wells *et al.*<sup>99</sup>, macrófagos de distintas cepas presentan diferencias en los patrones de expresión génica ante un mismo estímulo de LPS, lo que enfatiza la importancia de considerar los factores mencionados anteriormente al momento de contrastar resultados. Por otra lado, es interesante destacar que, el hecho que las hemocianinas provocaron efectos distintos a los observados con LPS, sugiere que ellas pueden invocar la expresión de TNF-α por vías distintas a las clásicas<sup>79,87</sup>.



**Figura 8: FLH al igual que KLH, estimula la secreción temprana de TNF- $\alpha$ .** A, B y C, representan resultados de cuantificaciones relativas a la condición control negativo (medio solo), provenientes de 3 experimentos independientes y utilizando a  $\beta$ -actina como gen *housekeeping*. En tanto, en D, E y F se muestran resultados de la cuantificación por ELISA de la citoquina, cuyos datos fueron transformados mediante la raíz cuadrada para ajustar su normalidad.. G y H corresponden a curvas de cinéticas de las medias de los resultados de qPCR y ELISA presentados anteriormente. Nuevamente, de las 3 hemocianinas, solamente KLH y FLH estarían provocando efectos tanto en el número de mRNA como en la secreción de proteína. En tanto, LPS al poseer un perfil de estimulación tanto a nivel de mRNA como de secreción citoquina, distinto al las hemocianinas, permite inferir que ellas ejercerían su acción mediante un mecanismos distinto al lipopolisacárido. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ . rc: raíz cuadrada.

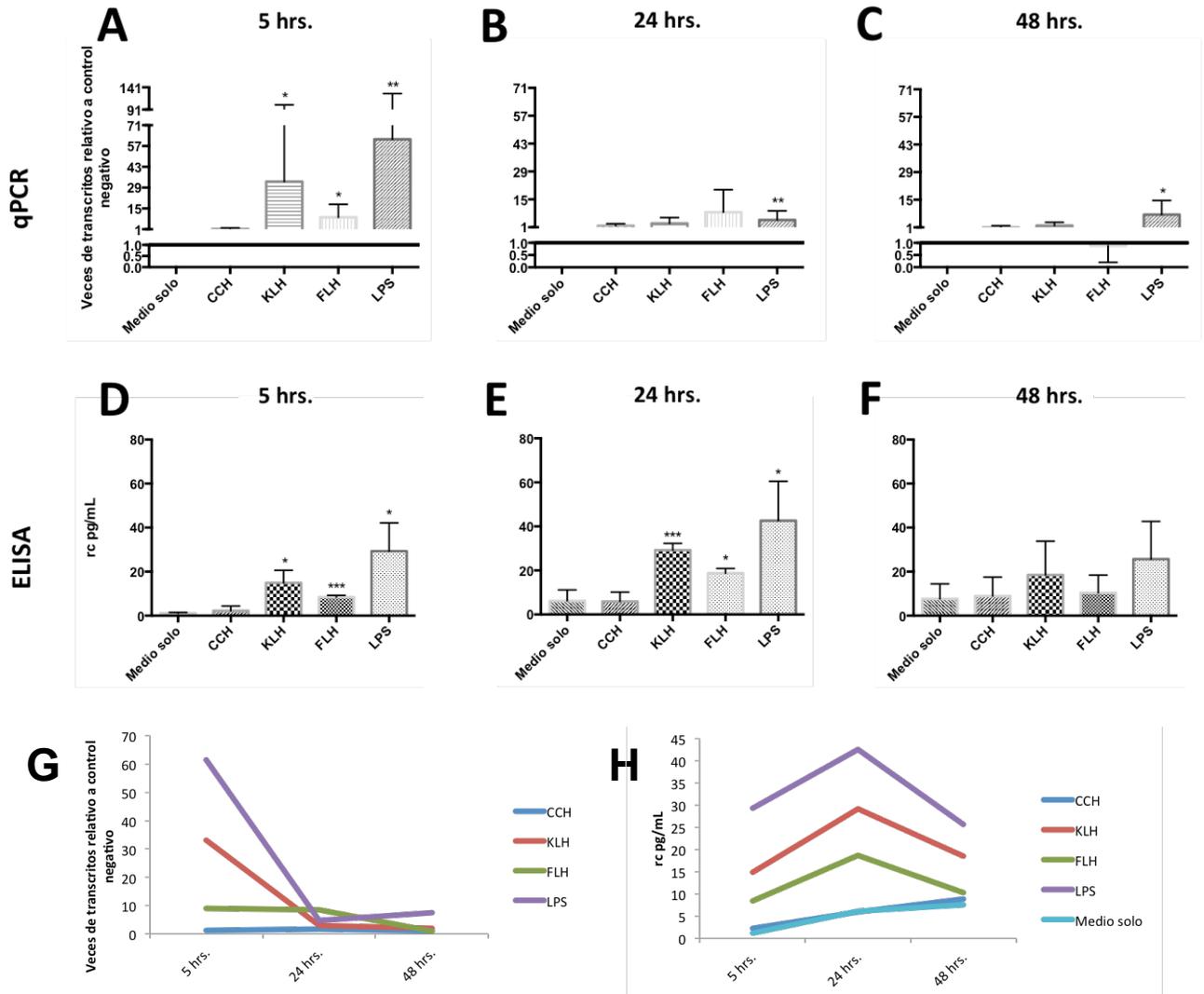
– **IL-12p40:** Esta subunidad en conjunto con IL-12p35 constituye la citoquina funcional IL-12p70 o comúnmente conocida como IL-12, que es expresada principalmente por células DC, macrófagos activados y neutrófilos. La **Figura 9** muestra los efectos de la estimulación de las 3 hemocianinas. De manera similar al nivel de mRNA observado para IL-6, KLH fue capaz de aumentar tempranamente el nivel de mRNA de IL-12p40, así como también FLH aunque a una menor escala. No obstante CCH, no estaría influyendo en el número de mensajero entre las 5 y 48 horas post-estimulación. La persistencia de un ligero aumento en el nivel de mRNA en el caso de LPS puede deberse a la acción de otras citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ . A nivel de la proteína secretada, si bien se registró un aumento a las 5 horas por efecto de las hemocianinas, el *peak* de liberación fue a las 24 horas, tanto para KLH y FLH así como para LPS (**Figura 9D, E, F y H**). Este retraso en la secreción de la subunidad corresponde, como ha sido descrito, al tipo de control a nivel transcripcional al cual se encuentra sometida la proteína<sup>100</sup>.

En las **Figura 10 y 11** se muestran las curvas de cinética tanto de los resultados de RT-PCR como de las reacción de ELISA mostradas anteriormente, donde se pueden observar el efecto de cada hemocianina en forma independiente sobre las distintas citoquinas estudiadas. Nótese que las

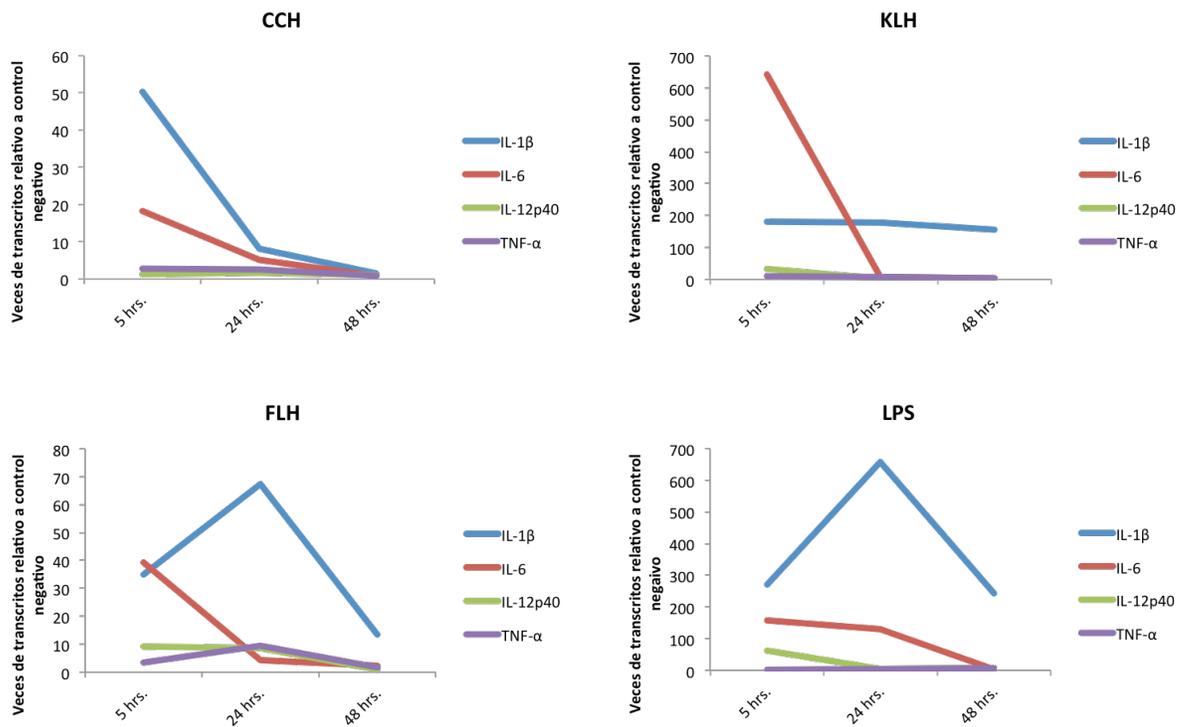
escalas son entre 0 y 60 veces o 0 y 80 veces para CCH y FLH, respectivamente y, de 0 a 700 veces para KLH y LPS. De acuerdo a estas curvas, CCH sería capaz de aumentar levemente los transcritos de IL-1 $\beta$  e IL-6 en tiempos tempranos de estimulación, en tanto su efecto para IL-12p40 y TNF- $\alpha$ , es prácticamente negativo, lo cual se correlaciona a nivel proteico, donde hasta las 48 horas post-estimulación, no se observa liberación de citoquinas atribuible directamente a algún efecto de esta hemocianina. KLH, en tanto, es capaz de aumentar el nivel de mRNA de todas las citoquinas estudiadas luego de 5 horas de incubación, no obstante con excepción de IL-1 $\beta$ , esta alza desaparece al cabo de las 24 horas post-estimulación. Si bien, estas interleuquinas se detectan por ELISA en tiempos tempranos, su máxima secreción se produce a las 24 horas, lo que refleja un control a nivel transcripcional de dichos genes. De manera similar, pero a menor escala, FLH también es capaz de aumentar tanto los niveles de mRNA como de proteína a las pocas horas de estimulación, alcanzado una máxima de secreción al cabo de 24 horas de cultivo. Cabe mencionar que aunque KLH, pudo estimular un aumento de mRNA de IL-6 a las 5 horas de cultivo mayor que LPS, en ninguno de los 3 tiempos estudiados, ninguna hemocianina es capaz de promover mayor secreción de citoquinas que el LPS. De acuerdo a estos perfiles cinéticos sobre las citoquinas, se determinó que tanto KLH como FLH son capaces de promover la expresión de citoquinas proinflamatorias entre 5 a 48 horas post-estimulación. No obstante, dado las diferencias en las intensidades de sus

efectos como en su cinética, mostradas en los resultados, nos permiten sugerir que existen diferencias en sus mecanismos de acción no solo entre las hemocianinas, sino también frente al LPS.

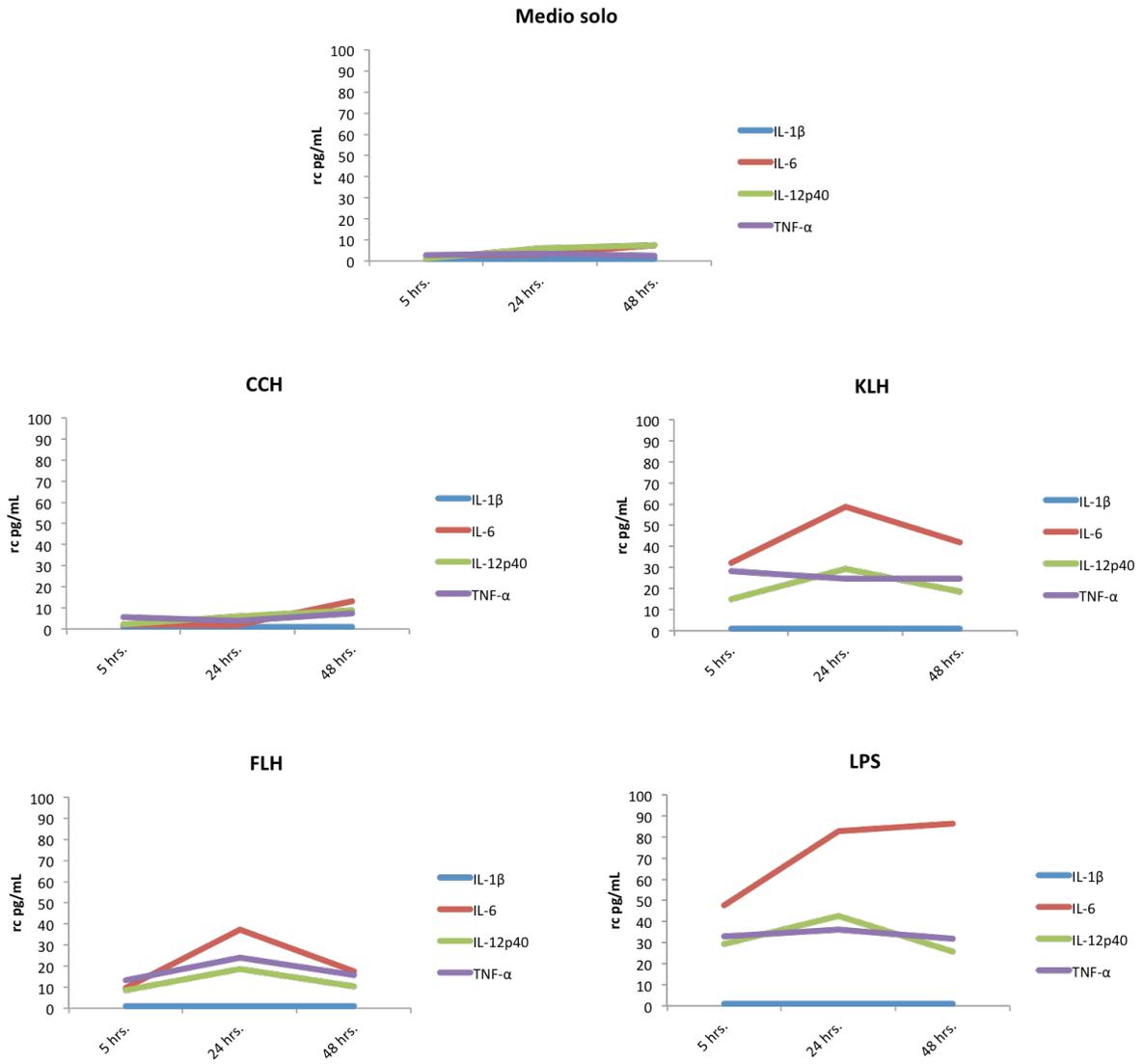
En base a estos resultados, se decidió continuar el estudio en mayor profundidad sobre los efectos de las hemocianinas en macrófagos luego de 24 horas de estimulación, ya que constituyó el tiempo donde se observaron los máximos niveles de mRNA como también de proteína secretada para varias citoquinas, sugiriendo que otras citoquinas relacionadas podrían estar en condiciones similares. Además, este tiempo aún se puede considerar temprano en una respuesta inmune innata contra hemocianinas y por tanto se encuentra dentro del marco temporal de una inflamación aguda, que es el objetivo de análisis general del presente trabajo.



**Figura 9: CCH, a diferencia de FLH y KLH no estimula de manera significativa la expresión de IL-12p40. A, B y C** representan los resultados de la cuantificación relativa a la condición sin estimular del gen de la subunidad p40 de IL-12, bajo la estimulación de las hemocianinas y LPS. De manera muy similar como ocurre en el transcrito de IL-6, tanto KLH y FLH son capaces de promover un aumento del nivel de mRNA de la subunidad p40 de IL-12 a pocas horas de estimulación, para luego volver al estado basal al cabo de 24 horas. En **D, E y F**, se representan los valores de la subunidad secretado al medio de cultivo bajo las condiciones de cultivos mencionadas anteriormente a las 5, 24 y 48 horas. En tanto, **G y H** corresponden a representaciones de curvas de cinéticas de los resultados de qPCR y ELISA, respectivamente. Todos los resultados corresponden a mediciones provenientes de 3 experimentos independientes. \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ . rc: raíz cuadrada.



**Figura 10:** Las hemocianinas de moluscos estimulan a distintos tiempos e intensidades la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p40. Las representaciones corresponde a las medias de los datos presentados en las figuras 5 a 8 anteriores.



**Figura 11: FLH y KLH inducen la secreción máxima de IL-6 y IL-12p40 a las 24 horas.** Las representaciones corresponden a las medias de los datos presentados en las figuras 5 a 8 anteriores.

#### 4. PCR-Array y ELISA-Array de un panel de 84 citoquinas y quimioquinas de macrófagos murinos estimulados *in vitro* con CCH, KLH, FLH por 24 horas

Una vez determinada la dosis de hemocianina apropiada para la estimulación de los macrófagos, el tiempo de incubación y además comprobar que efectivamente las células extraídas respondieron liberando al medio de cultivo las 4 citoquinas proinflamatorias características, se prosiguió con el análisis por PCR-Array. Este análisis consistió en el desarrollo de RT-PCR en tiempo real de un panel de 84 genes (**ANEXO I**), en este caso, citoquinas y quimioquinas murinas. En tanto, los sobrenadantes de cultivo fueron analizados por ELISA-Array, servicio llevado a cabo por la empresa Eve Technologies (AL, Canadá), que estudió la presencia de 32 citoquinas de las cuales 31 están consideradas en el ensayo de PCR-Array (**ANEXO 1**, resaltado con rojo), a excepción de la proteína MIP-2/CXCL-2.

En la **Tabla 2** se presentan los resultados del ensayo de PCR-Array de macrófagos estimulados con hemocianinas por 24 horas, en que solo se consideraron aquellos genes que presentaron cambios en el número de copias de mRNA en al menos una condición. Para el análisis se consideraron las siguientes condiciones: todos los valores Ct menores a 33, eficiencias de reacción mayores al 55% y con el perfil de curva *melting* según correspondió al amplicón específico. De los 84 genes estudiados, 46 presentaron un aumento

(*upregulation*) o disminución (*downregulation*) significativo ( $p < 0,05$ ) en su transcrito y fueron clasificados en la tabla de acuerdo a la función por la cual son conocidos de la siguiente forma: factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas proinflamatorias, citoquinas antiinflamatorias, citoquinas pertenecientes a la superfamilia TNF y otros.

Como se había comprobado con los anteriores experimentos de PCR en tiempo real, el LPS fue capaz de aumentar el nivel de mRNA de genes de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ; además su presencia también estimuló el aumento de transcritos de genes de proteínas quimioattractoras de neutrófilos como CXCL-3, CXCL-5 y CXCL-1 (KC), este último una de las principales y primeras quimioquinas en sintetizarse en una inflamación aguda por macrófagos, mastocitos y células epiteliales<sup>101,102</sup>. Cabe destacar el alto grado de estimulación del LPS (100 ng/mL) sobre aquellos genes claves durante una inflamación aguda como *Il1b*, *Il6*, *Cxcl3* y *Il12a*, lo que valida una vez más el modelo utilizado en esta tesis y el estado funcional respondedor en que se encontraban las células durante los experimentos con hemocianinas.

Entre las 3 hemocianinas, se observa una clara distinción en como éstas afectan a los genes estudiados, siendo CCH la que menos efecto ejerció sobre los transcritos, no obstante al igual que FLH, se mantuvieron en bajas copias

los mensajeros de *IL4* e *IL5*, citoquinas consideradas de perfil inmunológico Th2 y sintetizadas por macrófagos activados tipo M2<sup>103,104</sup>. Curiosamente, estas 2 hemocianinas también regulan hacia la baja el mRNA del gen de adiponectina, que es expresada exclusivamente por adipocitos y que promueve una polarización de macrófagos hacia el tipo M2<sup>105,106</sup>. Al comparar los perfiles de estimulación de de KLH y FLH, se pueden encontrar que ambos ejercen efectos en casi la mayoría de los genes que induce LPS, salvo en algunas excepciones como las de las quimioquinas *Cxcl13*, *Ccl24* y *Ccl3*, e *Ifn*, esta última citoquina clave en la polarización del perfil inmunológico Th1 donde solo FLH aumentó su nivel de transcrito, tanto como LPS. De manera interesante, entre todas condiciones de cultivo, FLH fue la única en regular hacia la baja el nivel de transcrito de TGF- $\beta$ 2, citoquina expresada por macrófagos involucrados en la fase resolutive de la reacción inflamatoria al promover el cese de la migración de leucocitos y la remoción de células inflamatorias<sup>107</sup>.

La **Figura 12** corresponde a gráficos de *scatter* de los resultados completos del ensayo de PCR-Array, donde se puede visualizar de mejor manera los efectos de los distintos estímulos en los mensajeros de los 84 genes de citoquinas. En estos gráficos, la diagonal de línea negra indica igualdad en la relación entre el número de mRNA de la condición estimulada y la de la condición sin estimular (medio solo), en tanto las líneas diagonales rosadas, establecen los límites superiores e inferiores que indica si un gen está regulado

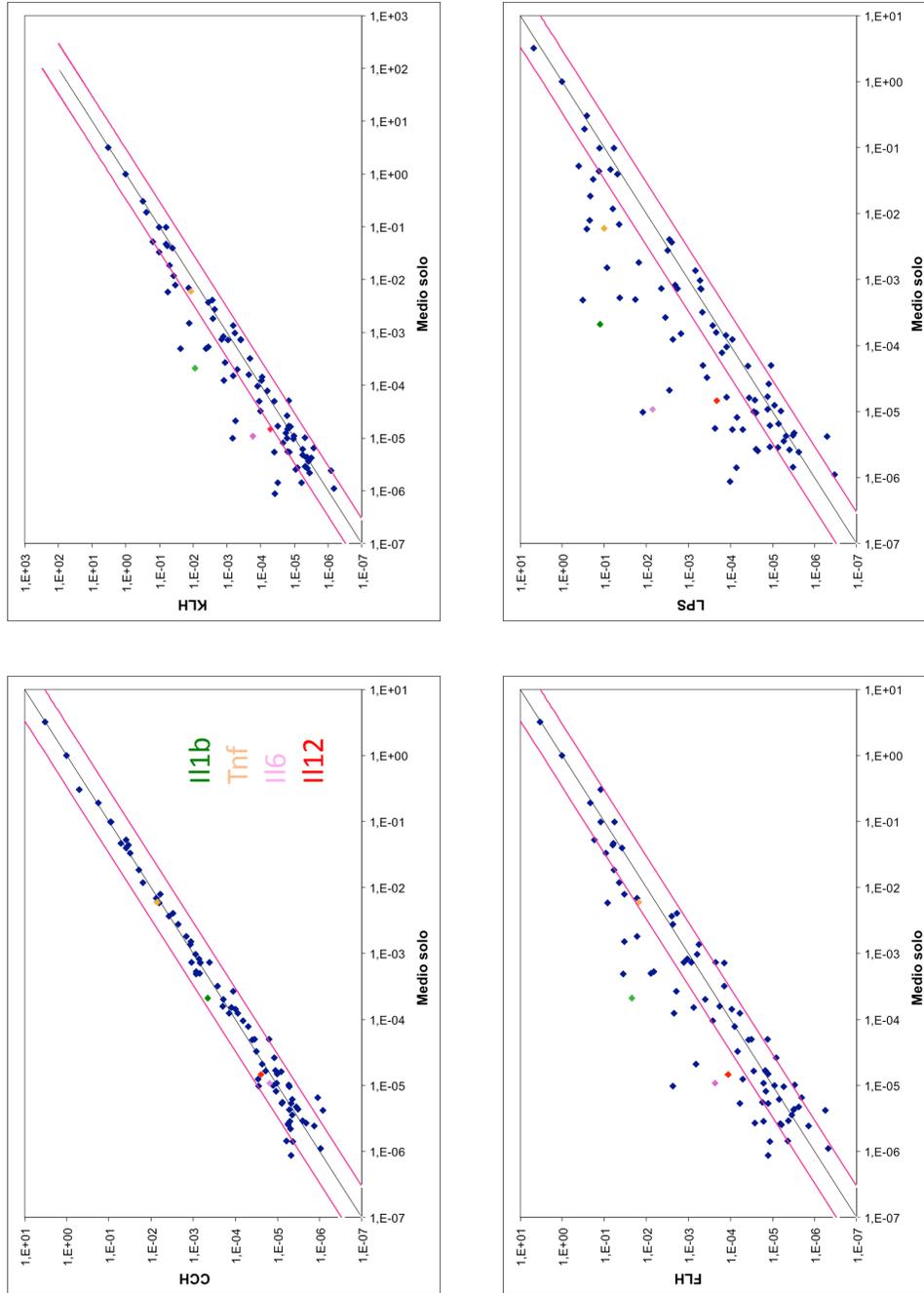
hacia al alza (>3) o hacia la baja (<3), respectivamente. De manera similar, pero destacando la significancia estadística de los aumentos o disminuciones en los mRNA, los resultados pueden mostrarse en gráficos volcano (**Figura 13**). De manera similar en los gráficos *scatter*, las líneas rosadas en los gráficos de volcano fijan los límites superiores e inferiores de regulación, considerando a la izquierda de la zona central como regulación hacia la baja y a la derecha como regulación hacia al alza. Como se ve en los dos tipos de representaciones, CCH a las 24 horas tiende a ejercer un escaso efecto a nivel del mRNA de estos genes, destacándose solo *Il4* e *Il5*, sin bien se registró un aumento para *Il22* e *Il17a*, estos valores no son significativo; en tanto KLH y FLH lo hacen al alza en muchos genes, entre ellos *Csf3*, *Ccl2*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il12a*, *Il12b*, *Cxcl15* e *Il17a*, que también son estimulados por LPS.

Gen/Proteína	CCH	KLH	FLH	LPS	
<i>Bmp7</i>				-3,31	<b>Factores de crecimiento</b>
<i>Cntf</i>			-3,20		
<i>Csf1</i> /M-CSF				6,00	
<i>Csf2</i> /GM-CSF			3,13	41,73	
<i>Csf3</i> /G-CSF		26,68	31,29	134,78	
<i>Lif</i>		3,12		10,98	
<i>Ccl17</i>				9,16	<b>Quimioquinas</b>
<i>Ccl19</i>			-3,23		
<i>Ccl2</i> /MCP-1		9,54	14,03	43,95	
<i>Ccl22</i>		4,31	4,93	9,93	
<i>Ccl24</i>			4,05		
<i>Ccl3</i> /MIP-1 $\alpha$			3,25	11,75	
<i>Ccl4</i> /MIP-1 $\beta$				6,48	
<i>Ccl5</i> /RANTES			3,31	7,76	
<i>Ccl7</i>		8,65	22,26	58,22	
<i>Cxcl1</i>		6,86	12,49	80,88	
<i>Cxcl10</i> /IP-10		8,55	15,59	36,96	
<i>Cxcl11</i>		3,70		9,00	
<i>Cxcl13</i>			9,00	8,31	
<i>Cxcl16</i>				3,09	
<i>Cxcl3</i>		49,14	72,39	652,83	
<i>Cxcl5</i> /LIX		4,19	7,18	13,29	
<i>Cxcl9</i> /MIG			5,69		
<i>Pf4</i> /CXCL-4		3,07		5,55	
<i>Ppbp</i> /CXCL-7		7,49	11,35	17,06	
<i>Ifng</i>			9,66	9,19	<b>Citoquinas proinflamatoria (Th1/Th17)</b>
<i>Il12a</i> /IL-12p35		67,70	237,94	1224,33	
<i>Il12b</i> /IL-12p40		3,51	7,79	14,42	
<i>Il1a</i> /IL-1 $\alpha$		4,33	4,19	27,81	
<i>Il1b</i> /IL-1 $\beta$		42,19	104,37	599,57	
<i>Il23a</i>				8,60	
<i>Il22</i>	5,53	43,89	14,40	118,88	
<i>Il17a</i>	3,05	22,01	8,17	50,52	
<i>Tgfb2</i>			-5,15		<b>Citoquinas anti-inflamatorias (Th2)</b>
<i>Il1m</i>		3,22	3,79	5,25	
<i>Il13</i>			-3,41		
<i>Il4</i>	-3,14	-3,41	-3,78	-4,63	
<i>Il5</i>	-5,82		-3,16		
<i>Il6</i>		15,55	21,61	659,14	
<i>Tnf</i>				16,78	<b>Citoquinas pertenecientes a la superfamilia de TNF</b>
<i>Cd70</i>				9,57	
<i>Lta</i>				7,46	
<i>Adipoq</i>	-5,05		-7,60	-8,45	<b>Otros</b>
<i>Hc/C5</i>				4,03	

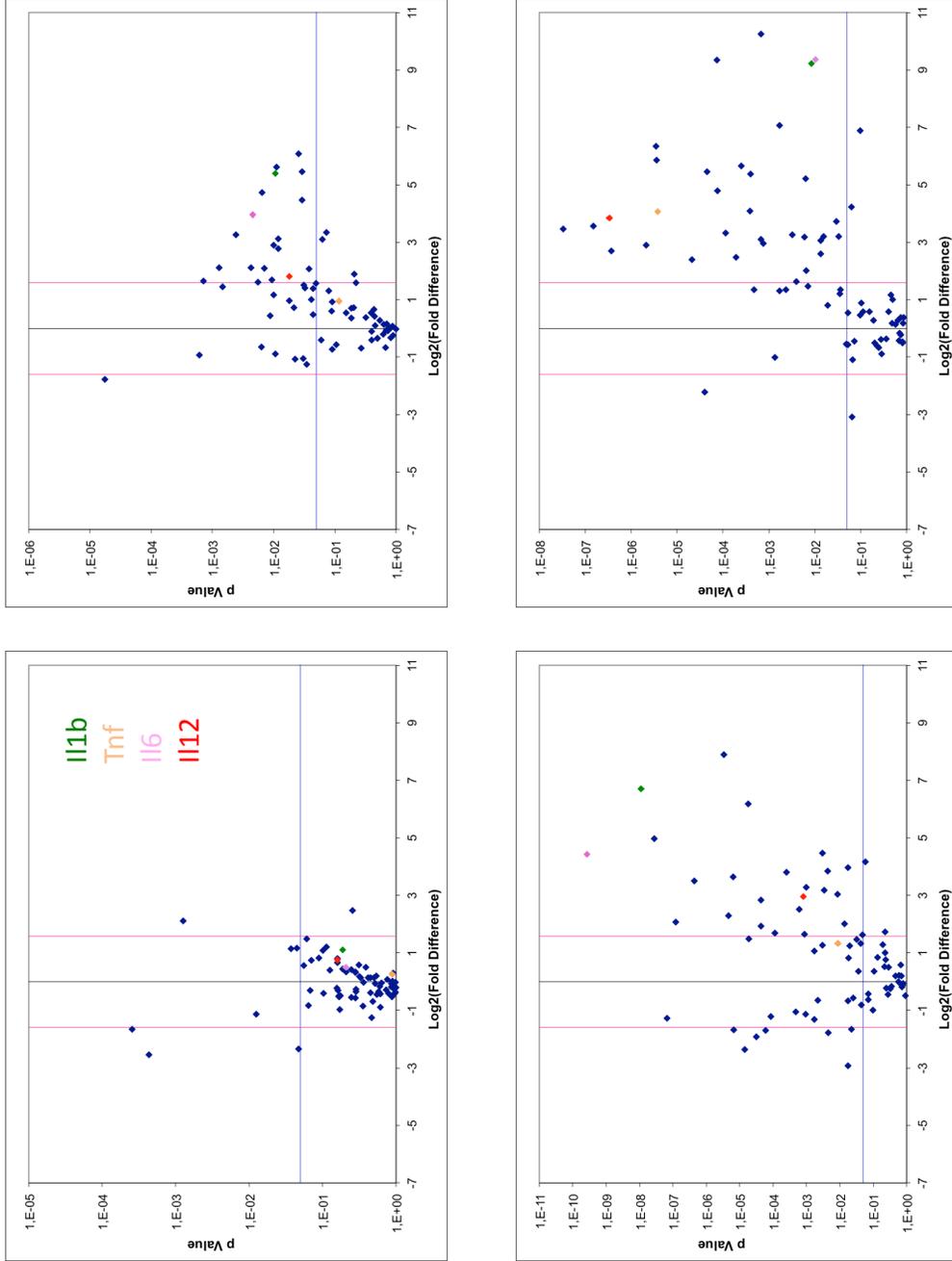
**Tabla 2**

Las tres hemocianinas regulan hacia la baja, el nivel de mRNA de genes asociados a la respuesta Th2. En la primera columna se indica el gen estudiado y el nombre de la proteína que codifica, separado por "/" según sea el caso. La cuantificación relativa se realizó con respecto a la condición sin estimular (control negativo). Los cuadros celestes sin números, indican que el número de copias de mRNA del gen bajo la condición de estimulación se mantuvo constante respecto al control sin estimular; los cuadros con números rojos indican aumento del nivel de mRNA de al menos 3 veces respecto al control y los números azules indican una baja de mRNA de al menos 3 veces respecto al control. Las casillas de color rojo o azul indican una significancia estadística con  $p < 0,05$ .

**Figura 12: Tanto KLH como FLH promueven el aumento del nivel relativo de genes de citoquinas y quimioquinas luego de 24 horas de estimulación.** Los valores de cada eje corresponden  $2^{\Delta Ct}$  de cada condición. Cada punto representa un gen de los 84 que comprenden el kit, algunos de ellos están resaltados en colores: verde corresponde a IL1b, amarillo a Tnf, rosa Il6 y rojo a Il12b. Los genes por sobre la línea rosa superior, se consideran que se encuentran regulados al alza (>3), en tanto todos aquellos genes que se encuentren por debajo de la segunda línea de rosa, se consideran que está regulados hacia la baja (<3).



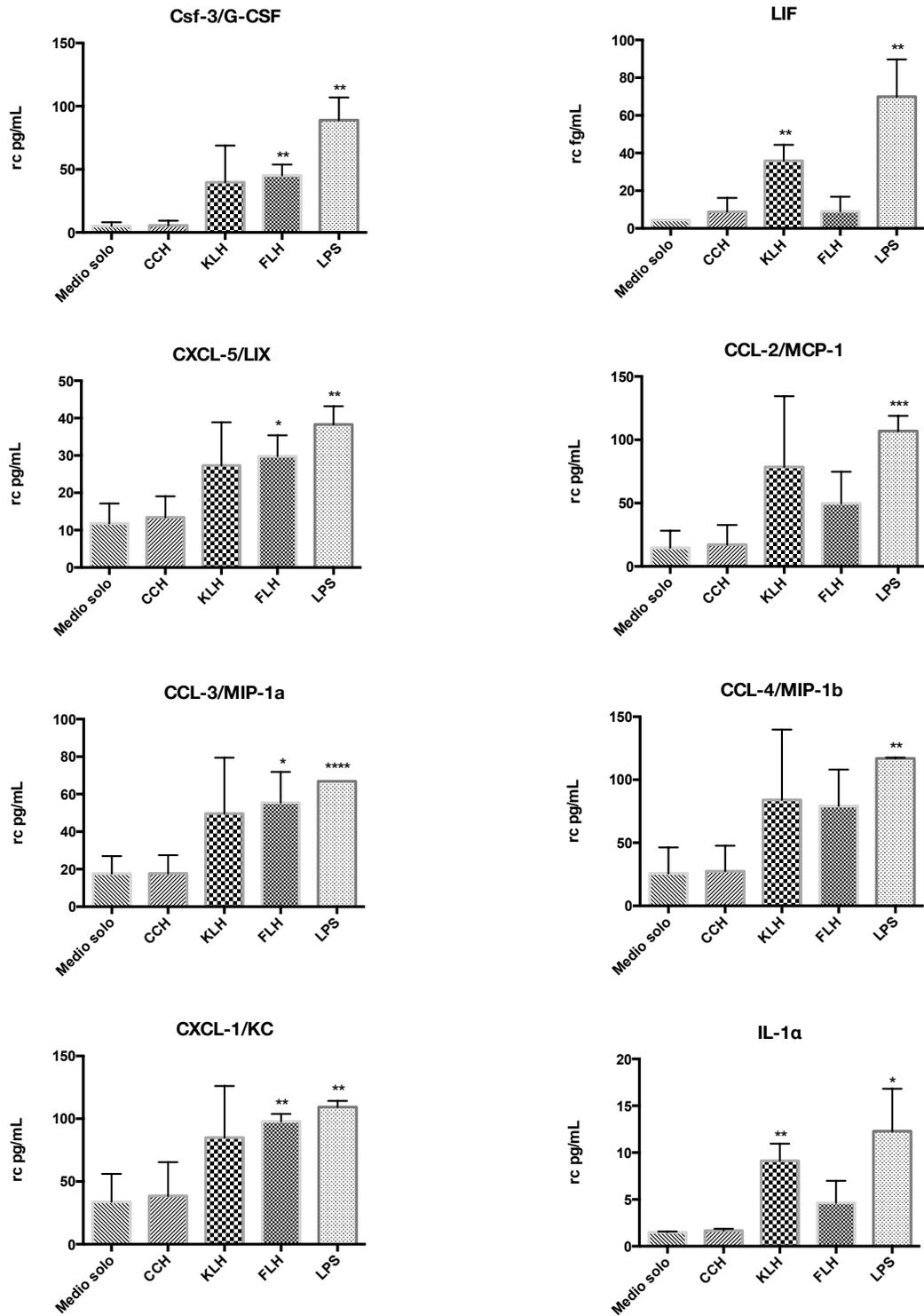
**Figura 13: FLH es más inmunogénica al inducir una mayor regulación al alza de mRNA de genes citoquinas y quimioquinas luego de 24 horas de estimulación.** Cada punto representa un gen de los 84 que comprenden el kit, algunos de ellos están resaltados en colores: verde para IL1b, amarillo a Tnf, rosa IL6 y rojo a IL12b. Los genes que se ubican hacia la izquierda de la zona comprendida entre las líneas rosas, por otro lado se consideran que se encuentran regulados al alza (>3) si se ubican a la derecha. La línea horizontal indica el valor de  $p=0,05$ .



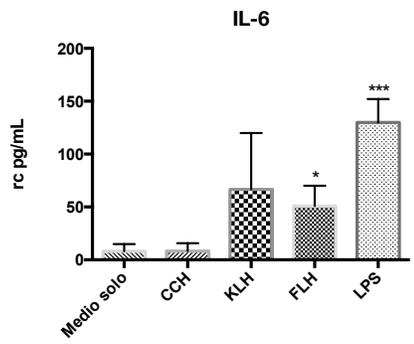
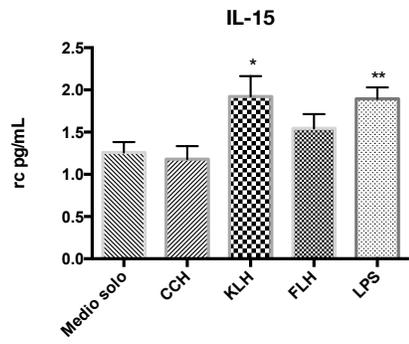
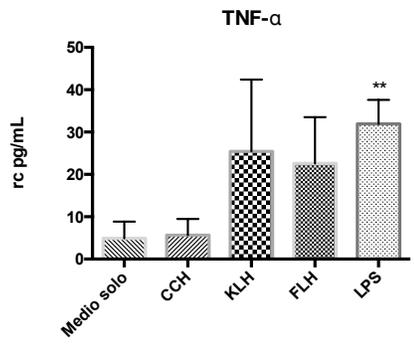
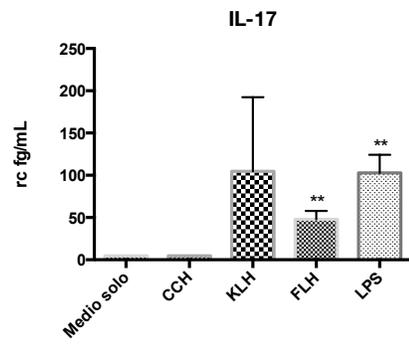
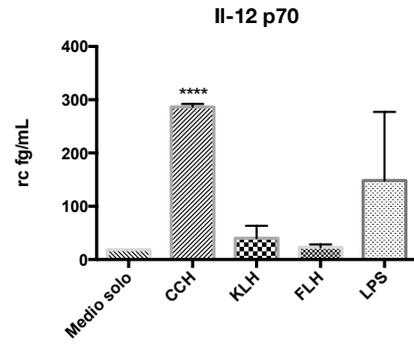
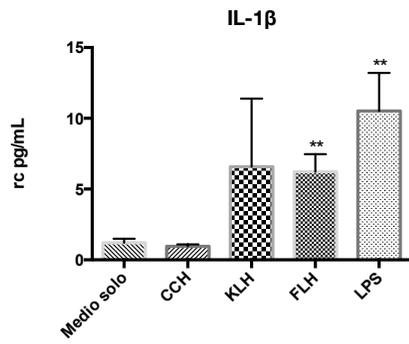
Para verificar los resultados de PCR-Array a nivel de proteína secretada al medio extracelular, los sobrenadantes de cultivo fueron analizados mediante un ensayo de ELISA-Array ofrecido por una empresa especializada. De las 32 citoquinas que componen el panel (Véase **ANEXO II**), 14 presentaron resultados significativos (**Figura 14**). A pesar que los resultados de PCR-Array indicaron alzas en los mRNA de GM-CSF, G-CSF, M-CSF y LIF, solamente se encontraron alzas significativas en proteína para G-CSF y LIF, con perfiles de secreción similar al de sus respectivos perfiles de mensajero. Entre las quimioquinas pesquisadas, los atractores de leucocitos KC, CXCL-5, CCL-2, CCL-3 y CCL-4 tuvieron una secreción significativa en comparación al control sin estimular (medio solo), donde los niveles de quimioquina liberada entre los distintos estímulos era bastante parejo, aunque LPS siempre ligeramente más alto que KLH y FLH. Entre las citoquinas proinflamatorias, llamó la atención que se haya registrado liberación tanto de IL-1 $\alpha$  como de IL-1 $\beta$ , debido a que necesitan de la activación del inflamosoma para su liberación<sup>108</sup>. Otro hecho interesante es la secreción particularmente alta de IL-12p70 bajo la condición de estimulación con CCH, dado que los resultados PCR-Array mostraron altos números de copias de mensajeros tanto de la subunidad p35 como p40 en todas las condiciones de cultivo excepto las que usaron CCH. La citoquina inductora del perfil inmunológico Th17, IL-17 también fue inducida a su secreción bajo las condiciones de KLH, FLH y LPS, como indica el alza en sus mRNA. De manera similar, se observa que el aumento en el transcrito del gen

*Tnf* por efecto del LPS, también se refleja en un alza en la liberación de citoquina, no obstante los resultados sugieren además que tanto KLH como FLH también estarían estimulando su secreción. Por otra parte, IL-6 es secretada en altas cantidades bajo los efectos del LPS, siguiendo en orden de disminución de su nivel FLH y KLH. De manera general, podemos decir que CCH, al igual que los resultados de PCR-Array, no estaría ejerciendo efecto a nivel de mRNA ni a nivel de proteína, por sí misma al cabo de 24 horas de estimulación.

Al evaluar los valores obtenidos en este ensayo y compararlos con los de los ELISA anteriores para las cuatro citoquinas modelo (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ ) se obtienen resultados muy parecidos, a excepción de IL-12p40, donde no se registraron valores significativos en el ELISA-Array, no obstante que ambas técnicas son tipo ELISA, su ejecución conlleva pasos distintos y reactivos distintos, por lo que se puede deducir que las muestras suministradas al servicio de ELISA-Array fueron de la misma calidad que las utilizadas en los kit de ELISA adquiridos comercialmente, usados en nuestro laboratorio.



**Figura 14:** FLH induce de manera significativa, la secreción de quimioquinas claves en el proceso de extravasación de neutrófilos luego de 24 horas de estimulación. Los datos corresponden a lecturas en triplicados de 3 experimentos independientes (n=3). rc: raíz cuadrada. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,005. (Continúa)



(Continuación)

## DISCUSIÓN

El interés biotecnológico en las hemocianinas y, específicamente en KLH, se remonta a los años 60, cuando se comienza con los primeros estudios sobre sus propiedades inmunoestimulantes en ensayos en animales<sup>56,109-111</sup>. Desde entonces, la hemocianina proveniente de la lapa californiana ha sido utilizada como proteína *carrier* de hormonas, péptidos, polisacáridos y las más diversas sustancias químicas; en vacunas profilácticas contra patógenos<sup>5,6</sup> y terapéuticas antitumorales<sup>7-10</sup>, e incluso como terapia alternativa, en reemplazo de la bacteria *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) para tratar el cáncer superficial de vejiga (CSV)<sup>12</sup>, todo esto gracias a su singular propiedad de inmunoestimulante no específico *per se*, es decir sin la ayuda de adyuvantes adicionales. Esta última característica sumada a la biodiversidad de hemocianinas, ha llevado a nuestro laboratorio a buscar nuevas candidatas con mejores propiedades inmunológicas y es así como emerge las hemocianinas CCH y FLH, provenientes de los moluscos *C. concholepas* y *F. latimarginata*, respectivamente, que habitan nuestras costas desde el Norte al Sur del país. Estas hemocianinas si bien comparten una clasificación proteica basada en su función primordial que es el transporte de oxígeno, son moléculas que difieren enormemente entre sí, lo cual se refleja en su composición estructural (heterodecamérica y homodecamérica, respectivamente)<sup>15,29</sup>, estabilidad (muy

alta y moderada, respectivamente)<sup>29,112</sup> y composición de carbohidratos (solo azúcares tipo *N-linked* expuestos y, tanto azúcares tipo *N-linked* como *O-linked* expuestos, respectivamente<sup>29</sup>, todos estos factores causales potenciales de inmunogenicidad. En trabajos previos, hemos demostrado que no solo las propiedades inmunoestimulantes de CCH y FLH son comparables a las de KLH<sup>14,15</sup>, sino que FLH incluso es aún más inmunogénica y con superior efecto antitumoral que KLH y CCH en un modelo de melanoma murino<sup>29,113</sup>. No obstante, a pesar de los numerosos estudios entorno a las propiedades inmunoestimulantes de estas megaproteínas, no existe un conocimiento profundo de los mecanismos por los cuales activan el sistema inmune y producen los benéficos efectos anteriormente señalados.

Es conocido que tanto KLH como CCH son capaces promover un perfil inmunológico tipo Th1<sup>53-55,114</sup>, ello sumado a la naturaleza proteica de la molécula, indican que indudablemente deben ser reconocidas por células APC, quienes las fagocitan y procesan para su presentación antigénica a linfocitos T CD4+, por tratarse de antígenos proteicos y exógenos. Bajo esta lógica, hemos demostrado que tanto CCH como KLH son fagocitados por células APC<sup>24,28,30</sup>, no obstante la activación celular en DCs, especialmente en lo referente a su presentación antigénica *in vitro* aún se mantiene en controversia<sup>24,28,39,40</sup>, probablemente debido a que por su lento procesamiento, los tiempos de observación *in vitro* para estas proteínas debieran ser mayores a lo que

habitualmente se usa para antígenos como BSA u OVO, cuyo procesamiento ocurre antes de las 24 hrs tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, es posible que las condiciones simplificadas de un cultivo *in vitro*, en que generalmente se usa un solo tipo celular, no sean las más adecuadas para las hemocianinas. En efecto, hemos observado que en cultivos *in vitro* de DCs estimulados con CCH, se observa la secreción de IL-12 recién a las 72 hrs. Sin embargo co-cultivos de DCs preincubadas con CCH y posteriormente cultivadas con células Natural Killer muestran secreción de dicha citoquina ya a las 24 hrs., según resultados de Del Campo *et al.* (datos presentado a revista). También hemos demostrado que en el reconocimiento de FLH participaría un receptor tipo lectina C que interactuaría con residuos de carbohidratos de la proteína<sup>24</sup>, de manera análoga al reconocimiento de KLH en que participan receptores de manosa<sup>39</sup>.

Si bien en los estudios anteriormente señalados están orientados a la incorporación y procesamiento de las hemocianinas por parte de APCs, no existen estudios detallados orientados a evaluar específicamente su nivel de activación mirando la secreción de ciertas citoquinas. Es así, que no se dispone de información que describa los efectos de las hemocianinas durante las primeras horas posteriores a su ingreso al organismo, en una respuesta primaria, es decir durante la respuesta inmune innata, si es que la hay contra ellas, lo que correspondería a una fase temprana de una inflamación aguda. Basamos esta hipótesis en el dogma actual en inmunología que dice que la

respuesta inmune para iniciarse requiere una señal de peligro y esto es la inflamación<sup>115</sup>. De manera tal que, conociendo el rol esencial de citoquinas y quimioquinas como mediadores químicos y coordinadores de la respuesta del sistema inmune, en esta tesis se propuso estudiar los efectos de las 3 hemocianinas mencionadas, CCH, KLH y FLH, en la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en macrófagos peritoneales cultivados *in vitro*. Los macrófagos son capaces de numerosas actividades funcionales tanto en la iniciación de la respuesta inmune mediada por células como en su desenlace (**Figura 15**). Así, durante el curso de la respuesta, los macrófagos pueden mostrar, en diferentes momentos, tanto una actividad inflamatoria como anti-inflamatoria, reflejadas en la citoquinas y/o quimioquinas que ellos secretan.

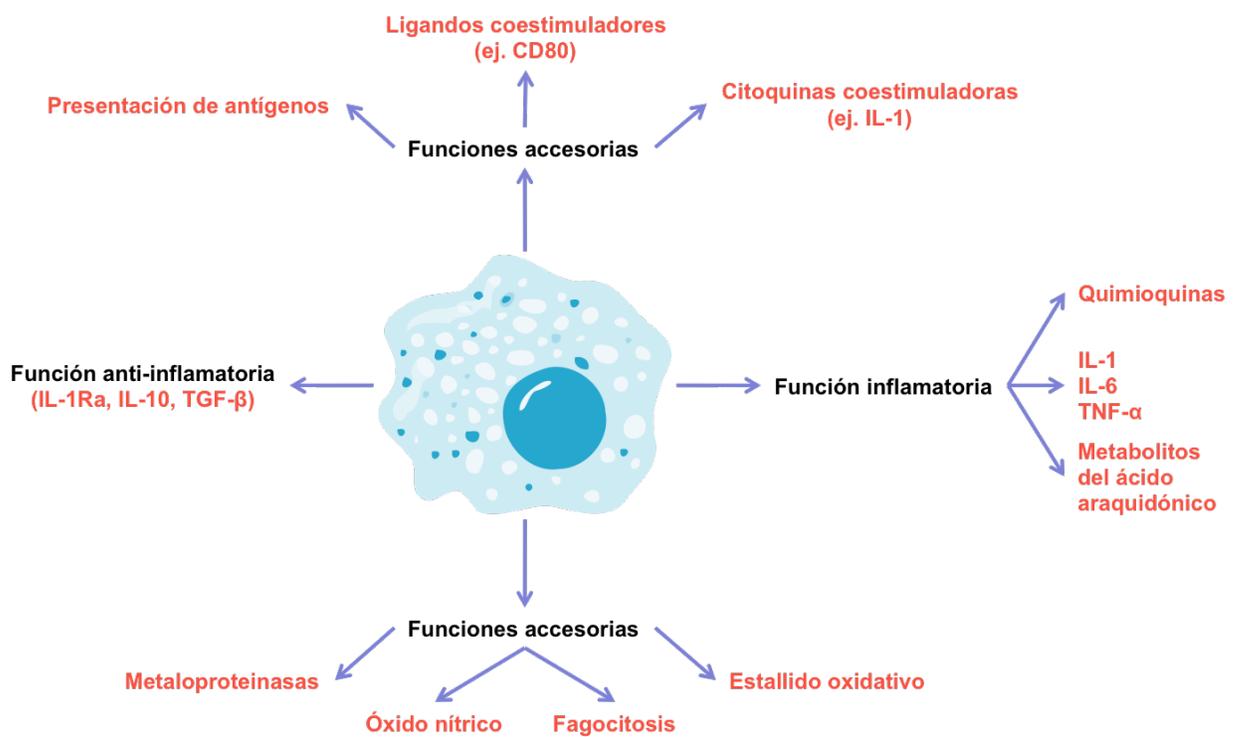


Figura 15: Las diversas funciones de los macrófagos. Figura modificada de Stout *et al.*<sup>116</sup>

## 1. Caracterización de cultivo de macrófagos peritoneales de ratón y ensayo dosis respuesta con CCH, KLH y FLH

Para llevar a cabo este trabajo, se estableció como modelo experimental trabajar con cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón, ya que estas células constituyen uno de los componentes de la primera línea de defensa, por ende se pueden encontrar en múltiples tejidos, además como ya se señaló, en una inflamación aguda, los macrófagos son unos de los principales reguladores de la respuesta inmune<sup>117-119</sup>. Una manera eficiente y fácil de obtener macrófagos es mediante inyección intraperitoneal de una solución de tioglicolato la cual permite recolectar un alto número de células por ratón en poco tiempo. Si bien la población reclutada es fenotípicamente y funcionalmente distinta a la residente<sup>69,120,121</sup>, son altamente fagocíticas y sensibles a estímulos proinflamatorios<sup>69,121,122</sup>. Como se demostró por microscopía con contraste de fase y citometría de flujo (**Figura 2**), las células obtenidas correspondían a una población homogénea compuesta en más del 99% por macrófagos, con fenotipo y morfología características, descritas en la literatura<sup>67,71,72</sup>. Para verificar la funcionalidad de estas células, fueron estimuladas con LPS y respondieron de acuerdo a lo esperado, con un aumento de tamaño y densidad, producto de la alza en gránulos citoplasmáticos y contenido proteico; fenotípicamente se manifestaron con un aumento de moléculas coestimuladoras, MHC II y CD40, todas estas características asociadas a la

activación clásica de macrófagos tipo M1<sup>70,123,124</sup>. Para verificar la capacidad fagocítica de los macrófagos, fueron co-cultivados con CCH por 1 hora y luego fijados para ser analizados mediante microscopía electrónica. La presencia de vacuolas endocíticas con moléculas de CCH, fue indicio de la incorporación activa y temprana de la proteína (**Figura 3**).

Una vez que se determinó que el método de extracción de macrófagos, permitía la obtención de células funcionales y sensibles a estímulos, se prosiguió con el ensayo para determinar la concentración óptima de hemocianinas mediante el establecimiento de curvas dosis-respuesta. A nivel morfológico, ninguna de las hemocianinas produjo un cambio comparable al ejercido por LPS al cabo de 24 horas, incluso a la concentración máxima, lo cual indica que no constituiría un estímulo de activación celular dentro del tiempo ensayado. Estos resultados se apoyan en lo reportado por Arancibia<sup>24</sup>, donde macrófagos estimulados con CCH, KLH y FLH no generaron alzas significativas de NO, que una señal característica de macrófagos activados del tipo M1. De los resultados de RT-PCR, se puede determinar claramente que las diferencias estructurales entre las hemocianinas se reflejan en sus efectos sobre los niveles de mRNA de 4 citoquinas claves en un proceso de inflamación aguda, a saber IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ , siendo FLH la única en generar una curva de dosis-respuesta para IL-1b, IL-6 e IL-12p40 (**Figura 4**). No obstante, considerando la baja sensibilidad de la técnica para visualizar los

amplicones, es posible que tanto CCH como KLH induzcan alzas no perceptible por este método, así también que estas hemocianinas ejerzan sus efectos a concentraciones más altas o en tiempos más tempranos o tardíos. De esta manera, considerando los resultados de las microscopías de los macrófagos estimulados con las 3 hemocianinas y tomando como referencia los efectos generados por FLH en los ensayo de RT-PCR, se determinó que la concentración a utilizar en los ensayo posteriores sería 1 mg hemocianina/mL de medio de cultivo.

## 2. Perfil cinético de la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y TNF- $\alpha$ en macrófagos peritoneales cultivados con CCH, KLH, FLH

Dado que la técnica de RT-PCR no permite mostrar diferencias sutiles, ni puede representar el nivel de mensajero de un gen en un momento dado, se recurrió a la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) para determinar las reales repercusiones de las 3 hemocianinas sobre la expresión de genes de citoquinas y quimioquinas de macrófagos. Además, considerando los resultados del análisis mediante RT-PCR, nos propusimos realizar una cinética de estimulación con las 3 hemocianinas y con LPS como control positivo, con el fin de definir el tiempo de estimulación que condujera a la expresión de la mayor cantidad de proteína. En paralelo, también se midió por ELISA, la cantidad de las citoquinas antes señaladas, secretadas al medio de cultivo.

Los datos colectados del ensayo de RT-qPCR fueron analizados usando el método  $\Delta\Delta Ct$ , cuya fórmula se representa en la **Figura 16**. Todas las cuantificaciones fueron realizadas usando  $\beta$ -actina como gen de referencia (ref) y relativas a la condición sin estimular (control). De los resultados colectados del ensayo de ELISA, debido a la dispersión observada, estos fueron transformados a la raíz cuadrada con el fin ajustar su normalidad, transformación comúnmente utilizada para valores positivo mayores a 1<sup>91,125-127</sup>. La dispersión observada en algunos de los resultados de RT-qPCR se explica debido a que el método cuenta con varios pasos en los cuales se puede introducir error, siendo la etapa más crítica la de transcripción reversa, reacción que es sabido que es de baja eficiencia<sup>128,129</sup> y que puede variar enormemente entre los diferentes fabricantes de los kits usados para este propósito. Por eso,

$$R = \frac{2^{-[Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{ref}}]_{\text{estímulo}}}}{2^{-[Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{ref}}]_{\text{control}}}}$$

Figura 16: Fórmula de la cuantificación relativa, método  $\Delta\Delta Ct$ .

fue fundamental contar con un método de extracción de RNA total eficiente y en cantidades suficientes (**Figura 4**). No obstante, cualquier error introducido en

cualquier etapa del RT-qPCR se magnifica en la aplicación del método  $\Delta\Delta C_t$ , al encontrarse los valores  $C_t$  elevados al exponente.

Al observar los efectos globales de cada hemocianina sobre los niveles de mRNA de las 4 citoquinas características (elegidas para poder establecer las condiciones de extracción de mRNA y su cuantificación mediante ELISA en el medio de cultivo de los macrófagos) una vez más se evidencia que las 3 hemocianinas afectan su expresión de forma diferente entre sí (**Figura 10**). Siendo CCH, la que menos estimula y esto se refleja claramente a nivel de la proteína secretada (**Figura 11**), lo cual explica en parte la ausencia de bandas observadas en la **Figura 4**. Entre KLH y FLH, si bien estimulan un alza temprana de los niveles de transcritos, como así mismo el LPS usado como control positivo, existen diferencias en la magnitud alcanzada como también en el tiempo en que se alcanza su máximo. No obstante, al observar los resultados de su secreción al medio mediante ELISA, se observa que los 3 estímulos coinciden en que el máximo de secreción se alcanza a las 24 horas, de lo cual se infiere que los 3 estímulos estarían afectando en distintos puntos de la regulación transcripcional y post-transcripcional de estas citoquinas<sup>75,130,131</sup>.

Considerando lo anterior, se decidió elegir el mRNA extraído a las 24 horas de estimulación de los macrófagos estimulados con las diferentes hemocianinas y, con LPS y medio solo, como control positivo y negativo,

respectivamente, para su análisis por PCR-Array y ELISA-Array, ya que fue el tiempo donde ocurrió la máxima secreción de las 4 citoquinas características evaluadas previamente. Si bien a nivel de mRNA, no todas las citoquinas presentaron sus máximos a las 24 horas, muchos de estos se mantuvieron altos. Además, debido a su naturaleza de activación temprana, es posible que a tiempos posteriores de sus máximos se pudieran recién alcanzar los efectos globales de cada estímulo en la expresión de las distintas citoquinas y quimioquinas.

### **3. PCR-Array y ELISA-Array: Patrón de expresión de citoquinas y quimioquinas en macrófagos estimulados con CCH, KLH y FLH**

Una respuesta inflamatoria aguda gatillada por agentes infecciosos o daño de tejido, involucra la entrega coordinada de componentes humorales y celulares sanguíneos al sitio de infección o injuria<sup>132</sup>. Esta respuesta primaria es mediada por macrófagos residentes y mastocitos especialmente, que reconocen estas amenazas, liberando variados mediadores inflamatorios, entre ellos aminas vasoactivas, eicosanoides, productos de cascadas proteolíticas, citoquinas y quimioquinas<sup>133</sup>, cuyo efecto principal y más inmediato es la generación del exudado local, compuesto por proteínas y leucocitos (principalmente neutrófilos) que normalmente se encuentran restringidos al torrente sanguíneo. En la literatura existen descripciones sobre las propiedades

inmunoestimulantes de las hemocianinas CCH, KLH y FLH en el sistema inmune de mamíferos<sup>23,28,29,39,40,113,114</sup>, como de su interacción con células APC<sup>24,28,30</sup>, así como también de su capacidad para modular la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th1<sup>30</sup>. No obstante, con los resultados presentados hasta el momento, claramente las 3 proteínas actúan de manera distinta sobre el macrófago en la secreción de citoquinas proinflamatorias, ya sea en su intensidad como en su temporalidad, por lo que nos preguntamos si estas diferencias eran transversales en la expresión del resto de las citoquinas y quimioquinas involucradas en una inflamación aguda.

De acuerdo a los resultados del PCR-Array para CCH, la hemocianina del Loco no estaría regulando de manera significativa a las 24 horas, los niveles de mRNA de la mayoría de los 84 genes incluido en el kit, a excepción de aquellos relacionados con la respuesta Th2 (IL-4 e IL-5). Esto estaría de acuerdo con lo reportado por Moltedo *et al.*<sup>18</sup>, quienes demostraron que CCH es capaz de dirigir la respuesta inmune a un perfil Th1 en el modelo murino de carcinoma murino MBT-2. En un estudio similar, macrófagos peritoneales estimulados con CCH por 24 horas, tampoco fueron capaces de secretar IL-1 $\alpha$ . Estas observaciones en conjunto con los resultados de RT-qPCR (**Figura 10**), indicarían que a diferencia de KLH y FLH, CCH estimularía la expresión de citoquinas y/o quimioquinas en macrófagos en un tiempo mayor a 24 horas luego de su reconocimiento, como lo evidencia los resultados obtenidos de co-

cultivos de BMDCs con CCH, cuya estimulación induce la secreción de IL-12 recién al cabo de 72 horas de cultivo<sup>28</sup>. Además, esta baja estimulación por parte de CCH, tal vez explica la razón por la cual es necesario la previa sensibilización de los animales para ser efectiva sus propiedades antitumorales en los modelos de carcinoma de vejiga<sup>24</sup> y melanoma<sup>18,23</sup>. Sin embargo también es cierto, que en el efecto inmunoestimulante de las CCH y de KLH, el requerimiento de una inmunización previa lo hemos interpretado en la dirección de que es un efecto *bystander* mediado por la respuesta adaptativa anti-hemocianinas<sup>18</sup>.

Como se mencionó anteriormente, uno de los efectos más inmediato en una respuesta inflamatoria aguda consiste en la extravasación de neutrófilos desde el torrente sanguíneo al sitio de la injuria mediante la liberación de quimioquinas<sup>117</sup>. Al comparar los perfiles de inducción quimioquinas de KLH y FLH con LPS, usado como control positivo (**Tabla 2**), vemos que los 3 agentes producen una elevación de los niveles de mRNA de las quimioquinas asociadas al reclutamiento de neutrófilos, tales como CCL-22, CCL-7, CXCL-3, CXCL-5, CXCL-1 y G-CSF/CSF-3, estas 2 últimas secretadas durante las primeras horas para promover el egreso de neutrófilos desde la médula ósea<sup>134</sup>. Otras quimioquinas atractoras de neutrófilos son MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , expresadas por la activación de receptores Toll en los inicios de una respuesta inflamatoria. Para el caso de LPS, ambos genes se encuentran a la alza; por otro lado, de las dos

hemocianinas, solo FLH reguló a la alza MIP-1 $\alpha$  pero discretamente. No obstante al revisar los niveles de secreción de estas proteínas MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  (**Figura 14**) en la condición de KLH, se observan una tendencia al alza muy similar a la inducida por FLH, lo que nos permite inferir, que KLH posiblemente estaría regulando los niveles de mRNA de las quimioquinas mencionadas antes de las 24 horas. Esto de ser cierto, indicaría que las diferencia a nivel de mRNA entre las dos hemocianinas, se deberían a que las dos proteínas no ejercen sus efectos al mismo tiempo.

Entre los genes estimulados, no solo cuenta con quimioattractantes de neutrófilos, debido a su naturaleza pleiotrópica también atraen a otros leucocitos como monocitos (P4, CCL-2, CCL-7 y CCL-22)<sup>34,135,136</sup> y células NK (MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ )<sup>137,138</sup>, este último activado por IL-12, constituye una fuente importante de IFN- $\gamma$  en la maduración y activación de monocitos que llegan al sitio de injuria. Curiosamente, ningunas de las hemocianinas fue capaz de regular al alza el mensajero de *Tnf*, no obstante tanto resultados de ELISA (**Figura 8**) como de ELISA-Array (**Figura 14**) indican que existen un aumento de secreción con respecto al control sin estimular, lo cual se puede explicar como un efecto a nivel traduccional de las hemocianinas en la secreción de TNF- $\alpha$ <sup>139</sup>. Según lo reportado por Arancibia<sup>24</sup>, FLH y KLH serían capaces de estimular la activación del inflamasoma y por consiguiente la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$ , no obstante según nuestros resultados, ninguna de las 3 hemocianinas

son capaces de estimular la secreción de estas interleuquinas. Lo registrado por ELISA-Array para estas dos citoquinas, constituyen cantidades muy bajas, generalmente asociadas a secreciones *leaky* o muerte de alguna célula<sup>140</sup>.

Según la literatura, los macrófagos M1 o activados, clásicamente se caracterizan por cambios en la membrana plasmática que incluyen un aumento de contenido de colesterol, fosfodiesterasa; un incremento de la capacidad fagocítica y de la capacidad de adherirse a sustratos de plástico y vidrio; un aumento de fagolisosomas y de vesículas endocíticas; un alto consumo de oxígeno, la secreción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 y de quimioquinas como CCL-2, CCL-3, CCL-5 y CXCL-10; además de especies reactivas de oxígeno y de óxido nítrico<sup>67,70,141,142</sup>. De acuerdo a los resultados de microscopía de luz, las hemocianinas no activan de manera clásica a los macrófagos peritoneales, no obstante según los resultados de PCR-Array, KLH y FLH son capaces de inducir un perfil de citoquinas y quimioquinas tipo macrófagos activados clásicamente.

La estimulación por parte LPS en células presentadoras de antígeno es mediada en parte por la unión al receptor TLR4. En cambio se ha postulado que en la unión de FLH participaría un receptor de lectina tipo-C involucrado en su reconocimiento y acción<sup>24</sup>, al igual que lo reportado para KLH<sup>39</sup>. Al comparar los genes inducidos por FLH y KLH y también por LPS, se confirma que,

efectivamente, algún receptor PRR debería estar involucrado. No obstante, pensamos que debe existir otro mecanismo de reconocimiento de las hemocianinas, ya que CCH, al igual que FLH y KLH aunque comparten oligosacáridos con un alto contenido de manosa, su perfil de carbohidratos *N-linked* y *O-linked* difiere enormemente, como lo demuestra un análisis mediante espectrometría de masas realizado recientemente por nuestro laboratorio. De este estudio se concluye que CCH tiene menos diversidad de azúcares que KLH y FLH y, que la mayor diferencia está en la presencia de xilosa en estas dos últimas hemocianinas y su ausencia en CCH (**Figura 17**). Interesantemente, en experimentos con CCH y FLH desglicosiladas totalmente usando un método químico, se encontró que la remoción de los azúcares de CCH no solo no afectaba el reconocimiento y fagocitosis por parte de DCs sino que sus propiedades inmunogénicas aumentaron y las antitumorales se mantuvieron. En cambio, la desglicosilación de FLH provocó una baja en sus propiedades antitumorales no así en su inmunogenicidad, que se vio aumentada<sup>24</sup>. La presencia de azúcares con residuos de xilosa en FLH supone una sorpresa, ya que estos tipos de glicanos son típicos de glicoproteínas en plantas<sup>143</sup>, no obstante no es la única hemocianina que ha sido descubierta con este tipo de residuo, según Geyer, *et al.*<sup>144</sup> KLH también poseería azúcares con xilosa al igual que las hemocianinas del caracol romano (*Helix pomatia*)<sup>145</sup> y del caracol limnea (*Lymnaea stagnalis*)<sup>146,147</sup>. Lo interesante es que azúcares de este tipo han sido reportados como muy inmunogénicos en mamíferos<sup>148-150</sup>, por

lo que es plausible suponer que parte de las propiedades inmunogénicas de FLH y KLH estén relacionadas con la presencia de glicanos con residuos de xilosa. No obstante lo anterior y como ya se mencionó, manosa es el azúcar común y mayoritario en todas las hemocianinas utilizadas en este trabajo, por lo cual no es descartable pensar que las hemocianinas puedan ser reconocidas como “agentes patógenos altamente manosilados”, lo cual tiene sentido pensando que las células presentadoras de antígeno y especialmente en los macrófagos y células dendríticas poseen abundantes receptores de manosa.

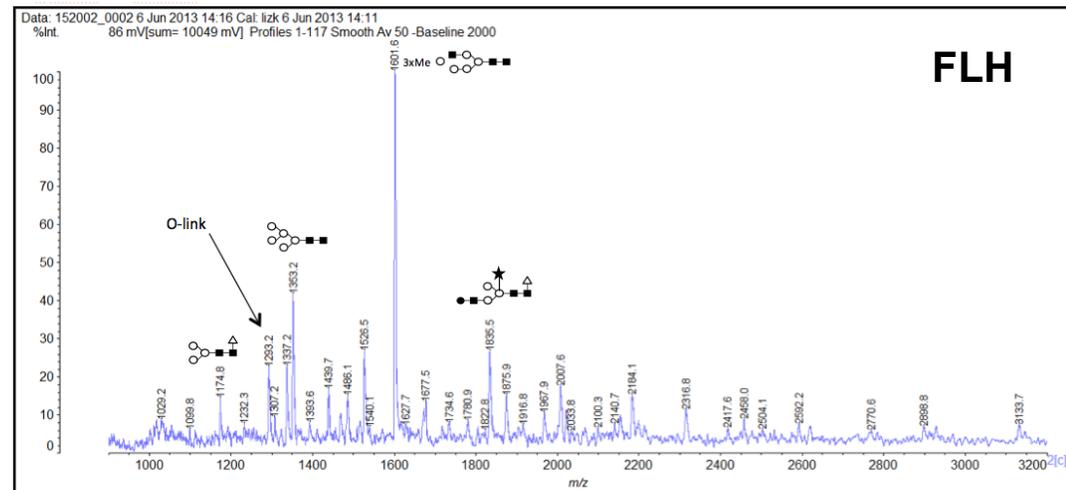
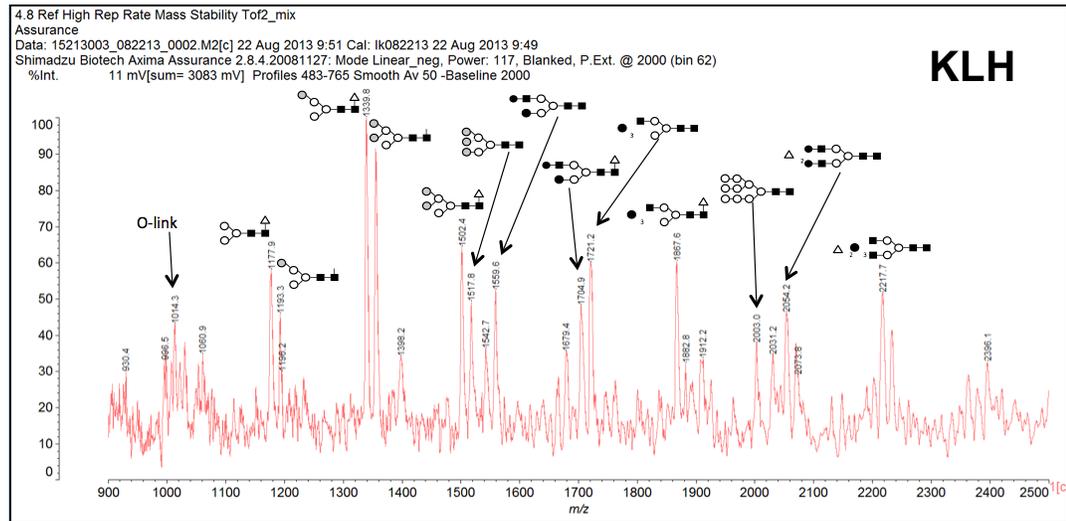
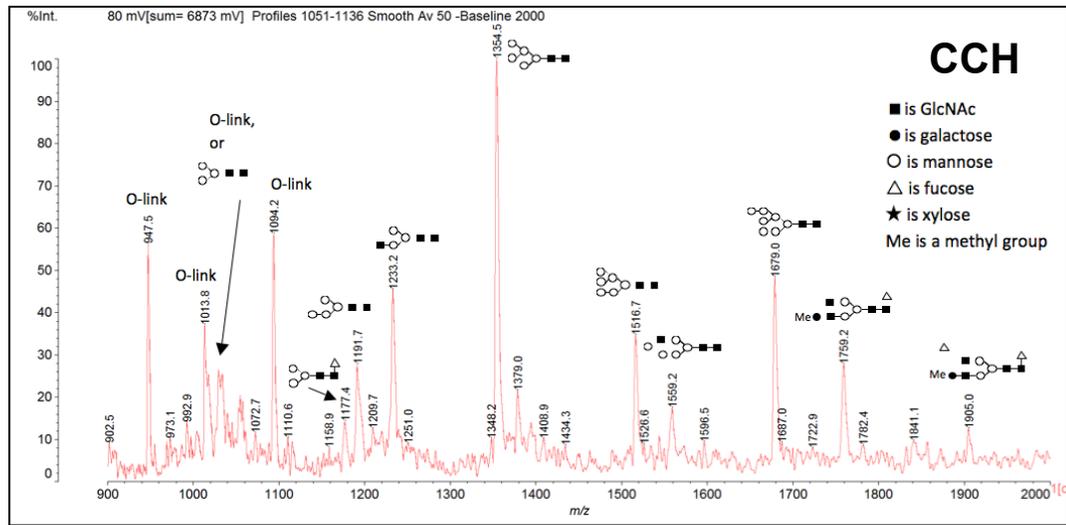
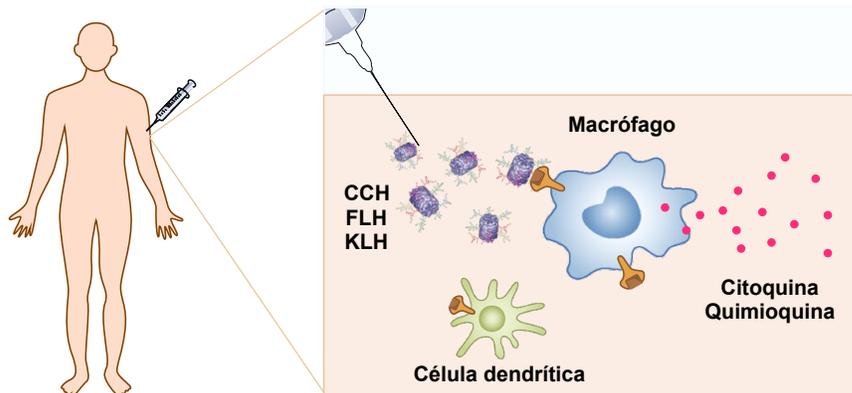


Figura 17: CCH, KLH y FLH analizados por MALDI-TOF-MS, presentan una diferente composición de azúcares. En cada análisis se utilizó 1 mg de proteína.

Hemos demostrado y descrito que las hemocianinas CCH, KLH y FLH, interactúan con macrófagos mediante su reconocimiento e incorporación en vacuolas tempranamente. Esta interacción al cabo de 24 horas no genera cambios morfológicos asociados a la activación por agentes bacterianos como LPS, incluso en altas concentraciones (1 mg/mL). Mediante la técnica de RT-qPCR, demostramos que las hemocianinas regulan al alza los mensajeros de citoquinas claves en un proceso inflamatorio, no obstante las cinéticas de inducción son propias de cada hemocianina. Tomando estos datos como referencia, se decidió estudiar en mayor profundidad los efectos de las 3 hemocianinas en la expresión de un panel mayor de citoquinas y quimioquinas. Los resultados de estos estudios, indican que posiblemente los efectos de CCH sean breves y de baja intensidad; en cambio los efectos ejercidos por KLH y FLH sobre estas citoquinas y quimioquinas son muy parecidos a los provocados por LPS, de lo que se infiere que existiría la participación de un receptor PRR; no obstante la intensidad de estimulación al alza de los mRNA por parte de las hemocianinas dista bastante del componente bacteriano, lo que correlaciona con la característica inocua de estas hemocianinas cuando son inoculadas en mamíferos. Es decir, provocan una inflamación menor pero suficiente para inducir un efecto *bystander* positivo, como lo demuestra su efecto adyuvante/inmunoestimulante. De las citoquinas y quimioquinas inducidas, los resultados permiten decir que tanto KLH y FLH, generan una respuesta inmune vigorosa de parte de células del sistema inmune residente, con un reclutamiento

de leucocitos al lugar de la injuria, con perfil inmunológico Th1 marcado, al mantener regulado a la baja citoquinas claves de la respuesta Th2 como IL-4, IL-5, IL-13 y TGF-  $\beta$ 2.

Finalmente, en la **Figura 19** se presenta un esquema que da cuenta de los principales resultados encontrados y propone como los cambios producidos por las hemocianinas dan el vamos no solo a la respuesta inmune contra ellas, si no también, permite estimular respuestas inmunes latentes en los ganglios regionales generando un ambiente inmunoestimulante con efectos positivos anti-tumorales.



Gen/Proteína	CCH	KLH	FLH	
<i>Cntf</i>			m24	<b>Factores de crecimiento</b>
<i>Csf2</i> /GM-CSF			m24	
<i>Csf3</i> /G-CSF		m24	m24/P24	
<i>Lif</i>		m24/P24		
<i>Ccl19</i>			m24	<b>Quimioquinas</b>
<i>Ccl2</i> /MCP-1		m24	m24	
<i>Ccl22</i>		m24	m24	
<i>Ccl24</i>			m24	
<i>Ccl3</i> /MIP-1 $\alpha$			m24/P24	
<i>Ccl7</i>		m24	m24	
<i>Cxcl1</i> /KC		m24	m24/P24	
<i>Cxcl10</i> /IP-10			m24	
<i>Cxcl13</i>			m24	
<i>Cxcl3</i>		m24	m24	
<i>Cxcl5</i> /LIX		m24	m24/P24	
<i>Cxcl9</i> /MIG			m24	
<i>Pf4</i> /CXCL-4		m24		
<i>Pppb</i> /CXCL-7		m24	m24	
<i>Ifng</i>			m24	<b>Citoquinas proinflamatoria (Th1/Th17)</b>
<i>Il12a</i> /IL-12p35		m24	m24	
<i>Il12b</i> /IL-12p40		m5, m24/P5, P24	m5, m24/P5, P24	
IL-12p70	P24			
<i>Il1a</i> /IL-1 $\alpha$		m24/P24	m24	
<i>Il1b</i> /IL-1 $\beta$		m5, m24	m24/P24	
<i>Il22</i>		m24	m24	
<i>Il17a</i>		m24	m24/P24	
<i>Tgfb2</i>			m24	<b>Citoquinas anti-inflamatorias (Th2)</b>
<i>Il1m</i>		m24	m24	
<i>Il13</i>			m24	
<i>Il4</i>	m24	m24	m24	
<i>Il5</i>	m24		m24	
<i>Il6</i>	m5	m5, m24/P5, P24	m5, m24/P5, P24	
<i>Tnf</i>		P5, P24	P5, P24	<b>Citoquinas pertenecientes a la superfamilia de TNF</b>
<i>Adipoq</i>	m24		m24	<b>Otros</b>
<i>Il9</i>		P24		

	Aumento
	Disminución
m5/24:	mRNA a las 5/24 horas
P5/24:	Proteína a las 5/24 horas

**Figura 18: Las hemocianinas son incorporadas por macrófagos y promueven tempranamente la generación de un ambiente de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.** Incluye solo los resultados significativos de RT-qPCR, PCR-Array, ELISA y ELISA-Array.

## PROYECCIONES FUTURAS

Aunque originalmente en esta tesis se propuso estudiar en más de una estirpe celular presentadora de antígenos los efectos de las hemocianinas, en aras de la reproducibilidad de los resultados se decidió continuar el estudio solo con los macrófagos peritoneales. Por esta razón, dentro de los planes futuros está realizar estudios similares a los implementados en esta tesis con DCs, ya que estas son consideradas por muchos la APC más importante por su capacidad de interactuar con células T CD4<sup>+</sup>. También, aunque en un principio del estudio, se propuso estudiar patrones cinéticos de expresión de citoquinas y quimioquinas, con los datos obtenidos de los RT-qPCRs y PCR-Arrays, nos dimos cuenta que existen ciertos grupos de genes en común que se regulan en presencia de estas hemocianinas, lo cual no justifica construir una cinética de 3 tiempos utilizando la costosa técnica de PCR-Array. Sin embargo los datos presentados sobre la expresión de macrófagos estimulados por 24 horas, sientan las bases y el panorama general sobre como CCH, KLH y FLH iniciarían una respuesta inflamatoria. Lo que se propone de aquí en el futuro estudiar mediante PCR-Array, es la estimulación de macrófagos con CCH en tiempos tempranos, con el fin de contrastar estos resultados con los obtenidos con KLH y FLH a las 24 horas de cultivo. Además sería interesante estudiar por la misma técnica otras moléculas involucradas en el reconocimiento de las hemocianinas,

tales como las vías de activación y señalización o, si inducen la activación de factores transcripcionales como NFκB, aspectos que finalmente permitirían comprender más acabadamente como las hemocianinas ejercen su efecto inmunoestimulante en el sistema inmune.

## CONCLUSIONES

1. Las hemocianinas CCH, KLH y FLH fagocitadas por macrófagos peritoneales murinos cultivados *in vitro*, no generaron cambios morfológicos apreciables al microscopio de luz y electrónico, ni tampoco produjeron toxicidad en un rango de concentraciones evaluadas hasta 1 mg/mL.
2. FLH indujo un aumento dosis-respuesta del mRNA de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12p40 a concentraciones menores que CCH y KLH, como evidenciaron los resultados de RT-qPCR.
3. Las tres hemocianinas estimularon la expresión de IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p40 y TNF- $\alpha$  en distintos tiempos e intensidades, como indican los resultados de RT-qPCR y ELISA, infiriéndose mecanismos de señalización diferentes para cada hemocianina, los cuales se sustentan en diferencias estructurales que involucran especialmente su composición de oligosacáridos.
4. Tanto CCH como KLH y FLH no activan el inflamasoma, ya que no son capaces de inducir la secreción de IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$ .

5. FLH y KLH estimularon tempranamente el aumento de la expresión de quimioquinas claves en la extravasación de leucocitos, tales como MIP-1 $\alpha$  (CCL-3), KC (CXCL-1) y LIX (CXCL-5), las cuales son marcadoras de un proceso inflamatorio agudo.
6. FLH indujo un mayor aumento que KLH y CCH en los mensajero de genes de citoquinas y quimioquinas involucrados en un proceso inflamatorio, tales como CCL-2, CCL-7, CXCL-13 y CXCL-3, resultado que explicaría su mayor inmunogenicidad y efecto antitumoral en un modelo de melanoma murino, en comparación con KLH y CCH.
7. En esta tesis por primera vez se realizó un análisis exhaustivo del conjunto de citoquinas y quimioquinas involucradas en la respuesta innata contra las hemocianinas y se confirmó que generan una respuesta de perfil inmunológico tipo Th1 marcado, al mantener regulado a la baja citoquinas claves de la respuesta Th2 como IL-4, IL-5, IL-13 y TGF- $\beta$ 2.
8. Finalmente, los resultados presentados en esta tesis permiten concluir que los macrófagos también participan en los mecanismos inmunológicos tempranos que acompañan el reconocimiento de las hemocianinas, induciendo un ambiente proinflamatorio que puede explicar sus notables propiedades inmunomoduladoras en los mamíferos.

## REFERENCIAS

1. van Holde, K. & Miller, K. I. Hemocyanins. *Advances in Protein Chemistry* **47**, 1–81 (1995).
2. van Holde, K. E. Hemocyanins and Invertebrate Evolution. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 15563–15566 (2001).
3. Swerdlow, R. D., Ebert, R. F., Lee, P., Bonaventura, C. & Miller, K. I. Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **113**, 537–548 (1996).
4. del Campo, M. *et al.* Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Revista médica de Chile* **139**, 236–246 (2011).
5. Slupetzky, K. *et al.* A papillomavirus-like particle (VLP) vaccine displaying HPV16 L2 epitopes induces cross-neutralizing antibodies to HPV11. *Vaccine* **25**, 2001–2010 (2007).
6. Fan, J. *et al.* Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine* **22**, 2993–3003 (2004).
7. Ragupathi, G. *et al.* Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin. Cancer Res.* **9**, 5214–5220 (2003).
8. López, M. N. *et al.* Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J. Clin. Oncol.* **27**, 945–952 (2009).
9. Slovin, S. F. *et al.* A bivalent conjugate vaccine in the treatment of biochemically relapsed prostate cancer: a study of glycosylated MUC-2-KLH and Globo H-KLH conjugate vaccines given with the new semi-synthetic saponin immunological adjuvant GPI-0100 OR QS-21. *Vaccine* **23**, 3114–3122 (2005).
10. Slovin, S. *et al.* A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: ‘are more antigens better?’. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **56**, 1921–1930 (2007).
11. Bendandi, M. *et al.* Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nat. Med.* **5**, 1171–1177 (1999).
12. Lamm, D. L. *et al.* Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. **37 Suppl 3**, 41–44 (2000).

13. Millard, A. L., Ittelet, D., Schooneman, F. & Bernard, J. Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4<sup>+</sup> T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. *Vaccine* **21**, 869–876 (2003).
14. Oliva, H. *et al.* Monoclonal antibodies to molluscan hemocyanin from *Concholepas concholepas* demonstrate common and specific epitopes among subunits. *Hybrid. Hybridomics* **21**, 365–374 (2002).
15. De Ioannes, P. *et al.* Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.* **279**, 26134–26142 (2004).
16. Matus, S. *et al.* Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **204**, 3221–3234 (2007).
17. Pilon, J. *et al.* Anti-prion activity generated by a novel vaccine formulation. *Neurosci. Lett.* **429**, 161–164 (2007).
18. Moltedo, B. *et al.* Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J. Urol.* **176**, 2690–2695 (2006).
19. Espinoza Morales, C. Caracterización bioquímica e inmunológica de la hemocianina de tres especies de lapas chilenas de la familia *Fissurellidae*: *Fissurella latimarginata* (Lapa negra), *Fissurella cumingi* (Lapa frutilla) y *Fissurella maxima* (Lapa reina). (2007).
20. Lieb, B., Altenhein, B. & Markl, J. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *J. Biol. Chem.* **275**, 5675–5681 (2000).
21. Harris, J. R. & Markl, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* **30**, 597–623 (1999).
22. Arancibia, S., Salazar, F. & Becker, M. I. Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer.
23. Becker, M. I. *et al.* Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *International Immunopharmacology* **9**, 330–339 (2009).
24. Arancibia Zunino, S. Participación De Receptores Tipo-Lectina en La Inmunogenicidad Y en El Efecto Antitumoral De Hemocianinas De Moluscos en Mamíferos. (2012).
25. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819–826 (2007).
26. Watts, C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol.* **5**, 685–692 (2004).
27. Trombetta, E. S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 975–1028 (2005).
28. Del Campo Zaldívar, M. I. Efecto de hemocianinas de moluscos en la maduración de células dendríticas murinas. (2007).

29. Arancibia, S., Del Campo, M., Nova, E., Salazar, F. & Becker, M. I. Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur. J. Immunol.* **42**, 688–699 (2012).
30. Born De Toro, R. Participación de macrófagos en el efecto inmunoestimulante de hemocianinas de moluscos en mamíferos. (2013).
31. Geissmann, F. *et al.* Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
32. Kol, A., Lichtman, A. H., Finberg, R. W., Libby, P. & Kurt-Jones, E. A. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *The Journal of Immunology* **164**, 13–17 (2000).
33. Krieg, A. M. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects\*. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 709–760 (2002).
34. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
35. Goerdts, S. & Orfanos, C. E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* **10**, 137–142 (1999).
36. Merad, M. & Manz, M. G. Dendritic cell homeostasis. *Blood* **113**, 3418–3427 (2009).
37. Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells\*. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685–711 (2003).
38. Liu, Y.-J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275–306 (2005).
39. Presicce, P., Taddeo, A., Conti, A., Villa, M. L. & Bella, Della, S. Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Molecular Immunology* **45**, 1136–1145 (2008).
40. Teitz-Tennenbaum, S., Li, Q., Davis, M. A. & Chang, A. E. Dendritic cells pulsed with keyhole limpet hemocyanin and cryopreserved maintain anti-tumor activity in a murine melanoma model. *Clin. Immunol.* **129**, 482–491 (2008).
41. Timmerman, J. M. & Levy, R. Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *The Journal of Immunology* **164**, 4797–4803 (2000).
42. Shimizu, K., Thomas, E. K., Giedlin, M. & Mulé, J. J. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res.* **61**, 2618–2624 (2001).
43. Jacobs, J. F. M. *et al.* Dendritic Cell Vaccination in Combination with Anti-CD25 Monoclonal Antibody Treatment: A Phase I/II Study in Metastatic Melanoma Patients. *clincancerres.aacrjournals.org*
44. Lesterhuis, W. J. *et al.* Wild-type and modified gp100 peptide-pulsed

- dendritic cell vaccination of advanced melanoma patients can lead to long-term clinical responses independent of the peptide used. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **60**, 249–260 (2011).
45. Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *New England Journal of Medicine* **354**, 610–621 (2006).
  46. Schall, T. J. & Proudfoot, A. E. I. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol* **11**, 355–363 (2011).
  47. Hofmann, S. R. *et al.* Cytokines and their role in lymphoid development, differentiation and homeostasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **2**, 495–506 (2002).
  48. Dinarello, C. A. Proinflammatory Cytokines\*. *Chest* **118**, 503–508 (2000).
  49. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**, 133–146 (2003).
  50. Ma, A., Koka, R. & Burkett, P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 657–679 (2006).
  51. Waldmann, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol* **6**, 595–601 (2006).
  52. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* **10**, 45–65 (2003).
  53. Rojas, L. X. L. *Participacion De Celulas Natural Killer (Nk) en El Efecto Inmunoestimulante De Hemocianinas.* (Memoria para optar al Título de Bioquímico, 2007).
  54. Musselli, C., Livingston, P. O. & Ragupathi, G. Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: The Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**, R20–R26 (2001).
  55. Lambert, S. L., Okada, C. Y. & Levy, R. TCR vaccines against a murine T cell lymphoma: a primary role for antibodies of the IgG2c class in tumor protection. *The Journal of Immunology* **172**, 929–936 (2004).
  56. Herscovitz, H. B., Harold, W. W. Stavitsky, AB. Immunochemical and immunogenic properties of a purified keyhole limpet haemocyanin. *Immunology* **22**, 51 (1972).
  57. Luft, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 409–414 (1961).
  58. Reynolds, C. W. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* **17**, 208–212 (1963).
  59. Barksby, H. E., Nile, C. J., Jaedicke, K. M., Taylor, J. J. & Preshaw, P. M. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Clinical & Experimental Immunology* **156**, 479–487

- (2009).
60. Schmid, C. D. *et al.* Differential gene expression in LPS/IFN $\gamma$  activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *Journal of Neurochemistry* **109 Suppl 1**, 117–125 (2009).
  61. Gaber, M. W. *et al.* Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain. *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 359–366 (2003).
  62. Fan, Y. *et al.* Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of coxsackievirus b3-induced viral myocarditis reduces myocardium inflammation. *Virology* **438**, 17 (2011).
  63. Jayakumar, A., Widenmaier, R., Ma, X. & McDowell, M. A. Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in *Leishmania* spp.-infected macrophages. *J. Parasitol.* **94**, 84–93 (2008).
  64. Goldmann, O. *et al.* Transcriptome analysis of murine macrophages in response to infection with *Streptococcus pyogenes* reveals an unusual activation program. *Infect. Immun.* **75**, 4148–4157 (2007).
  65. Edgar, A. Mice have a transcribed L-threonine aldolase/GLY1 gene, but the human GLY1 gene is a non-processed pseudogene. *BMC genomics* **6**, 32 (2005).
  66. Edgar, A. J. Molecular cloning and tissue distribution of mammalian L-threonine 3-dehydrogenases. *BMC Biochem* **3**, 19 (2002).
  67. Cohn, Z. A. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *The Journal of Immunology* **121**, 813–816 (1978).
  68. Xia, W. *et al.* A functional folate receptor is induced during macrophage activation and can be used to target drugs to activated macrophages. *Blood* **113**, 438–446 (2009).
  69. Ghosn, E. E. B. *et al.* Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 2568–2573 (2010).
  70. Mege, J.-L., Mehraj, V. & Capo, C. Macrophage polarization and bacterial infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 230–234 (2011).
  71. Bloom, W. & Fawcett, D. W. *A Textbook of Histology*. 175–179 (W. B. Saunders Co., 1975).
  72. Lichtman, M. A. Williams hematology. (2006).
  73. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**, 1630–1634 (2005).
  74. Delamarre, L., Couture, R., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J. Exp. Med.* **203**, 2049–2055 (2006).
  75. Simpson, A. E., Tomkins, P. T. & Cooper, K. L. An investigation of the temporal induction of cytokine mRNAs in LPS-challenged thioglycollate-elicited murine peritoneal macrophages using the reverse transcription polymerase chain reaction. *Inflamm. Res.* **46**, 65–71 (1997).

76. Obermeier, F., Gross, V., Schölmerich, J. & Falk, W. Interleukin-1 production by mouse macrophages is regulated in a feedback fashion by nitric oxide. *Journal of Leukocyte Biology* **66**, 829–836 (1999).
77. Lin, W. *et al.* Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nrf2 dependent pathway. *Biochemical Pharmacology* **76**, 967–973 (2008).
78. Lapara, N. J. & Kelly, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J Inflamm (Lond)* **7**, 8 (2010).
79. Björkbacka, H. *et al.* The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol. Genomics* **19**, 319–330 (2004).
80. Abdi, K. IL-12: The Role of p40 Versus p75. *Scandinavian journal of immunology* **56**, 1–11 (2002).
81. Dobrovolskaia, M. A. & Vogel, S. N. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect.* **4**, 903–914 (2002).
82. Kunkel, S. L., Spengler, M., Kwon, G., May, M. A. & Remick, D. G. Production and regulation of tumor necrosis factor alpha. A cellular and molecular analysis. *Methods Achiev Exp Pathol* **13**, 240–259 (1988).
83. Beutler, B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* **40**, 845–859 (2004).
84. Takasuka, N., Matsuura, K., Yamamoto, S. & Akagawa, K. S. Suppression of TNF-alpha mRNA expression in LPS-primed macrophages occurs at the level of nuclear factor-kappa B activation, but not at the level of protein kinase C or CD14 expression. *The Journal of Immunology* **154**, 4803–4812 (1995).
85. Beutler, B. & Cerami, A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv Immunol* **42**, 213–231 (1988).
86. Han, J., Brown, T. & Beutler, B. Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level. *J. Exp. Med.* **171**, 465–475 (1990).
87. Dumitru, C. D. *et al.* TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**, 1071–1083 (2000).
88. Schook, L. B., Albrecht, H., Gallay, P. & Jongeneel, C. V. Cytokine regulation of TNF-alpha mRNA and protein production by unprimed macrophages from C57Bl/6 and NZW mice. *Journal of Leukocyte Biology* **56**, 514–520 (1994).
89. Giulietti, A. *et al.* An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods* **25**, 386–401 (2001).
90. Wang, G., Petzke, M. M., Iyer, R., Wu, H. & Schwartz, I. Pattern of

- proinflammatory cytokine induction in RAW264.7 mouse macrophages is identical for virulent and attenuated *Borrelia burgdorferi*. *The Journal of Immunology* **180**, 8306–8315 (2008).
91. Suthanthiran, M. *et al.* Circulating transforming growth factor- $\beta$ 1 levels and the risk for kidney disease in African Americans. **76**, 72–80 (2009).
  92. Netea, M. G. *et al.* IL-1 $\beta$  Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathog* **6**, e1000661 (2010).
  93. van de Veerdonk, F. L., Netea, M. G., Dinarello, C. A. & Joosten, L. A. B. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol.* **32**, 110–116 (2011).
  94. Van Snick, J. Interleukin-6: an overview. *Annual review of immunology* (1990).
  95. Anderson, P. Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor  $\alpha$  production. *Annals of the rheumatic diseases* **59**, i3–i5 (2000).
  96. Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F. & Kollias, G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* **10**, 387–398 (1999).
  97. Lieu, Z. Z. *et al.* A trans-Golgi network golgin is required for the regulated secretion of TNF in activated macrophages in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3351–3356 (2008).
  98. Beutler, B., Mahoney, J., Le Trang, N., Pekala, P. & Cerami, A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J. Exp. Med.* **161**, 984–995 (1985).
  99. Wells, C. A. *et al.* Genetic control of the innate immune response. *BMC immunology* **4**, 5 (2003).
  100. Saito, S., Matsuura, M. & Hirai, Y. Regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin-12 production by activation of repressor element GA-12 through hyperactivation of the ERK pathway. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**, 876–883 (2006).
  101. De Filippo, K., Henderson, R. B., Laschinger, M. & Hogg, N. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *The Journal of Immunology* **180**, 4308–4315 (2008).
  102. Becker, S., Quay, J., Koren, H. S. & Haskill, J. S. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am J Physiol* **266**, L278–86 (1994).
  103. Mukherjee, S. *et al.* Lipopolysaccharide-driven Th2 Cytokine Production in Macrophages Is Regulated by Both MyD88 and TRAM. *jdbc.org*
  104. La Flamme, A. C. *et al.* Type II-Activated Murine Macrophages Produce IL-4. *PLoS ONE* **7**, e46989 (2012).

105. Ohashi, K. *et al.* Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6153–6160 (2010).
106. Luo, N. *et al.* Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis. *Diabetes* **59**, 791–799 (2010).
107. Stables, M. J. *et al.* Transcriptomic analyses of murine resolution-phase macrophages. *bloodjournal.hematologylibrary.org*
108. Fettelschoss, A. *et al.* Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 18055–18060 (2011).
109. Weigle, W. O. Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochemistry* **1**, 295–302 (1964).
110. Curtis, J. E., Hersh, E. M., Butler, W. T. & Rossen, R. D. Antigen dose in the human immune response. Dose-relationships in the human immune response to Keyhole limpet hemocyanin. *J Lab Clin Med* **78**, 61–69 (1971).
111. Curtis, J. E. & Hersh, E. M. The human secondary immune response to Keyhole limpet haemocyanin. *Clinical & Experimental Immunology* **10**, 171–177 (1972).
112. Tchorbanov, A., Idakieva, K., Mihaylova, N. & Doumanova, L. Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin. *International Immunopharmacology* **8**, 1033–1038 (2008).
113. Arancibia, S., Espinoza, C., Del Campo, M., Salazar, F. & Becker, M. I. Exceptional immunological and anticancer properties of a new hemocyanin from *Fissurella Latimarginata* (FLH). **33**, 891–891 (2010).
114. Moltedo, B. *et al.* Cutting Edge: Stealth Influenza Virus Replication Precedes the Initiation of Adaptive Immunity. *The Journal of Immunology* **183**, 3569–3573 (2009).
115. Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
116. Stout, R. D. & Suttles, J. T CELL SIGNALING OF MACROPHAGE FUNCTION IN INFLAMMATORY. *Frontiers in Bioscience* **2**, d197–206 (1997).
117. Sadik, C. D., Kim, N. D. & Luster, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* **32**, 452–460 (2011).
118. Cailhier, J. F. *et al.* Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *The Journal of Immunology* **174**, 2336–2342 (2005).
119. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762–774 (2011).
120. Shaw, D. & Griffin, F., Jr. Thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages are less efficient than resident macrophages in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *The Journal of Immunology* **128**,

- 433–440 (1982).
121. Leijh, P. C., van Zwet, T. L., Kuile, ter, M. N. & van Furth, R. Effect of thioglycolate on phagocytic and microbicidal activities of peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **46**, 448–452 (1984).
  122. Zhang, X., Goncalves, R. & Mosser, D. M. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* **83**, 1–14.1 (2008).
  123. Mosser, D. M. & Zhang, X. *Current Protocols in Immunology*. (John Wiley & Sons, Inc., 2001). doi:10.1002/0471142735.im1402s83
  124. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23–35 (2003).
  125. Nishida, T. [Data transformation and normalization]. *Rinsho Byori* **58**, 990–997 (2010).
  126. Jones, K. P., Morris, R. H., Rolf, S., Whatley, J. & Davies, B. H. The assay of interleukin 4 in the serum of normal subjects and atopic patients using a novel immunoassay. *Cytokine* **9**, 529–534 (1997).
  127. Noah Kiwanuka, M. R. O. L. G. K. F. W.-M. F. E. M. F. N. J. K. M. E. L. A. E. D. S. N. K. S. S. J. R. T. C. Q. R. H. G. M. J. W. C. C. W. HIV-1 Viral Subtype Differences in the Rate of CD4+ T-Cell Decline Among HIV Seroincident Antiretroviral Naive Persons in Rakai District, Uganda. *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **54**, 180 (2010).
  128. Levesque-Sergerie, J.-P., Duquette, M., Thibault, C., Delbecchi, L. & Bissonnette, N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol* **8**, 93 (2007).
  129. Stahlberg, A. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clinical Chemistry* **50**, 509–515 (2004).
  130. Anderson, P. Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol* **10**, 24–35 (2010).
  131. Seegmüller, I., Häcker, H. & Wagner, H. IL-4 regulates IL-12 p40 expression post-transcriptionally as well as via a promoter-based mechanism. *Eur. J. Immunol.* **33**, 428–433 (2003).
  132. Majno, G. & Joris, I. *Cells, Tissues, and Disease*. (OUP USA, 2004).
  133. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
  134. Wengner, A. M., Pitchford, S. C., Furze, R. C. & Rankin, S. M. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* **111**, 42–49 (2007).
  135. Chia-Lin Tsou, W. P. Y. S. S. S. A. M. A. S. P. W. M. M. I. F. C. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of Clinical*

- Investigation* **117**, 902 (2007).
136. Ting Jia, N. V. S. K. B. M. X. Z. I. M. L. I. F. C. E. G. P. Additive Roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated Recruitment of Inflammatory Monocytes During *Listeria monocytogenes* Infection. *J. Immunol.* **180**, 6846 (2008).
  137. Salazar-Mather, T. P., Hamilton, T. A. & Biron, C. A. A chemokine-to-cytokine-to-chemokine cascade critical in antiviral defense. *J. Clin. Invest.* **105**, 985–993 (2000).
  138. Salazar-Mather, T. P., Orange, J. S. & Biron, C. A. Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways. *J. Exp. Med.* **187**, 1–14 (1998).
  139. Anderson, P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat. Immunol.* **9**, 353–359 (2008).
  140. Mayer-Barber, K. D. *et al.* Cutting edge: caspase-1 independent IL-1 $\beta$  production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling in vivo. *The Journal of Immunology* **184**, 3326–3330 (2010).
  141. Correa, M. Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología* (2007).
  142. Karnovsky, M. L. & Lazdins, J. K. Biochemical criteria for activated macrophages. *The Journal of Immunology* **121**, 809–813 (1978).
  143. Bardor, M. *et al.* Immunoreactivity in mammals of two typical plant glycoepitopes, core  $\alpha$  (1, 3)-fucose and core xylose. *Glycobiology* **13**, 427–434 (2003).
  144. Geyer, H. Identification and Characterization of Keyhole Limpet Hemocyanin N-Glycans Mediating Cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40731–40748 (2005).
  145. van Kuik, J. A., van Halbeek, H., Kamerling, J. P. & Vliegenthart, J. F. Primary structure of the low-molecular-weight carbohydrate chains of *Helix pomatia* alpha-hemocyanin. Xylose as a constituent of N-linked oligosaccharides in an animal glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **260**, 13984–13988 (1985).
  146. Khoo, K. H., Huang, H. H. & Lee, K. M. Characteristic structural features of schistosome cercarial N-glycans: expression of Lewis X and core xylosylation. *Glycobiology* **11**, 149–163 (2001).
  147. Khoo, K. H., Chatterjee, D., Caulfield, J. P., Morris, H. R. & Dell, A. Structural mapping of the glycans from the egg glycoproteins of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*: identification of novel core structures and terminal sequences. *Glycobiology* **7**, 663–677 (1997).
  148. Garcia-Casado, G. *et al.* Role of complex asparagine-linked glycans in

- the allergenicity of plant glycoproteins. *Glycobiology* **6**, 471–477 (1996).
149. van Ree, R. & Aalberse, R. C. Demonstration of carbohydrate-specific immunoglobulin G4 antibodies in sera of patients receiving grass pollen immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* **106**, 146–148 (1995).
150. Wilson, I. B. & Altmann, F. Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. *Glycoconj J* **15**, 1055–1070 (1998).

## ANEXO I

UniGene	RefSeq	Símbolo	Descripción	Nombres del gen
Mm.3969	NM_009605	<i>Adipoq</i>	Adiponectin, C1Q and collagen domain containing	30kDa, APN, Acdc, Acrp30, GBP28, adipo, apM1
Mm.103205	NM_007553	<i>Bmp2</i>	Bone morphogenetic protein 2	AI467020, Bmp2a
Mm.6813	NM_007554	<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4	Bmp-4, Bmp2b, Bmp2b-1, Bmp2b1
Mm.385759	NM_007556	<i>Bmp6</i>	Bone morphogenetic protein 6	D13Wsu115e, Vgr1
Mm.595	NM_007557	<i>Bmp7</i>	Bone morphogenetic protein 7	OP1
Mm.1283	NM_011329	<i>Ccl1</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 1	BF534335, I-309, Scya1, Tca-3
Mm.4686	NM_011330	<b>Ccl11</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 11	Scya11, eotaxin
Mm.867	NM_011331	<i>Ccl12</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 12	MCP-5, Scya12
Mm.41988	NM_011332	<i>Ccl17</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 17	Abcd-2, Scya17, Scya17l, Tarc
Mm.424740	NM_011888	<i>Ccl19</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 19	CKb11, ELC, MIP3B, Scya19, exodus-3
Mm.290320	NM_011333	<b>Ccl2</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	AI323594, HC11, JE, MCAF, MCP-1, MCP1, SMC-CF, Scya2, Sigje
Mm.116739	NM_016960	<i>Ccl20</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 20	CKb4, LARC, MIP-3A, MIP-3[a], MIP3A, ST38, Scya20, exodus-1
Mm.12895	NM_009137	<i>Ccl22</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 22	ABCD-1, DCBCK, MDC, Scya22
Mm.31505	NM_019577	<i>Ccl24</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 24	CKb-6, MPIF-2, Scya24
Mm.1282	NM_011337	<b>Ccl3</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	AI323804, G0S19-1, LD78alpha, MIP-1alpha, MIP1-(a), MIP1-alpha, Mip1a, Scya3
Mm.244263	NM_013652	<b>Ccl4</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	AT744.1, Act-2, MIP-1B, Mip1b, Scya4
Mm.284248	NM_013653	<b>Ccl5</b>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	MuRantes, RANTES, SISd, Scya5, TCP228
Mm.341574	NM_013654	<i>Ccl7</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 7	MCP-3, Scya7, fic, marc, mcp3
Mm.4861	NM_011616	<i>Cd40lg</i>	CD40 ligand	CD154, CD40-L, Cd40l, HIGM1, IGM, IMD3, Ly-62, Ly62, T-BAM, TRAP, Tnfsf5, gp39
Mm.42228	NM_011617	<i>Cd70</i>	CD70 antigen	CD27LG, Cd27l, Tnfsf7
Mm.290924	NM_170786	<i>Cntf</i>	Ciliary neurotrophic factor	AI429687, MGC41235
Mm.795	NM_007778	<b>Csf1</b>	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	C87615, Csfm, MCSF, op
Mm.4922	NM_009969	<b>Csf2</b>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csfgm, Gm-CSf, MGC151255, MGC151257, MGI-IGM
Mm.1238	NM_009971	<b>Csf3</b>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Csfg, G-CSF, MGI-IG
Mm.389954	NM_007795	<i>Ctf1</i>	Cardiotrophin 1	CT-1
Mm.103711	NM_009142	<i>Cx3cl1</i>	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	AB030188, ABCD-3, AI848747, CX3C, Cxc3, D8Bwg0439e, Scyd1
Mm.21013	NM_008176	<b>Cxcl1</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp, Gro1, KC, Mgsa, N51, Scyb1, gro
Mm.877	NM_021274	<b>Cxcl10</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7, CRG-2, INP10, IP-10, IP10, Ifi10, Scyb10, glP-10, mob-1
Mm.131723	NM_019494	<i>Cxcl11</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11	Cxc11, H174, I-tac, Ip9, Itac, Scyb11, Scyb9b, b-R1, betaR1
Mm.303231	NM_021704	<i>Cxcl12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	AI174028, Pbsf, Scyb12, Sdf1, Sdf1a, Sdf1b, Tlsf, Tlsfa, Tlsfb, Tpar1
Mm.10116	NM_018866	<i>Cxcl13</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 13	4631412M08Rik, ANGIE2, Angie, BCA-1, BLC, BLR1L, Scyb13
Mm.425692	NM_023158	<i>Cxcl16</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 16	0910001K24Rik, AV290116, BB024863, CXCL16v1, CXCL16v2, SR-PSOX, Zmynd15
Mm.244289	NM_203320	<i>Cxcl3</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3	Dcip1, Gm1960
Mm.4660	NM_009141	<b>Cxcl5</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	AMCF-II, ENA-78, GCP-2, LIX, Scyb5, Scyb6
Mm.766	NM_008599	<b>Cxcl9</b>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	BB139920, CMK, Mig, MuMIG, Scyb9, crg-10
Mm.3355	NM_010177	<i>Fasl</i>	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	APT1LG1, CD178, CD95-L, CD95L, Fas-L, Faslg, Tnfsf6, gld
Mm.589	NM_008155	<i>Gpi1</i>	Glucose phosphate isomerase 1	Amf, Gpi, Gpi-1, Gpi-1r, Gpi-1s, Gpi-1t, Gpi-1r, Gpi-1-s, Gpi-1-t, Gpi1s, MF, MGC113776, NK, NK, GPI, Org
Mm.2168	NM_010406	<i>Hc</i>	Hemolytic complement	C5, C5a, He
Mm.14091	NM_010503	<i>Ifna2</i>	Interferon alpha 2	Ifa2
Mm.240327	NM_008337	<b>Ifnf</b>	Interferon gamma	IFN-g, Ifg
Mm.874	NM_010548	<b>Il10</b>	Interleukin 10	CSIF, Il-10
Mm.35814	NM_008350	<i>Il11</i>	Interleukin 11	IL-11
Mm.103783	NM_008351	<b>Il12a</b>	Interleukin 12A	IL-12p35, Il-12a, LI12a, MGC151228, MGC151232, p35
Mm.239707	NM_008352	<b>Il12b</b>	Interleukin 12B	Il-12b, Il-12p40, Il12p40, p40

Mm.1284	NM_008355	<b>Il13</b>	Interleukin 13	Il-13
Mm.4392	NM_008357	<b>Il15</b>	Interleukin 15	AI503618
Mm.10137	NM_010551	<b>Il16</b>	Interleukin 16	KIAA4048, mKIAA4048
Mm.5419	NM_010552	<b>Il17a</b>	Interleukin 17A	Ctla-8, Ctla8, IL-17, IL-17A, Il17
Mm.222807	NM_145856	<b>Il17f</b>	Interleukin 17F	C87042, IL-17F
Mm.1410	NM_008360	<b>Il18</b>	Interleukin 18	Ig1f, Il-18
Mm.15534	NM_010554	<b>Il1a</b>	Interleukin 1 alpha	Il-1a
Mm.222830	NM_008361	<b>Il1b</b>	Interleukin 1 beta	IL-1beta, Il-1b
Mm.882	NM_031167	<b>Il1rm</b>	Interleukin 1 receptor antagonist	F630041P17Rik, IL-1ra
Mm.14190	NM_008366	<b>Il2</b>	Interleukin 2	Il-2
Mm.157689	NM_021782	<b>Il21</b>	Interleukin 21	-
Mm.103585	NM_016971	<b>Il22</b>	Interleukin 22	IL-22, IL-22a, ILTIFa, Il1f, MGC129416, MGC129417
Mm.125482	NM_031252	<b>Il23a</b>	Interleukin 23, alpha subunit p19	IL-23, p19
Mm.196691	NM_053095	<b>Il24</b>	Interleukin 24	FISP, Mda-7, Mda7, St16
Mm.222632	NM_145636	<b>Il27</b>	Interleukin 27	IL-27, IL-27p28, Il30, p28
Mm.983	NM_010556	<b>Il3</b>	Interleukin 3	BPA, Csfmu, HCGF, Il-3, MCGF, PSF
Mm.276360	NM_021283	<b>Il4</b>	Interleukin 4	Il-4
Mm.4461	NM_010558	<b>Il5</b>	Interleukin 5	Il-5
Mm.1019	NM_031168	<b>Il6</b>	Interleukin 6	Il-6
Mm.3825	NM_008371	<b>Il7</b>	Interleukin 7	A630026I06Rik, Il-7, MGC129342, hlb368
Mm.3006	NM_008373	<b>Il9</b>	Interleukin 9	Il-9, P40
Mm.4964	NM_008501	<b>Lif</b>	Leukemia inhibitory factor	-
Mm.87787	NM_010735	<b>Lta</b>	Lymphotoxin A	LT, LT-[a], LT-alpha, LT[a], LTalpha, Ltx, MGC117668, TNF-beta, TNFSF1, Tnfb, Tnfsf1b, hlb382
Mm.1715	NM_008518	<b>Ltb</b>	Lymphotoxin B	AI662801, LTbeta, Tnfc, Tnfsf3, p33
Mm.2326	NM_010798	<b>Mif</b>	Macrophage migration inhibitory factor	GIF, Glif, MGC107654
Mm.3514	NM_010834	<b>Mstn</b>	Myostatin	Cmpt, Gdf8, MGC124261, MGC124262, MGC124263
Mm.57195	NM_013611	<b>Nodal</b>	Nodal	Tg.413d
Mm.131422	NM_001013365	<b>Osm</b>	Oncostatin M	OncoM
Mm.332490	NM_019932	<b>Pf4</b>	Platelet factor 4	Cxcl4, Scyb4
Mm.293614	NM_023785	<b>Ppbp</b>	Pro-platelet basic protein	2400003M24Rik, AI854500, CTAP3, CTAPIII, Cxcl7, LA-PF4, LDGF, MDGF, NAP-2, NAP-2-L1, Scyb7, TGB, TGB1, THGB1, b-TG1, beta-TG
Mm.288474	NM_009263	<b>Spp1</b>	Secreted phosphoprotein 1	2AR, Apl-1, BNSP, BSPI, Bsp, ETA-1, Eta, OP, Opn, Opnl, Ric, Spp-1
Mm.18213	NM_009367	<b>Tgfb2</b>	Transforming growth factor, beta 2	BB105277, Tgf-beta2, Tgfb-2
Mm.3943	NM_009379	<b>Thpo</b>	Thrombopoietin	Mgdf, Mi, Mplg, Tpo, Tpo1, Tpo2, Tpo3, Tpo4
Mm.1293	NM_013693	<b>Tnf</b>	Tumor necrosis factor	DIF, MGC151434, TNF-alpha, TNFSF2, TNFalpha, Tnfa, Tnfsf1a
Mm.15383	NM_008764	<b>Tnfrsf11b</b>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	OCIF, Opg, TR1
Mm.1062	NM_009425	<b>Tnfsf10</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	A330042I21Rik, AI448571, APO-2L, Ly81, TL2, Trail
Mm.249221	NM_011613	<b>Tnfsf11</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	Ly109I, ODF, OPG, OPGL, RANKL, Trance
Mm.28835	NM_033622	<b>Tnfsf13b</b>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	BAFF, BLyS, D8Erttd387e, MGC124060, MGC124061, TALL-1, TALL1, THANK, TNFSF20, zTNF4
Mm.282184	NM_009505	<b>Vegfa</b>	Vascular endothelial growth factor A	Vegf, Vegf120, Vegf164, Vegf188, Vpf
Mm.190	NM_008510	<b>Xcl1</b>	Chemokine (C motif) ligand 1	AI661682, ATAC, LTN, Lptn, SCM-1, SCM-1a, Scyc1
Mm.328431	NM_007393	<b>Actb</b>	Actin, beta	Actx, E430023M04Rik, beta-actin
Mm.163	NM_009735	<b>B2m</b>	Beta-2 microglobulin	Ly-m11, beta2-m, beta2m
Mm.343110	NM_008084	<b>Gapdh</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapd, MGC102544, MGC102546, MGC103190, MGC103191, MGC105239
Mm.3317	NM_010368	<b>Gusb</b>	Glucuronidase, beta	AI747421, Gur, Gus, Gus-r, Gus-s, Gus-t, Gus-u, Gut, asd, g
Mm.2180	NM_008302	<b>Hsp90ab1</b>	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	90kDa, AL022974, C81438, Hsp84, Hsp84-1, Hsp90, Hspcb, MGC115780

## ANEXO II

Proteína	Símbolo	Descripción	Nombres del gen
Eotaxina	<i>Ccl11</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 11	Scya11, eotaxin
MCP-1	<i>Ccl2</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 2	AI323594, HC11, JE, MCAF, MCP-1, MCP1, SMC-CF, Scya2, Sigje
MIP-1 $\alpha$	<i>Ccl3</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 3	AI323804, GOS19-1, LD78alpha, MIP-1alpha, MIP1-(a), MIP1-alpha, Mip1a, Scya3
MIP-1 $\beta$	<i>Ccl4</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 4	AT744.1, Act-2, Mip1b, Scya4
MIP-2	<i>Cxcl2</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	SCYB2, GRO2, GROb, MIP-2a, MGSA-b, CINC-2a
RANTES	<i>Ccl5</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 5	MuRantes, RANTES, SISd, Scya5, TCP228
M-CSF	<i>Csf1</i>	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	C87615, Csfm, MCSF, op
GM-CSF	<i>Csf2</i>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Csfgm, Gm-CSf, MGC151255, MGC151257, MGI-IGM
G-CSF	<i>Csf3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	Csfg, G-CSF, MGI-IG
KC	<i>Cxcl1</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1	Fsp, Gro1, KC, Mgsa, N51, Scyb1, gro
IP-10	<i>Cxcl10</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	C7, CRG-2, INP10, IP-10, IP10, Ifi10, Scyb10, gIP-10, mob-1
LIX	<i>Cxcl5</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	AMCF-II, ENA-78, GCP-2, LIX, Scyb5, Scyb6
MIG	<i>Cxcl9</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	BB139920, CMK, Mig, MuMIG, Scyb9, crg-10
IFN- $\gamma$	<i>Ifng</i>	Interferon gamma	IFN-g, Ifg
IL-10	<i>Il10</i>	Interleukin 10	CSIF, IL-10
IL-12p40	<i>Il12b</i>	Interleukin 12B	Il-12b, Il-12p40, Il12p40, p40
IL-12p70	-	-	-
IL-13	<i>Il13</i>	Interleukin 13	Il-13
IL-15	<i>Il15</i>	Interleukin 15	AI503618
IL-17A	<i>Il17a</i>	Interleukin 17A	Ctla-8, Ctla8, IL-17, IL-17A, Il17
IL-1 $\alpha$	<i>Il1a</i>	Interleukin 1 alpha	Il-1a
IL-1 $\beta$	<i>Il1b</i>	Interleukin 1 beta	IL-1beta, Il-1b
IL-3	<i>Il3</i>	Interleukin 3	BPA, Csfmu, HCGF, Il-3, MCGF, PSF
IL-4	<i>Il4</i>	Interleukin 4	Il-4
IL-5	<i>Il5</i>	Interleukin 5	Il-5
IL-6	<i>Il6</i>	Interleukin 6	Il-6
IL-7	<i>Il7</i>	Interleukin 7	A630026I06Rik, Il-7, MGC129342, hlb368
IL-9	<i>Il9</i>	Interleukin 9	Il-9, P40
IL-10	<i>Il10</i>	Interleukin 10	CSIF; IL-10; IL10A; MGC126450; MGC126451; TGIF
LIF	<i>Lif</i>	Leukemia inhibitory factor	-
TNF- $\alpha$	<i>Tnf</i>	Tumor necrosis factor	DIF, MGC151434, TNF-alpha, TNFSF2, TNFalpha, Tnfa, Tnfsf1a
VEGF	<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A	Vegf, Vegf120, Vegf164, Vegf188, Vpf