

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS PARA ACTIVAR LA VÍA CLÁSICA DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO HUMANO.*

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

***JAVIER ALONSO PIZARRO BAUERLE***

**Directores de Tesis: Dra. María Inés Becker Contreras  
Dr. Arturo Ferreira Vigouroux**

**Santiago, Chile**

**Enero de 2016**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

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

## JAVIER ALONSO PIZARRO BAUERLE

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día 20 de Enero de 2016.

#### Directores de Tesis:

Dra. María Inés Becker Contreras

---

Dr. Arturo Ferreira Vigouroux

---

#### Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Javier Puente Piccardo

---

Dr. Dante Miranda Wilson

---

Dr. Álvaro Lladser Caldera

---

*“Immunology is a fascinating subject, and one might justify a lifetime’s devotion to it based simply on the continued intellectual challenges it provides. But*

*I have always found unconvincing the claim that scientists should be supported simply so that they can satisfy their curiosity. A worthy subject must offer more at the end of the day than the satisfaction of curiosity. In that, we immunologists are fortunate because advances in our field have already contributed remarkably to human health, and a deeper understanding of the immune system’s mechanistic basis has the potential to contribute even more to the well-being of humankind.”*

*William E. Paul*

*A mis padres, mi hermana y mi tía.*

*A mi abuela, mis padrinos y tíos.*

*A toda mi familia, amigos y seres queridos.*

## AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a mis tutores, la Dra. María Inés Becker y el Dr. Arturo Ferreira, por darme la oportunidad de trabajar en dos laboratorios excelentes para el estudio de la Inmunología, y por toda la enseñanza impartida, tanto en los ámbitos científico como personal, además de creer en mí y apoyarme cuando la Tesis cambiaba de rumbo. Siempre estaré muy agradecido de ambos.

Quiero agradecer a mi comisión, los Dres. Javier Puente, Dante Miranda y Álvaro Lladser, por sus valiosos consejos y contribuciones para mejorar esta Tesis.

También quiero agradecer a la Universidad de Chile, las Facultades de Medicina y Ciencias Químicas y Farmacéuticas y a la carrera de Bioquímica y al programa de Magister en Bioquímica, especialmente a la Dra. Daniela Seelenfreund por su apoyo y preocupación constante. También al equipo de Secretaría de Postgrado, especialmente a Francisca. Además deseo agradecer a todos los docentes que tuve a lo largo de la carrera, especialmente a la Dra. Jenny Fiedler y el Dr. José Manuel Pérez y sus respectivos laboratorios, por permitirme trabajar con ellos y aprender mucho en el proceso.

A la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, FUCITED: a Javiera, Claudia, Juan José, Miguel, José Manuel, Ta-Ying y el Dr. Augusto Manubens, por recibirme en su grupo y aportar mucho al crecimiento de esta Tesis.

Al Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana: a Leonora, Paula, Katherine, Lorena, Gerardo, Eduardo, Fernando, Ismael, Carlos, Jaime, a la Dra. Carolina Valck, a la Sra. Mari Aranguren, a Juana Orellana y Ruth Mora, por ser amigos además de compañeros de trabajo, por toda la ayuda entregada y todas las risas y buenos momentos. También al Programa de Inmunología, especialmente a la Dra. Carolina Ribeiro, Bastián, Oriana, Marisol, Álvaro, la Sra. Nancy, Don Félix, Myriam y Carmen, a la Sra. Ana, a la Sra. Inelia, a las vecinas y vecinos del Laboratorio de Inmunovigilancia y Evasión Inmune y a todos los docentes del Programa y sus respectivos Laboratorios. A la Dra. Karina Pino, a Mauro, Tania y los demás miembros de su Laboratorio por permitirme participar en sus actividades y aprender muchísimo. A todos ellos muchísimas gracias.

A mis amigos del Hogar de Estudiantes, que han estado conmigo en muchos momentos importantes, gracias por su apoyo y por estar ahí siempre, especialmente a Julio, Fabián, Diego, Waldo, Katinga, Mauri, Memo, Guz, Manuel, Josema, Fernando, Ocho, Pavez, Andrés, Seba, Romero, Bubu, Juan, Sali, Paul y Daniel.

A mis amigos del Colegio, especialmente a Karla Artigas, por escucharme muchas veces y por darme valiosos consejos y a su familia por todo el cariño; a Memo, Pablo, Juanito, Claudio, Katy, Jenny, Daniela y Nashari, aunque con algunos no nos veamos tan seguidos, el cariño siempre está. También por supuesto para mi gran amigo Roberto, Diana y a mi ahijada Helena, muchísimas gracias por dejarme participar de su familia. A los profesores de mi Colegio, especialmente a la Profe Yenny Montoya, a la Tía Quichy, al Profe David Robles, la Miss Nora y el Profe Javier, por enseñarme con el ejemplo lo que significa la pasión por la enseñanza a través de sus respectivas áreas.

Por supuesto, también quiero agradecer a mis amigas y amigos de la Universidad, a Francisco, Rodrigo, Alejandro y Yara, y muy especialmente a mis tres amigas Claudia, Yanara y Carla, por aguantarme y apoyarme durante todos estos años, las quiero muchísimo.

Y finalmente, nada de esto hubiese sido posible sin el apoyo de mi familia, especialmente de mis padres Gladys y Ricardo, mi hermana Florencia y mi tía July, a quienes amo muchísimo. También a mi abuela Eugenia y mis padrinos Natalia y Francisco y mis primos Francisco y Jorge, donde siempre he tenido una casa en Santiago, por ser pilares fundamentales en mi vida, al igual que todos mis tíos, tías, primos y primas de mis familias paterna y materna. Mención especial para mis *roommates*, la Paulita, la Piu y mi Fefi, que me acompañaron durante gran parte de este proceso. Gracias a mi tío-abuelo Sergio, que me apoyó muchas veces alimentando mi curiosidad científica. Finalmente, a la Teru, mi abuela Rosa y mi abuelo Fernando, quienes ya no nos acompañan pero cuyo recuerdo guardo con mucho cariño.

A todos ellos y a todos los que se me hayan olvidado pero que no son menos importantes, muchísimas gracias por todo.

## FINANCIAMIENTO Y PRESENTACIONES

Esta tesis fue financiada por los proyectos FONDECYT 1095095 y 1130099 y Proyecto Anillo PIA-ACT 112 del Dr. Arturo Ferreira y por los proyectos FONDECYT 1110651 y 1151337 de la Dra. María Inés Becker. Además, el estudiante recibió el apoyo de la Beca para Estudios de Magíster Nacional (Concurso Complementario) de CONICYT y también, apoyo de BIOSONDA S.A. y de la Fundación Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (FUCITED).

### **Presentaciones a Congresos Nacionales:**

Pizarro-Bauerle J., Maldonado I., Sosoniuk E., Vallejos G., Rosas C., Valck C., Becker M.I., Ferreira A. **Detection of antibodies against molluskan hemocyanins in unsensitized individuals: A possible role for complement activation in hemocyanins immunogenicity?** Chilean Society for Cell Biology XXVIII Annual Meeting. Octubre, 26 – 30, 2014 Puerto Varas, Chile. Página 12, Libro de Resúmenes.

Pizarro-Bauerle J., Maldonado I., López M.N., Salazar-Onfray F., Valck C., Ferreira A., Becker M.I. **La vía clásica del complemento humano es activada por hemocianinas de moluscos en presencia de anticuerpos naturales de donantes no inmunizados.** LVIII Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile – XIII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Inmunología. Noviembre, 23 – 25, 2015. Puerto Varas, Chile. Página 12, Libro de Resúmenes.

### **Presentaciones a Congresos Internacionales:**

Pizarro-Bauerle J., Maldonado I., López M.N., Salazar-Onfray F., Valck C., Ferreira A., Becker M.I. **Molluskan hemocyanins activate *in vitro* the classical pathway of the human complement system, through the presence of natural serum antibodies recognizing these proteins in unsensitized donors.** 11<sup>th</sup> Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI. 10<sup>th</sup> Colombian Congress of Allergy, Asthma and Immunology – ACAAI. Octubre, 13 - 16, 2015, Medellín, Colombia. *Frontiers in Immunology*, doi: 10.3389/conf.fimmu.2015.05.00021

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Índice de Tablas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xvi</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1.- Hemocianinas</b> .....	<b>1</b>
1.1.- Propiedades generales de las hemocianinas.....	1
1.2.- Propiedades estructurales de las hemocianinas de moluscos.....	2
1.3.- Hemocianinas de moluscos y sus propiedades inmunoestimulantes.....	4
<b>2.- Sistema del complemento</b> .....	<b>10</b>
2.1.- Vía alterna del sistema del complemento.....	12
2.2.- Vía de las lectinas del sistema del complemento.....	12
2.3.- Vía clásica del sistema del complemento.....	13
<b>3.- Hemocianinas y sistema del complemento</b> .....	<b>15</b>
3.1.- Anticuerpos naturales y hemocianinas de moluscos.....	15
<b>Hipótesis</b> .....	<b>18</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>18</b>
<b>1.- Objetivo General</b> .....	<b>18</b>
<b>2.- Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>

<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>19</b>
<b>1.- Materiales.....</b>	<b>19</b>
1.1.- Reactivos e insumos generales.....	19
1.2.- Reactivos y material biológico.....	19
<b>2.- Métodos.....</b>	<b>21</b>
2.1.- Obtención de sueros.....	21
2.2.- Soluciones de hemocianinas nativas.....	21
2.3.- Soluciones de hemocianinas desglicosiladas.....	22
2.4.- Determinación de anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos en sueros de pacientes inmunizados y donantes no inmunizados.....	22
2.4.1.- Ensayos de <i>dot-blot</i> .....	22
2.4.2.- ELISA.....	23
2.5.- Determinación de la activación de la vía clásica del sistema del complemento en donantes no inmunizados.....	24
2.6.- Análisis estadístico.....	25
 <b>Resultados.....</b>	 <b>26</b>
<b>1.- Los sueros de pacientes previamente inmunizados con KLH contienen anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos.....</b>	 <b>26</b>
1.1.- Búsqueda de un suero humano anti-KLH como control positivo.....	26



<b>2.- Los sueros de donantes sanos no inmunizados contienen anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos.....</b>	<b>29</b>
2.1.- Detección de anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos mediante ensayos de <i>dot-blot</i> . ....	29
2.2.- Detección de anticuerpos reactivos con hemocianinas nativas y desglucosiladas mediante ELISA.....	30
<b>3.- Las hemocianinas nativas y desglucosiladas, junto a anticuerpos de donantes no inmunizados activan <i>in vitro</i> la vía clásica del sistema del complemento humano en una forma dependiente de la unión de C1q a inmunoglobulinas.....</b>	<b>36</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>48</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>49</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización y estructura de las unidades funcionales (FUs) de hemocianinas de moluscos.....	2
<b>Figura 2.</b> Organización cuaternaria de las hemocianinas de moluscos.....	3
<b>Figura 3.</b> Las hemocianinas de moluscos presentan una estructura similar al microscopio electrónico.....	5
<b>Figura 4.</b> Las subunidades que forman las hemocianinas de moluscos adoptan diferentes organizaciones.....	6
<b>Figura 5.</b> El sistema del complemento puede ser activado mediante tres vías.....	11
<b>Figura 6.</b> Activación del sistema del complemento mediante la vía clásica.....	14
<b>Figura 7.</b> Diseño experimental para detectar la activación de la vía clásica del sistema del complemento.....	25
<b>Figura 8.</b> Protocolo de vacunación para pacientes de melanoma.....	26
<b>Figura 9.</b> La inmunización en humanos con KLH produce niveles variables de anticuerpos séricos que presentan reacciones cruzadas de diferente intensidad con CCH y FLH.....	28
<b>Figura 10.</b> La técnica de dot-blot permite la detección de anticuerpos que reaccionan con hemocianinas en sueros de donantes no inmunizados.....	30
<b>Figura 11.</b> Donantes no inmunizados presentan anticuerpos naturales contra las hemocianinas de moluscos.....	31
<b>Figura 12.</b> Donantes no inmunizados presentan anticuerpos contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglicosiladas).....	32
<b>Figura 13.</b> Donantes no inmunizados presentan anticuerpos del isotipo IgG contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglicosiladas).....	34
<b>Figura 14.</b> Donantes no inmunizados presentan anticuerpos del isotipo IgM contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglicosiladas).....	35
<b>Figura 15.</b> Sueros de donantes no inmunizados activan in vitro la vía clásica del sistema del complemento humano.....	37
<b>Figura 16.</b> La activación de la vía clásica por hemocianinas de moluscos es dependiente de la capacidad de C1q para unirse a inmunoglobulinas.....	38
<b>Figura 17.</b> Activación del sistema del complemento por hemocianinas de moluscos.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Datos clínicos de pacientes inmunizados con una vacuna de células dendríticas cargadas con un lisado de células de melanoma (TRIMEL®), y acompañada de KLH como adyuvante..... **26**

**Tabla 2.** La técnica de *dot-blot* permite la detección de anticuerpos que reaccionan con hemocianinas en sueros de donantes no inmunizados..... **29**

## ABREVIATURAS

- APC** : Células presentadoras de antígeno (del inglés *antigen presenting cells*)
- CCH** : Hemocianina del loco, *Concholepas concholepas* (del inglés *Concholepas concholepas hemocyanin*).
- DAMPs** : Patrones moleculares asociados a daño (del inglés *pathogen associated damage patterns*)
- ELISA** : Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- FLH** : Hemocianina de la lapa negra, *Fissurella latimarginata* (del inglés *Fissurella latimarginata hemocyanin*).
- HIS** : Suero inactivado por calor (del inglés *heat inactivated serum*)
- KLH** : Hemocianina de la lapa californiana, *Megathura crenulata* (del inglés *keyhole limpet hemocyanin*).
- MAC** : Complejo de ataque a membrana (del inglés *membrane attack complex*)
- MBL** : Lectina que une manosa (del inglés *mannose-binding lectin*)
- MDa** : mega Dalton
- NHS** : Suero normal humano (del inglés *normal human serum*)
- Ox-CCH** : CCH desglicosilada mediante oxidación con peryodato de sodio
- Ox-FLH** : FLH desglicosilada mediante oxidación con peryodato de sodio
- Ox-KLH** : KLH desglicosilada mediante oxidación con peryodato de sodio.
- PAMPs** : Patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen associated molecular patterns*)
- PBS** : Solución salina tamponada con fosfato (del inglés *phosphate buffered saline*)
- PBS-T** : PBS con adición de Tween-20

- PRM** : Molécula que reconoce patrones (del inglés *pattern recognition molecule*)
- SPR** : Resonancia de plasmones superficiales (del inglés *surface plasmon resonance*)
- TBS** : Solución salina tamponada con Tris (del inglés *Tris buffered saline*)
- TBS-T** : TBS con adición de Tween-20
- VB<sup>2+</sup>** : Tampón Veronal (del inglés *Veronal buffer*)

## RESUMEN

### **Evaluación de la Capacidad de Hemocianinas de Moluscos para Activar la Vía Clásica del Sistema del Complemento Humano.**

Las hemocianinas son metaloglicoproteínas de elevado tamaño presentes en la hemolinfa de algunos moluscos, cuya función principal es el transporte de oxígeno. La hemocianina más estudiada se obtiene de la Lapa Californiana, *Megathura crenulata* y se conoce como KLH, presentando notorias capacidades inmunomoduladoras, por lo que ha sido utilizada con múltiples fines terapéuticos y de investigación. Sin embargo, las recientemente descubiertas hemocianinas del Loco, *Concholepas concholepas*, (CCH) y de la Lapa Negra, *Fissurella latimarginata*, (FLH), han cobrado relevancia, dadas sus mejores propiedades en cuanto a estabilidad y efectos inmunoestimulantes, respectivamente. No obstante, los mecanismos inmunológicos mediante los cuales estas proteínas ejercen sus diversas acciones son poco conocidos. Así, un factor frecuentemente mencionado es su alto contenido de carbohidratos (hasta 9% en peso), con diferencias en su composición entre las especies mencionadas. Interesantemente, se ha descrito en individuos no inmunizados de varias especies, incluyendo los seres humanos, la presencia de anticuerpos naturales reactivos con KLH que estarían dirigidos contra sus carbohidratos, hecho que lleva a considerar como otro factor posible al sistema del complemento.

El sistema del complemento es un conjunto de proteínas plasmáticas y de membrana cuya activación, finamente regulada se lleva a cabo en una secuencia de eventos proteolíticos limitados sobre los componentes iniciales. Culmina con la lisis del patógeno mediante la formación de complejos de ataque de membrana. Además, conduce a la opsonización del patógeno y a la coestimulación de linfocitos B, junto con la producción de anafilotoxinas con propiedades inflamatorias, que favorecen la respuesta inmune. Este sistema puede ser activado por la vía clásica, mediante anticuerpos que reconocen al agresor; la vía de las lectinas, mediante diversos carbohidratos presentes en el células agresoras, y la vía alterna, en que el sistema detecta ausencia de moléculas “propias”.

En vista de estos antecedentes, proponemos que **la presencia, en individuos no inmunizados, de anticuerpos naturales que reconocen a las hemocianinas, conduce a la activación de la vía clásica del sistema del complemento humano por dichas proteínas.**

Así, el objetivo general de esta tesis ha sido estudiar un rol del complemento que contribuya a explicar la capacidad inmunoestimulante no específica de las hemocianinas en mamíferos.

En primera instancia, se analizaron los sueros de 4 pacientes inmunizados con KLH, identificándose dos pacientes con altos niveles de anticuerpos anti-KLH, los cuales se utilizaron como controles positivos para la detección de anticuerpos en donantes no inmunizados con hemocianinas. Así, se detectó en una muestra de 5 donantes, diferentes niveles de anticuerpos no sólo contra KLH, sino que también contra FLH y CCH.

Luego, para analizar la especificidad de estos anticuerpos, se realizó una desglicosilación química de las hemocianinas y se observó si esto afectaba la unión de estos anticuerpos, encontrándose que este tratamiento afectó de forma diferencial su reactividad. Específicamente, en algunos casos la desglicosilación disminuyó la unión de los anticuerpos, en otros casos no tuvo efecto y en otros incluso aumentó.

Posteriormente, se procedió a analizar la capacidad de algunos sueros para activar la vía clásica del sistema del complemento *in vitro*, fenómeno que ocurrió con todas las hemocianinas, aunque no se pudo establecer una correlación entre el nivel de anticuerpos y la intensidad de la activación. Además, en concordancia con lo observado anteriormente, la desglicosilación de las hemocianinas tuvo un efecto diferencial en la activación de esta vía, destacándose el efecto sobre FLH, en la cual la desglicosilación aumentó fuertemente tanto la unión de anticuerpos como la activación de la vía clásica. En concordancia con estos resultados, cuando se utilizó un anticuerpo anti-C1q que inhibe específicamente la activación de la vía clásica, esta activación fue revertida.

En conjunto, estos resultados apuntan a un nuevo rol para el sistema del complemento, específicamente a través de la vía clásica, con respecto a las notables propiedades inmunomoduladoras no específicas de las hemocianinas de moluscos en mamíferos. Si bien no se pudo definir un rol preponderante para los carbohidratos en todas las hemocianinas, los resultados señalan la necesidad de continuar con esta línea de investigación, para proveer información adicional para un uso seguro de las hemocianinas en biomedicina.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the Capacity of Molluskan Hemocyanins to Activate the Classical Pathway of the Human Complement System**

Hemocyanins are metalloglycoproteins with large molecular sizes present in the hemolymph of some mollusks, with oxygen transport being their main function. The most studied hemocyanin is obtained from the keyhole limpet, *Megathura crenulata* and it is known as KLH, with remarkable immunomodulatory capacities, leading to its use in multiple therapeutical and research approaches uses. However, the recently discovered hemocyanins of the Chilean abalone, or “Loco”, *Concholepas concholepas* (CCH), and that from “Lapa negra”, *Fissurella latimarginata*, (FLH), have become relevant, given their better properties regarding stability and immunomodulatory effects, respectively. In spite of this, the mechanisms through which these molecules exert their effects are scarcely understood. A frequent explanation is their high carbohydrate content (up to 9% w/w), with differences between their compositions among the mentioned species. Interestingly, in unimmunized individuals from different species, humans included, it has been described the presence of natural antibodies reactive with KLH, possibly through its carbohydrate moieties, leading to the possibility that the complement system is also involved.

The complement system is a group of plasma and membrane-bound proteins whose finely regulated activation is carried out in a sequence of limited proteolytic events, involving mainly the initial components. It culminates with the pathogen lysis through formation of membrane attack complexes. It also leads to pathogen opsonization and B cell costimulation, along with the production of anaphylatoxins with inflammatory properties, thus favoring the immune response. This system can be activated through the classical pathway, due to antibodies recognizing an aggressor; the lectin pathway, due to diverse carbohydrates present on the aggressor cells; and the alternate pathway, where the system detects the absence of “self” molecules.

Taking these antecedents into account, we propose that **the presence, in unimmunized individuals, of antibodies recognizing the hemocyanins, leads to the activation of the classical pathway of the human complement system by these proteins.**



Thus, the general goal of this thesis has been to study a role of the complement that contributes to explain the non-specific immunostimulatory capacity of the hemocyanins in mammals.

First, the sera of 4 patients immunized with KLH were analyzed, and two patients with a high level of anti-KLH antibodies were identified, being used as a positive controls for the detection of antibodies in healthy donors previously unimmunized with hemocyanins. Then we detected in 5 donors, different levels of antibodies not only against KLH, but also against FLH and CCH.

In order to analyze the specificity of these antibodies, the hemocyanins were chemically deglycosylated and we observed how this affected the antibody binding in the sera of unimmunized donors, concluding that this treatment affected differentially their reactivity. Specifically, deglycosylation in some cases diminished antibody binding, while in others, no effect was observed and yet, in some it was even increased.

Then, the ability of some sera to activate *in vitro* the classical pathway of the complement system was assessed, a phenomenon that was observed with all hemocyanins, although no correlation between antibody level and activation intensity could be established. Also, as observed before, hemocyanin deglycosylation had a differential effect in the activation of this pathway, with a remarkable effect over FLH, where deglycosylation strongly increased both antibody binding and classical pathway activation. In agreement with these results, when an anti-C1q antibody that specifically inhibits classical pathway activation was used, this activation was reversed.

Taken together, these results point towards a new role for the complement system, specifically through the classical pathway, regarding the remarkable non-specific immunomodulatory properties of the molluskan hemocyanins in mammals. Even though we could not define a prevailing role for carbohydrates in all hemocyanins, the results indicate the need to continue with this line of research, to provide additional information for a safe use of hemocyanins in biomedicine.

# INTRODUCCIÓN

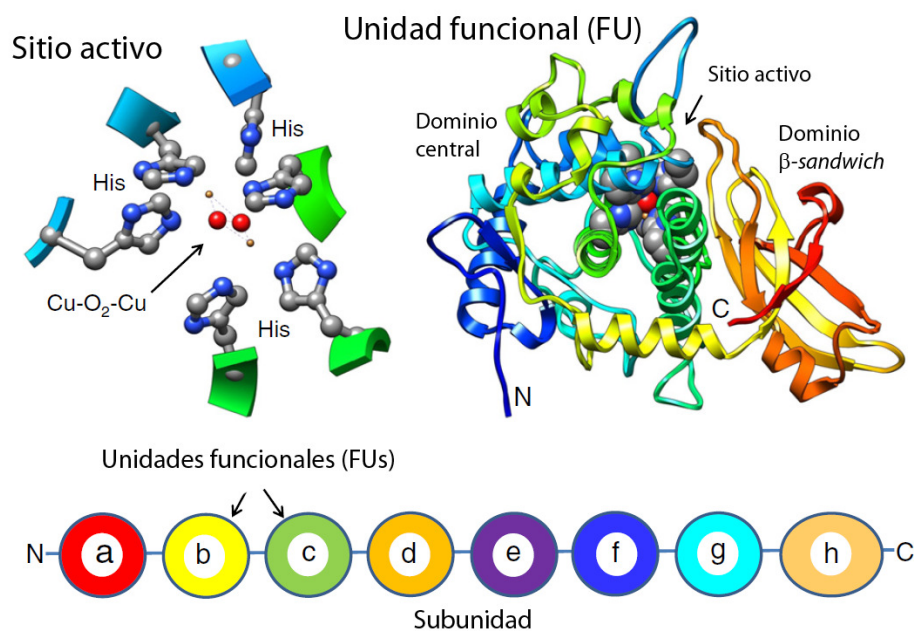
Las hemocianinas de moluscos son proteínas con gran relevancia en investigación clínica y básica, en terapia y biotecnología, y con potentes implicancias en biomedicina. Descritas a comienzos del siglo XX; han sido proteínas modelo en bioquímica y, unas décadas después, herramientas instrumentales en inmunología básica y aplicada, especialmente para el caso de la hemocianina de la Lapa Californiana (*keyhole limpet*). A ésta se han añadido las hemocianinas de dos especies chilenas, el Loco y la Lapa negra, que han demostrado tener propiedades muy prometedoras. Sin embargo, poco se sabe de los mecanismos que hay detrás de estas destacables propiedades, y a pesar de que nuestro grupo, además de otros investigadores, ha realizado importantes avances en la materia, queda mucho por conocerse sobre estas impresionantes proteínas con el fin de promover su uso seguro para el desarrollo de nuevas herramientas de investigación, diagnóstico y terapia. En el marco de esta Tesis, se buscó analizar si el sistema del complemento (un importante brazo efector y regulador del sistema inmune) es activado por estas proteínas y cuáles son los mecanismos involucrados en esta activación, buscando así contribuir a un mejor entendimiento de las hemocianinas.

## 1.- Hemocianinas

### 1.1.- Propiedades generales de las hemocianinas

Las hemocianinas son metaloglicoproteínas de elevado peso molecular, pudiendo llegar hasta 13,5 MDa<sup>1</sup>. Se encuentran presentes en forma libre en la hemolinfa de numerosos moluscos y artrópodos, donde transportan el oxígeno que éstos requieren para llevar a cabo sus procesos vitales, en lugar de la hemoglobina característica de mamíferos, siendo, después de ésta, la segunda proteína respiratoria más frecuente<sup>2</sup>.

La capacidad para transportar oxígeno se debe a la presencia de dos átomos de cobre, cada uno coordinado por una tríada de residuos de histidina<sup>3</sup>. Los átomos de cobre, al encontrarse en su estado de oxidación (II) cuando están unidos al oxígeno le confieren a las hemocianinas su característico color azul, propiedad que les da el nombre (*hemo* = sangre, *cyanos* = azul)<sup>4</sup>.

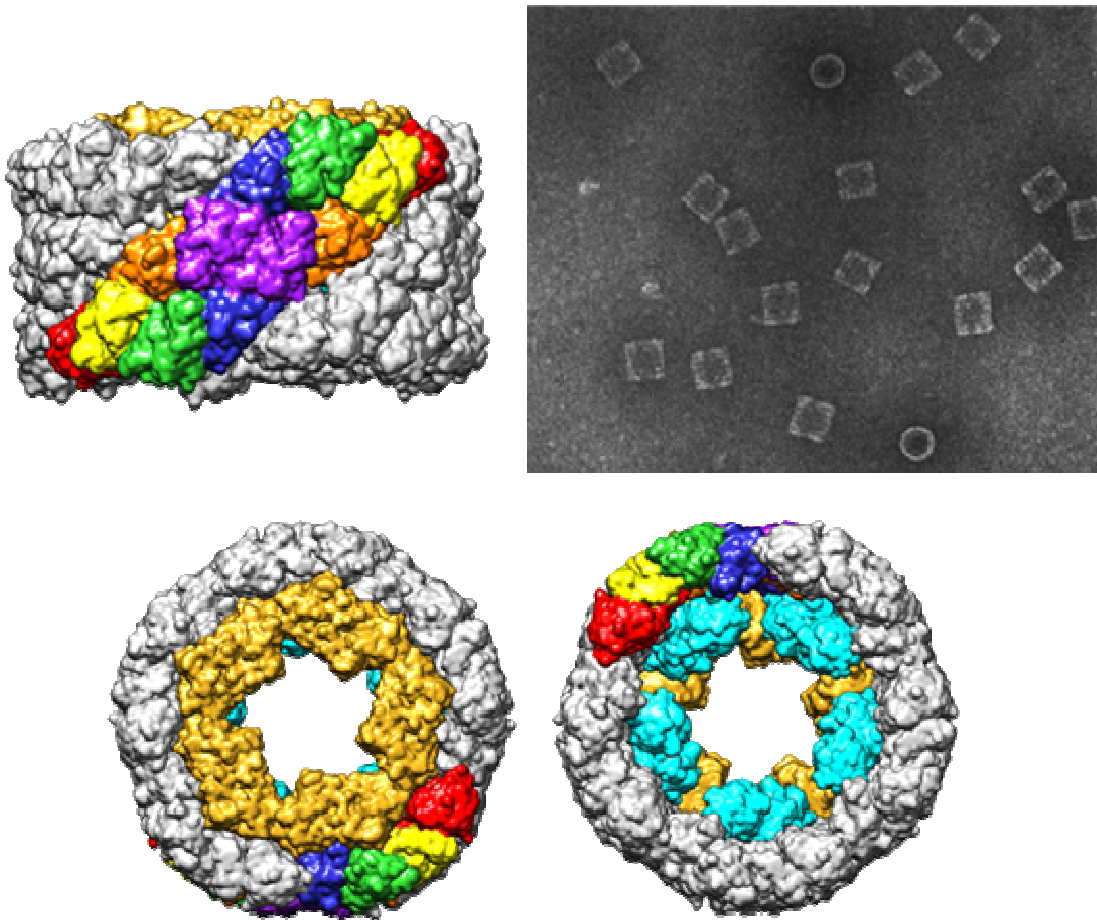


**Figura 1. Organización y estructura de las unidades funcionales (FUs) de hemocianinas de moluscos:** Panel superior, izquierda: Centro de coordinación de oxígeno con las seis histidinas involucradas. Panel superior, derecha: Centro de coordinación en el contexto de una FU. Panel inferior: FUs contenidas en una subunidad, y se pueden apreciar los segmentos que las unen (Tomado de Markl J., *Evolution of molluscan hemocyanin structures*. 2013, *Biochimica et Biophysica Acta*).

## 1.2.- Propiedades estructurales de las hemocianinas de moluscos

Las hemocianinas de moluscos, en las que se centrará esta tesis, a pesar de tener un origen y función común con las hemocianinas de artrópodos (ambas pertenecen a la familia de proteínas con cobre tipo III han evolucionado de forma divergente hasta adoptar una estructura característica<sup>3</sup>. En ésta, cada par de tríadas de histidina se encuentra dentro de una estructura globular denominada unidad funcional (FU).

Estas unidades funcionales son altamente compactas, con un núcleo formado por hélices  $\alpha$  (que contiene a las tríadas de histidina) y un dominio de *sandwich*  $\beta$ , estando unidas una con otra por segmentos de diez a quince aminoácidos y pudiendo unirse habitualmente 7 u 8 FUs para dar origen a subunidades con masas moleculares que bordean los 400-450 kDa<sup>3</sup>, como se puede apreciar en la Figura 1, aunque se han reportado subunidades compuestas por 12 FUs, con masas moleculares de aproximadamente 550 kDa<sup>1</sup>.



**Figura 2. Organización cuaternaria de las hemocianinas de moluscos.** Panel superior, izquierda: En colores, un dímero antiparalelo en el contexto de un decámero de hemocianina, los cuales pueden asociarse para formar didecámeros, como los que se observan en la micrografía electrónica a la derecha. Panel inferior: caras cerrada (izquierda) y abierta (derecha) de un decámero, con las FUs que transcurren por el interior del cilindro (Tomado de Markl J., *Evolution of molluscan hemocyanin structures*. 2013, *Biochimica et Biophysica Acta* y de Harris JR., *Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH) Purification of Intact KLH1 Through Selective Dissociation of KLH2*, 1995, *Micron*).

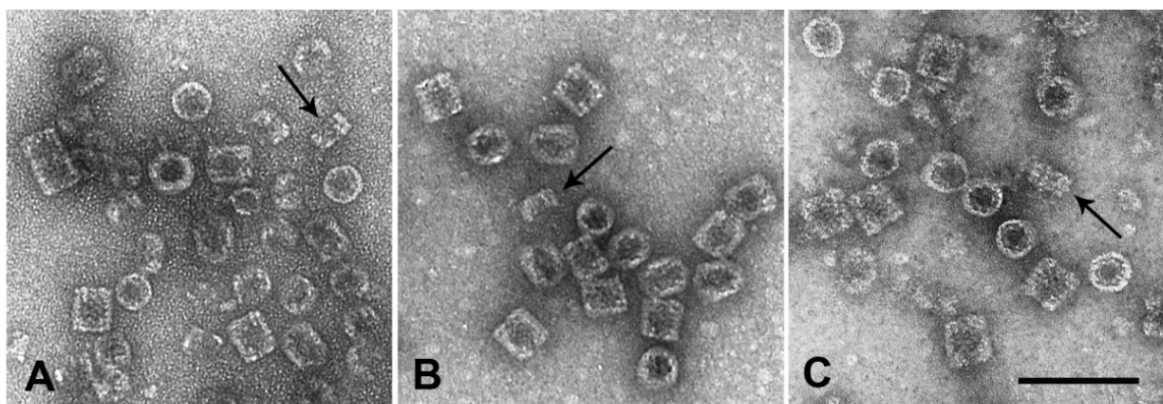
Diez de estas subunidades se organizan mediante uniones no covalentes, en un ordenamiento de dímeros antiparalelos en estructuras que reciben el nombre de decámeros y que tienen la forma de un cilindro semi-hueco. Estos, en algunos casos, (dependiendo de la especie y el número de FUs) presentan una asimetría reflejada en la presencia de dos caras: una abierta y una cerrada. Dos decámeros pueden unirse a través de sus caras abiertas para dar origen a un didecámero, y bajo condiciones especiales o en otras especies se pueden formar tridecámeros<sup>4</sup> y megatridecámeros<sup>1</sup> respectivamente. Estas moléculas poseen tamaños que permiten su observación en el microscopio electrónico<sup>5</sup>, tal como se aprecia en la Figura 2, y las estructuras más refinadas a la fecha han sido obtenidas mediante criomicroscopía electrónica<sup>6</sup>. Además, estas moléculas son altamente glicosiladas, con porcentajes de carbohidratos (en peso) frecuentemente superiores al 3%, pudiendo llegar en algunos casos hasta el 9%<sup>7</sup>, destacándose entre ellos la abundante presencia de manosa<sup>8</sup>.

### **1.3.- Hemocianinas de moluscos y sus propiedades inmunoestimulantes**

Entre las hemocianinas de moluscos, sin duda la más estudiada es la hemocianina de la lapa californiana, *Megathura crenulata*, conocida como *keyhole limpet hemocyanin*, (KLH), para la cual ya desde los años setenta se describió que poseía capacidades inmunoestimulantes<sup>4</sup>, adquiriendo importancia progresivamente. Entre sus capacidades se puede mencionar un importante efecto inmunoestimulante inespecífico, una actividad antitumoral ampliamente documentada contra el cáncer superficial de vejiga y una gran capacidad como proteína *carrier* para la generación de anticuerpos contra haptenos y péptidos<sup>4</sup>. También ha sido utilizada como herramienta en el diagnóstico de esquistosomiasis dada la presencia de epitopos oligosacáridos con el motivo Fuc( $\alpha$ 1–3)GalNAc( $\beta$ 1–4)[Fuc( $\alpha$ 1–3)]GlcNAc, que presentan reacciones cruzadas con este patógeno<sup>9</sup>. Sin embargo, un importante inconveniente de KLH es que se presenta en dos isoformas, KLH1 y KLH2, las cuales se asocian de forma homodecamérica y homodidecamérica, dando origen a macromoléculas inmunológicamente distintas (Figura 4), y la proporción entre estas es altamente variable y dependiente de múltiples factores

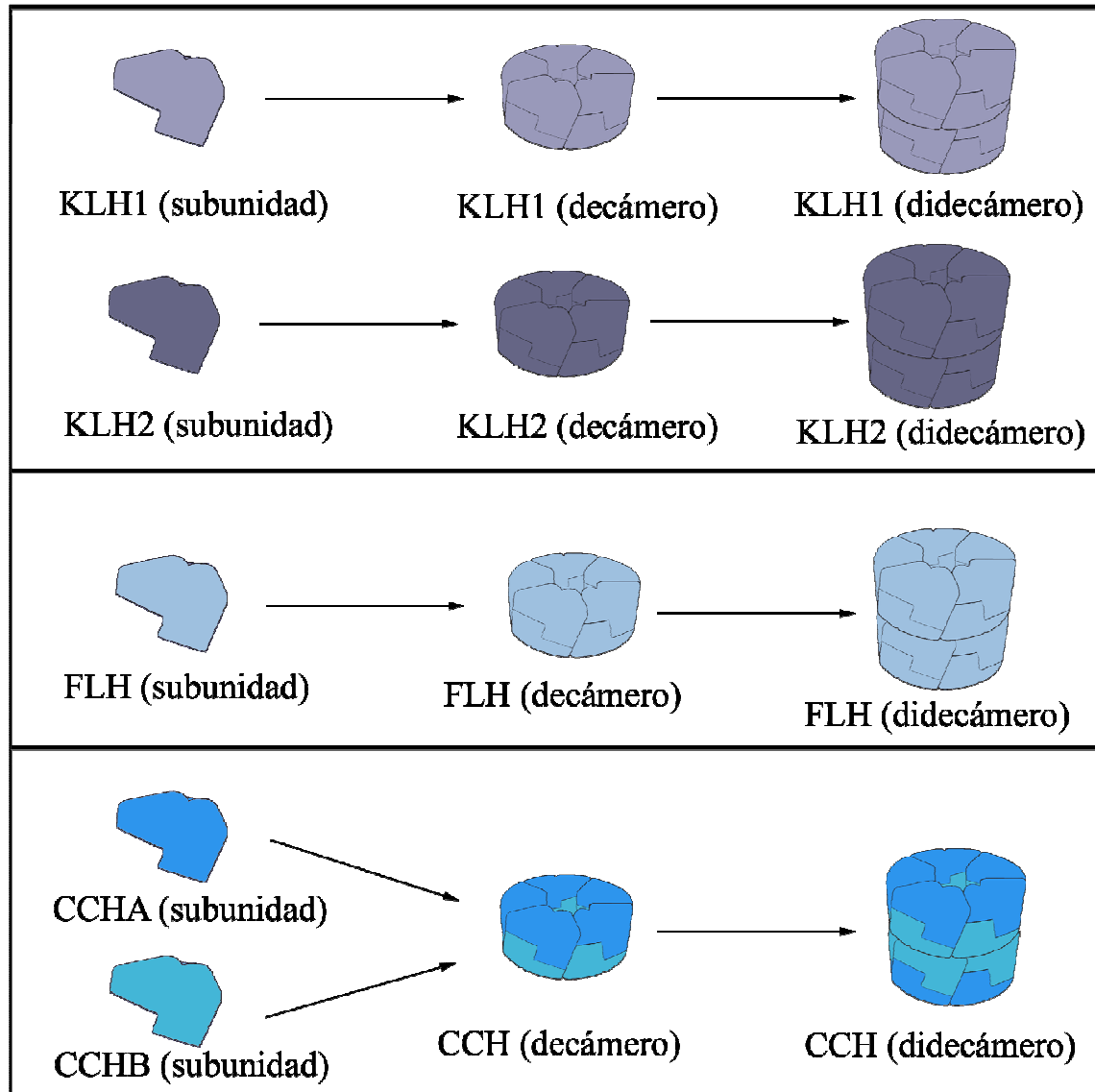
(e.g. estrés del organismo productor, dieta, ambiente utilizado para la crianza, etc.) lo cual dificulta un producto biológico de composición constante<sup>4</sup>. Además, KLH presenta una importante tendencia a precipitar, por lo que debe ser almacenada y transportada como liofilizado y una vez resuspendida posee una vida útil relativamente corta. Por último, KLH, al igual que la mayoría de las hemocianinas de moluscos, requiere de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) en soluciones estabilizantes utilizadas para prolongar su vida útil<sup>10</sup>.

Por otro lado, otras hemocianinas también han sido investigadas, y en los últimos años han cobrado importancia tanto a nivel nacional como internacional las hemocianinas del Loco, *Concholepas concholepas* (CCH)<sup>11</sup> y de la Lapa negra, *Fissurella latimarginata* (FLH)<sup>12</sup>, las cuales se encuentran igualmente en la hemolinfa de estos moluscos, observándose al microscopio electrónico estructuras muy similares (Figura 3). CCH presenta una estructura heterodidecamérica (Figura 4) destacándose por su gran estabilidad<sup>11</sup>, ya que no requiere de iones divalentes en los tampones de purificación y mantención para mantener su estructura cuaternaria (a diferencia de KLH), sin que se vean afectadas sus propiedades inmunoestimulantes y antitumorales<sup>13</sup>.



**Figura 3. Las hemocianinas de moluscos presentan una estructura similar al microscopio electrónico.** En la figura se muestran las hemocianinas de KLH (A), CCH (B) y FLH (C), todas con una forma cilíndrica característica. En todos los casos se pueden apreciar didecámeros, y ocasionalmente, indicados con flechas, decámeros individuales. La barra representa 100 nm (Tomado de Becker M.I. *et al. Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications*. 2015, InTech Open)

En el caso de FLH, esta presenta propiedades inmunoestimulantes superiores a CCH y KLH pero con una estabilidad similar a la de KLH<sup>12</sup> y está compuesta sólo por una subunidad, la cual se organiza en homodecámeros y homodidecámeros, de forma más similar a KLH (Figura 4).



**Figura 4. Las subunidades que forman las hemocianinas de moluscos adoptan diferentes organizaciones.** Panel superior: Las dos isoformas de KLH (KLH1 y KLH2), se asocian de forma independiente para generar dos homodecámeros y los respectivos homodidecámeros. Panel intermedio: FLH sólo presenta una subunidad, que da origen a homodecámeros y homodidecámeros. Panel inferior: Las dos subunidades de CCH se asocian en una proporción 1:1 para dar origen a heterodecámeros y heterodidecámeros. (Modificado de Arancibia *et al. Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer*. 2012, InTech Open).

Estas dos hemocianinas, descritas previamente en uno de los laboratorios donde se desarrolló esta Tesis, han demostrado, entre otras cosas, una destacable capacidad inmunoestimulante con efectos antitumorales no sólo en un modelo murino de cáncer superficial de vejiga<sup>13</sup>, sino que también de melanoma, siendo FLH la que ha demostrado una mayor capacidad antitumoral<sup>12</sup>. Además, CCH ha sido utilizado para generar anticuerpos contra diferentes péptidos y haptenos<sup>14-17</sup>, como antígeno experimental<sup>18</sup>, como carrier para vacunas inmunoanticonceptivas<sup>19</sup> y para una vacuna en un modelo animal de prionosis<sup>20</sup> y, recientemente, como adyuvante en una terapia antitumoral experimental en humanos<sup>21</sup>.

Sin embargo, a pesar de la amplia gama de usos biomédicos que reciben estas hemocianinas actualmente, los mecanismos a nivel molecular que les otorgan sus destacables propiedades inmunoestimulantes recién están comenzando a ser elucidados. Investigaciones realizadas han mostrado que, en modelos murinos, una inmunización previa y un posterior desafío tanto con KLH como con CCH causan activación de las células NK y producen un perfil de citoquinas de tipo Th1, caracterizado por la secreción de interferón- $\gamma$ <sup>13</sup>. Esta misma secreción de IFN- $\gamma$  ha sido observada para FLH<sup>12</sup>. Sin embargo, muchos de estos resultados no se observan en ratones *naive* para las hemocianinas, señalando la importancia del sistema inmune adaptativo en la capacidad inmunomoduladora de estas proteínas. En cuanto a los efectos de las hemocianinas sobre las células dendríticas (DCs), si bien se ha descrito una eficiente endocitosis para CCH<sup>22</sup>, los resultados en cuanto a efectos sobre la maduración de las primeras no son claros. En el caso de KLH se ha reportado un rol en la maduración *in vitro* de DCs humanas<sup>23</sup>, lo que no se condice con investigaciones de nuestro laboratorio en DCs murinas, en que no se observan cambios en la expresión de moléculas de superficie asociadas a maduración<sup>24</sup>. Por otro lado, cuando se realizan co-cultivos de células NK y DCs, CCH sí produce cambios morfológicos en las últimas, reforzando la importancia de las células NK en el rol inmunoestimulante de las hemocianinas<sup>24</sup>.



Sin embargo, un hallazgo que diferencia a FLH de KLH y CCH, aparte de su capacidad inmunoestimulante aún mayor, es que es capaz de inducir la activación y la maduración parcial de células dendríticas, conduciendo a la secreción de moléculas proinflamatorias como IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-23 e IL-12p40<sup>12</sup>.

Otra observación que cabe señalar es que las hemocianinas son procesadas lentamente a nivel intracelular por células presentadoras de antígenos<sup>22,25,26</sup>, lo que favorecería un mayor tiempo de presentación y por tanto una respuesta más fuerte y prolongada<sup>27</sup>, siendo factible que éste sea también un factor importante del efecto inmunomodulador de las hemocianinas de moluscos.

Buscando una explicación a la potente capacidad inmunogénica de las hemocianinas en un nivel más general, se han invocado un número de características como lo son su gran tamaño, su simetría cuasi-D5<sup>6</sup>, su xenogenicidad y su alto contenido de carbohidratos<sup>4,22</sup>. En el último caso la afirmación se ve sustentada en el hecho de que KLH posee epitopos que reaccionan de forma cruzada con otros presentes en agentes patógenos tales como *Cryptococcus neoformans*<sup>28</sup> y *Schistosoma mansoni*<sup>9</sup>. Sin embargo, se ha demostrado para CCH<sup>29</sup> y para la hemocianina de otro molusco, *Rapana thomasi* (RtH)<sup>30</sup>, que los primeros dos factores no son determinantes, ya que las subunidades aisladas son igualmente o más inmunogénicas que la molécula completa. En cuanto al rol que juegan los carbohidratos en sus propiedades, a pesar de que éste sea probablemente la causa más frecuentemente invocada<sup>4</sup>, se ha descrito para KLH, CCH y FLH que la remoción con peryodato de los carbohidratos no reduce la antigenicidad de estas moléculas al estudiar el título de anticuerpos en animales inmunizados<sup>12,31</sup>, y que, para CCH, tampoco juegan un papel en la endocitosis por parte de células dendríticas<sup>22</sup>. Aún más, CCH, al ser desglicosilada por oxidación con peryodato, presenta una mayor estabilidad producto de la formación de bases de Schiff y mejora aún más sus propiedades inmunogénicas, manteniendo sus propiedades antitumorales<sup>22</sup>. Sin embargo, en este último aspecto, nuevamente FLH presenta un comportamiento diferente, ya que la remoción de sus carbohidratos por el mismo método tiene un efecto drástico en la sobrevivencia de animales en un modelo murino de melanoma<sup>12</sup>.

Es importante hacer notar que el perfil de carbohidratos es distinto entre las tres hemocianinas, aunque KLH y FLH presentan una mayor semejanza entre sí, lo cual puede estar relacionado con que son filogenéticamente más cercanas. Estudios de unión con lectinas biotiniladas realizados en nuestro laboratorio<sup>12</sup> mostraron reactividad de las tres hemocianinas con concanavalina A (ConA), una lectina que une manosa (un representante de los carbohidratos con unión de tipo N), en tanto que sólo KLH y FLH reaccionan con la aglutinina de maní (PNA), una lectina que une a Gal( $\beta$ 1-3)-GalNAc (un representante de carbohidratos con unión de tipo O), lo cual indicaría diferente distribución de los carbohidratos accesibles en la superficie de las hemocianinas. Para realizar este estudio de forma más completa, se analizaron mediante espectrometría de masa los carbohidratos de CCH y FLH, y se encontró que, de manera similar a KLH y en concordancia con la unión a ConA, ambas hemocianinas poseen oligosacáridos ricos en manosa, así como también oligosacáridos fucosilados<sup>12</sup>. Sin embargo, sólo en FLH se detectó la presencia de xilosa, un carbohidrato ya descrito en KLH, en adición a microheterogeneidad en los azúcares de tipo N y pequeñas señales que podrían indicar oligosacáridos con presencia de ácido siálico<sup>12</sup>.

Sin embargo, si observamos exclusivamente la relación de los carbohidratos con los efectos antitumorales, se ha descrito que KLH posee el determinante Gal( $\beta$ 1-3)-GalNAc antes mencionado, que se reacciona de forma cruzada con el antígeno de Thomsen-Friedenreich<sup>32</sup>, un oligosacárido presente en diversos tipos de cáncer, entre los que destaca el cáncer de vejiga, que como se mencionó anteriormente, fue el estudiado en el primer reporte sobre el efecto antitumoral de KLH<sup>33</sup> y para el que aún se utiliza como inmunoestimulante inespecífico<sup>34,35</sup>.

En resumen, los antecedentes antes expuestos resultan conflictivos a la hora de determinar un rol de los carbohidratos en las propiedades de las hemocianinas. Es por esta razón que consideramos deben realizarse más estudios relacionados con el rol de los carbohidratos presentes en la estructura de las hemocianinas, para analizar eventuales

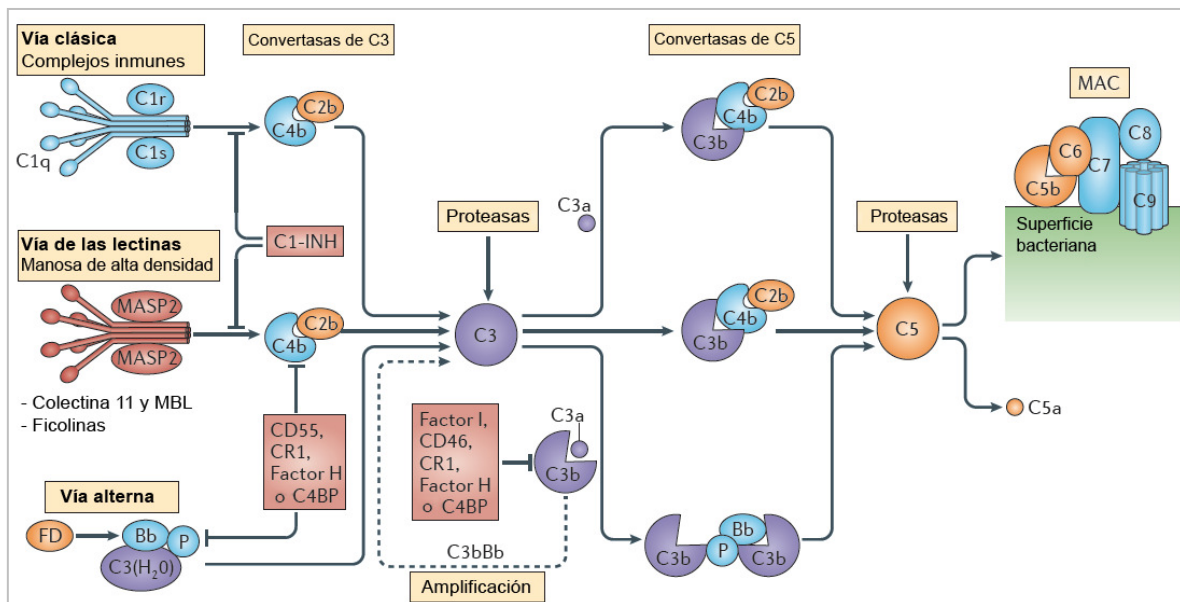
contribuciones de este componente mediante algún otro mecanismo aún no descrito, en adición a la posible contribución de la secuencia proteica de las hemocianinas, es decir, su xenogenicidad para mamíferos, y la mayor permanencia intracelular, todo esto con el fin de determinar si los carbohidratos tienen un papel general e importante en la inmunogenicidad de las hemocianinas o si su rol debe ser estudiado caso a caso.

Entre los componentes de la respuesta inmune que han sido escasamente estudiados en relación a los carbohidratos de las hemocianinas, se cuenta el rol que podría jugar el sistema del complemento, dado que posee mecanismos que le permiten detectar carbohidratos ajenos a los propios y desencadenar una potente respuesta inmune tanto a nivel innato como adaptativo.

## **2.- Sistema del complemento.**

El sistema del complemento está compuesto por alrededor de cuarenta proteínas séricas y de membrana que median importantes mecanismos de defensa, tanto innatos como adaptativos<sup>36</sup>. Su activación está mediada por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs)<sup>37</sup>, detectados por moléculas reconocedoras de patrones (PRM)<sup>38</sup>, que al activarse desencadenan una rápida serie de reacciones de proteólisis, llevando a la formación de complejos de ataque a membrana (MACs), que corresponden a poros que producen la lisis de la célula blanco<sup>36</sup>. Además, paralelo a la activación de los componentes terminales del sistema del complemento, se producen una serie de moléculas con diversas funciones, como es el caso de las anafilotoxinas (C3a y C5a), que favorecen reacciones inflamatorias al jugar un rol en la contracción del músculo liso, en quimiotaxis, en la permeabilidad de las paredes capilares y en la liberación de histamina<sup>36</sup>. También se generan fragmentos (C3b y C4b) que actúan opsonizando la célula blanco (haciéndola más “atractiva” al sistema inmune) y cumpliendo un rol coestimulador<sup>38</sup>, especialmente a nivel de la respuesta B-dependiente. Todos estos procesos se encuentran finamente controlados en múltiples niveles, dado que su activación descontrolada puede conducir a severas patologías<sup>36</sup>.

Cabe destacar que este sistema no sólo media defensa ante microorganismos, ya que se ha descubierto que algunos de sus componentes juegan un importante rol en otros procesos como la eliminación de células apoptóticas y células que han adquirido un fenotipo canceroso, la regeneración de tejidos, y además, en otros estados patológicos como el síndrome hemolítico urémico atípico y la degeneración macular relacionada a la edad<sup>36</sup>. El sistema del complemento primero fue descrito, como su nombre lo indica, como un complemento a la actividad protectora de los anticuerpos<sup>39</sup>. Actualmente se conocen en detalle tres vías mediante las cuales el sistema del complemento puede ser activado<sup>36</sup>: la vía alterna, la vía de las lectinas y la vía clásica, como puede apreciarse en la Figura 5.



**Figura 5. El sistema del complemento puede ser activado mediante tres vías.** Cada vía, mediante diferentes moléculas de reconocimiento de patrones de peligro (DAMPs), genera, mediante proteólisis, convertasas de C3 y C5 sucesivamente, las que llevan a la formación del complejo de ataque a membrana (MAC). Además, los fragmentos de mayor tamaño de C3 y C4 (C3b y C4b respectivamente) se pueden depositar en la superficie bacteriana generando su opsonización (no representado) (Modificado de Kolev et al. *Complement — tapping into new sites and effector systems*. 2014, Nature Reviews Immunology).

## **2.1.- Vía alterna del sistema del complemento**

La vía alterna se considera uno de los brazos más antiguos del sistema del complemento, dado que análisis filogenéticos muestran que algunos de sus componentes se encuentran presentes en representantes del género *Cnidaria*<sup>40</sup>, en conjunto con algunos componentes de la vía de las lectinas, formando parte de una versión primitiva del sistema del complemento<sup>41</sup>. Esta vía se activa independientemente de anticuerpos y se basa en una activación continua de C3 en la que el agua actúa como nucleófilo para formar C3b, que puede unirse al factor B, el cual entonces puede ser hidrolizado por el factor D, liberando un fragmento llamado Ba. El fragmento que permanece unido forma C3bBb, también conocida como C3 convertasa de la vía alternativa, que puede ser estabilizada por la properdina. Cabe mencionar que en este punto, las tres vías convergen, ya que todas producen una C3 convertasa de algún tipo. Posteriormente, la hidrólisis de C3 (la proteína del sistema del complemento más abundante en el plasma), genera dos fragmentos: C3a y C3b, siendo la primera molécula una potente anafilotoxina. C3b, por su parte, puede unirse a la C3 convertasa, generando C3bBbC3b (C5 convertasa de la vía alterna), o actuar como opsonina (fragmento opsonizante). La C5 convertasa de la vía alterna, a su vez, proteoliza a C5, produciendo C5a y C5b. El primer fragmento, al igual que C3a, es una potente anafilotoxina, y el segundo fragmento recluta a la membrana a C6, C7, C8 y C9, culminando, gracias a la polimerización de este último, en la formación del MAC<sup>38</sup>.

## **2.2.- Vía de las lectinas del sistema del complemento**

Como se dijo anteriormente, se postula en base a evidencia filogenética, que en conjunto con la vía alterna, componentes de la vía de las lectinas formaban parte de una versión primitiva del sistema del complemento. Esta vía se basa en el reconocimiento de diversos carbohidratos ampliamente distribuidos en patógenos mediante diversas proteínas. De las proteínas que cumplen esta función, la mejor descrita es la lectina que une manosa (MBL), de la familia de las colectinas, y, que como su nombre lo indica, une a manosa, aunque no de forma exclusiva, uniéndose también a N-acetilglucosamina (GlnNAc) y otros carbohidratos<sup>42</sup>.

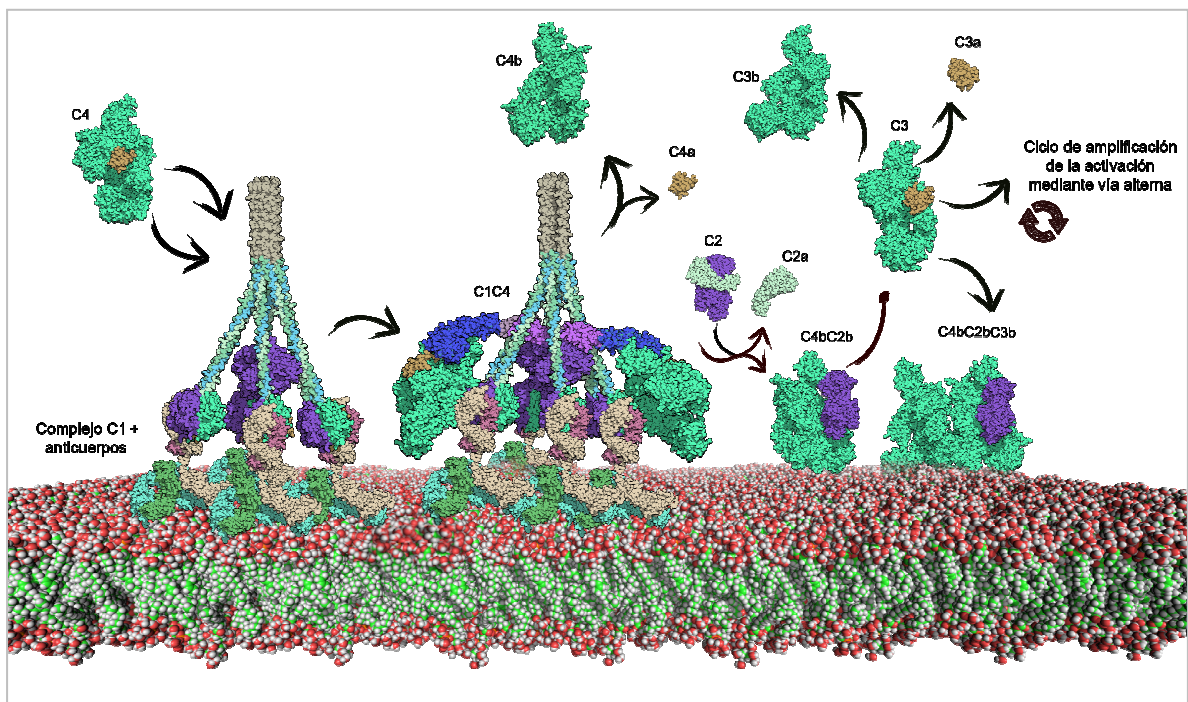
Esta unión se realiza a través de múltiples unidades de los carbohidratos, ya que MBL se organiza en formas oligoméricas (3-6 oligómeros) y esto lleva a la activación de la serino-proteasas asociada a MBL (MASP), MASP-1, la cual a su vez activa a MASP-2<sup>43</sup>. Estas serino-proteasas, a su vez, activan proteolíticamente a C4, generando los fragmentos C4a y C4b<sup>44</sup>. Esta última molécula posee un enlace tioléster metaestable que puede ser fácilmente atacado por un nucleófilo<sup>38</sup>. Esto hace posible que reaccione con grupos amino o hidroxilo presentes en la superficie de las células blanco, uniéndose a ellas de forma covalente y opsonizándolas. Además, las serino-proteasas también activan a C2 en una secuencia similar, generando C2a y C2b, pudiendo este último asociarse con C4b para dar origen a C4b2b, una C3 convertasa, y de este punto procede la vía terminal ya descrita para la vía alterna<sup>45</sup>.

Sin embargo, MBL no es la única molécula de reconocimiento que puede activar la vía de las lectinas mediante MASPs, ya que se han descrito otras cuatro proteínas (L-ficolina, M-ficolina, H-ficolina y colectina-11), que mediante la misma unión a MASPs conducen a la activación de la vía<sup>46,47</sup>. Eso sí, cabe destacar que la especificidad de estas lectinas es diferente, mostrando una unión a GlcNAc y a N-acetilgalactosamina (GalNAc), indicando una preferencia hacia motivos acetilados<sup>42</sup>.

### **2.3.- Vía clásica del sistema del complemento.**

La vía clásica se considera el brazo más reciente del sistema del complemento, dado que su funcionamiento incluye mecanismos que requieren la presencia de anticuerpos, los cuales surgieron en etapas más tardías de la evolución de los animales. En esta vía, la principal señal detectada es la presencia de dos moléculas de anticuerpos de tipo IgG a una distancia crítica de 30-40 nm, o de una molécula de anticuerpo de tipo IgM, teniendo este último una mayor capacidad activadora. Esto produce la unión de un complejo proteico llamado C1, compuesto por diferentes subunidades: C1q, dos moléculas de C1r y dos moléculas de C1s. C1q es la encargada de reconocer esta disposición específica de los anticuerpos mediante “cabezas” globulares.

El cambio conformacional que esto genera produce la activación de C1r, que procesa a C1s a su forma activa. C1s, a su vez, activa proteolíticamente a C4, generando los fragmentos C4a y C4b<sup>44</sup>. Esta última molécula puede, a través del enlace tioéster metaestable antes mencionado, unirse de forma covalente a la superficie de las células blanco. Además, C1s también procesa simultáneamente a C2, generando C2b, que al unirse a C4b expone un sitio con actividad proteolítica y esta enzima así generada recibe el nombre de C3 convertasa<sup>38</sup>. Es importante señalar que C1q presenta una gran homología con MBL y, por otra parte, C1r con C1s presentan una gran homología con MASP-1 y MASP-2. Esto, en adición a que C1q puede unirse a MASPs, señala que la vía clásica surgió como una modificación de la vía de las lectinas, que posteriormente fue capaz de incorporar a los anticuerpos, generados recientemente como producto de la evolución en las especies que desarrollaron una respuesta inmune adaptativa, dando origen a los mecanismos de activación de la vía clásica que conocemos hoy<sup>41,48</sup>.



**Figura 6. Activación del sistema del complemento mediante la vía clásica.** El componente C1, a través de la unión a inmunoglobulinas, es capaz de activar a sus componentes C1r y C1s, los que proteolizan a C4 y C2, generando una convertasa de C3, convergiendo así en la vía terminal que lleva a la formación de complejos de ataque a membranas (MACs). Cabe destacar que, si bien la figura muestra anticuerpos de isotipo IgG, el isotipo IgM es el más eficiente en la activación de la vía clásica (Adaptado de molecularart.dk)

### **3.- Hemocianinas y sistema del complemento.**

En nuestro conocimiento, el único antecedente que involucra alguna hemocianina con el sistema del complemento es el reportado por Thornton *et al.*<sup>49</sup>, en que se estudió si la unión de anticuerpos naturales contra KLH podía generar complejos inmunes que contuviesen C3b y esto permitiese la unión a células con receptores específicos para C3b. Sin embargo, este estudio utilizó KLH por su rol como proteína modelo dado su fuerte efecto estimulante, pero nunca se estudió hacia qué componente de ésta iban dirigidos los anticuerpos, ni realizó un análisis con otras hemocianinas. Además, dada la naturaleza de los experimentos realizados, no se puede garantizar que el depósito observado provenga de la activación de la vía clásica ya que en los experimentos se utilizó suero humano completo, sin inhibición de ningún tipo, y dado el alto contenido de carbohidratos de las hemocianinas, y especialmente de manosa, es razonable postular que en adición a la vía clásica, se esté activando también la vía de las lectinas. Sin embargo, existen más trabajos que, sin estudiar el sistema del complemento, muestran la presencia de anticuerpos naturales contra KLH en individuos no inmunizados, lo cual reforzarían la hipótesis de que la activación del sistema del complemento observada por Thornton *et al.* estaría ocurriendo mediante la vía clásica, específicamente mediante la unión de C1 a anticuerpos naturales contra las hemocianinas.

#### **3.1.- Anticuerpos naturales y hemocianinas de moluscos.**

Desde los inicios del estudio del sistema inmune adaptativo se ha descrito la presencia de anticuerpos en individuos no inmunizados, incluso en etapas muy tempranas de la vida, así como en animales experimentales libres de patógenos o de exposición a antígenos externos<sup>50</sup>. En algunos casos, estos anticuerpos pueden estar dirigidos contra componentes propios, así como contra antígenos extraños (i.e. proteínas virales o bacterianas). Entre los estudios más tempranos en este tema, cabe mencionar el descubrimiento de los grupos sanguíneos humanos del sistema ABO, que se expresa en la superficie de los eritrocitos y en el cual los individuos de un determinado grupo (A, B, O o



AB) poseen anticuerpos de la clase IgM contra el o los determinantes antigénicos que no expresan (anticuerpos anti-B, anti-A, anti-A/anti-B o ninguno de los anteriores, respectivamente), descubrimiento que valió a Karl Landsteiner el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1930<sup>51</sup>.

Estos anticuerpos, que reciben el nombre de anticuerpos naturales (NAb), son producidos por una población de linfocitos B, con propiedades de células de la inmunidad innata, denominados linfocitos B-1. Entre otras características, estos linfocitos presentan un repertorio de BCR separado, con bajos o nulos niveles de recombinación e hipermutación somática<sup>50</sup>, se movilizan rápidamente en respuesta a señales de alerta de la inmunidad innata y se ubican principalmente a nivel peritoneal<sup>50</sup>.

Los NAb poseen, en general, baja afinidad pero amplia especificidad<sup>50</sup>, correspondiendo principalmente a anticuerpos de los isotipos IgM<sup>50</sup> e IgG<sup>52</sup>, con algunos reportes también para IgA<sup>53</sup>. En el caso de los NAb de tipo IgM, se consideran fundamentales en el control temprano de infecciones virales y bacterianas, ya sea mediante directa neutralización y eliminación de la circulación, mediante reclutamiento de células fagocíticas, o activación del sistema del complemento<sup>50</sup>. En adición a esto, se han descrito un rol de los NAb en la eliminación de eritrocitos senescentes<sup>50</sup>.

En el caso de los NAb de tipo IgG, han sido, en general, considerados como un marcador de patologías autoinmunes, particularmente en caso de NAb que reconocen antígenos propios; sin embargo, reportes recientes indican la presencia de estos autoanticuerpos en amplias cohortes de individuos sanos, pero vinculando variaciones en sus niveles con diferentes enfermedades<sup>54</sup>. Además, existen también estudios que han determinado que NAb de tipo IgG trabajan en conjunto con las antes mencionadas ficolinas, conduciendo a una eliminación más eficaz de diferentes patógenos<sup>55,56</sup>.

Como ya se mencionó, se ha descrito la presencia de anticuerpos naturales capaces de reconocer a KLH en humanos no inmunizados, que pertenecen a los isotipos IgG e IgM, con alta frecuencia entre los donantes de sangre<sup>57,58</sup>, habiéndose descrito su capacidad para activar el sistema del complemento humano<sup>49</sup>. Sin embargo, no hay antecedentes que señalen que esto se cumpla para otras hemocianinas de moluscos como las estudiadas por nuestro laboratorio ni experimentos dirigidos a confirmar la participación de la vía clásica del sistema del complemento humano. Es en base a los antecedentes anteriormente expuestos que proponemos la hipótesis y los objetivos detallados en las siguientes secciones.

## HIPOTESIS

**Las hemocianinas de moluscos de las familias *Fissurellidae* (KLH y FLH) y *Muricidae* (CCH) activan la vía clásica del sistema del complemento humano a través de anticuerpos naturales capaces de reconocer estas proteínas.**

## OBJETIVOS

### 1.- Objetivo General

Contribuir al conocimiento de los mecanismos que regulan las propiedades inmunomoduladoras de las hemocianinas de moluscos en mamíferos, a través del análisis de la vía clásica del sistema del complemento humano.

### 2.- Objetivos específicos

2.1.- Detectar anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos en los sueros de pacientes previamente inmunizados con KLH.

2.2.- Detectar anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos en los sueros de donantes sanos no inmunizados.

2.2.1.- Detectar anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos mediante ensayos de *dot-blot*

2.2.2.- Detectar anticuerpos reactivos con hemocianinas nativas y desglicosiladas mediante ELISA.

2.3.- Determinar si las hemocianinas nativas y desglicosiladas, junto a anticuerpos de donantes no inmunizados, activan *in vitro* la vía clásica del sistema del complemento humano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- Materiales

#### 1.1.- Reactivos e insumos generales.

Agua bidestilada Apiroflex® (libre de pirógenos) fue utilizada para las soluciones y obtenida de Fresenius Kabi. De Merck se obtuvo fosfato monohidrogenado disódico, cloruro de calcio dihidratado y peryodato de sodio. Acetato de sodio trihidratado, cloruro de sodio, (tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y Tween-20 fueron adquiridos de Winkler Ltda. Etilenglicol se obtuvo de bioWORLD y ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) se obtuvo de Sigma®. Para los ensayos de *dot-blot* se usó leche descremada de consumo humano en polvo. Para los ensayos de *dot-blot* se utilizaron membranas de nitrocelulosa Amersham® Hybond®-ECL de GE Healthcare, y para colectar sangre y obtener suero se utilizaron tubos BD Vacutainer®.

#### 1.2.- Reactivos y material biológico

KLH (Imject® Mariculture Keyhole Limpet Hemocyanin) fue obtenida de Thermo Scientific®. CCH (Immunocyanine®) y FLH (Blue-Vac®) fueron obtenidas de Biosonda S.A., en condiciones libres de LPS. Manano (purificado de *S. cerevisiae*) fue obtenido de Sigma. Caseína bovina fue adquirida en Winkler.

El anticuerpo de conejo anti-IgG humana (específico para cadenas  $\gamma$ ) acoplado a fosfatasa alcalina se obtuvo de Dako (cód. D0336). El anticuerpo de conejo anti-IgG humana (H+L) acoplado a peroxidasa se obtuvo de Amersham. IgM humana purificada por afinidad y un anticuerpo de cabra anti-IgM humana (específico para fragmentos  $Fc_{5\mu}$ ) acoplado a peroxidasa fueron adquiridos en Jackson ImmunoResearch (códos. 009-000-012 y 109-035-043, respectivamente). El anticuerpo de conejo anti-IgG (específico para fragmentos  $Fc_{\gamma}$ ) acoplado a peroxidasa se obtuvo de Sigma (cód. A0170).

El anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra (H+L) acoplado a peroxidasa se obtuvo de Calbiochem (cód. 401515) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-C1q-85 (anticuerpo inactivador dirigido contra la región globular de C1q humano) fue gentilmente obsequiado por Diana Wouters (Departamento de Inmunopatología, Sanquin Blood Supply Foundation, Amsterdam, Países Bajos).

Los siguientes reactivos del sistema del complemento fueron obtenidos de Complement Technology (CompTech, Texas, USA): C1 humano purificado (cód. A098), C4 humano purificado (cód. A105) y un anticuerpo de cabra anti-C4 humano (cód. A205).

Los sueros de pacientes fueron gentilmente proporcionados por la Dra. Mercedes López y el Dr. Flavio Salazar-Onfray, del Programa de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y corresponden a pacientes diagnosticados con melanoma maligno, a los cuales se les aplica una inmunoterapia con células dendríticas cargadas con un lisado tumoral de melanoma (TRIMEL®), administrada en conjunto con 100 µg de KLH como adyuvante<sup>59</sup>. En estos pacientes, el suero se obtuvo a partir de sangre extraída antes de la inmunización y un mes después de la última de las inmunizaciones (realizadas a los 0, 10, 30 y 50 días). La sangre de los donantes no inmunizados fue procesada según lo indicado en Métodos para obtener los sueros a utilizar en los experimentos.

## **2.- Métodos**

### **2.1.- Obtención de sueros**

Para donantes sanos no inmunizados, definidos mediante una declaración simple como aquellos no habiendo sido activamente inmunizados con hemocianinas de moluscos y sin diagnóstico de ninguna enfermedad crónica, se obtuvo sangre mediante punción venosa, en tubos sin aditivo (BD Vacutainer®), se esperó a la formación del coágulo, se realizó centrifugación de los tubos a 1.200 r.p.m durante 10 minutos a una temperatura de 15°C (en centrífuga SL 16R, Thermo Scientific) y se extrajo el sobrenadante, el cual fue alicuotado y almacenado a -80°C hasta su uso. Cuando se usó suero inactivado por calor (HIS), éste fue obtenido sometiendo el suero normal a una incubación a una temperatura de 56°C durante 30 minutos (en baño térmico, modelo Julabo F25), tanto para sueros de donantes sanos como para sueros de pacientes inmunizados.

### **2.2.- Soluciones de hemocianinas nativas.**

Las diferentes hemocianinas fueron disueltas en PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  8 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 7,4) a partir de sus diferentes stocks (KLH fue primero reconstituida con agua bidestilada a una concentración de 2,5 mg/ml, CCH se encontraba a una concentración de 38,1 mg/ml y FLH a concentraciones de 10,3 o 19,6 mg/ml) para obtener soluciones stock de cada hemocianina a concentraciones de 0,4 y 0,5 mg/ml.

### **2.3.- Soluciones de hemocianinas desglicosiladas.**

Para preparar hemocianinas desglicosiladas, se siguió el protocolo de Arancibia *et al.*<sup>22</sup>, con algunas modificaciones. Brevemente, 5 ml de soluciones 0,5 mg/ml de cada hemocianina fueron incubadas durante 1 hora, en oscuridad y a temperatura ambiente, con una solución 15 mM de peryodato de sodio disuelto en una solución 0,1 M de acetato de sodio ajustada a pH 5,5. Luego, se agregó un exceso de 25 µl de etilenglicol para consumir el peryodato restante, para lo cual se mantuvo la muestra a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se concentraron las hemocianinas desglicosiladas utilizando el sistema Amicon® Ultra-4 10K (Merck®), obteniéndose alrededor de 500 µl de cada hemocianina, a concentraciones de 2,4; 3,3 y 3,6 mg/ml para Ox-KLH, Ox-FLH y Ox-CCH respectivamente, determinado mediante el método de Bradford<sup>60</sup>. A partir estas soluciones se prepararon diluciones a una concentración de 0,4 mg/ml, de forma análoga a las hemocianinas nativas.

### **2.4.- Determinación de anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos en sueros de pacientes inmunizados y donantes no inmunizados.**

#### **2.4.1.- Ensayos de *dot-blot***

Membranas de nitrocelulosa fueron sensibilizadas con las diferentes hemocianinas nativas (1 µl de cada hemocianina a una concentración de 0,4 mg/ml en PBS), utilizando PBS como control negativo y HIS a una dilución de 1:10 como control positivo del anticuerpo secundario. Después de la evaporación pasiva del solvente, las membranas fueron bloqueadas durante la noche con una solución acuosa de leche descremada al 5% a una temperatura de 4°C. Luego, después de cinco lavados de cinco minutos, en agitación, con PBS-Tween-20 0.05% (PBS-T), se incubaron las membranas con los sueros de los diferentes donantes, diluidos 1:50 en leche descremada al 3%, durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Se repitieron los lavados y se incubaron las membranas con un anticuerpo de conejo anti-IgG humana acoplado a fosfatasa alcalina, en una dilución de 1:1000 en PBS-T, también a temperatura ambiente durante 1,5 horas.

Finalmente, con los lavados correspondientes, las membranas fueron reveladas a temperatura ambiente y con agitación mediante el sistema de sustratos de NBT/BCIP (nitroazul de tetrazolio/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en un buffer específico para fosfatasa alcalina (NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y Trizma base 100 mM ajustado a un pH de 9,5), que lleva a la formación de una mezcla de productos de color violeta, y la reacción se detuvo mediante un último lavado con PBS-T.

#### 2.4.2.- ELISA

Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano (MaxiSorp™, Nunc™, Thermo Scientific™) fueron sensibilizadas (100 µl/pocillo) con las diferentes hemocianinas de moluscos a una concentración de 10 µg/ml en PBS, sin tratamiento alguno o desglicosiladas e incubadas durante la noche a 4°C. Como control negativo se incubaron pocillos con una solución de caseína a la misma concentración. Posteriormente, los pocillos fueron lavados cinco veces con PBS-T (lavador de placas Nunc-Immuno™ Wash 8) y bloqueados con una solución de caseína (preparada en agua destilada y ajustada a pH 7,0) al 2,5% p/v, a una temperatura de 37°C durante 2 horas (200 µl/pocillo, Abbott Commander Dynamic Incubator). Luego de un nuevo lavado, se añadieron los sueros (descomplementados) a una dilución de 1:200 o 1:250 (para diferentes experimentos) en caseína al 2,5% p/v en el caso de los pacientes inmunizados y a una dilución de 1:100 en caseína al 2,5% p/v en el caso de los donantes no inmunizados, incubándose a una temperatura de 37°C durante 1 hora (100 µl/pocillo). Después de volver a lavar los pocillos, se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-IgG humana (H+L) acoplado a peroxidasa, a una dilución de 1:10.000 en PBS-T, a una temperatura de 37°C durante 1 hora (100 µl/pocillo).



Posteriormente, luego de un lavado final, se reveló la placa con ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,1% (100 µl/pocillo, disuelto en buffer citrato-fosfato 70 mM ajustado a pH 4.2), registrándose la lectura de absorbancia a 405 nm a los 20 minutos de transcurrida la reacción (Lector de placas Multiskan™ FC, Thermo Scientific™).

Para la determinación específica de isotipos IgG e IgM, se reemplazó el anticuerpo anti-IgG humana (H+L) acoplado a peroxidasa por un anticuerpo de cabra anti-IgG humana específico contra fragmentos Fc<sub>γ</sub> acoplado a peroxidasa o con un anticuerpo de cabra anti-IgM humana específico contra fragmentos Fc<sub>5μ</sub> (5 fragmentos Fc<sub>μ</sub> unidos procedentes de un pentámero de IgM) acoplado a peroxidasa respectivamente.

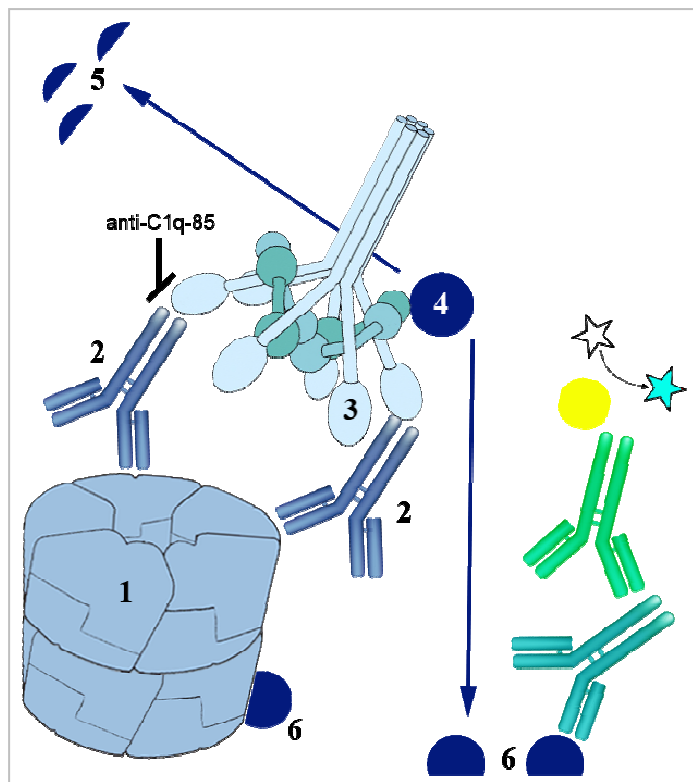
## 2.5.- Determinación de la activación de la vía clásica del sistema del complemento en sueros de donantes no inmunizados

El proceso se muestra esquematizado en la Figura 7 y corresponde a una modificación del protocolo de Ferreira *et al*<sup>61</sup>. Brevemente, placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano fueron sensibilizadas (100 µl/pocillo) con las diferentes hemocianinas de moluscos a una concentración de 10 µg/ml en PBS, sin tratamiento alguno o desglucosiladas e incubadas durante la noche a 4°C. Como control negativo se incubaron pocillos con una solución de caseína a la misma concentración y como control positivo se incubaron pocillos con IgM humana a una concentración de 2 µg/ml en PBS. Posteriormente, los pocillos fueron lavados (al igual que para el resto de los pasos) cinco veces con TBS/Tween-20 0,05%/Ca<sup>2+</sup> 5 mM (TBS-T-Ca<sup>2+</sup>) y bloqueados con una solución de caseína al 2,5% p/v, a una temperatura de 37°C durante 2 horas (200 µl/pocillo). Luego, se añadieron los sueros descomplementados de los donantes no inmunizados a una dilución de 1:60 en caseína al 2,5% p/v, incubándose a una temperatura de 37°C durante 1 hora (100 µl/pocillo). Después, los pocillos se incubaron con una solución de C1 humano purificado, disuelto en buffer Veronal (VB<sup>2+</sup>, dietilbarbiturato de sodio 5 mM, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM) a una concentración de 200 ng/ml (100 µl/pocillo).

Además, para algunos experimentos, se añadió a la solución de C1 EDTA 20 mM o anti-C1q-85 (un anticuerpo que inhibe la unión de los dominios globulares de C1q a las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgM respectivamente<sup>62</sup>) a una concentración de 2 µg/ml. Luego, se añadió una solución de C4 humano purificado disuelto en VB<sup>2+</sup> a una concentración de 1 µg/ml (100 µl/pocillo). Posteriormente, se incubaron los pocillos con un anticuerpo de cabra anti-C4 humano a una dilución de 1:10.000 en caseína 2,5% p/v, seguido de un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra acoplado a peroxidasa, también a una dilución de 1:10.000, en TBS-T-Ca<sup>2+</sup>. Finalmente, se reveló la placa con ácido 2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico] (ABTS) suplementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,1% (100 µl/pocillo), registrándose la lectura de absorbancia a 405 nm a los 5 minutos de transcurrida la reacción.

## 2.6.- Análisis estadístico

GraphPad Prism 5 fue utilizado para procesar y analizar los resultados. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba t de Student (tanto para los ensayos de detección de anticuerpos y de activación de la vía clásica) y se realizaron tres repeticiones independientes del experimento.



**Figura 7. Diseño experimental para detectar la activación de la vía clásica del sistema del complemento.** Las hemocianinas de moluscos (1) fijan los anticuerpos presentes en el suero de los donantes (2), los cuales, a través de sus regiones CH2 y CH3 (para IgG e IgM respectivamente), reclutan C1 (3). Es en este punto que el anticuerpo monoclonal anti-C1q-85 puede suprimir esta activación<sup>62</sup>. La unión de C1q genera un cambio conformacional en las proteasas C1r y C1s, las cuales proteolizan C4 (4), liberándose C4a (5) y C4b (6). Este último puede depositarse de forma covalente en la placa y puede ser detectado mediante colorimetría con anticuerpos específicos.

## RESULTADOS

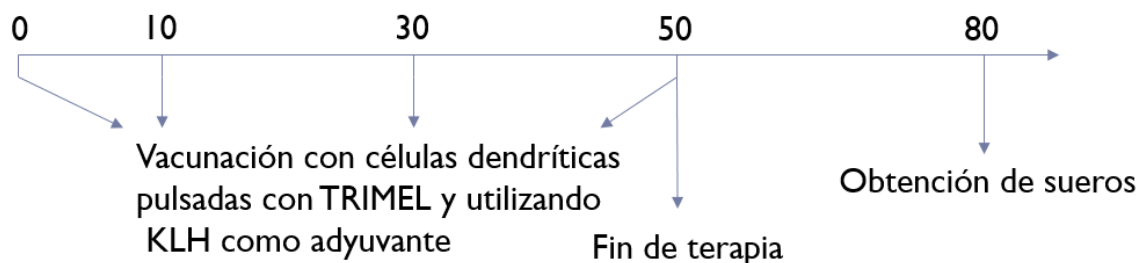
### 1.- Los sueros de pacientes previamente inmunizados con KLH contienen anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos.

#### 1.1.- Búsqueda de un suero humano anti-KLH como control positivo

Si bien la literatura ha indicado la presencia de anticuerpos capaces de unirse a KLH en sueros de individuos no inmunizados, con fines metodológicos (obtención de control positivo para ELISA y validación de la técnica) se analizó, en cuatro pacientes diagnosticados con melanoma maligno, el suero obtenido al inicio de la inmunoterapia (células dendríticas cargadas con TRIMEL® y utilizando KLH como adyuvante, Figura 8) y el suero obtenido a los 80 días de la terapia (30 días después de la última vacunación). En todos los pacientes los tumores se encontraban clasificados como etapa IV. Todos presentaron un DTH positivo al tratamiento (i.e., desarrollo de una respuesta celular a la vacuna). La información clínica relevante de los pacientes para nuestro trabajo se muestra en la Tabla 1.

Paciente	Género	Edad	Sobrevida (semanas)	Estado clínico a la fecha
80	M	74	89	Vivo, estable
102	F	46	36	Fallecida
202	F	29	36	Fallecida
231	-	-	19	Fallecido(a)

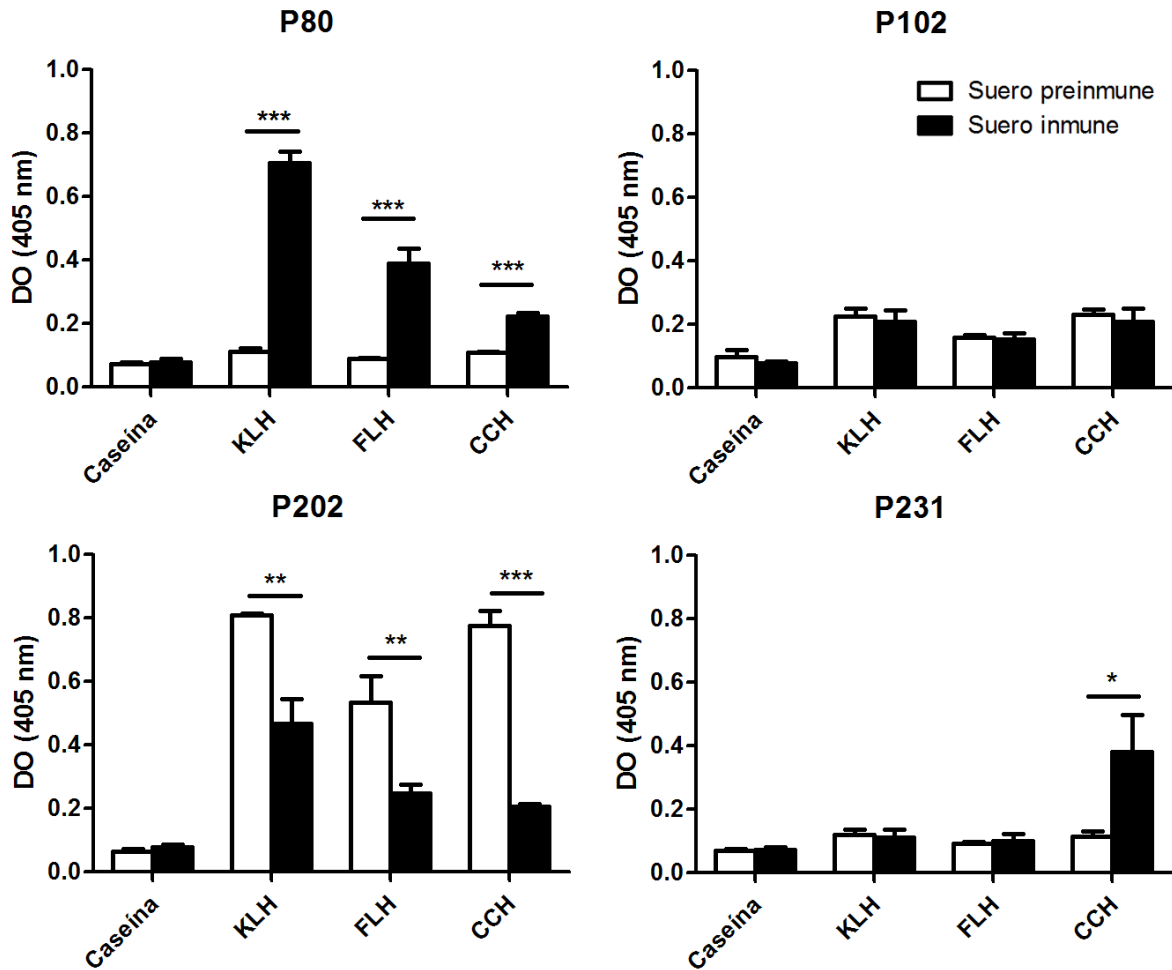
**Tabla 1.** Datos clínicos de pacientes inmunizados con una vacuna de células dendríticas cargadas con un lisado de células de melanoma (TRIMEL®), y acompañada de KLH como adyuvante.



**Figura 8.** Protocolo de vacunación para pacientes de melanoma.

Considerando la nomenclatura del estudio original, que los identifica como pacientes 80, 102, 202 y 231, en este trabajo se identifican respectivamente como P80, P102, P202 y P231. Como se puede observar en la Figura 9, los pacientes respondieron de diversas formas, destacándose el caso del paciente 80, en que los niveles de anticuerpos detectados para cada hemocianina (medidos como la densidad óptica producida por la enzima acoplada al anticuerpo secundario) se incrementan en un factor de alrededor de 7 veces post-inmunización, especialmente para KLH. En el caso del paciente 231, también se observa este incremento, pero sólo para CCH. Por otra parte, en el caso del paciente 102, no se observa variación en los niveles de anticuerpos, y, de forma contraria a lo esperado, el paciente 202 muestra importantes niveles pre-inmunización, los que disminuyen a la mitad o incluso a la cuarta parte (dependiendo de la hemocianina) en el suero inmune. Cabe mencionar que este experimento fue realizado con un anticuerpo secundario desarrollado contra la molécula completa de IgG, por lo que a pesar de que las condiciones del experimento imponen una gran especificidad, es esperable un cierto grado de reactividad cruzada con las cadenas livianas de los anticuerpos de otros isotipos (muy probablemente IgM).

Dado que se contaba con pequeñas cantidades de los sueros, no todos los experimentos posteriores pudieron realizarse utilizando el mismo suero como control positivo, por lo que se trabajó con los sueros post-inmunización del paciente 80 o del paciente 202 (porque presentaban mayor señal post-inmunización) como controles positivos para la detección de anticuerpos en donantes sanos no inmunizados, según se indicará en los experimentos respectivos.



**Figura 9.** La inmunización en humanos con KLH produce niveles variables de anticuerpos séricos que presentan reacciones cruzadas de diferente intensidad con CCH y FLH. Se determinaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos contra KLH, FLH y CCH en sueros obtenidos de 4 pacientes (diluidos 1:200), previo a una inmunización con KLH y 80 días después de la inmunización. Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

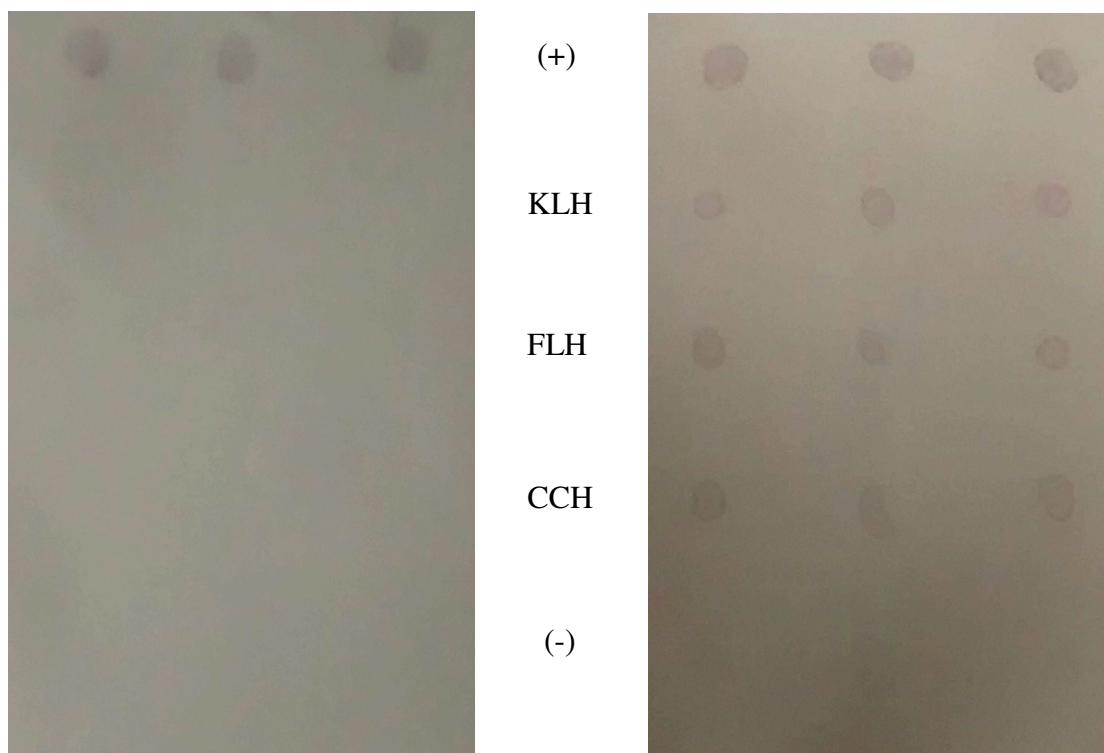
## 2.- Los sueros de donantes sanos no inmunizados contienen anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos.

### 2.1.- Detección de anticuerpos reactivos con hemocianinas de moluscos mediante ensayos de dot-blot.

Como primer acercamiento a la detección de anticuerpos capaces de unirse a hemocianinas de moluscos en el suero de donantes no inmunizados, se utilizaron ensayos de *dot-blot* en que se analizaron los sueros de 5 donantes sanos, denominados D1, D2, D3, D4 y D5. Los resultados de estos ensayos se detallan en la Tabla 2 y muestran que los 5 donantes presentaron reactividad contra KLH, 4 presentaron reactividad contra FLH y sólo uno de ellos, D5, presentó reactividad contra CCH. La Figura 10 muestra un resultado representativo de este último donante en comparación al respectivo control.

Donante	Edad	Sexo	KLH	FLH	CCH
D1	25	M	+	+	-
D2	28	M	+	+	-
D3	31	F	+	+/-	-
D4	34	F	+	+	-
D5	36	F	+	+	+
Total	-	-	5	4	1

**Tabla 2. La técnica de *dot-blot* permite la detección de anticuerpos que reaccionan con hemocianinas en sueros de donantes no inmunizados.** La intensidad de la reacción se asignó en una escala arbitraria en la cual: + indica reacción positiva, +/- indica resultados no concluyentes y - indica reacción negativa con respecto a los controles.



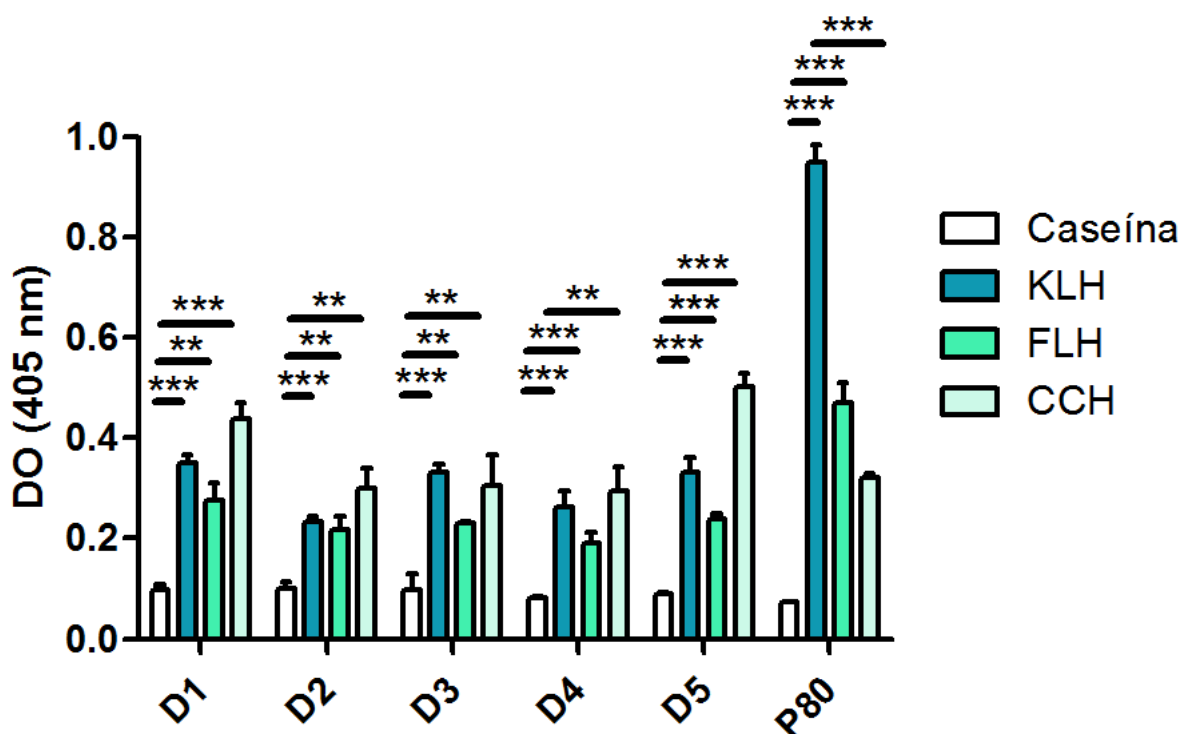
**Figura 10.- La técnica de *dot-blot* permite la detección de anticuerpos que reaccionan con hemocianinas en sueros de donantes no inmunizados.** La imagen de la derecha corresponde a una membrana incubada con la solución control de leche descremada y la membrana de la izquierda corresponde a una membrana incubada con el suero del donante D5 disuelto en leche descremada. Como control positivo (+) se utilizó suero humano inactivado por calor como fuente de inmunoglobulina G y como control negativo (-) se utilizó PBS 1X.

## 2.2.- Detección de anticuerpos reactivos con hemocianinas nativas y desglicosiladas mediante ELISA.

Para tener un resultado cuantificable y estadísticamente validable de la detección de anticuerpos reactivos con las hemocianinas, se llevó a cabo su detección mediante ELISA. En primera instancia, experimentos utilizando un anticuerpo de conejo contra la molécula completa de IgG humana (H+L) mostraron, según se puede ver en la Figura 11, que los cinco donantes, a diferentes niveles, presentaron anticuerpos que reconocen epitopos en las tres hemocianinas nativas. De acuerdo a lo observado anteriormente, si bien el paciente utilizado como control positivo (P80) presentó altos niveles de anticuerpos contra KLH (se obtuvieron densidades ópticas cercanas a 1), la proteína con la que fue inmunizado,

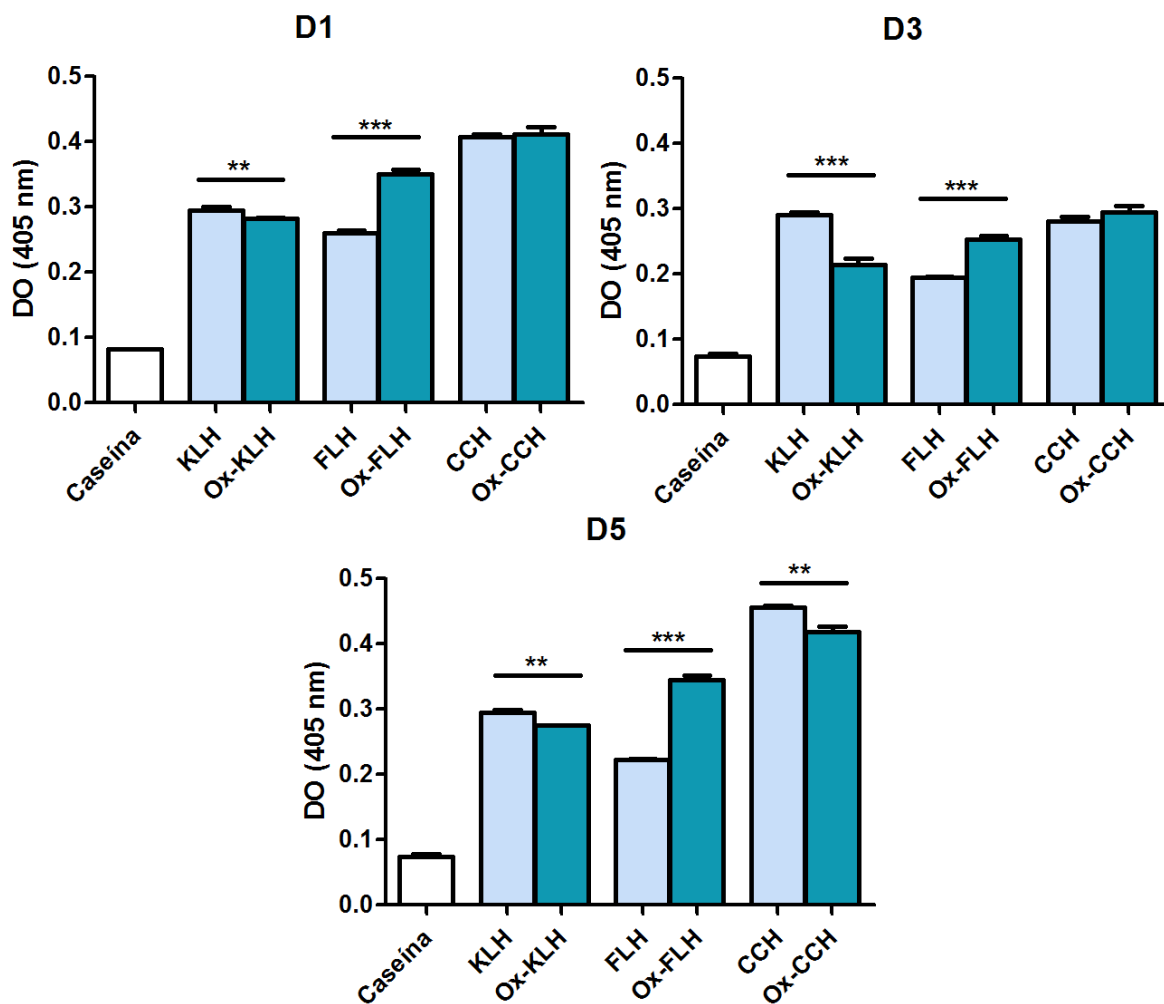
también presentó reacción cruzada con FLH y CCH, fenómeno que también se ha observado entre CCH y KLH en modelos animales<sup>13</sup>.

Luego, se repitió este experimento con las hemocianinas desglicosiladas y utilizando el suero de los donantes D1, D3 y D5, dado que son los que consistentemente presentaron mayores niveles de anticuerpos en el primer ensayo, observándose en la Figura 12 que los tres sueros reconocen a las hemocianinas, tanto en su forma nativa como sometida a oxidación con peryodato. Cabe destacar que en los tres donantes, el cambio más notorio fue el aumento en la señal para Ox-FLH, en lugar de la disminución esperada si es que los anticuerpos hubiesen estado dirigidos contra los carbohidratos de FLH.



**Figura 11. Donantes no inmunizados presentan anticuerpos naturales contra las hemocianinas de moluscos.** Se determinaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos del isotipo IgG (H+L) contra KLH, FLH y CCH en sueros obtenidos de 5 donantes no inmunizados (diluidos 1:100). Se utilizó como control positivo el suero del paciente P80, (diluido 1:200). Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

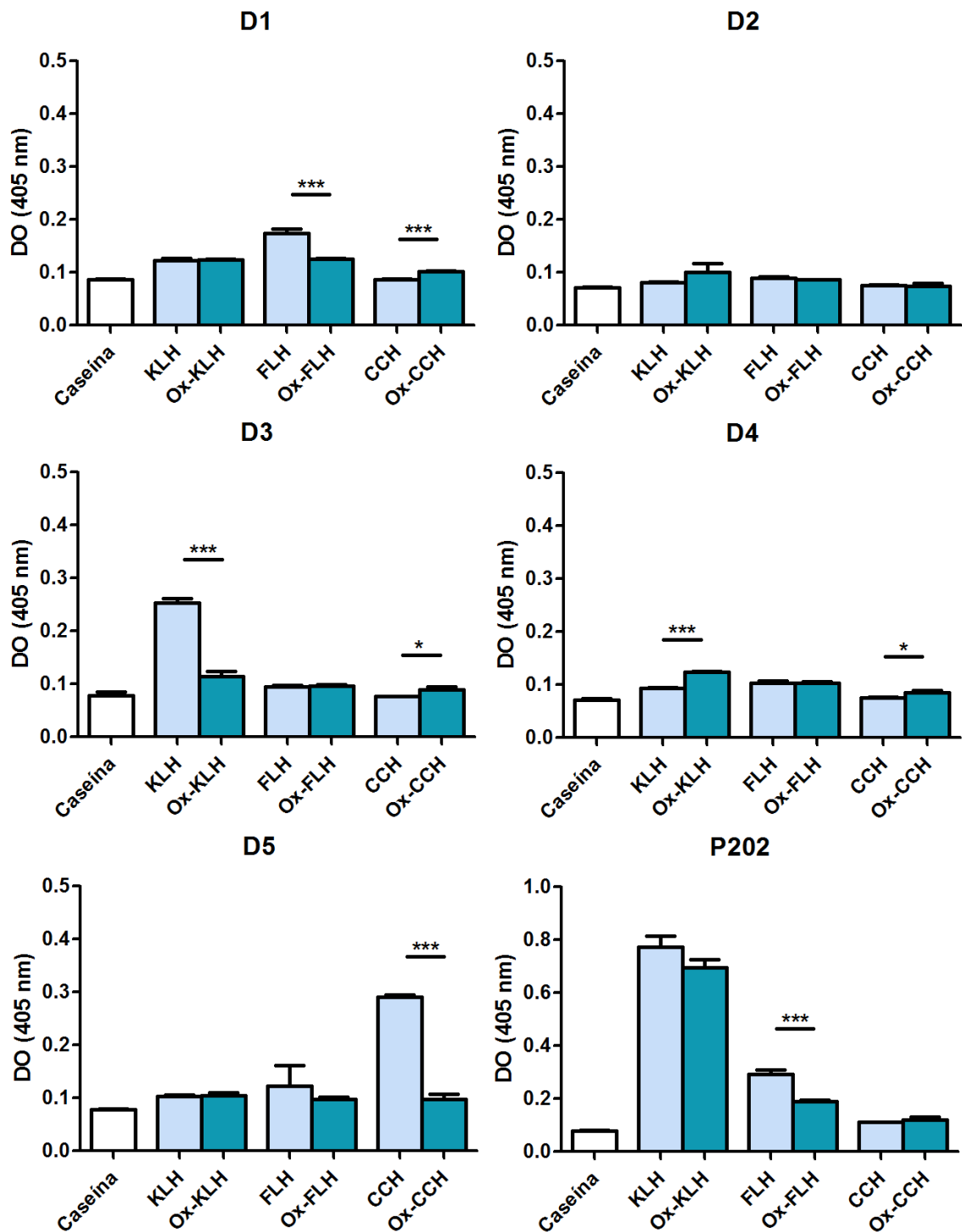




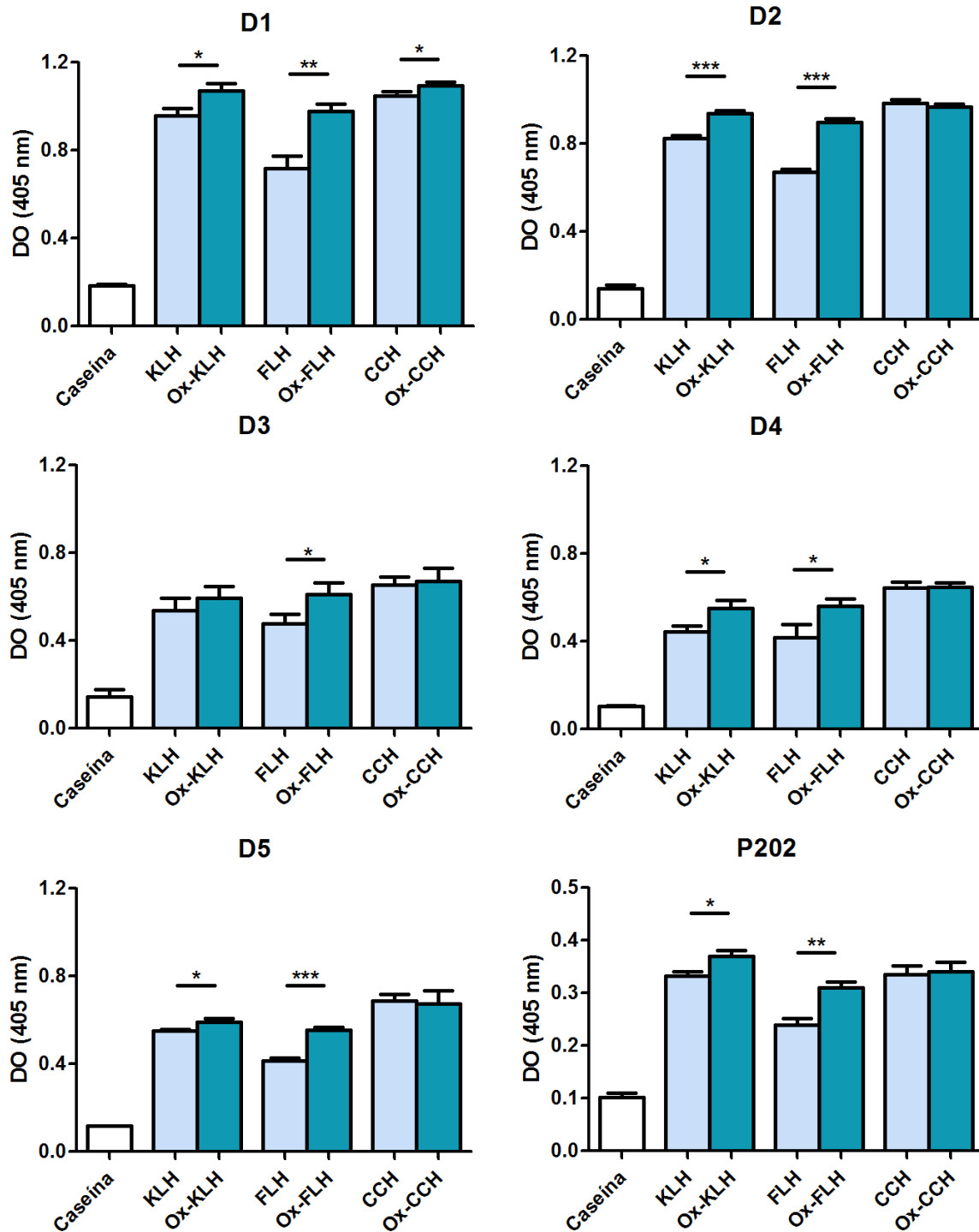
**Figura 12. Donantes no inmunizados presentan anticuerpos contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglicosiladas).** Se determinaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos del isotipo IgG (H+L) contra KLH, FLH, CCH y sus contrapartes desglicosiladas en sueros obtenidos de 3 donantes no inmunizados (diluidos 1:100). Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*\*:  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

Posteriormente, con el fin de eliminar el efecto de posibles reacciones cruzadas con las cadenas livianas de otros isotipos de inmunoglobulinas, se repitió el experimento anterior, pero utilizando un anticuerpo anti-IgG humana específico contra el fragmento Fc<sub>γ</sub>, asegurando así la detección exclusiva de anticuerpos del isotipo IgG. Además, en este experimento se incluyeron las hemocianinas desglicosiladas. En contraste con el resultado obtenido anteriormente, se puede observar en la Figura 13 que sólo los donantes 1, 3 y 5 presentan anticuerpos de tipo IgG (contra FLH, KLH y CCH respectivamente), y en todos los casos, la unión de los anticuerpos se vio abolida cuando la hemocianina fue desglicosilada. Por otra parte, para el control positivo (D202, suero post-inmunización), si bien se observó una disminución en la señal para Ox-KLH y Ox-FLH, una gran parte de la reactividad no se vio alterada.

Finalmente, para analizar la contribución de otros isotipos y así explicar la aparente discrepancia entre los resultados obtenidos con los diferentes anticuerpos anti-IgG humana, se repitió el experimento anterior utilizando un anticuerpo anti-IgM humana, específico contra fragmentos Fc<sub>5μ</sub>. Como se puede ver en la Figura 14, la reactividad obtenida se asemeja a la observada con el anticuerpo anti-IgG humana (H+L), por lo que, en este primer experimento, la reactividad se puede atribuir, al menos en parte, a una reacción cruzada contra IgM unida a las hemocianinas.



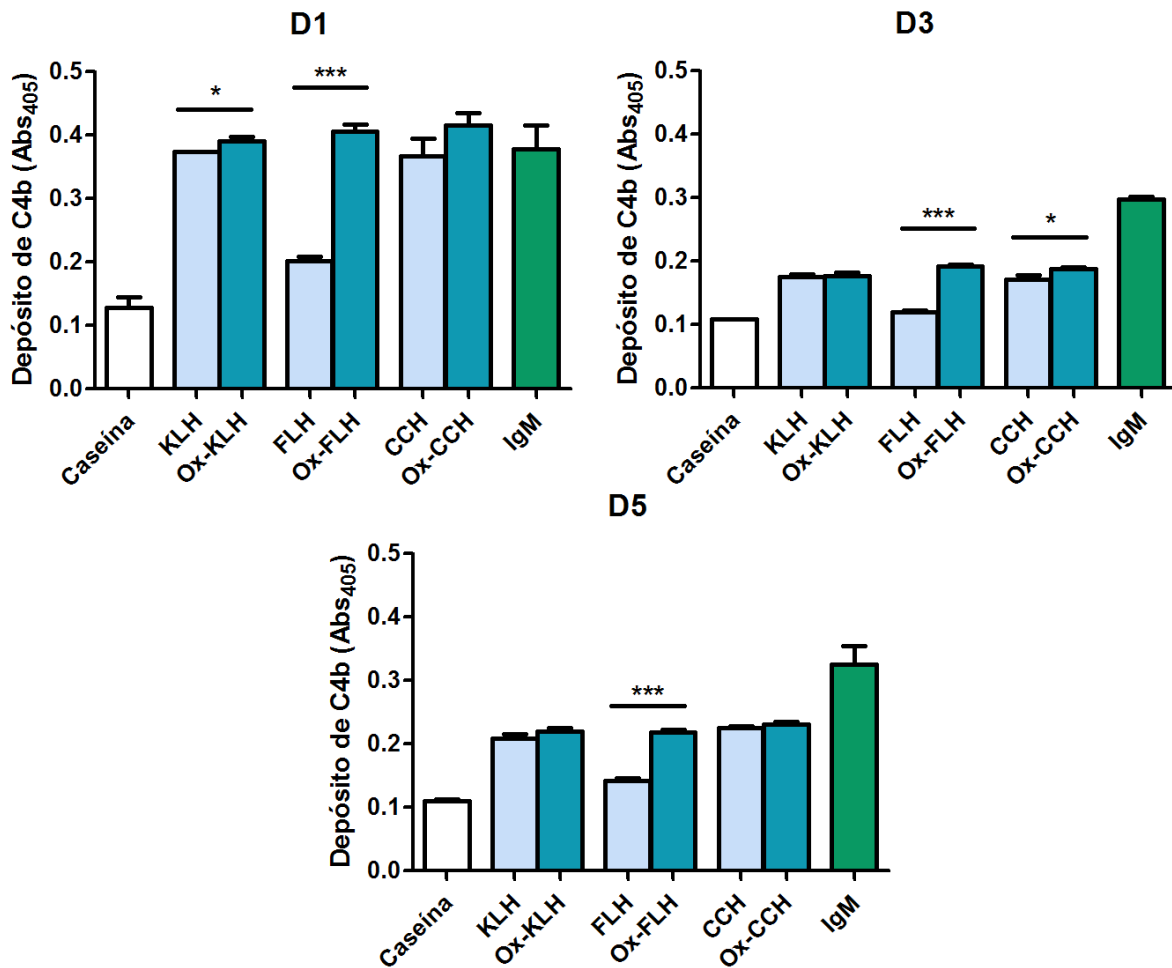
**Figura 13. Donantes no inmunizados presentan anticuerpos del isotipo IgG contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglucosiladas).** Se determinaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos del isotipo IgG (de forma específica, con un suero anti-Fc $\gamma$ ) contra KLH, FLH, CCH y sus contrapartes desglucosiladas en sueros obtenidos de 5 donantes no inmunizados (diluidos 1:100). Se utilizó como control el suero del paciente P202 (diluido 1:250). Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.



**Figura 14. Donantes no inmunizados presentan anticuerpos del isotipo IgM contra las hemocianinas de moluscos (nativas y desglicosiladas).** Se determinaron mediante ELISA los niveles de anticuerpos del isotipo IgM (de forma específica, con un suero anti-Fc<sub>μ</sub>) contra KLH, FLH, CCH y sus contrapartes desglicosiladas en sueros obtenidos de 5 donantes no inmunizados (diluidos 1:100). Se utilizó como control el suero del paciente P202 (diluido 1:250). Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

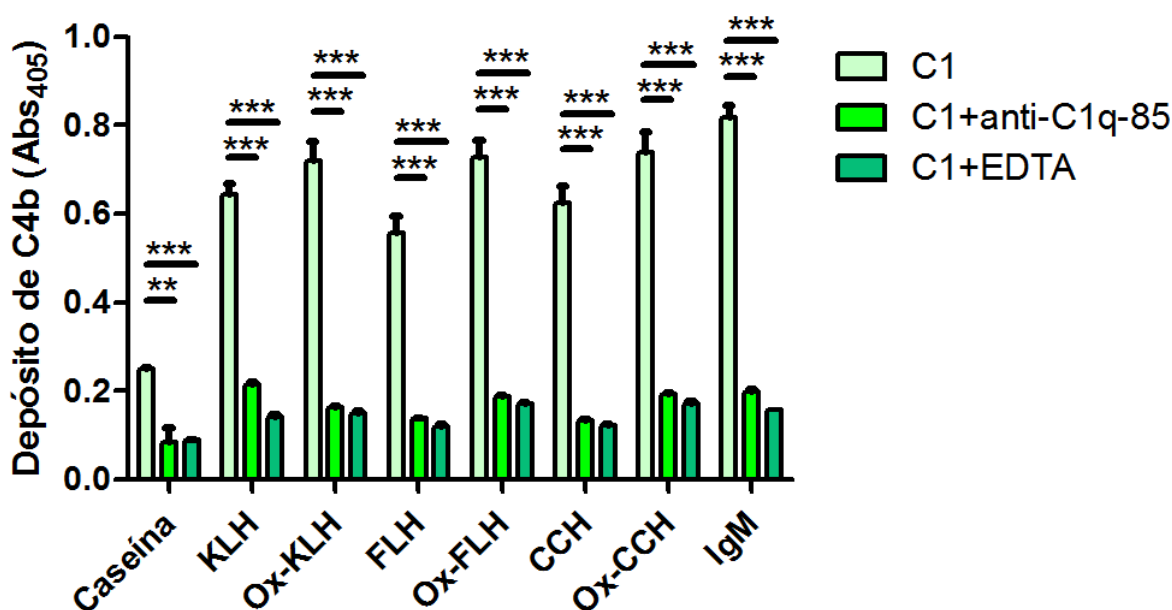
**3.- Las hemocianinas nativas y desglicosiladas, junto a anticuerpos de donantes no inmunizados activan *in vitro* la vía clásica del sistema del complemento humano en una forma dependiente de la unión de C1q a inmunoglobulinas.**

Dada la presencia de anticuerpos contra las hemocianinas de moluscos en donantes, buscamos demostrar, mediante un ensayo de depósito de C4b, la capacidad de las hemocianinas para activar la vía clásica del sistema del complemento, según el esquema que se muestra en la Figura 7. Como se puede apreciar en la Figura 15, si bien todas las hemocianinas fueron capaces de activar la vía clásica, FLH fue la que mostró el menor depósito de C4b, lo cual se condice con lo observado en los resultados anteriores, dado que también es la hemocianina que une menos IgM. Además, con la excepción nuevamente de FLH, la desglicosilación no produce mayores cambios en la capacidad de las hemocianinas para activar el sistema del complemento.



**Figura 15. Sueros de donantes no inmunizados activan *in vitro* la vía clásica del sistema del complemento humano.** Se determinó mediante ELISA el depósito de C4b (como componente clave de la activación de la vía clásica) en respuesta a la incubación de KLH, FLH, CCH y sus contrapartes desglucosiladas con sueros obtenidos de 3 donantes no inmunizados (diluidos 1:60). Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

Por último, con el fin de poder verificar la participación de la vía clásica a un nivel molecular, utilizando el suero del donante D1, realizamos el ensayo anterior en presencia de anti-C1q-85 (un anticuerpo monoclonal dirigido contra la porción globular de C1q y que por tanto impide la unión de C1 a los dominios CH2 y CH3 de IgG e IgM respectivamente, representado en la Figura 7). Como se puede apreciar en la Figura 16, la incubación con el anticuerpo bloqueador a una concentración de 2 µg/ml redujo el depósito de C4b a niveles similares a los obtenidos producto de una incubación con EDTA 20 mM (que como quelante de calcio inactiva las proteasas calcio-dependientes que forman parte de C1) confirmando que la activación del sistema del complemento por las hemocianinas transcurre mediante C1.



**Figura 16. La activación de la vía clásica por hemocianinas de moluscos es dependiente de la capacidad de C1q para unirse a inmunoglobulinas.** Se determinó mediante ELISA el depósito de C4b en respuesta a la incubación de KLH, FLH, CCH y sus contrapartes desglucosiladas con suero obtenido del donante D1 (donante no inmunizado, suero diluido 1:60), además de evaluar la inhibición de este depósito en presencia de un anticuerpo bloqueador de C1q y de EDTA. Las barras representan valores promedio de pocillos en triplicado con la desviación estándar respectiva. Los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones, con resultados similares. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,001$ , evaluado mediante una prueba t de Student.

## DISCUSIÓN

La hemocianina de la lapa californiana, KLH, ha sido utilizada por más de 50 años por sus propiedades inmunoestimulantes muy destacables, tanto en modelos animales como en humanos. Después de descubrirse de manera fortuita sus propiedades antitumorales inespecíficas en cáncer superficial de vejiga, ha encontrado usos tanto en esta misma patología y otras así como en diagnóstico e investigación. Sin embargo, los mecanismos que le otorgan estas propiedades son poco conocidos ya que los estudios se han centrado directamente en las aplicaciones, aunque frecuentemente se postulan cuatro motivos subyacentes a las propiedades inmunomodulatorias de las hemocianinas de moluscos: su gran tamaño, su estructura casi D5 (repetitiva), su xenogenicidad y su alto contenido de carbohidratos. Los dos primeros factores han sido descartados por trabajos realizados por nuestro grupo<sup>29</sup> y otros<sup>30</sup>, pero los estudios con respecto a la influencia de los carbohidratos son escasos y no han sido concluyentes<sup>22,23,24</sup>.

Por otro lado, si bien la inocuidad de KLH se encuentra ampliamente documentada, esta proteína presenta las desventajas antes mencionadas (e.g. poca solubilidad, variabilidad) que han limitado su uso en humanos, sumado a que el suministro depende de su fuente natural que ha sido sobreexplotada. Esto ha despertado interés por disponer de nuevas hemocianinas. Las hemocianinas del Loco (CCH) y de la Lapa negra (FLH) ofrecen soluciones a algunos de los problemas que presenta KLH: en el caso de CCH, tiene una mayor solubilidad, estabilidad y una composición constante<sup>11</sup> y, en el caso de FLH, posee sólo una subunidad, presenta mayor inmunogenicidad en variadas condiciones experimentales, y, al igual que KLH, es producida por una especie más apta para producción en condiciones GMP dada su dieta herbívora<sup>12</sup>.



Entre otros hallazgos, se ha reportado un efecto antitumoral de CCH y FLH en diferentes modelos murinos de cáncer<sup>12,13</sup>, diferentes perfiles de citoquinas producidas por macrófagos en respuesta a incubación con las hemocianinas<sup>25</sup> y perfiles de glicosilación diferentes a lo descrito para KLH. Sin embargo, al igual que para KLH, los reportes no son concluyentes respecto a la influencia de los carbohidratos en las propiedades inmunoestimulantes de dichas hemocianinas. Es en este punto donde el sistema del complemento puede jugar un rol, dado que diferentes que detectan señales de peligro (e.g. C1q, receptores de lectinas tipo C) presentes en el suero y en células del sistema inmune innato, podrían ser determinantes en los efectos inmunomoduladores que ellas inducen.

Además, dadas las necesarias regulaciones actuales sobre productos biológicos para uso en humanos, es deseable conocer de forma acabada los mecanismos mediante los cuales una molécula ejerce sus efectos antes de promover su uso en experimentación y/o clínica, y la investigación sobre las hemocianinas utilizadas en esta investigación, sumada a otras<sup>30,63</sup>, aún no arroja luces claras sobre los mecanismos que gobiernan sus propiedades inmunoestimulantes, por lo que esta tesis buscó esclarecer la contribución del sistema del complemento humano a estas propiedades. Inicialmente postulamos la participación de la vía de las lectinas como el mecanismo involucrado, considerando el alto nivel de carbohidratos (principalmente manosa) en las hemocianinas de moluscos y la capacidad de dichos carbohidratos para unir y activar MBL, la molécula considerada más importante en la activación de la vía de las lectinas (ver Figura 5). Sin embargo, los experimentos realizados no fueron concluyentes y por esta razón, la tesis se reorientó para enfocarse en la activación de la vía clásica, dados los antecedentes de la presencia de anticuerpos naturales que reconocen KLH en donantes no inmunizados<sup>49</sup>.

Entre los hallazgos destacables en el estado del arte, se ha demostrado la presencia de anticuerpos de los isotipos IgM y/o IgG reactivos con KLH en diferentes grupos de individuos mediante técnicas como radioinmunodifusión, radioinmunoensayos directos y radioinmunoensayos de inhibición<sup>57</sup>, ensayos de hemaglutinación pasiva<sup>58</sup> y ELISA<sup>49</sup>. En este último incluso se demostró el depósito de C3 sobre complejos inmunes, con consecuencias funcionales sobre linfocitos B expuestos a dichos complejos.

Sin embargo, es necesario destacar que este estudio no incluyó experimentos para demostrar inequívocamente que la activación transcurriese por la vía clásica, a pesar de que la vía de las lectinas había sido recientemente descrita y, como se indicó, hay motivos para presumir su participación. Es por esta razón que nos avocamos a evaluar la presencia de anticuerpos capaces de reconocer tanto a CCH como a FLH, de forma análoga a lo observado para KLH, en donantes no inmunizados, y que de este modo, si las hemocianinas de moluscos eran capaces de activar *in vitro* la vía clásica del sistema del complemento humano.

La primera observación que resultó *a priori* inesperada en los resultados se muestra en la Figura 9. Como se puede apreciar, sólo el paciente P80 mostró un aumento en los niveles de anticuerpos anti-KLH posterior a la inmunización con KLH, siendo que este proceso lógicamente debiese llevar al aumento en los niveles de anticuerpos anti-KLH en la mayoría de los individuos, si es que no en todos. Además, cabe hacer notar que en el paciente P202 se encontró reactividad contra las tres hemocianinas en el suero obtenido previo a la inmunización, la cual disminuye posterior a ésta. Es importante destacar que, al ser pacientes en tratamiento contra melanoma, su sistema inmune podría encontrarse severamente comprometido o suprimido<sup>64,65</sup>, lo que impediría una adecuada presentación, coestimulación o proliferación de las células del sistema inmune que en condiciones normales generarían una respuesta humoral contra KLH. Esto podría explicar la falta de aumento e incluso una eventual disminución en los niveles de anticuerpos contra las hemocianinas de moluscos. Otra hipótesis plausible, es que dados los antecedentes de la capacidad de KLH para reaccionar con anticuerpos dirigidos contra carbohidratos presentes en algunos tipos de tumores<sup>32</sup>, es posible, del mismo modo, que los anticuerpos anti-KLH generados se pudieran concentrar en el tejido tumoral y pudieran ser removidos por los mecanismos efectores de la respuesta inmune, asumiendo una expresión diferencial del antígeno en los pacientes, produciéndose de esta forma, una disminución específica en los niveles de anticuerpos anti-KLH a nivel sistémico. Es importante también destacar que incluso en los donantes sanos que no aumentaron los niveles de anticuerpos en respuesta a la inmunización (e.g. P202) se observa una unión de los anticuerpos a hemocianinas que es superior a la unión a caseína, lo que nos da indicios de la presencia de anticuerpos naturales en estos pacientes, en apoyo a los resultados posteriores.

Otro hallazgo importante, si bien esperable, es el hecho de que se encontraron anticuerpos que reaccionan cruzado con FLH y CCH en el paciente P80. Estudios en modelos animales han mostrado un grado de reactividad cruzada entre las hemocianinas de moluscos, que si bien no es muy elevado, podría explicar la reactividad observada<sup>29</sup>. Sin embargo, la detección de anticuerpos exclusivamente contra CCH en el paciente P231 es algo más sorprendente, dado que la suposición de que se originan en respuesta a la inmunización con KLH y reaccionan de forma cruzada, se invalida al no observarse reactividad contra KLH en el paciente indicado. Una explicación, posible, podría ser que en ese paciente, la terapia desencadenó una respuesta antitumoral efectiva, generando anticuerpos contra carbohidratos no detectados anteriormente por el sistema inmune, los cuales podrían ser compartidos exclusivamente con CCH y no con las otras hemocianinas. Sin embargo, las últimas suposiciones sólo pueden ser aclaradas analizando datos clínicos de los pacientes y probablemente carezcan de fuerza estadística de no ampliarse el estudio a un mayor número de muestras.

Posteriormente, es importante señalar que, si bien no hay una completa correspondencia entre los resultados obtenidos mediante *dot-blot* y ELISA, en el caso del donante D5 se observó mediante ELISA la mayor reactividad contra CCH, en concordancia con lo observado en los ensayos de *dot-blot*, donde el donante D5 fue el único que presentó reactividad contra CCH. Estos resultados muestran por primera vez la detección de anticuerpos contra FLH y CCH en donantes humanos no inmunizados. Es interesante mencionar que la similitud en la reactividad de KLH y FLH observada mediante *dot-blot*, a diferencia de CCH, podría tener relación con la menor distancia filogenética entre las dos primeras hemocianinas, a diferencia de la distancia que hay entre ellas y CCH. *M. crenulata* y *F. latimarginata*, las cuales producen KLH y FLH, respectivamente, se clasifican como *Archaeogastropoda: Fissurellidae*, mientras que CCH pertenece a los *Neogastropoda: Muricidae*, un grupo lejano de moluscos gastrópodos<sup>66</sup>. Si bien no tenemos información que arroje luces sobre el origen de estos anticuerpos, cabe mencionar que estudios preliminares de nuestro laboratorio muestran inducción de anticuerpos contra CCH mediante inmunización por vía oral en un modelo murino, y dado que *Concholepas concholepas* es una especie que se consume con relativa frecuencia en nuestro país, no se puede descartar que esto favorezca la inducción de anticuerpos contra CCH.

En vista de estos resultados, y considerando que se ha descrito que los anticuerpos naturales clásicamente unen carbohidratos, buscamos estudiar la especificidad de estos anticuerpos eliminando los carbohidratos en las hemocianinas mediante desglicosilación con peryodato. El resultado más sorprendente fue que la desglicosilación aumentó de forma significativa la unión de anticuerpos a FLH en los tres donantes, lo cual si bien había sido reportado para anticuerpos monoclonales con CCH<sup>67</sup>, de acuerdo a nuestro conocimiento nunca había sido reportado para FLH ni para anticuerpos de humanos no inmunizados.

Además, si bien en el caso de KLH se observaron disminuciones significativas en los tres donantes, la diferencia fue mayor en el caso del donante D3, que consistentemente presentó una fuerte reactividad con KLH. Por último, en el caso del donante D5, se observó una disminución significativa, que no se observó en los otros donantes, y que podría indicar la presencia de carbohidratos que unen a los anticuerpos naturales y que se están perdiendo en el proceso de desglicosilación.

Sin embargo, al utilizar un anticuerpo generado contra las cadenas  $\gamma$  de IgG, se observó que sólo los donantes D1, D3 y D5 presentaron reactividad contra FLH, KLH y CCH respectivamente, la cual desaparece en las hemocianinas desglicosiladas, lo que indicaría que estos anticuerpos están dirigidos contra carbohidratos. De forma concordante, la desglicosilación no afecta tan drásticamente a la unión de anticuerpos en el suero del paciente P202, lo que concuerda con anticuerpos producidos contra el componente proteico de las hemocianinas vía un proceso de inmunización activa.

Esta aparente discordancia podría explicarse por una reactividad cruzada del antisuero-IgG (H+L) con inmunoglobulinas de isotipo IgM, por lo que utilizamos un anticuerpo específico contra las cadenas  $\mu$ , y en un resultado que apoya esta posibilidad, observamos elevados niveles de reactividad contra todas las hemocianinas en todos los pacientes, con un perfil similar al observado para el anticuerpo anti-IgG (H+L), especialmente en lo que se refiere al aumento de la reactividad contra Ox-FLH con respecto a FLH en todos los donantes e incluso en el paciente utilizado como control. Ante esto, pensamos que, producto de una desglicosilación incompleta, se exponen carbohidratos previamente escondidos, los cuales podrían reaccionar con los anticuerpos naturales, habiendo antecedentes que reportan hallazgos similares<sup>68</sup>.

Por ejemplo, estudios de nuestro laboratorio han sugerido que FLH puede contener residuos de ácido siálico, en adición a una mayor microheterogeneidad de azúcares de tipo N al ser comparada con KLH<sup>12</sup>. Otra posibilidad, también descrita en proteínas desglicosiladas con peryodato, es que la desglicosilación en sí genere neoepitopos de tipo aldehído, lo cual aumenta el número de epitopos disponibles para la unión de anticuerpos naturales, los cuales ya se ha descrito que poseen una amplia reactividad. Sin embargo, esto debiese observarse en todas las hemocianinas, por lo que tal vez alguna propiedad intrínseca de FLH conduce a este fenómeno de manera exclusiva.

Otros estudios en progreso en nuestro laboratorio, realizados mediante SPR, indican que las hemocianinas son capaces de interactuar con algunos receptores de lectina tipo C, como el receptor de manosa y DC-SIGN, y que la desglicosilación con peryodato remueve de forma eficaz los carbohidratos que determinan esta unión (Tesis de Magister en Bioquímica, Universidad de Chile, Javiera Villar, en desarrollo). Es por esto que, en adición a la evidencia descrita en la literatura, es importante destacar que, al no observarse una disminución en la unión de anticuerpos a las hemocianinas para algunos de los donantes producto de la desglicosilación, sugiere que al menos una parte de ellos (especialmente los pertenecientes al isotipo IgM) está dirigida contra epitopos de naturaleza proteica.

Por otra parte, al evaluar la activación *in vitro* del sistema del complemento mediante la vía clásica, se observó que las todas las hemocianinas, tanto en su forma nativa como desglicosilada, son capaces de producir un depósito de C4b al ser comparadas con caseína bovina usada como control, de manera consistente con los experimentos de detección de IgM, el isotipo con mayor capacidad de activar la vía clásica (ver leyenda de Figura 6). Además, se observa que FLH, que presenta los menores niveles de unión a IgM, también presenta un menor depósito de C4b, sugiriendo que los niveles de IgM se relacionan directamente con la intensidad de la activación del sistema del complemento. En el caso de IgG, sin embargo, a pesar de que la desglicosilación reduce los niveles de unión observados para D1, D3 y D5 contra FLH, KLH y CCH respectivamente, no se observa que esto lleve a una disminución en el depósito de C4b, sugiriendo que los anticuerpos de tipo

IgG detectados no pueden activar la vía clásica. Para verificarlo sería útil realizar un análisis de los subtipos de anticuerpos IgG, donde se esperaría detectar subtipos no activadores, como IgG4<sup>69</sup>.

Por último, al utilizar un anticuerpo bloqueador de la unión de C1q a inmunoglobulinas, se redujo el depósito de C4b al mismo nivel que al utilizar EDTA, lo cual indica que efectivamente el depósito generado es producto de la activación de C1q y descartan posibles productos artefactuales, como por ejemplo, uniones inespecíficas, en adición a los controles propios del ensayo de deposición de complemento.

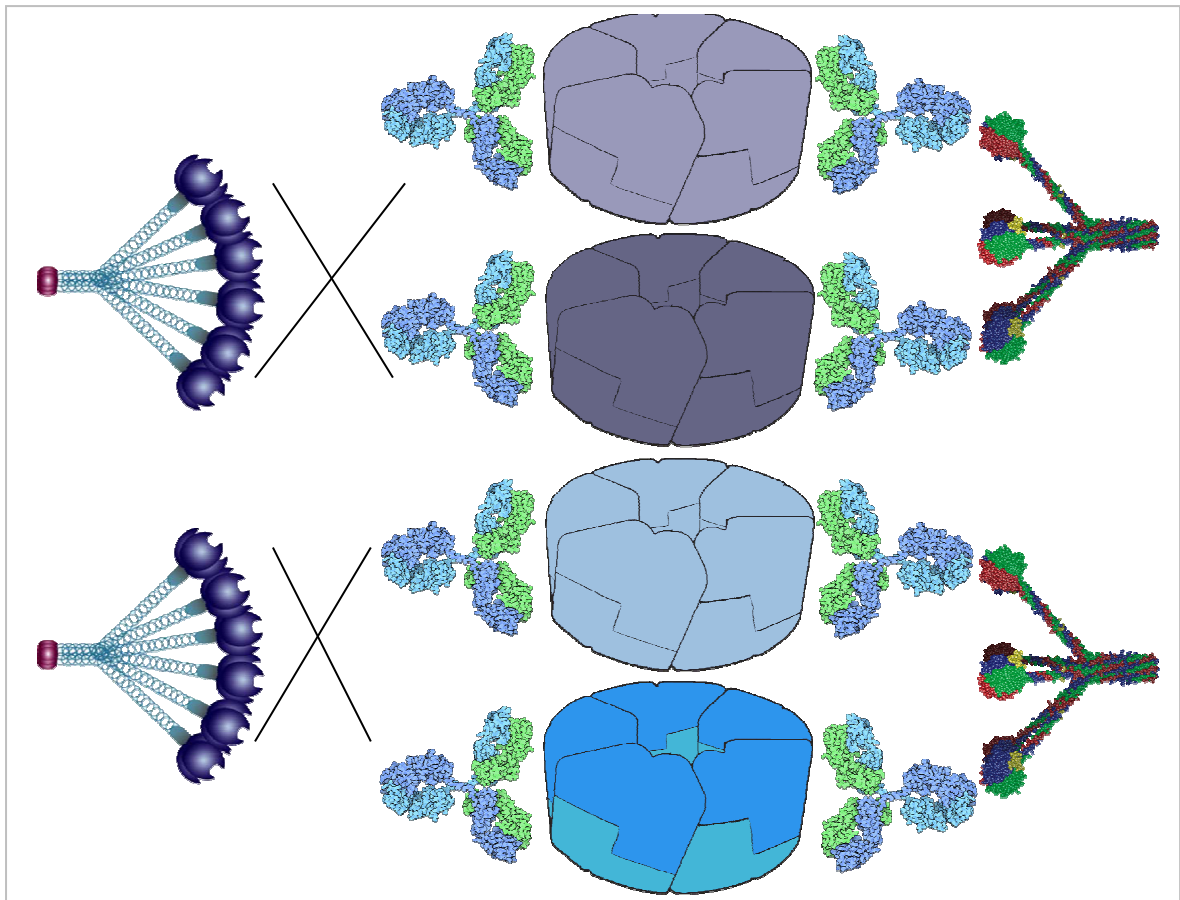
Cabe destacar que estos resultados conllevan varias implicancias. Primero, dado que la inmunización con KLH en pacientes con melanoma no resultó en los niveles esperados de anticuerpos en todos los individuos estudiados, sería interesante incorporar muestras de un mayor número de pacientes en este análisis y determinar si este comportamiento ocurre en una fracción significativa de ellos. Como se puede apreciar en la Tabla 1, el paciente con la mayor sobrevida es el paciente que además presentó el mayor aumento en los niveles de anticuerpos contra las tres hemocianinas en respuesta a la inmunización. Es tentador sugerir que el aumento en los niveles de anticuerpos anti-hemocianinas en respuesta a la vacunación podría utilizarse como un factor pronóstico de la sobrevida, como un criterio adicional a los ya existentes, como por ejemplo, la presencia de una reacción DTH positiva<sup>59</sup>. Es evidente, sin embargo, que se requieren estudios mucho más completos para poder respaldar esta hipótesis.

Por otra parte, es importante notar que los niveles de anticuerpos también varían entre donantes sanos no inmunizados, para las mismas y para diferentes hemocianinas. Hay consenso en la literatura que los anticuerpos naturales constituyen una importante línea de defensa contra patógenos como virus y bacterias, ya que se ha demostrado en animales experimentales que estos anticuerpos pueden reducir considerablemente las cargas virales en modelos de infección<sup>50</sup>. Además, es interesante notar que esto también se observa en otras especies, ya que hay estudios que han relacionado los niveles de anticuerpos naturales contra KLH en aves de criadero y en ganado con diferentes parámetros asociados a sobrevida y productividad<sup>70,71,72</sup>. Constituye entonces, una interesante proyección estudiar si los niveles de anticuerpos contra hemocianinas predicen, por ejemplo, efectividad de una

vacuna en la que se utilice alguna hemocianina como adyuvante o *carrier*, tanto en humanos como en otros mamíferos.

Finalmente, si bien nosotros sólo estudiamos la activación del sistema del complemento como efecto de la unión de los anticuerpos a las hemocianinas, donde observamos poca variabilidad entre donantes, se requieren más estudios, idealmente *in vivo*, que permitan evaluar otros efectos de esta unión, como por ejemplo, una mayor fagocitosis de las hemocianinas, donde los anticuerpos de tipo IgG detectados (que al parecer no son determinantes en la activación del complemento) podrían jugar un papel, con el factor adicional que son los niveles que más varían entre donantes, pudiendo favorecer en un futuro el desarrollo de terapias personalizadas en base al perfil de anticuerpos que presente cada individuo.

Además, es necesario realizar experimentos que afirmen o descarten inequívocamente la capacidad de las hemocianinas de moluscos para activar la vía de las lectinas. Una posibilidad que consideramos es que los anticuerpos presentes en los donantes no inmunizados, mediante impedimentos estéricos, impidan la unión de MBL a las hemocianinas y la activación de la vía de las lectinas, como se esquematiza en la Figura 17, en paralelo a la activación demostrada para la vía clásica. Por último, si bien generalmente se considera que la vía alterna no es activada por proteínas en fase fluida<sup>49</sup>, no se puede descartar por completo su participación, y dado que los ensayos para detectar su activación son similares a los aquí empleados, también podría estudiarse en investigaciones futuras.



**Figura 17. Activación del sistema del complemento por hemocianinas de moluscos.** A la izquierda se representa la posibilidad de que los anticuerpos naturales encontrados en donantes sanos pudiesen bloquear el acceso de MBL a las hemocianinas, explicando porqué no se pudo observar la activación esperada de la vía de las lectinas. En tanto, a la derecha se representa la unión de C1q a través de los anticuerpos naturales unidos a las hemocianinas, lo que llevaría a la activación de C1r y C1s *in vivo*, el procesamiento de C2 y C4 y el depósito posterior de C4b, de forma análoga a lo representado para el ensayo *in vitro* en la Figura 7, contribuyendo a las destacables propiedades inmunoestimulantes inespecíficas de las hemocianinas de moluscos.



## CONCLUSIONES

I.- El análisis mediante ELISA del suero de cuatro pacientes con melanoma, mostró la presencia de **anticuerpos naturales reactivos con KLH** previo a la inmunización esta hemocianina, aumentando en dos de ellos post-inmunización.

II.- **Se encontraron anticuerpos** en niveles variables, mediante ELISA y *dot-blot*, **contra las tres hemocianinas de moluscos usadas en este trabajo (CCH, KLH y FLH)**, en cinco donantes **no inmunizados** con hemocianinas.

III.- Se determinó que la **mayor parte de estos anticuerpos son del isotipo IgM**, y que una parte de ellos se encuentra dirigida contra el componente proteico de las hemocianinas, ya que la desglicosilación no afectó su unión salvo una excepción, en el caso de FLH, en que la desglicosilación aumentó la unión de los anticuerpos.

IV.- También **se detectaron anticuerpos del isotipo IgG**, si bien en menores niveles (DO cercanas a 0,3), en tres de los cinco donantes, y en todos los casos la desglicosilación redujo la unión de estos anticuerpos a niveles control, lo que indica que reaccionan contra carbohidratos presentes en las hemocianinas.

V.- **Se determinó que las hemocianinas de moluscos activan la vía clásica del sistema del complemento humano** a niveles relativamente similares entre diferentes donantes. En el caso de FLH, también se observa una mayor activación del sistema del complemento, en correspondencia con lo observado para la unión de anticuerpos.

VI.- Los estudios realizados refuerzan la idea de que los carbohidratos (y su remoción) **afectan de forma diferencial a las propiedades inmunoestimulantes de las hemocianinas**, por lo que cualquier estudio que tome en cuenta la contribución de los carbohidratos debiese ser realizado para cada hemocianina de interés.

VII.- Este trabajo abre la puerta a futuros estudios sobre la posibilidad de utilizar los anticuerpos naturales contra hemocianinas de moluscos como una **herramienta predictiva de la eficacia de terapias** que utilicen estas proteínas.

## REFERENCIAS

- 1.- Gatsogiannis C., Hofnagel O., Markl J., Raunser S. **Structure of Mega-Hemocyanin Reveals Protein Origami in Snails.** *Structure*, 2015, Ene 6;23(1):93-103. doi: 10.1016/j.str.2014.10.013
- 2.- van Holde K. E., Miller K. I., Lang W. H. **Molluscan hemocyanins: structure and function.** *Adv Comp Environ Physiol*, 1992, 13:257-300
- 3.- Markl J. **Evolution of molluscan hemocyanin structures.** *Biochim Biophys Acta*, 2013, Sep;1834(9):1840-52. doi: 10.1016/j.bbapap.2013.02.020.
- 4.- Harris J.R., Markl J. **Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review.** *Micron*, 1999, Dec;30(6):597-623.
- 5.- Harris J.R., Gebauer W., Söhngen S.M., Markl J. **Keyhole Limpet Haemocyanin (KLH): Purification of Intact KLH1 Through Selective Dissociation of KLH2.** *Micron*, 1995, 26(3):201–212
- 6.- Gatsogiannis C., Markl J. **Keyhole Limpet Hemocyanin: 9-Å CryoEM Structure and Molecular Model of the KLH1 Didecamer Reveal the Interfaces and Intricate Topology of the 160 Functional Units.** *J Mol Biol*, 2009, Jan 23;385(3):963-83. doi: 10.1016/j.jmb.2008
- 7.- Dijk J., Brouwer M., Coert A., Gruber M. **Structure and function of hemocyanins. VII. The smallest subunit of  $\alpha$ - and  $\beta$ -hemocyanin of *Helix pomatia*: size, composition, N- and C-terminal amino acids.** *Biochim Biophys Acta*, 1970, Dec 22;221(3):467–479.
- 8.- Hall R.L., Wood E.J. **The Carbohydrate Content of Gastropod Hemocyanins.** *Biochem Soc Trans*, 1976, 4:307-309
- 9.- Geyer H., Wuhrer M., Resemann A., Geyer R. **Identification and Characterization of Keyhole Limpet Hemocyanin N-Glycans Mediating Cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*.** *J Biol Chem*, 2005, Dec 9;280(49):40731-48.
- 10.- van Holde K.E., Miller K.I. **Hemocyanins.** *Adv Protein Chem*, 1995;47:1-81.

- 11.- De Ioannes P., Moltedo B., Oliva H., Pacheco R., Faunes F., De Ioannes A.E., Becker M.I. **Hemocyanin of the Molluscan *Concholepas concholepas* Exhibits an Unusual Heterodecameric Array of Subunits.** J Biol Chem. 2004, Jun 18;279(25):26134-42.
- 12.- Arancibia S., Espinoza C., Salazar F., Del Campo M., Tampe R., Zhong T.Y., De Ioannes P., Moltedo B., Ferreira J., Lavelle EC., Manubens A., De Ioannes A.E., Becker M.I. **A Novel Immunomodulatory Hemocyanin from the Limpet *Fissurella latimarginata* Promotes Potent Anti-Tumor Activity in Melanoma.** PLOS One, 2014, Jan 23;9(1):e87240. doi: 10.1371/journal.pone.0087240.
- 13.- Moltedo B., Faunes F., Haussmann D., De Ioannes P., De Ioannes A.E., Puente J., Becker M.I. **Immunotherapeutic Effect of *Concholepas* Hemocyanin in the Murine Bladder Cancer Model: Evidence for Conserved Antitumor Properties Among Hemocyanins.** J Urol, 2006, Dec;176(6 Pt 1):2690-5.
- 14.- Manosalva H., De Ioannes A.E., Becker M.I. **Development of Monoclonal Antibodies Bearing the Internal Image of the Gizzerosine Epitope and Application in a Competitive ELISA for Fish Meal.** Hybrid Hybridomics, 2004, Feb;23(1):45-54.
- 15.- Matus S., Burgos P.V., Bravo-Zehnder M., Kraft R., Porras O.H., Farías P., Barros L.F., Torrealba F., Massardo L., Jacobelli S., González A.. **Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis.** J Exp Med, 2007, Dec 24;204(13):3221-34.
- 16.- Gravotta D., Deora A., Perret E., Oyanadel C., Soza A., Schreiner R., Gonzalez A., Rodriguez-Boulan E. **AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells.** Proc Natl Acad Sci USA, 2007, Jan 30;104(5):1564-9.
- 17.- Corvalán L.A., Araya R., Brañes M.C., Sáez P.J., Kalergis A.M., Tobar J.A., Theis M., Willecke K., Sáez J.C. **Injury of Skeletal Muscle and Specific Cytokines Induce the Expression of Gap Junction Channels in Mouse Dendritic Cells.** J Cell Physiol, 2007, Jun;211(3):649-60.
- 18.- Becker M.I., De Ioannes A.E., León C., Ebensperger L.A. **Females of the communally breeding rodent, *Octodon degus*, transfer antibodies to their offspring during pregnancy and lactation.** J Reprod Immunol, 2007, Jun;74(1-2):68-77.

- 19.- Benka V.A., Levy J.K. **Vaccines for feline contraception: GonaCon GnRH-hemocyanin conjugate immunocontraceptive.** J Feline Med Surg, 2015, Sep;17(9):758-65. doi: 10.1177/1098612X15594989.
- 20.- Pilon J., Loiacono C., Okeson D., Lund S., Vercauteren K., Rhyan J., Miller L. **Anti-prion activity generated by a novel vaccine formulation.** Neurosci Lett, 2007, Dec 18;429(2-3):161-4
- 21.- Reyes D., Salazar L., Espinoza E., Pereda C., Castellón E., Valdevenito R., Huidobro C., Becker M.I., Lladser A., López M.N., Salazar-Onfray F. **Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients.** Br J Cancer, 2013, Sep 17;109(6):1488-97. doi: 10.1038/bjc.2013.494
- 22.- 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, 2012, Mar;42(3):688-99. doi: 10.1002/eji.201142011.
- 23.- Presicce P., Taddeo A., Conti A., Villa M.L., Della Bella S. **Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor.** Mol Immunol, 2008, Feb;45(4):1136-45.
- 24.- Del Campo M. **Efecto de hemocianinas de moluscos en la maduración de células dendríticas murinas.** Memoria para optar al Título de Bioquímico, Universidad de Chile, 2007.
- 25.- Zhang, T.Y. **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, Universidad de Chile, 2013.
- 26.- Born R. **Participación de macrófagos en el efecto inmunoestimulante de hemocianinas de moluscos en mamíferos.** Seminario de Título para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, Universidad de Chile, 2013.

- 27.- Delamarre L., Couture R., Mellman I., Trombetta E.S. **Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis.** *J Exp Med*, 2006, Sep 4;203(9):2049-55.
- 28.- May R.J., Beenhouwer D.O., Scharff M.D. **Antibodies to Keyhole Limpet Hemocyanin Cross-React with an Epitope on the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus neoformans* and Other Carbohydrates.** *J Immunol*, 2003, Nov 1;171(9):4905-12.
- 29.- 2009.- Becker M.I., Fuentes A., Del Campo M., Manubens A., Nova E., Oliva H., Faunes F., Valenzuela M.A., Campos-Vallette M., Aliaga A., Ferreira J., De Ioannes A.E., De Ioannes P., Moltedo B. **Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas hemocyanin* is associated with unique biochemical properties.** *Int Immunopharmacol*, 2009, Mar;9(3):330-9. doi: 10.1016/j.intimp.2008.12.011.
- 30.- Tchorbanov A., Idakieva K., Mihaylova N., Doumanova L. **Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin.** *Int Immunopharmacol*, 2008, Jul;8(7):1033-8. doi: 10.1016/j.intimp.2008.03.008.
- 31.- Arancibia, S. **Participación de receptores tipo-lectina en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral de hemocianinas de moluscos en mamíferos.** Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Bioquímica, Universidad de Chile, 2012.
- 32.- Wirguin I., Suturkova-Milosević L., Briani C., Latov N. **Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(β1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen.** *Cancer Immunol Immunother*, 1995, May;40(5):307-10.
- 33.- Olsson C.A., Chute R., Rao C.N. **Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate.** *J Urol*, 1974, Feb;111(2):173-6.
- 34.- Arancibia S., Salazar F., Becker M.I. **Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer.** *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*, InTech Open, 2012, Capítulo 11. doi: 10.5772/28281
- 35.- Becker M.I., Arancibia S., Salazar F., Del Campo M., De Ioannes A.E. **Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications.** *Immune Response Activation*, InTech Open, 2014, Capítulo 2. doi:10.5772/57552

- 36.- Sarma J.V., Ward P.A. **The complement system.** Cell Tissue Res, 2011, Jan;343(1):227-35. doi: 10.1007/s00441-010-1034-0.
- 37.- Paréj K., Dobó J., Závodszky P., Gál P. **The control of the complement lectin pathway activation revisited: Both C1-inhibitor and antithrombin are likely physiological inhibitors, while a2-macroglobulin is not.** Mol Immunol, 2013, Jul;54(3-4):415-22. doi: 10.1016/j.molimm.2013.01.009.
- 38.- Ricklin D., Hajishengallis G., Yang K., Lambris J.D. **Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis.** Nat Immunol, 2010, Sep;11(9):785-97. doi: 10.1038/ni.1923.
- 39.- Walport M.J. **Complement. First of two parts.** N Engl J Med, 2001, Apr 5;344(14):1058-66.
- 40.- Nonaka M., Kimura A. **Genomic view of the evolution of the complement system.** Immunogenetics, 2006, Sep;58(9):701-13
- 41.- Nonaka M. **Evolution of the Complement System.** *MACPF/CDC Proteins - Agents of Defence, Attack and Invasion*, Springer, 2014.DOI: 10.1007/978-94-017-8881-6\_3
- 42.- Holmskov U., Malhotra R., Sim R.B., Jensenius J.C. **Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system.** Immunol Today, 1994, Feb;15(2):67-74.
- 43.- Héja D., Kocsis A., Dobó J., Szilágyi K., Szász R., Závodszky P., Pál G., Gál P. **Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2.** Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, Jun 26;109(26):10498-503. doi: 10.1073/pnas.1202588109.
- 44.- Gál P., Dobó J., Závodszky P., Sim R.B. **Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions.** Mol Immunol, 2009, Sep;46(14):2745-52. doi: 10.1016/j.molimm.2009.04.026
- 45.- Matsushita M., Endo Y., Fujita T. **Structural and Functional Overview of the Lectin Complement Pathway: Its Molecular Basis and Physiological Implication.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2013, Aug;61(4):273-83. doi: 10.1007/s00005-013-0229-y

- 46.- Endo Y., Matsushita M., Fujita T. **The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity.** *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, May;43(5):705-12. doi: 10.1016/j.biocel.2011.02.003.
- 47.- Ma Y.J., Skjoedt M.O., Garred P. **Collectin-11-MASP Complex Formation Triggers Activation of the Lectin Complement Pathway – The Fifth Lectin Pathway Initiation Complex.** *J Innate Immun*, 2013, 5(3):242-50. doi: 10.1159/00034535e6
- 48.- Dodds A.W., Matsushita M. **The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway.** *Immunobiology*, 2007, 212(4-5):233-43.
- 49.- Thornton B.P., Větvička V., Ross G.D. **Natural Antibody and Complement-Mediated Antigen Processing and Presentation by B Lymphocytes.** *J Immunol*, 1994 Feb, 15;152(4):1727-37.
- 50.- Ochsenbein A.F., Zinkernagel R.M. **Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity.** *Immunol Today*, 2000, Dec;21(12):624-30.
- 51.- Chudley A.E. **Genetic landmarks through philately – Karl Landsteiner: the father of blood grouping.** *Clin Genet*, 2000, Apr;57(4):267-9.
- 52.- Avrameas S. **Natural autoantibodies from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'.** *Immunol Today*, 1991, May;12(5):154-9.
- 53.- Panda S., Ding J.L. **Natural Antibodies Bridge Innate and Adaptive Immunity.** *J Immunol*, 2015, Jan 1;194(1):13-20. doi: 10.4049/jimmunol.1400844.
- 54.- Nagele E.P., Han M., Acharya N.K., DeMarshall C., Kosciuk M.C., Nagele R.G. **Natural IgG Autoantibodies Are Abundant and Ubiquitous in Human Sera, and Their Number Is Influenced By Age, Gender, and Disease.** *PLOS One*, 2013, Apr 2;8(4):e60726. doi: 10.1371/journal.pone.0060726.
- 55.- Panda S., Zhang J., Tan N.S., Ho B., Ding J.L. **Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria.** *EMBO J*, 2013, Nov 13;32(22):2905-19. doi: 10.1038/emboj.2013.199

- 56.- Panda S., Zhang J., Yang L., Anand G.S., Ding J.L. **Molecular interaction between natural IgG and ficolin – mechanistic insights on adaptive-innate immune crosstalk.** Sci Rep, 2014, Jan 14;4:3675. doi: 10.1038/srep03675.
- 57.- Moroz L.A., Krygier V., Kotoulas A.O. **Normal Human IgG with Antibody Activity for Keyhole Limpet Haemocyanin.** Immunology, 1973, Sep;25(3):441-9.
- 58.- Burke G.P., Smith K.A., Stocking R.I., Ferm M., McIntyre O.R. **Anti-keyhole limpet hemocyanin antibody in normal unsensitized individuals.** J Allergy Clin Immunol, 1977, Apr;59(4):309-13.
- 59.- López M.N., Pereda C., Segal G., Muñoz L., Aguilera R., González F.E., Escobar A., Ginesta A., Reyes D., González R., Mendoza-Naranjo A., Larrondo M., Compán A., Ferrada C., Salazar-Onfray F. **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.**
- 60.- Bradford M.M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.** Anal Biochem, 1976, May 7;72:248-54.
- 61.- Ferreira V., Valck C., Sánchez G., Gingras A., Tzima S., Molina M.C., Sim R., Schwaeble W., Ferreira A. **The Classical Activation Pathway of the Human Complement System Is Specifically Inhibited by Calreticulin from *Trypanosoma cruzi*.** J Immunol, 2004, Mar 1;172(5):3042-50.
- 62.- Roos A., Bouwman L.H., Munoz J., Zuiverloon T., Faber-Krol M.C., Fallaux-van den Houten F.C., Klar-Mohamad N., Hack C.E., Tilanus M.G., Daha M.R. **Functional characterization of the lectin pathway of complement in human serum.** Mol Immunol, 2003, Jan;39(11):655-68.
- 63.- Dolashka-Angelova P., Stefanova T., Livaniou E., Velkova L., Klimentzou P., Stevanovic S., Salvato B., Neychev H., Voelter W. **Immunological Potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* Hemocyanins.** Immunol Invest, 2008, 37(8):822-40. doi: 10.1080/08820130802403366.



- 64.- Baumgartner J., Wilson C., Palmer B., Richter D., Banerjee A., McCarter M. **Melanoma Induces Immunosuppression by Up-Regulating FOXP3+ Regulatory T Cells.** J Surg Res, 2007, Jul;141(1):72-7.
- 65.- Umansky V., Sevko A. **Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization.** Semin Cancer Biol, 2012, Aug;22(4):319-26. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.02.003.
- 66.- Ponder W.F., Lindberg D.R. **Phylogeny and Evolution of the Mollusca.** University of California Press, 2008.
- 67.- Oliva H., Moltedo B., De Ioannes P., Faunes F., De Ioannes A.E., Becker M.I. **Monoclonal Antibodies to Molluskan Hemocyanin from *Concholepas concholepas* Demonstrate Common and Specific Epitopes among Subunits.** Hybrid Hybridomics, 2002, Oct;21(5):365-74.
- 68.- Leito J.T., Ligtenberg A.J., van Houdt M., van den Berg T.K., Wouters D. **The bacteria binding glycoprotein salivary agglutinin (SAG-gp340) activates complement via the lectin pathway.** Mol Immunol, 2011, Oct;49(1-2):185-90. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.010.
- 69.- Murphy K. **The Generation of Lymphocyte Antigen Receptors.** *Janeway's Immunobiology.* Capítulo 5, 8<sup>va</sup> Edición. Garland Science, 2012.
- 70.- de Klerk B., Ducro B.J., Heuven H.C., den Uyl I., van Arendonk J.A., Parmentier H.K., van der Poel J.J. **Phenotypic and genetic relationships of bovine natural antibodies binding keyhole limpet hemocyanin in plasma and milk.** J Dairy Sci, 2015, Apr;98(4):2746-52. doi: 10.3168/jds.2014-8818

71.- van der Klein S.A., Berghof T.V., Arts J.A., Parmentier H.K., van der Poel J.J., Bovenhuis H. **Genetic relations between natural antibodies binding keyhole limpet hemocyanin and production traits in a purebred layer chicken line.** *Poult Sci*, 2015, May;94(5):875-82. doi: 10.3382/ps/pev052.

72.- Berghof T.V., van der Klein S.A., Arts J.A., Parmentier H.K., van der Poel J.J., Bovenhuis H. **Genetic and Non-Genetic Inheritance of Natural Antibodies Binding Keyhole Limpet Hemocyanin in a Purebred Layer Chicken Line.** *PLOS One*, 2015, Jun 26;10(6):e0131088. doi: 10.1371/journal.pone.0131088.