

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EFECTO DE LA ELIMINACIÓN ENZIMÁTICA DE
N-GLÚCIDOS SOBRE LA ESTRUCTURA Y PROPIEDADES
INMUNOGÉNICAS Y ANTITUMORALES DE LAS
HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS EN MAMÍFEROS.***

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

MICHELLE LUNA SALAZAR LUCO

Director de Tesis: Dra. María Inés Becker C.

Santiago-CHILE

Agosto 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

MICHELLE LUNA SALAZAR LUCO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización Proteínas y Biotecnología y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día jueves 2 de agosto de 2018.

Director de Tesis:

Dra. María Inés Becker

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. María Antonieta Valenzuela

Dra. María Carmen Molina

Dr. Christian Wilson

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Dra. María Inés Becker por su confianza y apoyo durante la realización de esta Tesis, además de su enorme calidad humana y profesional. Agradezco también a quienes son o han sido mis compañeros en FUCITED y Biosonda por los gratos momentos y por los consejos y sugerencias durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Mauricio Báez y Maira Rivera por su valiosa colaboración experimental, y también a la Dra. María Rosa Bono y Leonardo Vargas por su ayuda en citometría de flujo. A los docentes de mi facultad, y especialmente a quienes me acogieron en sus laboratorios a lo largo de estos años en Unidades de Investigación, valoro extraordinariamente su participación en mi formación profesional.

Todo este trabajo además ha sido posible gracias a mi familia, y en especial gracias al cariño y apoyo incondicional de mi madre Silvia. Agradezco también a mi pareja Pablo por los días espléndidos, por creer en mí y por el espíritu de equipo que hemos formado. A mis compañeros de carrera, y en especial a los amigos de “El Piño” por los grandes momentos que compartimos estos años y que siempre recordaré con infinito afecto. Del mismo modo, agradezco a todos mis amigos fuera de la universidad, en especial a mis amigas de la infancia Lorryn, Fernanda y Colin.

Las palabras nunca serán suficientes, pero me siento una persona muy afortunada por haber llegado hasta este punto en compañía de todos ustedes.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1151337 de María Inés Becker C., PhD. Además, la estudiante recibió apoyo de BIOSONDA S.A. y de la Fundación Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (FUCITED).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Michelle Salazar, José M. Jiménez, Javiera Villar, Augusto Manubens, María Inés Becker. Efecto de la eliminación enzimática de N-glicosilaciones sobre la estructura e inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos en mamíferos. XXXIV Congreso Nacional de Estudiantes de Bioquímica, ANEB-CHILE. Agosto, 01-05, 2017. Antofagasta, Chile. (Segundo premio a la mejor comunicación en formato póster).

Michelle Salazar, José M. Jiménez, Javiera Villar, Augusto Manubens, María Inés Becker. Effect of enzymatic elimination of N-glycosylations on the structure and immunogenic properties of mollusk hemocyanins. XL Reunión Anual de la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular. Septiembre, 26-29, 2017. Puerto Varas, Chile. (Libro de Resúmenes: 72, página 208). (Primer premio a la mejor comunicación en formato póster).

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	iv
PRESENTACIÓN A CONGRESOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xviii
1. Introducción	1
1.1. Estructura general de las hemocianinas e importancia de los azúcares	2
1.2. Respuesta inmune de mamíferos	8
1.3. Respuesta inmune anti-hemocianinas	11
2. Hipótesis	15
3. Objetivo general	15
4. Objetivos específicos	16
5. Materiales	17
5.1. Material biológico	17
5.1.1. Hemocianinas	17
5.1.2. Animales de experimentación	17
5.1.3. Líneas celulares	17
5.1.4. Anticuerpos	18
5.1.5. Receptores quiméricos	18
6. Metodología	19
6.1. Caracterización de hemocianinas desglucosiladas mediante parámetros bioquímicos	19
6.1.1. Desglucosilación de hemocianinas	19

6.1.2. Dot blot con lectinas y tinción de PAS	20
6.1.3. <i>Lectin Array Blot</i>	20
6.1.4. SDS-PAGE	21
6.1.5. Microscopía electrónica de transmisión (MET)	21
6.1.6. Dicroísmo circular	21
6.2. Estudio de la unión de hemocianinas nativas y desglucosiladas a CLRs	22
6.2.1. Ensayos de unión de hemocianinas a CLRs mediante ELISA	22
6.2.2. Ensayos de competencia de la unión de hemocianinas a CLRs por ELISA	23
6.3. Estudio de la incorporación de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas en APCs cultivadas in vitro, mediante citometría de flujo	23
6.3.1. Hemocianinas conjugadas a fluoróforo	23
6.3.2. Cultivo de la línea celular J774.2	24
6.3.3. Análisis de marcadores de superficie y CLRs en la línea celular J774.2	24
6.3.4. Unión/incorporación de hemocianinas en la línea celular J774.2	25
6.3.5. Inhibición de la incorporación de hemocianinas en la línea celular J774.2	25
6.3.6. Análisis de la producción de citoquinas, inducida por hemocianinas nativas y N-desglucosiladas en cultivos de células J774.2	26
6.4. Determinación de la respuesta humoral y antitumoral producida por hemocianinas nativas y N-desglucosiladas in vivo, en un modelo murino de melanoma	27
6.4.1. Animales de experimentación	27
6.4.2. Cultivo celular de la línea de melanoma murino B16F10	27
6.4.3. Análisis de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas	27
6.4.4. Ensayo antitumoral en un modelo murino de melanoma	28
6.5. Análisis estadísticos	29
7. Resultados	30
7.1. Caracterización de las hemocianinas desglucosiladas según parámetros bioquímicos	30

7.1.1. Análisis de azúcares remanentes en hemocianinas desglucosiladas química y enzimáticamente.	30
7.1.2. Estudios mediante <i>Lectin array blot</i>	34
7.1.3. Evaluación de cambios estructurales en hemocianinas nativas y desglucosiladas mediante SDS-PAGE	40
7.1.4. Análisis de los cambios en la estructura cuaternaria de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas	43
7.1.5. Estudios mediante dicroísmo circular de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas	43
7.2. Análisis del efecto de la N-desglucosilación de hemocianinas sobre su unión a receptores de inmunidad innata <i>in vitro</i>	50
7.2.1. Unión de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas a receptores lectina tipo-C quiméricos (MR, Dectina-1 y Dectina-2)	50
7.2.2. Especificidad de la unión a receptores de lectina tipo C mediante ensayos de competencia con D-(+)-Manosa y D-(+)-Galactosa	53
7.3. Determinación del efecto de las N-glicosilaciones de hemocianinas, en la unión/incorporación a células presentadoras de antígenos y producción de citoquinas <i>in vitro</i>	59
7.3.1. Caracterización de la línea celular de macrófagos murinos J774.2	59
7.3.2. Estudio de la unión/incorporación de hemocianinas nativas en la línea celular de macrófagos murinos J774.2 mediante citometría de flujo	59
7.3.3. Análisis de la producción de citoquinas inducida por hemocianinas nativas y N-desglucosiladas, en macrófagos de la línea J774.2	66
7.4. Análisis del efecto de las N-glicosilaciones de hemocianinas sobre la respuesta inmune humoral y antitumoral <i>in vivo</i>	70
7.4.1. Estudio del efecto de la remoción de N-glicosilaciones de hemocianinas sobre la respuesta inmune humoral	70
7.4.2. Estudio del efecto de la remoción de N-glicosilaciones de hemocianinas, sobre su potencial antitumoral en un modelo murino de melanoma	72

8. Discusión	76
8.1. La N-desglucosilación enzimática es selectiva, parcial, y afecta la estructura cuaternaria de las hemocianinas.	77
8.2. Las hemocianinas se unen a distintos CLRs, y la unión es dependiente de sus azúcares.	80
8.3. Los N-glúcidos participan en la producción de citoquinas inducida por hemocianinas en APCs, y contribuyen parcialmente a su unión/incorporación.	82
8.4. Los N-glúcidos de hemocianinas contribuyen a la respuesta humoral y participarían en la respuesta antitumoral no específica.	86
9. Conclusiones	93
10. Referencias	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página	
Figura 1	Imágenes de la estructura de hemocianinas de moluscos obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, con tinción negativa.	3
Figura 2	Sitios putativos de N-glicosilación del homodidecámero KLH1.	5
Figura 3	N-glicosilaciones putativas en la estructura de la hemocianina de <i>Todarodes pacificus</i> .	6
Figura 4	Representación de los receptores de lectina tipo C (CLRs).	12
Figura 5	Análisis de las hemocianinas (CCH, FLH y KLH) nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D), mediante dot blot utilizando ConA.	31
Figura 6	Análisis de hemocianinas (CCH, FLH y KLH) nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D), mediante dot blot utilizando PNA.	32
Figura 7	Análisis de hemocianinas nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D) mediante dot blot con tinción de PAS.	33
Figura 8	Análisis de glicosilaciones de hemocianinas mediante <i>Lectin array blot</i> .	36
Figura 9	Comparación de la unión de CCH, FLH y KLH, nativas y N-desglucosiladas, a distintas lectinas mediante <i>Lectin Array Blot</i> .	39
Figura 10	Análisis mediante SDS-PAGE de hemocianinas nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente con PNGasa F (D).	41
Figura 11	Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas enzimáticamente.	44

Figura 12	Espectros de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas obtenidos mediante dicroísmo circular.	46
Figura 13	Curvas de estabilidad de FLH nativa y N-desglicosilada, obtenidas mediante dicroísmo circular.	48
Figura 14	Curvas de estabilidad de KLH nativa y N-desglicosilada, obtenidas mediante dicroísmo circular.	49
Figura 15	Análisis de la unión de hemocianinas a MR mediante ELISA.	51
Figura 16	Análisis de la unión de hemocianinas a Dectina-1 mediante ELISA.	52
Figura 17	Análisis de la unión de hemocianinas a Dectina-2 mediante ELISA.	54
Figura 18	Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas al MR, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución.	55
Figura 19	Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas a Dectina-1, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución.	57
Figura 20	Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas a Dectina-2, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución.	58
Figura 21	Caracterización de la línea celular de macrófagos murinos J774.2 por citometría de flujo.	60
Figura 22	Estudio de la unión/incorporación de hemocianinas en células de la línea J774.2 mediante citometría de flujo.	61
Figura 23	Efecto del inhibidor de macropinocitosis N,N-Dimetilamilorida (DMA) sobre la unión/incorporación de hemocianinas en macrófagos de la línea celular J774.2.	63
Figura 24	Efecto de azúcares en solución sobre la unión/incorporación de hemocianinas, en macrófagos de la línea celular J774.2.	64
Figura 25	Efecto de la co-incubación de azúcares y del inhibidor de macropinocitosis N,N-Dimetilamilorida (DMA) sobre la unión/incorporación de hemocianinas en macrófagos de la línea celular J774.2.	65

Figura 26	Efecto de la N-desglicosilación de las hemocianinas sobre su unión/incorporación en macrófagos J774.2.	67
Figura 27	Estudio de la producción de citoquinas proinflamatorias, inducidas por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en macrófagos J774.2.	69
Figura 28	Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas nativas y N-desglicosiladas.	71
Figura 29	Evaluación del potencial antitumoral de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en un modelo de melanoma murino.	73
Figura 30	Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en un modelo de melanoma murino.	75
Figura 31	Modelo propuesto sobre el rol de los azúcares en la estructura y propiedades inmunogénicas y antitumorales de las hemocianinas	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Panel de Lectinas utilizadas en el análisis mediante Lectin array blot.	35
Tabla 2. Porcentaje de azúcares removidos por la enzima PNGasa F en CCH, FLH y KLH.	41

ABREVIATURAS

APCs	:	Células presentadoras de antígeno
BCR	:	Receptor de células B
BMDCs	:	Células dendríticas derivadas de médula ósea
BSA	:	Albúmina de suero bovino
CCH	:	Hemocianina de <i>Concholepas Concholepas</i>
CLRs	:	Receptores de lectina tipo C
ConA	:	Concanavalina A
CRD	:	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CryoEM	:	Criomicroscopía electrónica
CTLD	:	Dominios tipo lectina C
DAMPs	:	Patrones moleculares asociados a daño o peligro
DC	:	Célula dendrítica
DC-SIGN	:	<i>DC-specific ICAM grabbing non-integrin</i>
DMA	:	5-(N,N)-Dimetilamilorida
DMEM	:	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DO	:	Densidad óptica
ELISA	:	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FAL	:	Fosfatasa alcalina
Fc	:	Fracción constante
FcR γ	:	Receptor de Fc gamma
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
FLH	:	Hemocianina de <i>Fisurella latimarginata</i>
FRET	:	Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia
FU	:	Unidad funcional
IFN- γ	:	Interferón gamma
Ig	:	Inmunoglobulina
IL	:	Interleuquina
ITAM	:	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>

ITIM	: <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
KLH	: Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
LPS	: Lipopolisacárido
MET	: Microscopía electrónica de transmisión
MFI	: Intensidad media de fluorescencia
MGL	: Lectina de macrófagos que une galactosa
MHC-I	: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	: Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MR	: Receptor de manosa
NK	: Células <i>natural killer</i>
OVA	: Ovoalbúmina
PAMPs	: Patrones moleculares asociados a patógenos
PAS	: Ácido peryódico de Schiff
PBS	: Tampón fosfato salino
PFA	: p-Formaldehído
PNA	: Aglutinina de maní
PNGasa F	: Péptido:N-glicosidasa F
PRRs	: Receptores que reconocen patrones moleculares
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
SFB	: Suero fetal bovino
SPR	: Resonancia de plasmones superficiales
TCR	: Receptor de célula T
Th1	: Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 1
Th2	: Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 2
Th17	: Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4+) tipo 17
TLRs	: Receptores de tipo Toll
TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa

RESUMEN

Las hemocianinas, glicoproteínas de alto peso molecular cuya función más conocida es transportar el oxígeno en algunos moluscos, son ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. La hemocianina más empleada para estos propósitos, conocida como KLH, proviene de la Lapa californiana *Keyhole limpet* (*Megathura crenulata*), y en Chile se han descubierto dos hemocianinas sustitutas que provienen de las especies litorales *Concholepas concholepas* (CCH) y *Fissurella latimarginata* (FLH). Las hemocianinas se utilizan como *carriers* de moléculas de haptenos y péptidos, como adyuvantes en vacunas y como inmunoestimulantes no específicos en la terapia contra ciertos tipos de cáncer, pues al ser inoculadas en mamíferos inducen una respuesta inmune adaptativa del tipo Th1, caracterizada por la síntesis de IFN- γ , fundamental en la destrucción de células tumorales e infectadas con patógenos.

Los efectos inmunogénicos y antitumorales de las hemocianinas se han atribuido a su tamaño (4-8 MDa), a su estructura cuaternaria didecamérica con múltiples epítomos repetidos, a su xenogenicidad, y a sus azúcares, mayoritariamente N-glicosilaciones heterogéneas y complejas ricas en manosa, que alcanzan un 3-4% (p/p). Se ha demostrado que las N-glicosilaciones tienen funciones estructurales en la hemocianina de *Tadorodes pacificus*, sin embargo, este aspecto está escasamente estudiado en CCH, FLH y KLH, así como también el rol de los azúcares en sus efectos inmunológicos. Al respecto, se ha descrito que las hemocianinas son endocitadas por células presentadoras de antígenos (APCs) vía receptores de reconocimiento de patógenos de la familia lectina tipo C (CLRs), los cuales reconocen azúcares ricos en manosa, tales como el receptor de manosa (MR), Dectina-1 y Dectina-2, estimulando la secreción de citoquinas que generan un ambiente proinflamatorio benéfico. Sin embargo, no se ha estudiado experimentalmente la contribución de los azúcares sobre la estructura y la respuesta inmunomoduladora y antitumoral de dichas hemocianinas, por lo cual, en base a los antecedentes, se sustenta la siguiente hipótesis: **“La eliminación enzimática de N-glicosilaciones en hemocianinas de gastrópodos, tales como KLH, CCH y FLH, disminuye la formación de estructuras didecaméricas y sus propiedades inmunogénicas y antitumorales en mamíferos”**.

CCH, FLH y KLH fueron N-desglicosiladas enzimáticamente utilizando PNGasa F y también, químicamente con peryodato de sodio como control. Posteriormente fueron analizadas según parámetros bioquímicos que incluyeron *dot blot* con lectinas, tinción de PAS y *Lectin array blot* para determinar la presencia de azúcares remanentes, y además, se realizaron análisis mediante SDS-PAGE, microscopía electrónica de transmisión y dicroísmo circular para determinar las

modificaciones estructurales. Los resultados principales indicaron que la N-desglicosilación enzimática es parcial, selectiva, y que los azúcares remanentes corresponden principalmente a fucosilaciones. Además, la N-desglicosilación no afectó la estructura secundaria ni el desplegamiento, pero sí la estructura cuaternaria y el replegamiento de estas glicoproteínas.

Los estudios inmunoquímicos mediante ELISA demostraron que la unión de hemocianinas desglicosiladas a CLR_s quiméricos (MR-Fc, Dectina-1-Fc y Dectina-2-Fc) disminuye, en comparación con la unión de las hemocianinas nativas. Además, se demostró que la unión de hemocianinas al MR y Dectina-2 es específica para manosa, no así la unión a Dectina-1. Estudios mediante citometría de flujo y ELISA, en los que se evaluó el efecto funcional de la N-desglicosilación de las hemocianinas, sobre la unión/incorporación y secreción de citoquinas proinflamatorias en la línea de macrófagos murinos J774.2, demostraron que los N-glúcidos de estas glicoproteínas contribuyen a su unión/incorporación en dichas células, así como a la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-6 e IL-12p40. Finalmente, se realizaron estudios inmunológicos en los que se evaluó el efecto de la N-desglicosilación de hemocianinas sobre la respuesta humoral específica y antitumoral en un modelo murino de melanoma B16F10. Los resultados demostraron que la N-desglicosilación disminuyó el título de anticuerpos anti-hemocianinas, indicando una respuesta humoral desfavorecida. Respecto al potencial antitumoral, el volumen tumoral y porcentaje de animales con tumor no mostraron diferencias entre hemocianinas nativas y N-desglicosiladas con CCH y FLH, pero sí con KLH, donde se observó un mayor volumen tumoral en el grupo tratado con hemocianina N-desglicosilada.

El conjunto de los resultados obtenidos, confirman el rol de los N-glúcidos de CCH, FLH y KLH a nivel de su estructura cuaternaria, y además, sugieren fuertemente que las N-glicosilaciones participan en su reconocimiento por algunos receptores lectina tipo C, así como en su efecto proinflamatorio en células presentadoras de antígenos. Finalmente, la N-desglicosilación disminuye la respuesta humoral anti-hemocianinas, sin embargo, se requieren experimentos adicionales para confirmar su rol en el efecto antitumoral.

ABSTRACT

Hemocyanins are huge glycoproteins with several applications in biomedicine and biotechnology, whose better-known function is to carry oxygen in the hemolymph of some mollusks. The most used hemocyanin is named as KLH, from the keyhole limpet (*Megathura crenulata*), and two substitute hemocyanins have been described in Chile, from the species *Concholepas concholepas* (CCH) and *Fissurella latimarginata* (FLH). Hemocyanins act as non-specific immunostimulants when inoculated in mammals, inducing an adaptative Th1 immune response, characterized by the secretion of IFN- γ , essential in the destruction of tumoral and infected cells. By this property, hemocyanins are widely used in biomedicine as carriers of haptens/peptides, as adjuvants in vaccines, and as immunostimulants in therapies against certain types of cancer. Their immunomodulatory properties have been attributed to their high molecular weight (4-8 MDa), their complex quaternary structure, their xenogenicity and their high and heterogeneous glycan content, mainly mannose-rich N-glycans that reach up to 3-4% (w/w). Studies in the hemocyanin of *Todarodes pacificus* and other glycoproteins suggest a structural role of N-glycans, however, this role has been scarcely studied in CCH, FLH, KLH, as well as the role of N-glycans on their immunostimulant properties. Hemocyanins are incorporated by antigen presenting cells (APCs) through mannose-recognizing C-type lectin receptors (CLRs), such as mannose receptor (MR), Dectin-1 and Dectin-2, promoting the secretion of beneficial proinflammatory cytokines. Nevertheless, the contribution of glycans to the structure and the immunomodulatory and antitumor properties of CCH, FLH and KLH has not been experimentally demonstrated. Based on the bibliographic background, the proposed hypothesis is that: **“The enzymatic N-deglycosylation of gastropods hemocyanins, such as KLH, CCH and FLH, disfavors the quaternary didecameric structure, and their immunogenic and antitumor properties in mammals”**.

Hemocyanins were enzymatically N-deglycosylated by PNGase F, and as a control, they were chemically deglycosylated by oxidation with sodium periodate. Analyses by dot blot and lectin array blot suggest that N-deglycosylation is selective and partial, leaving fucose-rich residual glycans. Also, analyses by SDS-PAGE, transmission electron microscopy and circular dichroism showed that N-deglycosylation did not affect the secondary structure or unfolding of hemocyanins, but it disfavored the association of subunits to form quaternary structures and their refolding. Moreover, ELISA binding assays showed that the binding of deglycosylated hemocyanins to chimeric CLRs (MR-Fc, Dectin-1-Fc and Dectin-2-Fc) decreased, compared with

native hemocyanins. Besides, the binding of hemocyanins to MR and Dectin-2, but not to Dectin-1, was specific for mannose-rich glycans. Experiments by flow cytometry and ELISA, performed in J774.2 macrophage cells, showed a decreased binding and incorporation of N-deglycosylated hemocyanins in these cells, and also showed a decrease in the secretion of proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-12p40, by N-deglycosylated proteins. Moreover, studies in a B16F10 murine model of melanoma were performed, to study the contribution of N-glycans to the humoral and antitumor responses induced by hemocyanins. ELISA assays showed a decreased antibody titer in mice immunized with N-deglycosylated hemocyanins, compared with their native forms. Nevertheless, no clear effects of N-deglycosylation on antitumor properties were observed, as mice immunized with native and N-deglycosylated CCH and FLH did not showed differences in tumor volume and tumor incidence. In contrast, mice immunized with N-deglycosylated KLH showed an increased tumor volume, compared with the native KLH group.

Altogether, these results confirm that the N-glycans of CCH, FLH and KLH are essential for their didecameric structure. Similarly, N-glycans of hemocyanins contribute to their incorporation through CLRs, to the activation of the proinflammatory response by APCs, and to the humoral anti-hemocyanin response. However, further analyses are required to confirm the participation of N-glycans on their antitumor properties.

1. INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son glicoproteínas de alto peso molecular que circulan libremente en la hemolinfa de algunos moluscos y artrópodos, cuya función más conocida es el transporte de oxígeno. La unión de estas proteínas a oxígeno es reversible y es mediada por cobre, metal que en su estado reducido les otorga una coloración azul [1]. Al ser inoculadas en mamíferos las hemocianinas de moluscos actúan como inmunoestimulantes no específicos, motivo por el cual son ampliamente utilizadas en biomedicina y biotecnología, y razón por la cual concentran el interés de esta tesis. Algunas de las aplicaciones principales de las hemocianinas incluyen su uso como proteínas transportadoras o *carriers* para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos, como adyuvantes en vacunas terapéuticas para cáncer en base a células dendríticas, y su uso como inmunoestimulantes no específicos en el tratamiento de cáncer superficial de vejiga, entre otros [2,3]. Sin embargo, aunque son ampliamente utilizadas, los mecanismos inmunológicos mediante los cuales las hemocianinas actúan como inmunomoduladores han sido poco estudiados experimentalmente. Clásicamente, sus efectos sobre la respuesta inmune se han atribuido principalmente a su gran tamaño (4-8 MDa), a su estructura cuaternaria compleja y con múltiples epítomos repetidos y con simetría tipo D5, a su xenogenicidad, y a los azúcares presentes en su estructura [4,5].

La hemocianina más estudiada y la primera en ser descubierta corresponde a la proteína que se extrae de la lapa *Keyhole limpet (Megathura crenulata)*, conocida como KLH, la cual ha sido utilizada por más de 45 años en biomedicina [6]. Es destacable que, actualmente, las hemocianinas sólo pueden extraerse de su fuente natural, pues su tamaño y estructura compleja no han permitido su expresión heteróloga. Es así que, el aumento en su demanda ha llevado a buscar hemocianinas en fuentes alternativas con propiedades inmunológicas similares. Al respecto, en Chile se descubrieron dos hemocianinas de especies de moluscos que habitan en su litoral, que provienen de *Concholepas concholepas* (Loco) y *Fissurella latimarginata* (Lapa negra), CCH y FLH respectivamente [7,8,9]. CCH posee propiedades inmunoestimulantes similares a las de KLH, mientras que FLH es significativamente superior, lo que se explicaría en parte por las diferencias que presentan a nivel de su estructura cuaternaria [8,10].

1.1 Estructura general de las hemocianinas e importancia de los azúcares.

Las hemocianinas son glicoproteínas complejas, compuestas por 10 subunidades que se agrupan de a pares y forman una estructura básica conocida como decámero, que tienen la forma de cilindros huecos de aproximadamente 35 nm de diámetro y 38 nm de altura, los cuales se pueden observar fácilmente mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) con tinción negativa (**figura 1**) [4]. Por su parte, cada subunidad oscila entre los 350 y 450 kDa de peso molecular y posee 8 dominios globulares conocidos como unidades funcionales (FUs), cada uno de los cuales posee un par de átomos de cobre que unen reversiblemente una molécula de oxígeno [11,12]. Aunque comparten estas similitudes, las hemocianinas previamente señaladas, difieren en otras características relacionadas con su estructura y estabilidad, por ejemplo, mientras CCH y KLH pueden estar formadas por dos tipos de subunidades (CCH-A y CCH-B, KLH1 y KLH2, respectivamente), FLH posee sólo un tipo de subunidad. Además, los decámeros de estas hemocianinas pueden asociarse y formar heterodidecámeros en el caso de CCH y homodidecámeros en el caso de KLH y FLH, siendo la estabilidad de los homodidecámeros dependientes de la presencia de cationes divalentes en el medio [7,12,13].

Una de las características más relevantes de las hemocianinas, por su rol estructural y propiedades inmunológicas, es su alto contenido de carbohidratos. Estudios realizados en KLH y en otras hemocianinas, tales como las extraídas de *Helix lucorum*, *Rapana venosa*, y *Haliotis tuberculata*, han demostrado que estas glicoproteínas poseen azúcares heterogéneos, siendo los más abundantes los N-glúcidos ricos en manosa, aunque también se han descrito N-glúcidos mixtos que contienen galactosa. Así mismo, estas hemocianinas exhiben árboles de glicosilación que no se encuentran en mamíferos [14,15,16,17]. Respecto a las hemocianinas de nuestro laboratorio, CCH, FLH y KLH poseen N-glicosilaciones, donde además de manosa se observan estructuras ricas en fucosa y N-acetilglucosamina. Además, KLH y FLH, a diferencia de CCH, presentan O-glicosilaciones expuestas y presencia de xilosa. Del mismo modo, se ha descrito que en KLH y CCH los azúcares corresponden a aproximadamente el 3-4% del peso molecular total de la proteína, y si bien este dato no está descrito para FLH se estima un contenido similar [8].

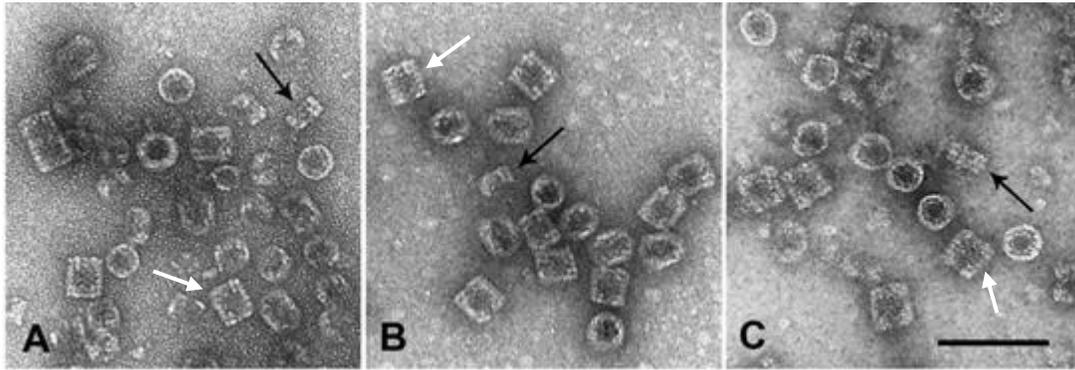


Figura 1. Imágenes de la estructura de hemocianinas de moluscos obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, con tinción negativa. (A) Hemocianina de *Keyhole limpet* (*Megathura crenulata*), conocida como KLH. **(B)** Hemocianina de *Concholepas concholepas*, conocida como CCH. **(C)** Hemocianina de *Fissurella latimarginata*, conocida como FLH. Las flechas negras indican decámeros, y las flechas blancas indican didecámeros, estructura preferente en las hemocianinas de gastrópodos. La barra de escala representa 100 nm. (Adaptado de Becker y cols., 2014).

Debido a la complejidad de las hemocianinas, se dispone de pocos análisis estructurales, sin embargo, se ha propuesto un modelo para el homodidecámero KLH1 a través de criomicroscopía electrónica (CryoEM) a 9 Å de resolución (**figura 2**). Mediante esta técnica se ha modelado la estructura de la proteína, analizando los residuos de asparagina que podrían estar glicosilados. En esta estructura se observa que hay 120 sitios putativos de N-glicosilación, todos ellos externos, y además se distinguen 5 sitios en la zona superior del cilindro [18]. Si bien en este modelo no se analiza qué azúcares componen los árboles de glicosilación, se ha descrito que tanto KLH1 como KLH2 poseen principalmente manosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y fucosa, en distintas proporciones [19]. Adicionalmente, se han encontrado patrones de glicosilación únicos, tales como Gal(β 1-6)Man, el cual no se encuentra frecuentemente en glicoproteínas [20], o estructuras más complejas como centros modificados de Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)GlcNAc. También se han descrito patrones inmunogénicos en KLH, tales como Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, glicosilación que también está presente en el parásito humano *Schistosoma mansoni* [21], y Gal(β 1-6)GalNAc, estructura presente en el antígeno T de algunas células tumorales, siendo estas glicosilaciones determinantes inmunogénicos relevantes en KLH [22].

Por otra parte, recientemente se resolvió a 3 Å de resolución la estructura de la hemocianina del calamar común japonés *Todarodes pacificus*, de 3,8 MDa, mediante cristalografía de rayos X, siendo esta la primera estructura de una hemocianina intacta resuelta utilizando esta técnica. Este análisis reveló que el decámero de dicha proteína posee 28.470 residuos de aminoácidos, 80 conglomerados (*clusters*) de cobre-oxígeno y 50 motivos de carbohidratos. Un aspecto relevante es que, además de observar la organización de las unidades funcionales, se analizó la presencia de azúcares y se describió que los motivos correspondían principalmente a glicosilaciones presentes en residuos de asparagina, es decir, N-glicosilaciones ricas en manosa y N-acetilglucosamina. Además, se describió que algunas FUs formaban *clusters* de glicosilación, y se hallaron motivos de glicosilación conservados en los sitios de unión entre FUs (**figura 3**). Así mismo, estudios con la hemocianina desglicosilada enzimáticamente y analizada mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), mostraron que la formación de los decámeros disminuyó significativamente al remover los N-glúcidos [23].

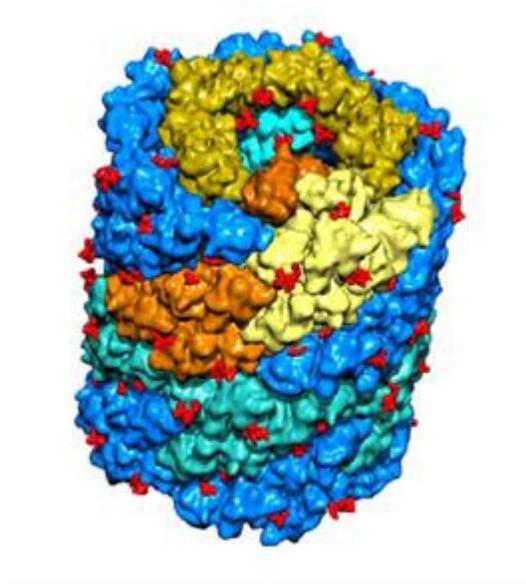


Figura 2. Sitios putativos de N-glicosilación del homododecámero KLH1. Se muestra un modelo obtenido mediante criomicroscopía electrónica, a 9-Å de resolución, de los 120 sitios putativos de N-glicosilación, mostrados en rojo. (Adaptado de Gatsogiannis y cols., 2008).

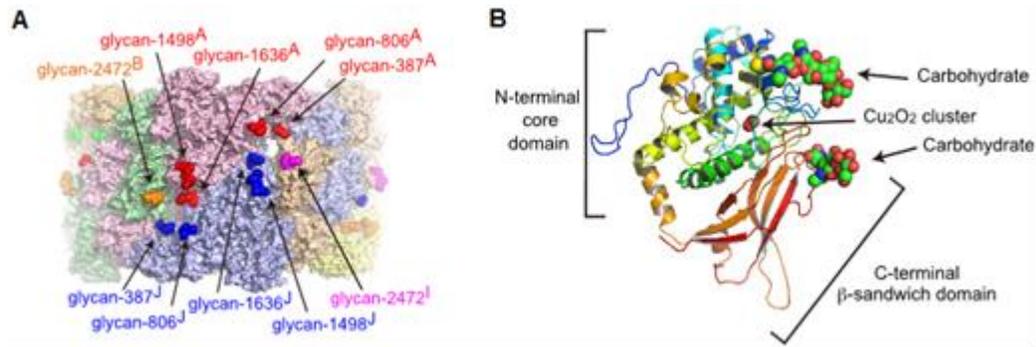


Figura 3. N-glicosilaciones putativas en la estructura de la hemocianina de *Todarodes pacificus*. Esta proteína fue cristalizada y analizada mediante cristalografía de rayos X a 3-Å. **(A)** Clusters de N-glicosilaciones presentes en la estructura decamérica, representadas en el primer plano por esferas de diferentes colores. Las estructuras coloreadas en el segundo plano muestran distintas subunidades. **(B)** Diagrama representativo de una unidad funcional (FU-d), que muestra la cercanía entre clusters putativos de N-glicosilación y clusters de unión a oxígeno mediada por átomos de cobre. (Adaptado de Gai y cols., 2015).

Estos resultados, en conjunto, sugieren que las N-glicosilaciones tienen un rol en el ensamblaje y estabilidad estructural de la hemocianina de *T. pacificus* y, además, sugiere que al haber *clusters* de glicosilación en las FUs, los azúcares podrían participar en la regulación alostérica de la unión reversible de oxígeno a estas proteínas [23].

En general, las glicosilaciones presentes en las proteínas pueden tener distintos roles, modificando tanto aspectos estructurales, así como también su función biológica. Estructuralmente, los azúcares son responsables del correcto plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico y, además, influyen en la estructura y solubilidad de las mismas [24]. Esto se ha corroborado experimentalmente, pues gran parte de las glicoproteínas que son desglicosiladas sufren alteraciones, por ejemplo, mediante estudios de FRET se observó que al desglicosilar la fracción constante (fragmento Fc) de la Inmunoglobulina G (IgG), esta presenta un amplio espectro de cambios conformacionales [25]. Así mismo, en un estudio diferente, se observó que al desglicosilar enzimáticamente inmunoglobulinas de la subclase IgG1 recombinantes, además de cambios conformacionales, estas presentan mayor susceptibilidad a ser degradadas por tripsina y quimiotripsina [26]. En base a los antecedentes expuestos, se puede sugerir que las glicosilaciones, presentes tanto en hemocianinas como en otras proteínas, tienen relevancia en el ensamblaje y en la estabilidad estructural, y si bien este aspecto no se ha estudiado experimentalmente con CCH, FLH y KLH, se podría esperar un efecto similar.

Además del rol estructural que poseen las glicosilaciones en las proteínas, se destaca su función biológica, por ejemplo, en el reconocimiento e interacción con otras moléculas, en la fertilización, durante el desarrollo y especialmente a nivel de la respuesta inmune, en alergias y eventos patológicos [24,27]. Si bien este tema será abordado con detalle más adelante, es relevante mencionar que la gran cantidad de glicosilaciones presentes en hemocianinas y su diversidad, es una característica en común con patógenos y células cancerosas, que poseen estructuras oligosacáridas que también se encuentran altamente glicosiladas. En este contexto, es factible que, debido a los glúcidos conjugados a su estructura, CCH y FLH puedan compartir algunos epítomos con patógenos y células tumorales, como ocurre con las glicosilaciones de *Schistosoma mansoni* y del antígeno T presentes en KLH, las cuales son reconocidas por el sistema inmune [21,22].

1.2 Respuesta inmune de mamíferos.

Para hacer referencia al efecto inmunoestimulante de las hemocianinas, es necesario contextualizar sobre la respuesta inmune en mamíferos. A modo general, este sistema posee células capaces de reconocer antígenos y generar un amplio espectro de respuestas específicas ante ellos, habitualmente adquiriendo memoria contra los agresores [28]. Para realizar estas funciones, el sistema inmune se compone de distintos elementos, los que se han clasificado según sus características y curso temporal en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. La respuesta inmune innata es la respuesta dominante en la mayoría de los organismos vivos, ocurre de manera inmediata frente al antígeno y se desencadena por la activación del Complemento y también por receptores codificados en la línea germinal (*pattern recognition receptors* o PRRs), que reconocen patrones o motivos moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* o PAMPs), y también patrones moleculares asociados a señales de daño o peligro (*damage-associated molecular patterns* o DAMPs) [29]. Los principales PRRs de membrana corresponden a los receptores de tipo toll (*toll-like receptors* o TLRs) y los receptores de lectina tipo C (*C-type lectin receptors* o CLR). Estos receptores están expresados diferencialmente en las células del sistema inmune innato, tales como macrófagos y células dendríticas, entre otras. Una vez que los receptores reconocen al antígeno, se induce la producción de citoquinas en las células mencionadas, mediadores que favorecen el reclutamiento de otras células, tales como neutrófilos y monocitos, gracias a un aumento en el flujo sanguíneo, un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y cambios en la permeabilidad del endotelio. Esta respuesta favorece el aumento de células y mediadores proinflamatorios en el sitio de infección. Así mismo, macrófagos y células dendríticas, además de producir citoquinas, aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras, tales como CD80 y CD86, y de los complejos mayores de histocompatibilidad (MHC), proteínas que son esenciales para la activación de la inmunidad adaptativa. Otro mecanismo de la inmunidad innata, como se mencionó, corresponde al sistema del Complemento. Este sistema está compuesto por proteínas plasmáticas, que reaccionan entre ellas para opsonizar al antígeno y reclutar a células fagocíticas, tales como neutrófilos, macrófagos y mastocitos. Existen tres vías de activación del complemento, la vía clásica, la vía alternativa y la vía de las lectinas, sin embargo, todas producen los mismos efectos ya mencionados. En conjunto, la activación del Complemento, la endocitosis

de los agresores, y la producción de citoquinas favorecen la respuesta inflamatoria para controlar la infección, sin embargo, si estos mecanismos no son suficientes, algunas células activadas, tales como macrófagos y células dendríticas, desarrollan mecanismos para iniciar la respuesta inmune adaptativa [30]. Es relevante mencionar que, si bien en la bibliografía clásica se ha descrito que la inmunidad innata no produce memoria inmunológica, algunas evidencias sugieren que esta respuesta podría generar algún tipo de memoria vía modificaciones epigenéticas, aunque esta propiedad se sigue atribuyendo principalmente a la inmunidad adaptativa [31,32].

Por otra parte, el sistema inmune adaptativo está compuesto por linfocitos T y B, células que expresan proteínas de membrana que permiten el reconocimiento de antígenos, tales como el receptor de célula T (*T-cell receptor, TCR*) y el receptor de célula B (*B-cell receptor, BCR*), respectivamente, este último también conocido como anticuerpo o inmunoglobulina (Ig) que reconoce antígenos en solución y que se puede secretar. En cambio, en el caso de los linfocitos T, el TCR está siempre anclado a la membrana y no reconoce antígenos en solución, sino que se activa al reconocer péptidos asociados al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) durante la presentación antigénica. Este proceso es mediado por células presentadoras de antígeno (APCs), las cuales son principalmente células dendríticas, macrófagos y también linfocitos B. Como se mencionó, estas células fagocíticas endocitan al antígeno y, además, producen citoquinas, moléculas co-estimuladoras y MHC para activar la respuesta adaptativa. Las APCs, presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T mediante los MHC de clase I o II (MHC-I/II). Si el antígeno (endógeno) es presentado por un MHC-I se activarán los linfocitos T CD8+ (citotóxicos), mientras que si el antígeno (exógeno) es presentado por un MHC-II se activan linfocitos T CD4+ (ayudadores o *helper*), los que a su vez se polarizan en fenotipos Th1, Th2, o Th17, entre otros, según las citoquinas expresadas por las APCs (IFN- γ , IL-4 e IL-17, que caracterizan estas respuestas, respectivamente). Para que la presentación antigénica sea efectiva, es necesario que el péptido esté cargado en su MHC correspondiente, pero también se requiere la presencia de las moléculas co-estimuladoras y la producción de citoquinas por parte de las APCs. Si uno de estos elementos está ausente, el linfocito T no será activado, o bien se puede producir su apoptosis o anergia [30,31,33]. Es relevante mencionar que los MHC-I se encuentran en prácticamente todas las células nucleadas del organismo, y presentan antígenos citosólicos o endógenos. Por otra parte, los MHC-II sólo se encuentran en las APCs, y presentan

antígenos extracelulares o exógenos. En ocasiones, los antígenos exógenos son presentados en MHC-I, proceso que se conoce como presentación cruzada, y que ocurre principalmente en células dendríticas, pues expresan ambos MHC, aunque también puede ocurrir en otras APCs [34]. La presentación cruzada ocurre cuando un antígeno exógeno es endocitado, y mientras es procesado en las vesículas fagocíticas este es translocado al citosol y cargado en MHC-I. Este proceso participa en la inmunidad contra ciertas infecciones virales y bacterianas, así como en la respuesta inmune contra células tumorales. De hecho, la presentación cruzada en células dendríticas ha sido ampliamente investigada en el área de inmunoterapia antitumoral, como una posible terapia en ciertos tumores [35].

Respecto a los linfocitos B, estas células reconocen antígenos a través del BCR, también conocido como inmunoglobulina. El BCR, a diferencia del TCR, no requiere que el antígeno esté procesado ni que sea presentado en el contexto de MHC, sino que puede reconocer epítomos en antígenos completos, incluyendo azúcares y lípidos. Cuando los linfocitos B están activados y diferenciados, las Igs son secretadas como anticuerpos, siendo esta la principal función efectora de los linfocitos B. Estos anticuerpos se unen al antígeno a través de su región variable, y reclutan células y moléculas que destruyan al patógeno a través de su fracción constante (Fc). Las regiones variables son muy diversas entre distintos anticuerpos, permitiendo que esta respuesta se desencadene ante un gran repertorio de antígenos. Por el contrario, la fracción constante en humanos y murinos sólo puede corresponder a 5 tipos o clases (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), y cada una de ellas produce distintas respuestas efectoras, siendo la IgG la más abundante en el plasma [30]. Por otra parte, los linfocitos B pueden requerir la colaboración de los linfocitos T CD4+ para activarse ante antígenos timo dependientes (mayoritariamente proteínas), mientras que pueden prescindir de ellos ante antígenos timo independientes (carbohidratos). Junto a los linfocitos T, los linfocitos B producen memoria inmunológica, como se ha atribuido a la inmunidad adaptativa clásicamente [28].

1.3 Respuesta inmune anti-hemocianinas.

Se ha acumulado evidencia experimental que demuestra que las hemocianinas son inmunoestimulantes no específicos, que producen una respuesta inmune adaptativa polarizada de linfocitos T CD4+ hacia el fenotipo Th1 (linfocito T *helper* 1), jugando un papel clave en los mecanismos que conducen a este tipo de respuesta las glicosilaciones presentes en su estructura. En efecto, existe evidencia de que estos árboles de glicosilación serían relevantes en la activación de la respuesta inmune anti-hemocianinas, principalmente a través de su interacción con receptores de inmunidad innata localizados en APCs, tales como los CLRs, que reconocen motivos moleculares asociados a carbohidratos [36]. Debido a que las hemocianinas poseen abundantes N-glicosilaciones ricas en manosa y mixtas, agrupadas en *clusters* [19], se comportan como multiligandos, en que los CLRs más relevantes y candidatos a interactuar con ellas son el Receptor de Manosa (MR), Dectina-1, Dectina-2, DC-SIGN y MGL (*macrophage galactose lectin*) (figura 4).

Se ha descrito que el MR reconoce azúcares que son abundantes en patógenos, tales como manosa, N-acetilglucosamina y fucosa, produciendo la endocitosis del patógeno en APCs y favoreciendo la presentación antigénica a linfocitos T [37]. Dectina-1 por su parte, reconoce un amplio espectro de azúcares unidos de forma β 1-3 y β 1-6 en hongos, bacterias y parásitos, siendo su ligando preferente el zimosano, un β -glúcido presente en hongos [38]. Una vez activado, Dectina-1 promueve la activación del factor de transcripción NF- κ B, y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y de citoquinas proinflamatorias en APCs [39]. Igualmente, el receptor Dectina-2 presenta una alta afinidad por estructuras ricas en manosa y α -manano presentes en patógenos, especialmente en las especies de *Candida*, produciendo una respuesta adaptativa de tipo Th17 o Th1, si es que actúa en conjunto con Dectina-1 [40]. DC-SIGN también reconoce estructuras de patógenos ricas en manosa, mientras que MGL reconoce estructuras ricas en galactosa, presentes en N- y O-glúcidos, ya sea de patógenos o de componentes propios como células tumorales. Tanto DC-SIGN como MGL favorecen la incorporación de antígenos en APCs, y la posterior presentación antigénica [41,42,43].

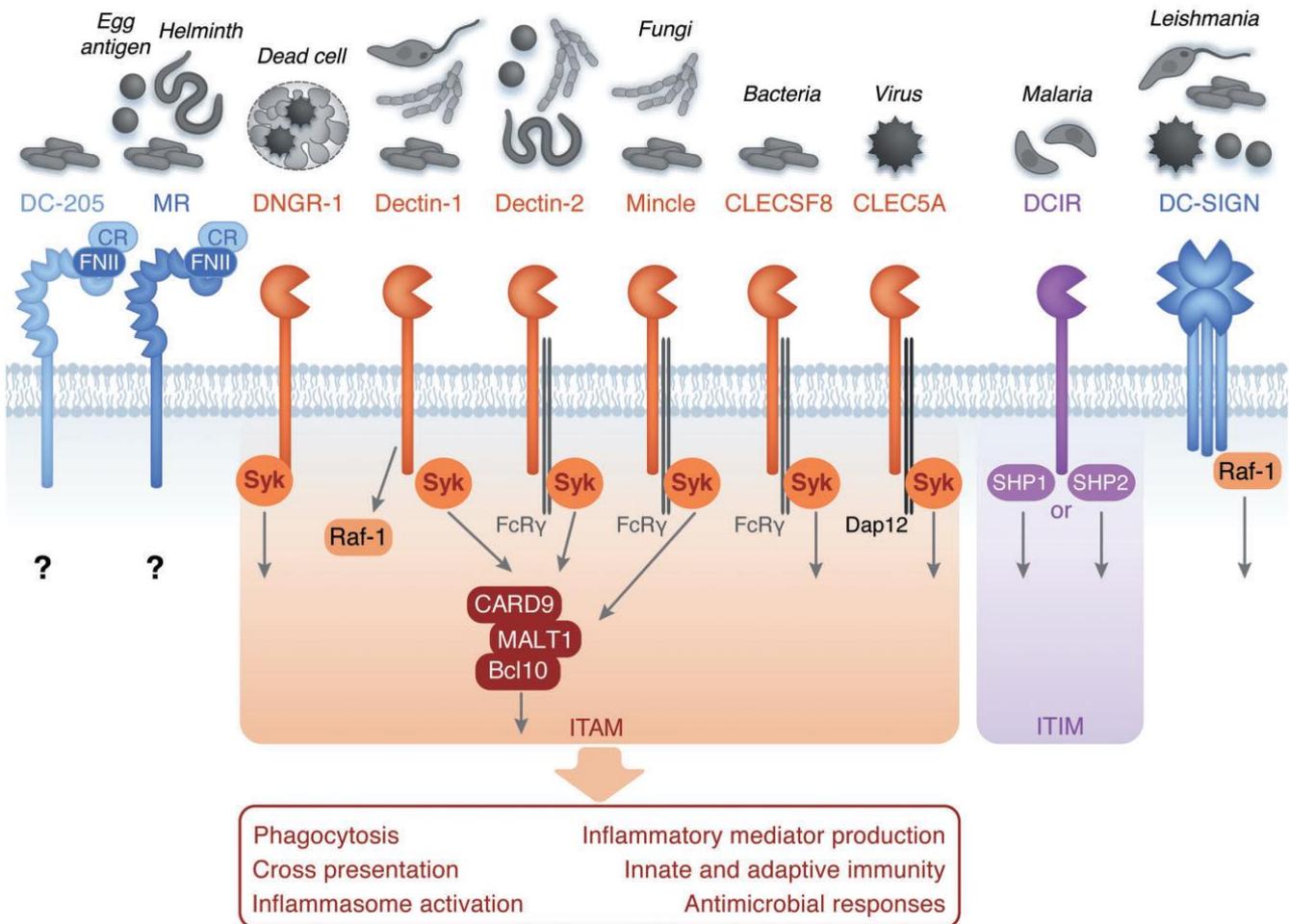


Figura 4. Representación de los receptores de lectina tipo C (CLRs). Se muestra el tipo de microorganismo o ligando de cada receptor, las vías de señalización principales y las respuestas inmunes que ellos inducen. ITAM indica que los receptores utilizan motivos de activación basados en tirosina, e ITIM motivos de inhibición basados en tirosina. (Adaptado de Hoving y cols. 2014).

De los receptores nombrados, Dectina-1 produce una activación directa de motivos ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) presentes en su extremo intracelular, mientras que Dectina-2 produce una activación indirecta de motivos ITAM, pues se asocian con moléculas adaptadoras, tales como FcR γ . Así, estos receptores activan la quinasa Syk, promoviendo efectos inmunológicos en las APCs, tales como síntesis de mediadores proinflamatorios, fagocitosis, y presentación antigénica, incluyendo la presentación cruzada. En el caso de MR, DC-SIGN y MGL, por otra parte, no existe evidencia para asociar estos receptores a una de las vías ya descritas [44,45].

Respecto a las hemocianinas, estudios con KLH han descrito que se une al MR, desencadenando la activación de la respuesta proinflamatoria en APCs [46]. En nuestro laboratorio, se demostró mediante espectroscopia por resonancia de plasmones superficiales (SPR) que CCH, FLH y KLH se unen a más de un CLR, tales como MR y DC-SIGN, mientras que sólo KLH y FLH se unen a MGL [47]. Además, se observó mediante ELISA que las tres hemocianinas se unen a los receptores Dectina-1 y Dectina-2 (Jiménez, JM., y cols. Manuscrito en preparación). Así mismo, en nuestro laboratorio también se ha demostrado que las hemocianinas son incorporadas en células dendríticas y macrófagos cultivados *in vitro*, tanto por macropinocitosis como por endocitosis mediada por receptores. Una vez incorporadas, dichas hemocianinas son lentamente procesadas, e inducen la expresión y secreción de distintas citoquinas proinflamatorias, tales como IL-6, TNF- α e IL-12p40, expresión que varía en intensidad y temporalidad dependiendo de la hemocianina estudiada [2,48]. Del mismo modo, como se mencionó anteriormente, a pesar de la diferencia estructural y de origen entre KLH, CCH y FLH, se ha descrito que al ser inoculadas en mamíferos, todas favorecen la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 [8].

En cuanto al potencial terapéutico, las tres hemocianinas poseen propiedades antitumorales, demostradas en modelos murinos de melanoma, cáncer superficial de vejiga y cáncer oral. Al respecto, en un modelo murino de melanoma las tres hemocianinas aumentaron los niveles plasmáticos de IFN- γ de forma similar, sin embargo, si bien las tres hemocianinas activaron la respuesta humoral, el título de anticuerpos aumentó significativamente en los ratones tratados con FLH, respecto a los tratados con CCH o KLH. Además, los ratones tratados

con FLH presentaron mayor sobrevida y menor volumen tumoral que los ratones tratados con CCH y KLH. En cuanto a CCH y KLH, el efecto que produjeron en los parámetros analizados fue muy similar, por lo que el potencial antitumoral de CCH es comparable con el potencial de KLH. Finalmente, mientras que CCH y KLH requieren del proceso de *priming* o sensibilización para presentar el efecto antitumoral, se demostró que FLH no lo requiere [8].

El mecanismo mediante el cual las hemocianinas producen los efectos señalados no se ha descrito completamente, sin embargo, el modelo propuesto por nuestro laboratorio en base a los antecedentes, es que las hemocianinas serían reconocidas “como organismos altamente manosilados” por los CLR’s mencionados a través de sus azúcares, y serían incorporadas en APCs mediante estos receptores, induciendo la vía de señalización dependiente de la quinasa Syk, y estimulando así la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Así mismo, luego de ser incorporadas en APCs, las hemocianinas son lentamente procesadas, presentadas como antígenos exógenos y también vía presentación cruzada, favoreciendo un fenotipo Th1 [8,47,48]. Sin embargo, la contribución de los N-glúcidos de hemocianinas en esta respuesta es poco conocida.

Con el propósito de esclarecer el rol de los azúcares de KLH, CCH y FLH, tanto en su estructura como en sus efectos inmunomoduladores y antitumorales, el objetivo general de esta tesis ha sido estudiar el efecto de la eliminación enzimática de las N-glicosilaciones de dichas hemocianinas en su estructura, inmunogenicidad a nivel de la respuesta inmune humoral y en su efecto antitumoral en un modelo murino de melanoma.

2. HIPÓTESIS

“La eliminación enzimática de N-glicosilaciones en hemocianinas de gasterópodos, tales como KLH, CCH y FLH, disminuye la formación de estructuras didecaméricas y sus propiedades inmunogénicas y antitumorales en mamíferos”.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la eliminación enzimática de las N-glicosilaciones de hemocianinas de gasterópodos (KLH, CCH y FLH) sobre su estructura, inmunogenicidad y efecto antitumoral en mamíferos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) **Caracterizar las hemocianinas desglicosiladas según parámetros bioquímicos.**

- 1.1 Establecer un protocolo de desglicosilación enzimática de las hemocianinas con PNGasa F.
- 1.2 Identificar la presencia de azúcares residuales en las hemocianinas desglicosiladas.
- 1.3 Analizar los cambios estructurales de las hemocianinas desglicosiladas enzimáticamente.

2) **Analizar el efecto de la eliminación de las N-glicosilaciones de las hemocianinas en la unión a receptores de lectina tipo C *in vitro*.**

- 2.1 Evaluar la unión de hemocianinas a receptores lectina tipo-C quiméricos: MR, Dectina-1 y Dectina-2.
- 2.2 Determinar la especificidad de la unión mediante ensayos de competencia con manosa.

3) **Determinar el efecto de la eliminación de las N-glicosilaciones de hemocianinas en su incorporación a células presentadoras de antígenos cultivadas *in vitro*.**

- 3.1 Evaluar la incorporación de hemocianinas desglicosiladas en macrófagos o células dendríticas murinas cultivadas *in vitro*.

4) **Evaluar el efecto de la eliminación de las N-glicosilaciones de hemocianinas sobre la respuesta inmune humoral y antitumoral *in vivo*.**

- 4.1 Evaluar la respuesta inmune humoral contra hemocianinas desglicosiladas enzimáticamente.
- 4.2 Evaluar el efecto antitumoral de hemocianinas desglicosiladas enzimáticamente en un modelo murino de melanoma.

5. MATERIALES

5.1 Materiales biológicos

5.1.1 Hemocianinas

Las hemocianinas de *Concholepas concholepas* (CCH, Inmunocyanine®) en tampón fosfato salino (en adelante PBS, compuesto por fosfato de sodio 0,1M y cloruro de sodio 0,15M, pH 7,2), y de *Fissurella latimarginata* (FLH, Blue-Vac®) en PBS o tampón Tris (trisaminometano 1M, pH 7), purificadas bajo condiciones libres de pirógenos, fueron suministradas por Biosonda S.A. (Santiago, Chile). La hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) en PBS fue obtenida de Calbiochem (Massachusetts, USA). OVA fue obtenida de InvivoGen (California, USA).

5.1.2 Animales de experimentación

Ratones C57BL/6 de 8-12 semanas fueron obtenidos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Los animales fueron mantenidos a 22-24°C, con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y comida y agua *ad libitum*. El estudio se llevó a cabo en estricta conformidad con las normas bioéticas de FUCITED, exigidas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT).

5.1.3 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular J774.2, correspondiente a macrófagos murinos de la cepa BALB/c [49]. Además, se utilizó la línea celular B16-F10, correspondiente a células de melanoma murino de la cepa C57BL/6 [50].

5.1.4 Anticuerpos

Para los ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) se utilizó un suero de cabra anti-IgG humana acoplado a fosfatasa alcalina (anti-IgG-FAL) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Para estudiar los CLRs expresados en la línea celular J774.2 se utilizaron los anticuerpos monoclonales primarios anti-Dectina-1, anti-Dectina-2, anti-MGL, y anti-TLR4 (Abcam, Cambridge, UK), además de un anticuerpo monoclonal anti-MR (BioLegend, California, USA). Como control de isotipo, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-IgG2a de rata (Abcam). Como anticuerpo secundario se utilizó un suero de cabra anti-IgG de rata acoplado a isotiocianato de fluoresceína (anti-IgG-FITC) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Para estudiar los marcadores de superficie de la línea J774.2 se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-F4/80-AlexaFluor647, anti-MHC-I-FITC y anti-MHC-II-FITC (BioLegend).

5.1.5 Receptores quiméricos

La quimera recombinante del MR fue donado por la Dra. Luisa Martínez-Pomares (School of Life Sciences, University of Nottingham, Nottingham, UK). El constructo posee los dominios lectina del MR (CTLD), unidos a la fracción constante de la inmunoglobulina humana (Fc). Brevemente, para su producción se transfectaron células HEK293, y luego de 5 días se purificó la quimera desde el sobrenadante, utilizando una columna de Proteína A. El conjunto de fracciones que contenía una mayor concentración de la quimera se dializó contra PBS [51].

Las quimeras recombinantes de Dectina-1 y Dectina-2, fueron donadas por el Dr. Gordon Brown (Institute of Medical Sciences, University of Aberdeen, Aberdeen, UK), y también poseen los dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), unidos al Fc de la inmunoglobulina humana. Estas quimeras se obtuvieron de forma similar a lo descrito para MR, mediante transfección de células HEK293T y purificación de los sobrenadantes en una columna de proteína A [52,53].

6. METODOLOGÍA

6.1 Caracterización de hemocianinas desglicosiladas mediante parámetros bioquímicos.

6.1.1 Desglicosilación de hemocianinas.

La N-desglicosilación enzimática de las proteínas se realizó con la enzima Péptido:N-glicosidasa F (PNGasa F) de Asparia Glycomics (San Sebastián, España). Para llevar a cabo la desglicosilación se ensayaron múltiples protocolos, sin embargo, se utilizará y describirá solamente el definitivo, escogido de acuerdo con el rendimiento de la reacción, en cuanto a la cantidad de hemocianina final obtenida. Brevemente, 1 mg de proteína se disolvió en un volumen final de 200 μ l de tampón 130 mM Glicina, NaOH pH 8,6 y se calentó a 60°C durante 10 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agregaron 2 μ l de PNGasa F disuelta en agua bidestilada de grado clínico (B. Braun, Melsungen, Alemania), y se incubó durante 24 horas a 37°C en baño termorregulado. La reacción se detuvo guardando las preparaciones a 4°C.

La desglicosilación química se realizó mediante tratamiento con peryodato de sodio [54]. Brevemente, 5 mg de proteína se disolvieron en 10 ml de peryodato de sodio 15 mM (Merck, Darmstadt, Alemania), preparado en PBS pH 7,2. Se incubó por 24 horas en oscuridad, a temperatura ambiente y con agitación. Para detener la reacción se agregaron 25 μ l de glicerol por cada ml de solución, y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.

En ambos métodos de desglicosilación, luego de detener la reacción, las proteínas se lavaron con PBS 5 mM MgCl₂, 5 mM CaCl₂ pH 7,2 en tubos Amicon Ultra-15 10K MWCO (Millipore, Massachusetts, USA), centrifugando a 5.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Finalmente, la soluciones conteniendo las proteínas se pasaron por un filtro de 0,22 μ m (Whatman, Midstone, UK). La concentración final de proteínas se determinó por el método colorimétrico Pierce® 660 nm (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del fabricante, usando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA).

6.1.2 Dot blot con lectinas y tinción de PAS

Se utilizó el procedimiento general de Schumacher y cols [55]. En una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm se agregaron 30 μg de proteína con ayuda del dispositivo Biodot Microfiltration Apparatus[®] (Bio-Rad, California, USA). La detección de las glicosilaciones se realizó mediante incubación con lectinas y tinción de PAS. En el primer caso, se incubó la membrana con tampón de bloqueo (1% BSA 0,05% Tween 20 en PBS pH 7,2) durante 1 hora, y se incubó con las lectinas biotiniladas Concanavalina A (ConA) o Aglutinina de Maní (PNA) (Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el mismo tampón durante 90 minutos. Posteriormente, se incubó con Avidina-Fosfatasa Alcalina (FAL) (Thermo Fisher Scientific) 1:3.000 en tampón de bloqueo durante 30 minutos, y se reveló con el reactivo NBT-BCIP[®] (Thermo Fisher Scientific). En el caso de la detección mediante tinción de PAS (Ácido peryodico de Schiff), se utilizó el kit *Pierce[®] Glycoprotein Staining Kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.1.3 Lectin Array Blot

Se realizaron análisis adicionales del contenido de azúcares de las hemocianinas nativas y desglicosiladas mediante *Lectin array blot* [56], servicio que se solicitó a Asparia Glycomics. Brevemente, las hemocianinas (0,5 mg/ml) fueron marcadas con el reactivo Alexa-555-NHS dye, y posteriormente diluidas en PBS 0,5% Tween-20, 0,4 mg/ml BSA y 0,3 mM CaCl_2 . Las proteínas marcadas fueron incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente, en láminas de vidrio previamente preparadas con 48 lectinas diferentes. Finalmente, las láminas de vidrio se lavaron con PBS durante 5 minutos y se escanearon en el equipo G265BA Microarray Scanner (Agilent Technologies, California, USA). Los datos obtenidos se analizaron con el programa ProScan Array Express software (PerkinElmer, Massachusetts, USA).

6.1.4 SDS-PAGE

Se prepararon geles en gradiente de acrilamida de 5-15% para el gel separador, y 5% para el gel concentrador, según el método de Laemmli [57]. Se cargaron 2-5 μg de proteína por carril, las cuales fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos, en presencia de SDS y β -mercaptoetanol. La electroforesis se realizó en tampón de corrida (0,1 M Tris, 0,1 M HEPES, 3 mM SDS, pH 8,0), a 60 V durante 1 hora, y a 100 V durante 3 horas. Los geles se tiñeron durante 20 minutos con una solución 0,5% Azul de Coomassie, 50% metanol y 10% ácido acético, y luego se destiñeron en una solución 50% metanol y 10% ácido acético durante toda la noche. Se usó el estándar de peso molecular Kaleidoscope™ Precision Plus Protein (Bio-Rad, USA).

6.1.5 Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Se utilizó el procedimiento de De Ioannes y cols. con modificaciones [7]. Se agregaron 20 μl de hemocianina (0,6 mg/ml) en grillas de cobre recubiertas con parlodion, previamente estabilizadas por evaporación al vacío. Las muestras se tiñeron con 20 μl de acetato de uranilo 1-2% durante 30 segundos. Las grillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en un microscopio electrónico Phillips Tecnai 12, en el Servicio de Microscopía de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Se tomaron entre 15 y 20 imágenes representativas de distintas muestras y distintos campos, a 80KV con aumentos de 60.000x y 87.000x.

6.1.6 Dicroísmo circular

Los análisis mediante dicroísmo circular se realizaron según lo descrito por Kelly y cols. [58]. Para estudiar la estructura secundaria de las hemocianinas, los espectros de cada hemocianina se midieron en la región UV lejana (190-260 nm), en un espectropolarímetro JASCO, modelo J-810 (JASCO, Essex, UK) de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (Santiago, Chile). Se utilizaron 200 μl de cada proteína, a una concentración de 0,25 mg/ml, en cubetas de 0,1 cm de paso óptico, a 25 °C. Para realizar las curvas de

desplegamiento, las hemocianinas fueron incubadas con concentraciones crecientes de Guanidinio-HCl (0-6,7 M) durante 24 horas. Para realizar las curvas de replegamiento, las hemocianinas fueron incubadas durante 24 horas con Guanidinio-HCl 6,7 M, y posteriormente diluidas en PBS para obtener distintas concentraciones de Guanidinio-HCl (0,5 – 6,7 M). Para todas las muestras, se tomaron espectros entre 210-260 nm, y además se midió la señal de dicroísmo a 222 nm durante 1 minuto. En todas las muestras la concentración final de hemocianina fue de 0,25 mg/ml.

6.2 Estudio de la unión de hemocianinas nativas y desglicosiladas a CLR.

6.2.1 Ensayos de unión de hemocianinas a CLR mediante ELISA.

Los ensayos de unión se realizaron mediante ELISA según el procedimiento general descrito por Royer y cols. [59]. Brevemente, placas de poliestireno fueron activadas con 50 µl de hemocianina nativa o desglicosilada, a concentraciones variables (0,5-10 µg/ml en PBS pH 7,2), durante toda la noche a 4°C. Como controles positivos se usaron furfurman (extracto de pared celular de *Malassezia furfur*) (Invivogen), y zimozano (extracto de pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*), (Aberdeen University, UK). Como control negativo se usó gelatina (Merck). Todos los controles se usaron a 10 µg/ml en PBS pH 7,2. Posteriormente, se incubó con 50 µl de los receptores quiméricos (MR-Fc 1 µg/ml, Dectina-1-Fc 2,5 µg/ml, y Dectina-2-Fc 2 µg/ml). Los receptores se diluyeron en tampón TBS (10 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂·2H₂O, 154 mM NaCl y 0,05% [v/v] Tween 20, pH 7,5), y se incubaron con las hemocianinas durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se incubó con 50 µl de suero de cabra anti-IgG humana (Sigma-Aldrich) acoplado a FAL, diluido 1:1.000 en TBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre cada paso, la placa fue lavada 3 veces con 250 µl de TBS. Finalmente, se reveló adicionando 50 µl de p-nitrofenilfosfato (pNPP) (Thermo Scientific, USA) diluido a 1 mg/ml en tampón FAL (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂·6H₂O, pH 9,5), incubando a 37°C y leyendo la absorbancia a 405 nm en el lector de placas de ELISA SynergyHTX (Biotek, Vermont, USA).

6.2.2 Ensayos de inhibición de la unión de hemocianinas a CLR's por ELISA.

Placas de poliestireno fueron activadas con 50 µl de hemocianinas, nativas o desglucosiladas, a una concentración de 10 µg/ml y se incubó a 4°C toda la noche. Como controles positivos se usaron furfurman y zimozano. Como control negativo se usó gelatina. Los controles, al igual que las hemocianinas, fueron incubados a 10 µg/ml en PBS pH 7,2. Al día siguiente, se agregaron 50 µl de los receptores quiméricos (MR-Fc 1 µg/ml, Dectina-1-Fc 2,5 µg/ml, y Dectina-2-Fc 2 µg/ml), los cuales fueron previamente incubados con concentraciones crecientes (0-40 mM) de D-(+)-manosa (Sigma-Aldrich) o D-(+)-galactosa (Alfa Aesar, Massachusetts, USA), según correspondiese, durante 30 minutos. Se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 2 horas, y luego se incubó con 50 µl de un suero de cabra anti-IgG humano (Sigma-Aldrich) acoplado a FAL, diluido 1:1.000 en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre cada paso, la placa fue lavada 3 veces con 250 µL de TBS. Finalmente, se reveló adicionando 50 µL de pNPP 1 mg/mL en tampón FAL, incubando a 37°C y leyendo la absorbancia a 405 nm en el lector de placas de ELISA SynergyHTX (Biotek).

6.3 Estudio de la incorporación de hemocianinas nativas y N-desglucosiladas en APCs cultivadas *in vitro*, mediante citometría de flujo.

6.3.1 Hemocianinas conjugadas a fluoróforo.

Las hemocianinas fueron marcadas con los reactivos DyLight NHS Ester 488 y 594 (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las hemocianinas fueron diluidas 1:5 en PBS pH 7,2 y se agregaron 100 µl de Bicarbonato 1 M para alcanzar un pH de 8,5. Las proteínas y el reactivo de tinción, disueltos en dimetilformamida, se mezclaron en proporción 1:7, respectivamente. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, y la reacción se detuvo con la adición de un exceso de hidroxilamina pH 6,5. Se dejó reposar 30 minutos y se centrifugó en tubos Amicon Ultra-15 10K MWCO (Millipore, USA), centrifugando a 5.000 rpm durante 15 minutos, al menos 6 veces, agregando 10 ml de PBS pH 7,2 entre cada centrifugación. Las hemocianinas marcadas se almacenaron en oscuridad, a 4°C hasta su posterior uso.

6.3.2 Cultivo de la línea celular J774.2.

La línea celular de macrófagos murinos J774.2 fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 1 mM solución de aminoácidos no esenciales MEM (*minimum essential medium*), 1 mM penicilina y estreptomycin (todos de HyClone, Utah, USA), en adelante medio completo. En todos los experimentos, las células fueron cosechadas mediante una incubación con tripsina 0,25% EDTA 0,1% (HyClone) durante 10 minutos, y posterior adición de un volumen equivalente de medio completo para neutralizar la tripsina. Las células cosechadas se centrifugaron a 1.600 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se resuspendieron en 10 ml de medio completo. El conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer. Para expandir las células, estas fueron diluidas 1:6 en medio completo, mientras que, para los análisis posteriores, se sembraron entre 2,5x10⁵ y 3x10⁵ células por condición experimental, en placas de 24 pocillos.

6.3.3 Análisis de marcadores de superficie y CLR en la línea celular J774.2.

Las células J774.2 previamente sembradas en placas de 24 pocillos se lavaron con PBS Dulbecco (Thermo Fisher Scientific), y se incubaron con los anticuerpos primarios en PBS-SFB 2% en una dilución 1:50 o 1:100, según correspondiese. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-Dectina-1, anti-Dectina-2, anti-MGL, anti-TLR4 (Abcam), y anti-MR (BioLegend), además del control de isotipo IgG2a de rata (Abcam). Se incubó a 4°C durante 1 hora, y posteriormente se lavó con PBS-SFB 2%. Luego se incubó con el anticuerpo secundario (suero de cabra anti-IgG de rata-FITC, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:100 en PBS-SFB 2%, durante 30 minutos en oscuridad. Las células se lavaron nuevamente, y se incubaron 30 minutos en oscuridad a 4°C, con diluciones 1:100 en PBS-SFB 2% de los anticuerpos para marcadores celulares anti-F4/80-AlexaFluor647 (marcador de macrófagos), anti-MHC-I-FITC y anti-MHC-II-FITC (BioLegend). Finalmente, se lavó con PBS-SFB 2% dos veces, y se fijó con PBS-para-formaldehído (PBS-PFA) 2%, manteniendo los tubos a 4°C en oscuridad. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACSort de BD (Servicio de citometría de flujo, Laboratorio de Inmunología dirigido por la Dra.

María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), y los datos se trataron posteriormente utilizando el programa FlowJo 6.0 (Oregón, USA).

6.3.4 Unión/incorporación de hemocianinas en la línea celular J774.2.

Las células J774.2 previamente sembradas en placas de 24 pocillos se lavaron con PBS Dulbecco (Thermo Fisher Scientific), y se incubaron con 100 µl de hemocianina conjugada a fluoróforo (AlexaFluor-488), nativa o N-desglicosilada según se especifique. Las hemocianinas nativas se incubaron a 10 y 100 µg/ml, en medio sin suero, durante 1 y 3 horas para establecer el mejor protocolo, correspondiente a la incubación a 50 µg/ml durante 1 hora. Posteriormente, se desprendieron las células con PBS EDTA (HyClone) 5 mM, se lavó con PBS-SFB 2% y se incubó con la sonda de viabilidad eFluor 780 (Thermo Fisher Scientific) 1:1.000, durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Se lavó nuevamente y se fijó con PBS-PFA 2%, manteniendo los tubos a 4°C en oscuridad. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACSORT de BD (Servicio de citometría de flujo, Laboratorio de Inmunología dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), y los datos se trataron posteriormente utilizando el programa FlowJo 6.0 (Oregón, USA).

6.3.5 Inhibición de la incorporación de hemocianinas en la línea celular J774.2.

Las células J774.2 previamente sembradas en placas de 24 pocillos se lavaron con PBS Dulbecco (Thermo Fisher Scientific), y se incubaron con 200 µl de D-(+)-Manosa (Sigma-Aldrich), D-(+)-Fucosa y D-(+)-galactosa (Alfa Aesar) a una concentración de 100 mM. También se ensayó la incubación con el inhibidor de macropinocitosis N,N-dimetilamilorida (DMA) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 200 µg/ml. Todas las condiciones se realizaron en un volumen final de 200 µl, durante 30 minutos a 37°C. Posterior a los tratamientos mencionados, se incubó con 100 µl de hemocianina conjugada a fluoróforo (AlexaFluor-488) a 50 µg/ml, en medio sin suero, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se desprendieron las células con PBS EDTA 5 mM (HyClone). Se lavó con PBS-SFB 2% y se incubó con la sonda de viabilidad

eFluor 780 1:1.000 (Thermo Fisher Scientific), durante 30 minutos, a 4°C y en oscuridad. Se lavó nuevamente y se fijó con PBS-PFA 2%, manteniendo los tubos a 4°C en oscuridad. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACSsort de BD (Servicio de citometría de flujo, Laboratorio de Inmunología dirigido por la Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile), y los datos se trataron posteriormente utilizando el programa FlowJo 6.0 (Oregón, USA).

6.3.6 Análisis de la producción de citoquinas, inducida por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas en cultivos de células J774.2.

Se sembraron 5×10^5 células J774.2 en placas de 24 pocillos, en un volumen final de 1 ml de medio completo. Una vez adheridas a la placa, las células se incubaron con hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, a una concentración de 500 µg/ml, en un volumen final de 1 ml, durante 16 y 24 horas, a 37°C. Como control positivo, las células fueron incubadas con LPS de *E. Coli* (Enzo Life Sciences, New York, USA), a una concentración de 100 ng/ml. Como control negativo, las células fueron incubadas sólo con el medio de cultivo, sin adición de hemocianina. Los sobrenadantes fueron colectados y se congelaron a -80°C hasta su posterior análisis.

Para la cuantificación de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos, se realizó una determinación mediante ensayos de ELISA, utilizando los kits comerciales de BD OptEIA™ (BD Biosciences, California, USA) para detectar IL-6, IL-12p40, IFN-γ y TNF-α, según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se activaron placas de ELISA con 100 µl de un anticuerpo de captura para cada citoquina, incubando a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se bloqueó con PBS-SFB 10% durante 1 hora, y se incubó con 100 µl de cada sobrenadante, durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego se incubó con 100 µl de anticuerpo de detección acoplado a peroxidasa de rábano (HRP), durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre cada paso, la placa fue lavada 3-6 veces con 250 µl de PBS-Tween-20 0,05%. Finalmente, se agregaron 100 µl del sustrato 3,3'-5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Thermo Fisher Scientific), se incubó 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, y la reacción se detuvo agregando 50 µl de ácido sulfúrico 2M. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas de ELISA SynergyHTX (Biotek), y los valores fueron corregidos sustrayendo la absorbancia a 570 nm.

6.4 Determinación de la respuesta humoral y antitumoral producida por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas *in vivo*, en un modelo murino de melanoma.

6.4.1 Animales de experimentación

Ratones C57BL/6 de 8-12 semanas, mantenidos según las condiciones descritas en el apartado 5.1.2, fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos experimentales de 3 o 5 ratones cada uno, según se especifica en cada experimento. Los grupos correspondieron a ratones inmunizados con CCH nativa, FLH nativa, KLH nativa, CCH N-desglicosilada, FLH N-desglicosilada KLH N-desglicosilada, y sólo PBS como control, correspondiente al vehículo de las hemocianinas. Los ratones fueron marcados con picrato de sodio saturado en agua en sus patas traseras o delanteras para distinguir entre grupos. Así mismo, dentro de cada grupo los ratones fueron marcados mediante una pequeña incisión en la oreja derecha, izquierda, o ambas, para distinguirlos individualmente.

6.4.2 Cultivo celular de la línea de melanoma murino B16F10

La línea de células de melanoma murino, B16F10, fue cultivada a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, en medio RPMI-1640 suplementado con 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 1 mM solución de aminoácidos no esenciales MEM, 1 mM penicilina y estreptomina, (todos de HyClone), en adelante medio completo. Las células fueron cosechadas en fase exponencial, mediante tratamiento con tripsina 0,25% EDTA 0,1 % (HyClone) durante 5 minutos, y posterior adición de un volumen equivalente de medio completo. Las células cosechadas se centrifugaron a 1.600 rpm durante 5 minutos a 4°C, y se resuspendieron en 10 ml de medio completo. El conteo se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

6.4.3 Análisis de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas.

Ratones C57BL/6 (3 por grupo) fueron inmunizados intraperitonealmente con 200 µg de hemocianina nativa o N-desglicosilada, en un volumen final de 100 µl, los días 1, 15 y 42. Como control, se inmunizó un grupo con PBS, vehículo de las hemocianinas. Al día 52 del experimento

se realizó la sangría de los ratones, las muestras recolectadas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 minutos para obtener el suero. Los tubos con suero fueron almacenados a -20°C hasta su posterior uso.

Para cuantificar el título de anticuerpos se utilizó el protocolo descrito por Arancibia y cols. [8]. Para esto, se activaron placas de ELISA con 100 µl de hemocianina (10 µg/ml) por pocillo, nativa o N-desglicosilada, y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las placas se bloquearon con 100 µl PBS 1% Caseína (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente, y se incubaron con 50 µl del suero correspondiente, previamente obtenido de la sangría, haciendo diluciones seriadas de los mismos en PBS 1% Caseína. La incubación se realizó durante 90 minutos a 37°C en un baño termorregulado. Luego se agregaron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG murino (Thermo Fisher Scientific) 1:2.500 en PBS 1% Caseína, incubando a 37°C durante 30 minutos, y se reveló usando pNPP 1 mg/ml en tampón FAL, incubando a 37°C y leyendo la absorbancia a 405 nm en el lector de placas de ELISA SynergyHTX (Biotek). Entre cada etapa las placas fueron lavadas con PBS 1% Caseína. El título de anticuerpos se definió operacionalmente como la dilución del suero a la cual se obtuvo la mitad de la absorbancia máxima.

6.4.4 Ensayo antitumoral en un modelo murino de melanoma

Se siguió el protocolo descrito por Arancibia y cols. con modificaciones [8]. Ratones C57BL/6 (5 por grupo) fueron inmunizados intraperitonealmente con 400 µg de hemocianina nativa o N-desglicosilada, en un volumen final de 100 µl, dos semanas antes del experimento (día -14) a modo de sensibilización o *priming*. Se incluyó un grupo control que fue inmunizado sólo con PBS, vehículo de las hemocianinas. El día 0 del experimento, todos los grupos fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de la línea B16F10, en un volumen final de 100 µl de medio RPMI-1640 con 2% de suero fetal bovino, mediante inyección subcutánea. Dosis terapéuticas vía subcutánea de 100 µg de cada hemocianina nativa, N-desglicosilada o PBS, según correspondiese, en un volumen final de 100 µl, fueron administradas los días 1, 4, 7, 10, 14 y 18 del experimento. Se monitoreó visualmente y por palpación cada 3 días la aparición de tumores

y las dimensiones de los mismos, así como el estado de salud de los animales de experimentación. El volumen tumoral se estimó midiendo el largo y ancho del tumor, y posteriormente, utilizando la fórmula del elipsoide $[(\text{largo} \times \text{ancho} \times \text{ancho})/2]$. El día 25 del experimento los animales fueron sangrados para obtener los sueros inmunes y estimar el título de anticuerpos (véase apartado 6.4.3) y posteriormente fueron eutanasiados mediante dislocación cervical, acorde a las normas bioéticas.

6.5 Análisis estadísticos

La mayoría de los experimentos se realizaron al menos dos veces de forma independiente, en duplicado o triplicado cuando fue posible. Los resultados fueron graficados utilizando el programa GraphPad Prism 6 (California, USA), y analizados mediante test T de Student, o ANOVA de una o dos vías, según se indique en cada caso.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de las hemocianinas desglicosiladas según parámetros bioquímicos.

7.1.1 Análisis de azúcares remanentes en hemocianinas desglicosiladas química y enzimáticamente.

Las hemocianinas de molusco en estudio, a saber, CCH, FLH, y KLH, fueron desglicosiladas química y enzimáticamente, mediante tratamiento con peryodato de sodio e incubación con la enzima PNGasa F, respectivamente. Para verificar la remoción de los azúcares, las hemocianinas se analizaron mediante *dot blot*, con lectinas y con tinción de PAS, utilizando las proteínas nativas como control positivo. En el caso de las hemocianinas desglicosiladas químicamente, se observó la remoción de gran parte de sus azúcares al compararlas con las hemocianinas nativas, sin embargo, se detectó la presencia de glicosilaciones remanentes, correspondientes tanto a N-glicosilaciones, que fueron reactivas con Concanavalina A (ConA), como a O-glicosilaciones, que fueron reactivas con Aglutinina de maní (PNA) (**figuras 5 y 6**). El análisis de estas mismas proteínas mediante *dot blot* utilizando la tinción de PAS, método que revela la presencia de azúcares de forma inespecífica, mostró resultados concordantes con los anteriores, ya que también se observaron restos de azúcares en la estructura de las tres hemocianinas (**figura 7**).

Así mismo, las hemocianinas tratadas con PNGasa F fueron analizadas utilizando la misma metodología antes señalada. Se observó mediante *dot blot* con lectinas que hubo una remoción significativa de los N-glúcidos, así como también una reactividad atribuible a las O-glicosilaciones presentes en las tres hemocianinas (**figuras 5 y 6**). Además, mediante *dot blot* con tinción de PAS (**figura 7**), se observó una señal remanente, indicadora de glicosilaciones que, de acuerdo con la información del proveedor de la enzima (Asparia Glycomics), se puede atribuir a O-glicosilaciones, o a glúcidos fucosilados [60].

El conjunto de estos resultados indica que ambos métodos de desglicosilación son parciales, sin embargo, los datos indican que la desglicosilación más exhaustiva y específica de las hemocianinas fue la realizada enzimáticamente.

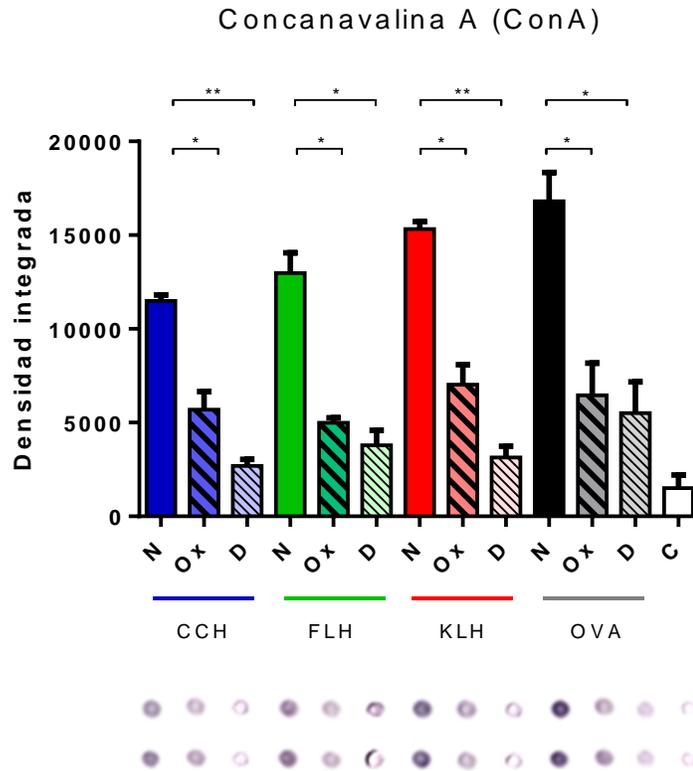


Figura 5. Análisis de las hemocianinas (CCH, FLH y KLH) nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D), mediante dot blot utilizando ConA. En membranas de nitrocelulosa, se colocaron 30 μg /punto de cada hemocianina y de Ovoalbúmina (OVA) como control, y se incubó con la lectina biotinilada Concanavalina A (ConA, específica para N-glicosilaciones) a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS 0,05% Tween-20. Posteriormente, se incubó con Avidina-FAL 1:3.000 y se reveló con el reactivo NBT-BCIP. Las membranas se escanearon y analizaron con el programa ImageJ. Los datos se muestran como promedio \pm SEM. Análisis estadístico mediante el test T. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. La barra en blanco (C) representa un control, en que la membrana se incubó con todos los reactivos, pero sin hemocianina. Figura representativa de al menos tres experimentos independientes.

Aglutinina de maní (PNA)

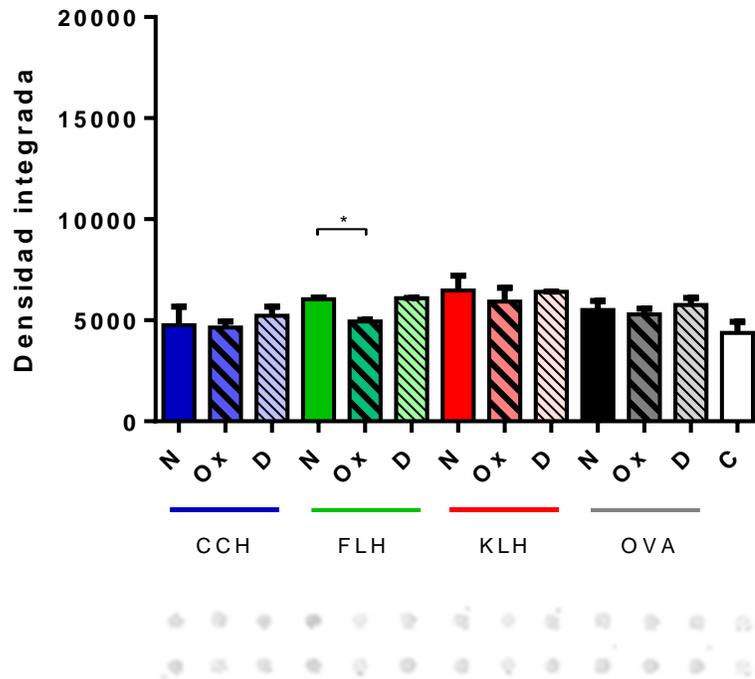


Figura 6. Análisis de hemocianinas (CCH, FLH y KLH) nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D), mediante dot blot utilizando PNA. En membranas de nitrocelulosa, se colocaron 30 μg /punto de cada hemocianina y de Ovoalbúmina (OVA) como control, y se incubó con la lectina biotinilada Aglutinina de maní (PNA, específica para O-glicosilaciones) a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS 0,05% Tween-20. Posteriormente, se incubó con Avidina-FAL 1:3.000 y se reveló con el reactivo NBT-BCIP. Las membranas se escanearon y analizaron con el programa ImageJ. Los datos se muestran como promedio \pm SD. Análisis estadístico mediante el test T. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. La barra en blanco (C) representa un control, en que la membrana se incubó con todos los reactivos, pero sin hemocianina. Figura representativa de al menos tres experimentos independientes.

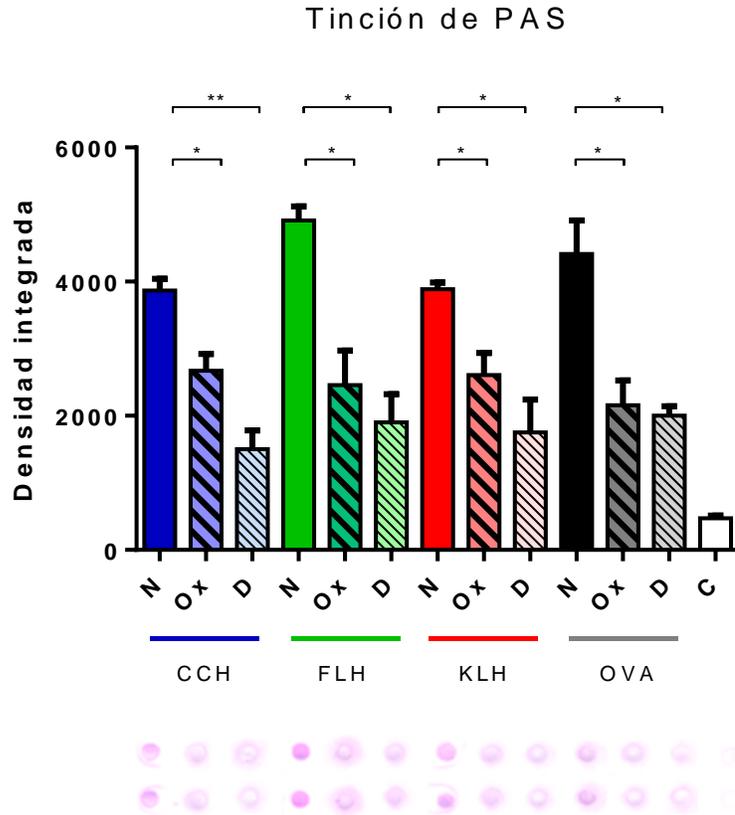


Figura 7. Análisis de hemocianinas nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente (D) mediante *dot blot* con tinción de PAS. Se agregaron 30 μg /punto de cada hemocianina y de Ovoalbúmina (OVA) como control en una membrana de nitrocelulosa, y se analizó mediante tinción de PAS, utilizando los reactivos de Pierce® Glycoprotein Staining Kit. Las membranas se escanearon y analizaron con el software ImageJ. Los datos se muestran como promedio \pm SEM. Análisis estadístico mediante test T. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. La barra en blanco (C) representa un control, en que la membrana se incubó con todos los reactivos, pero sin hemocianina. Figura representativa de al menos tres experimentos independientes.

7.1.2 Estudios mediante *Lectin array blot*

Se debe considerar que los análisis anteriores poseen ciertas limitaciones, ya que ambos métodos pueden dar una alta señal de fondo inespecífica. Además, en estos ensayos se utilizaron 2 lectinas que detectan de manera general N- y O-glicosilaciones expuestas en la molécula, sin embargo, puede haber azúcares remanentes que no sean ligandos de las lectinas utilizadas. Por esta razón, para complementar los análisis anteriores, se realizó un estudio adicional, mediante *Lectin array blot* (Asparia Glycomics). En este análisis, las hemocianinas nativas y N-desglicosiladas enzimáticamente, fueron marcadas con una sonda fluorescente (AlexaFluor-555) y posteriormente, fueron incubadas con 40 lectinas diferentes (véase en **tabla 1** el nombre, sigla y especificidad de cada una), que reconocen distintos monosacáridos. Luego, se analizó en una escala arbitraria la afinidad de la unión de cada lectina con cada hemocianina. Además, como control del procedimiento, se utilizó Ovoalbúmina (OVA) nativa y N-desglicosilada, debido a que sus azúcares están caracterizados [61]. Cabe mencionar que este análisis no se realizó en hemocianinas desglicosiladas químicamente, principalmente debido a la dificultad que existe para acoplar sondas fluorescentes a proteínas tratadas con periodato de sodio y, también, debido a que este método de desglicosilación ha probado ser poco selectivo en la remoción de azúcares [54].

Con el fin de facilitar el análisis de estos resultados, de las 40 lectinas ensayadas, en los gráficos se mostrarán sólo las 24 que presentaron unión a las hemocianinas estudiadas. En el análisis de hemocianinas nativas (**figura 8**), se observa que CCH y KLH muestran señales similares, pues ambas se unen a ConA, WGA, LEL, STL, RCA, PSA, LCA, y ACA con distintas afinidades. Este patrón de unión, interpretado de acuerdo con la especificidad de cada lectina (**tabla 1**), indica que ambas hemocianinas poseen principalmente α -manosas y estructuras complejas de N-acetilglucosaminas, además de fucosas unidas a dichos monosacáridos, que son los principales componentes de las N-glicosilaciones. También se detectaron en menor medida N-acetilactosaminas, lactosas y β -galactosas, siendo estas últimas componentes principales de O-glicosilaciones, o parte de N-glicosilaciones mixtas, es decir, N-glicosilaciones que no son necesariamente complejas o ricas en manosa, como se ha descrito en la hemocianina de *H. lucorum* [16,62].

Tabla 1. Panel de Lectinas utilizadas en el análisis mediante *Lectin array blot*.

Monosacárido	Lectina	Especificidad
Manosa (Man)	Concanavalin A (ConA)	α -Man, α -Glc
	Narcissus Pseudonarcissus (NPL)	Man interna y terminal
	Hippeastrum Hybrid (HHL)	α -1,3Man, α -1,6Man
	Vicia faba lectin (VFA)	α -Man, Glc, GlcNAc
	Allium sativum lectin (ASA)	α -1,3-Man
N-Acetilglucosamina (GlcNAc)	Triticum Vulgaris (WGA)	(GlcNAc)-Sial
	Griffonia simplicifolia II (BS-II)	(GlcNAc) terminal
	Lycopersicon esculentum (LEL)	(GlcNAc) ₃ - GlcNAc
	Solanum tuberosum (STL)	(GlcNAc) ₃ , LacNAc-GlcNAc
N-Acetilglucosamina	Phaseolus Vulgaris Agglutining (PHA L)	Cadena compleja
	Phaseolus Vulgaris Agglutining (PHA E)	Cadena compleja
Lactosa	Phaseolus Vulgaris Agglutining (PHA E+L)	Oligosacáridos
	Cicer arietinum (CAL)	Lac en fetuína/ IgM
Ácido siálico	Sambucus nigra (SNA)	α -2-6 Sial-LacNAc
	Maackia amurensis Lectin I (MAL-I)	α -2,3-Sial-LacNAc
	Homarus americanus (HMA)	NeuNAc / GalNAc-Sial
Fucosa	Ulex Europaea Aggl (UEA-I)	α -1,3Fuc
	Pisum sativum (PSA)	Fuc α -1,6 -GlcNAc y α -Man-Fuc
	Lens Culinaris (LCA)	Core complejo de Man/GlcNAc con α -1,6-Fuc
	Lotus tetragonolobus (LTL)	α -Fuc terminal
	Aspergillus oryzae (AOL)	Fuc-Fuc
N-Acetilgalactosamina	Erythrina Cristagalli A (ECA)	Gal, GalNAc
	Vicia villosa B4 (VVL)	GalNAc-GalNAc
	Jacalin (JAC)	GalNAc en antígeno T
	Helix pomatia (HPL)	α -GalNAc y GalNAc terminal
	Sophora japonica (SJA)	GalNAc-GalNAc
	Glycine max (GML-SBA)	GalNAc terminal
	Dolichos biflorus (DBL)	α -GalNAc
	Wisteria floribunda (WFL)	GalNAc
	Salvia sclarea lectin (SSA)	GalNAc terminal
	Helix aspersa (HAL)	GalNAc
Galactosa	Psophocarpus tetragonolobus I (PT-I)	α -GalNAc
	Soybean agglutinin (SBA)	α -Gal-GalNAc
	Ricinus Communis Agglutinin (RCA120)	β -Gal, Lac, LacNAc
	Maackia amurensis Lectin II (MAL-II)	LacNAc Gal
	Agaricus bisporus (ABL)	α -Gal(1-3)GalNAc de antígeno T
	Amarantus Caudatus (ACA)	antígeno T
	Maclura Pomifera (MPA)	antígeno T
	Psophocarpus tetragonolobus II (PT-II)	α -1,2-Fuc-LacNAc
	Griffonia simplicifolia I (BS-I)	α -Gal
	Pseudomonas aeruginosa PA-I (PAL)	Gal
Galactosa	Euonymus Europaeus (EEA)	Lac
	Marasmius oreades agglutinin MOA	Gal- α 1,3Gal y Gal- α 1,3Gal- β 1,4GlcNAc
	Peanut agglutinin (PNA)	Gal- β -1,3 - GalNAc

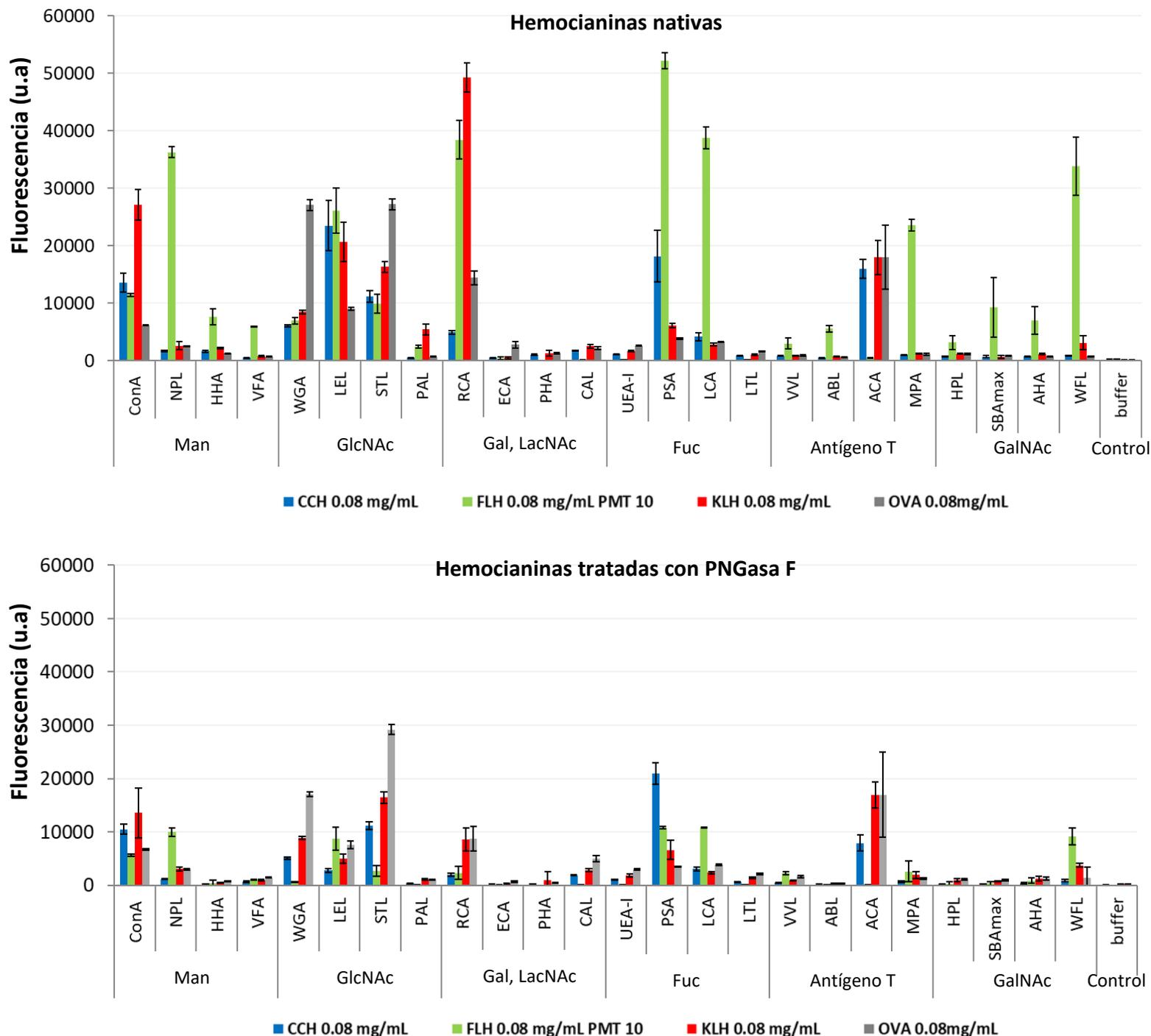


Figura 8. Análisis de glicosilaciones de hemocianinas mediante Lectin array blot. Las hemocianinas CCH, FLH y KLH, y Ovoalbúmina como control (OVA), fueron analizadas mediante un ensayo con 40 lectinas, específicas para Manosa (Man), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), Galactosa (Gal), N-acetilactosamina (LacNAc), Fucosa (Fuc), Antígeno T y N-Acetilgalactosamina (GalNAc). Brevemente, cada proteína fue marcada con el reactivo AlexaFluor-555 Dye e incubada a una concentración de 0,08 mg/ml, durante 1 hora a 37°C, en un arreglo con las lectinas mencionadas (véase en **tabla 1** nombre y especificidad de cada lectina). La unión se cuantificó en unidades arbitrarias de fluorescencia (*fluorescence a.u.*). Para facilitar el análisis, de todas las lectinas ensayadas se graficaron sólo aquellas que presentaron unión a hemocianinas. Los datos se muestran como promedio \pm SEM de 1 experimento realizado en quintuplicado.

También se detectaron α -Glucosas, que corresponden a glicosilaciones que pueden ocurrir de forma no enzimática en las proteínas [63]. Para FLH, además de las lectinas ya mencionadas, se observó unión a NPL, HHA, VFA, MPA, SBAmáx, AHA y WFL. A partir de esto, se concluye que FLH además de compartir los azúcares ya mencionados con CCH y KLH, posee otras glicosilaciones, tales como manosas terminales y N-acetilglucosaminas unidas a α -manosas, que son características de N-glicosilaciones. Respecto a las O-glicosilaciones, se detectó además de galactosa, la presencia de N-acetilgalactosamina, sugiriendo que los azúcares de FLH poseen una mayor variedad de monosacáridos que CCH y KLH. Además, es necesario mencionar que la unión de FLH con algunas lectinas produjo una saturación de la señal de fluorescencia, por lo que esta hemocianina tuvo que ser analizada disminuyendo la intensidad del láser, sugiriendo un contenido mayor de azúcares en dicha proteína que en CCH y KLH. Por otra parte, las tres hemocianinas presentaron unión a lectinas específicas para el antígeno Thomsen-Friedenreich (Gal β 1-3GalNAc), conocido como antígeno T, disacárido característico de células tumorales, cuya presencia en KLH ha sido reportada [22].

Si bien la perspectiva inmunológica se analizará en los objetivos siguientes, el conjunto de estos resultados se relaciona con el potencial inmunoestimulante de las hemocianinas, ya que sus abundantes y variadas glicosilaciones pueden ser blanco de receptores de inmunidad innata, y además podrían corresponder a glicotopos compartidos con antígenos asociados a tumores y como consecuencia, los anticuerpos anti-hemocianina actuarían vía una reacción cruzada, como ya se ha descrito en la bibliografía para KLH [21,64]. Finalmente, los resultados para el control con Ovoalbúmina fueron consistentes con lo descrito, pues esta proteína es reactiva con las lectinas ConA, WGA, LEL, STL y RCA, que indican presencia de manosa y N-acetilglucosamina. Sin embargo, se observó una señal inesperada, correspondiente a la lectina ACA, que es utilizada para identificar el antígeno T, no descrito en OVA. Debido a que ACA reconoce al antígeno T a través de su galactosa, es probable que haya una unión inespecífica de esta lectina a las galactosas presentes en los árboles de glicosilación de OVA, o bien, esta unión podría deberse a alguno de los contaminantes presentes en las muestras comerciales de OVA [61].

El mismo análisis mediante *Lectin array blot* se realizó para las hemocianinas tratadas con la enzima PNGasa F, para corroborar el efecto de esta enzima en proteínas tan grandes y complejas como las hemocianinas. En un análisis general, se puede observar que la fluorescencia disminuye (**figura 8**), aunque también hay reactividad con algunas glicosilaciones remanentes, destacándose así la alta sensibilidad de esta metodología [56].

Para un análisis más detallado, se realizó una comparación de la señal entregada por cada hemocianina nativa y su correspondiente tratada con PNGasa F. En el caso de CCH (**figura 9**), disminuyó en distintas proporciones la unión a ConA, NPL, HHA, WGA, LEL, RCA, PHA y ACA, indicando una remoción parcial de estructuras complejas de N-acetilglucosamina y α -manosa, además de N-acetilactosamina y galactosa. Por otra parte, no disminuye la unión a STL ni PSA, indicando que hay N-acetilactosaminas y fucosas que no son removidas por la enzima. En el caso de FLH, se observa una disminución en la unión a todas las lectinas, quedando sólo algunas señales que indican manosas, fucosas, galactosas y N-acetilgalactosaminas remanentes, dadas por la unión a ConA, NPL, LEL, PSA, LCA, y WFL.

Finalmente, en el caso de KLH, nuevamente el resultado es muy similar al obtenido con CCH, pues disminuye su unión a ConA, LEL y RCA, indicando remoción de manosas, N-acetilglucosaminas y galactosas, pero dejando intactas las señales de fucosa, N-acetilactosaminas y galactosas, dadas por la unión a ACA, STL y PSA. En todos los casos, la disminución en la señal de galactosa podría implicar que parte de estos monosacáridos se encuentran en N-glúcidos formando azúcares mixtos, como se ha descrito en otras hemocianinas de gastrópodos, como el caso de *H. lucorum* [16]. Por otra parte, según datos del proveedor, algunas fucosas presentes en N-glicosilaciones pueden impedir la unión de la enzima a su ligando, afectando por ende la remoción de algunos N-glúcidos. Ya que la unión de hemocianinas a lectinas que se unen a fucosa no disminuye al tratar estas proteínas con PNGasa F, se puede sugerir que estos monosacáridos estarían inhibiendo parcialmente a la enzima, y que las señales remanentes de manosa y N-acetilglucosamina probablemente correspondan a monosacáridos presentes en N-glicosilaciones fucosiladas.

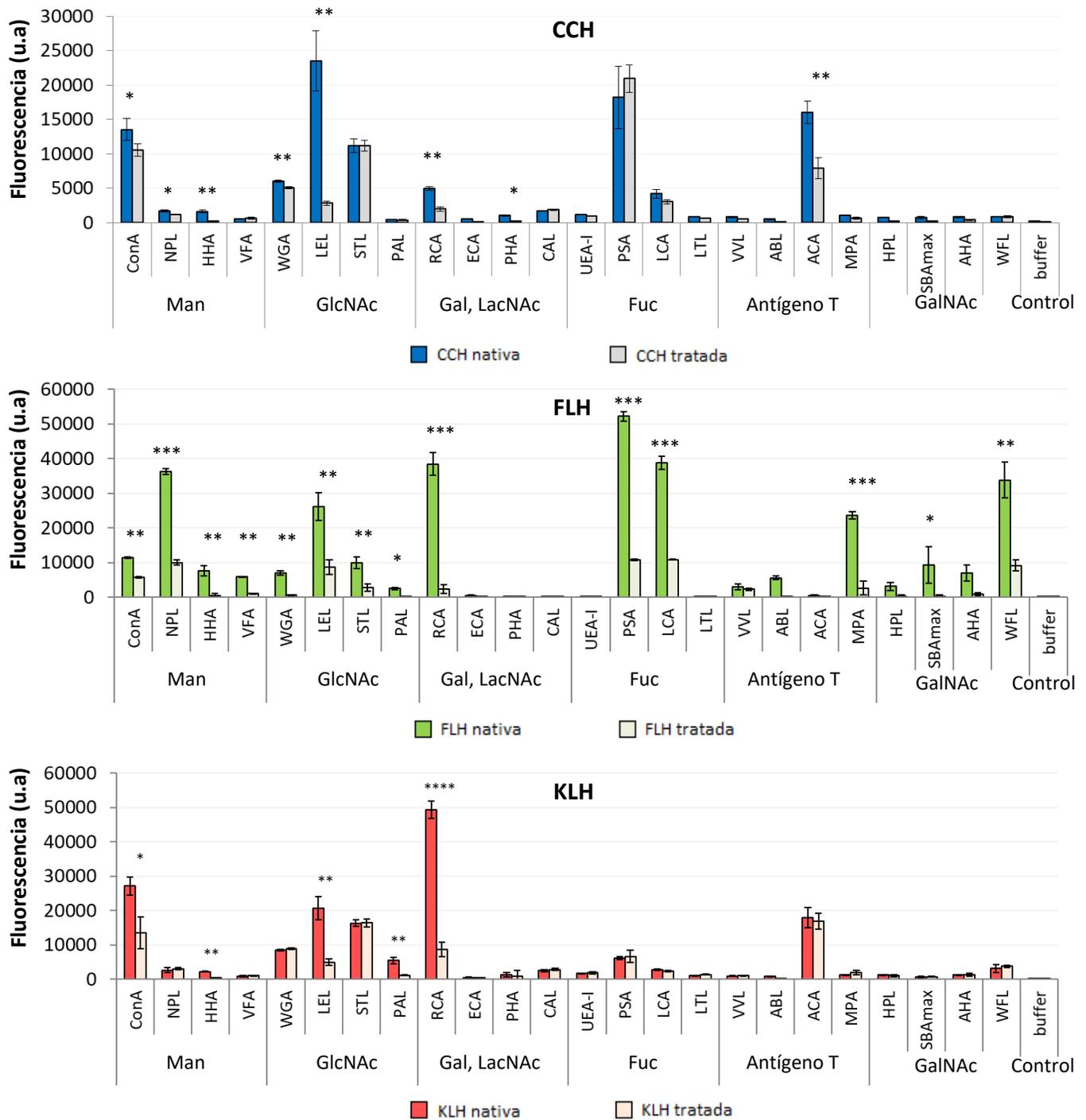


Figura 9. Comparación de la unión a distintas lectinas mediante *Lectin array blot* de CCH, FLH y KLH, nativas y N-desglicosiladas. Las hemocianinas nativas y tratadas con PNGasa F fueron analizadas mediante un ensayo con lectinas específicas para Manosa (Man), N-Acetilglucosamina (GlcNAc), Galactosa (Gal), N-acetilactosamina (LacNac), Fucosa (Fuc), Antígeno T y N-Acetilgalactosamina (GalNAc). Brevemente, cada proteína fue marcada con el reactivo AlexaFluor-555 Dye e incubada a una concentración de 0,08 mg/ml, durante 1 hora a 37°C, en un arreglo con las lectinas mencionadas (véase en **tabla 1** nombre y especificidad de cada lectina). La unión se cuantificó en unidades arbitrarias de fluorescencia (*fluorescence a.u.*). Los datos se muestran como promedio \pm SEM de 1 experimento realizado en quintuplicado. Análisis estadístico mediante ANOVA de una vía. Comparación de la unión de hemocianinas nativas vs. N-desglicosiladas a cada de lectina. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

A partir de los resultados expuestos, se puede sugerir que FLH tiene una mayor diversidad de azúcares que CCH y KLH, y además un mayor número de glicosilaciones, como lo señalan también los análisis mediante SDS-PAGE. Si bien la perspectiva estructural se abordará a continuación, se cuantificó con el programa ImageJ la diferencia en la migración electroforética de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas (**Tabla 2**), y en base a esta diferencia se estableció el porcentaje de azúcares que fueron removidos mediante el tratamiento con PNGasa F. El porcentaje estimado de azúcares removidos, según la diferencia en el peso molecular estimado, fue de un 2,74% (p/p) y un 2,31% (p/p), en CCH y KLH, respectivamente, mientras que en FLH la remoción alcanzó un 4,1% (p/p). Los porcentajes reportados por la bibliografía establecen que las glicosilaciones totales de CCH y KLH serían alrededor de un 3,2%-3,4% (p/p) [65,66], y aunque este dato no está reportado para FLH, según estos resultados se estima que sus glicosilaciones totales estarían en torno al 4% (p/p).

En resumen, la técnica de *Lectin array blot* mostró ser altamente sensible, mientras que los *dot blots* realizados como primera aproximación de este trabajo, representaron una técnica de menor sensibilidad, en la que se detectan azúcares preferentemente en el rango μM [67]. A partir de los resultados expuestos, se puede concluir entonces, que hay una remoción significativa de las N-glicosilaciones en las hemocianinas tratadas con PNGasa F, resultado que consideramos novedoso para proteínas tan complejas como CCH, FLH y KLH, en las que es probable que el acceso de la enzima a algunos de los árboles azucarados se vea impedido [18].

7.1.3 Evaluación de cambios estructurales en hemocianinas nativas y desglicosiladas mediante SDS-PAGE.

Para caracterizar las diferencias estructurales entre hemocianinas nativas y desglicosiladas, se realizó como primera aproximación un análisis mediante SDS-PAGE (**figura 10**), pues permite identificar las diferencias en la migración electroforética, así como la integridad estructural de una proteína.

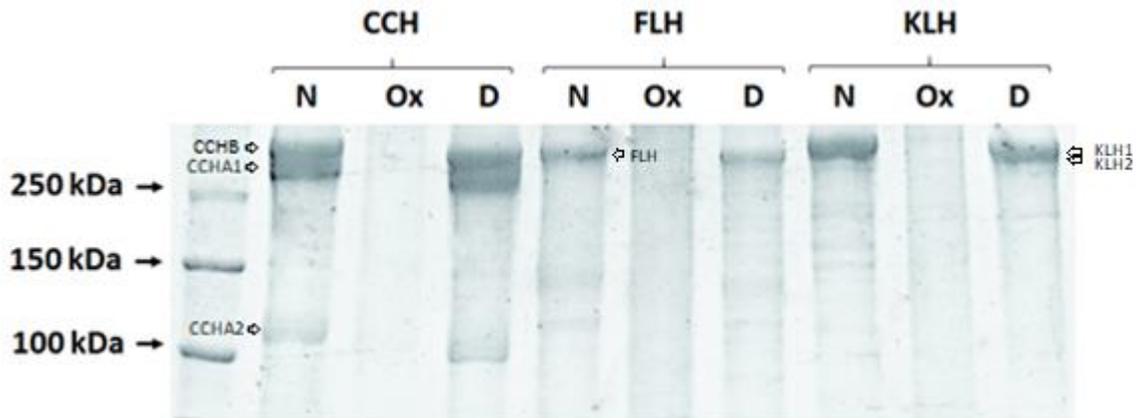


Figura 10. Análisis mediante SDS-PAGE de hemocianinas nativas (N), desglucosiladas químicamente (Ox) y N-desglucosiladas enzimáticamente con PNGasa F (D). Gel en gradiente de acrilamida (5-15%), teñido con Azul de Coomassie, en el que se cargaron 2 µg de proteína por carril. A la izquierda se señalan los estándares de peso molecular. Además, se señalan las subunidades características de cada hemocianina; CCH (CCH B y los fragmentos CCHA1 y CCHA2) FLH (una sola banda) y KLH (KLH1 y KLH2). Imagen representativa de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 2. Porcentaje de azúcares removidos por la enzima PNGasa F en CCH, FLH y KLH.

HEMOCIANINA	% TOTAL DE AZÚCARES REPORTADO	% DE N-GLÚCIDOS REMOVIDOS	% TOTAL DE AZÚCARES ESTIMADO
CCH	3,1 [65]	2,74 ± 0,42	
FLH	ND	4,10 ± 1,12	5,47
KLH	3,4 [12]	2,31 ± 0,42	

Se realizaron electroforesis en geles de acrilamida (SDS-PAGE), y se cuantificó la diferencia de migración electroforética entre hemocianinas nativas y N-desglucosiladas, en al menos 5 geles distintos. A partir de esta diferencia se estimó el porcentaje de azúcares removidos, el cual se presenta como promedio ± SEM, y corresponde a las N-glicosilaciones eliminadas por la enzima PNGasa F. Además, se muestra el porcentaje de azúcares totales reportado en la bibliografía, dato que sólo se encuentra disponible para CCH y KLH, y que no ha sido descrito hasta este trabajo para FLH. ND: no determinado.

Como se observa, CCH presentó sus tres bandas características, una de aproximadamente 350 kDa, correspondiente a la subunidad CCH-B, y dos bandas de aproximadamente 300 kDa y 108 kDa, correspondientes a la subunidad CCH-A que se auto-proteoliza en condiciones denaturantes, en los fragmentos CCH-A1 y CCH-A2, respectivamente [65]. En el caso de FLH, que posee sólo una subunidad, se observa una banda característica de aproximadamente 350 kDa. Para KLH, proteína que posee dos subunidades de peso muy similar en torno a 350 kDa [8], se observa sólo una banda pues sus dos subunidades se superponen. Al analizar la migración electroforética de las proteínas desglicosiladas químicamente y, como ha sido previamente reportado, se observa que ninguna de las hemocianinas ingresa al gel separador. Este efecto se explica pues, la desglicosilación química consiste en una oxidación con periodato de sodio no selectiva, que en algunos casos puede oxidar aminoácidos además de azúcares, formando bases de Schiff y favoreciendo el entrecruzamiento entre aminoácidos [2]. Por otra parte, al analizar la migración electroforética de las hemocianinas N-desglicosiladas enzimáticamente, se observa que el patrón de bandas es similar al de las hemocianinas nativas, pero con un leve desplazamiento en la migración, reflejando la disminución del peso molecular que resulta de la pérdida de sus azúcares. Esta diferencia en la migración fue cuantificada con el programa ImageJ, para estimar el porcentaje de azúcares removidos mediante el tratamiento con PNGasa F (**tabla 2**), como se señaló en el punto 7.1.2. La diferencia entre el porcentaje de azúcares reportado para CCH y KLH y el obtenido en este trabajo, se explican en parte porque solo se han removido las N-glicosilaciones.

7.1.4 Análisis de los cambios en la estructura cuaternaria de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas.

Respecto a las estructuras cuaternarias características de las hemocianinas, conocidas como didecámeros, se ha descrito en hemocianinas de cefalópodos que la N-desglicosilación disminuye la re-asociación de subunidades para formar estas estructuras [23].

Para analizar si este efecto se produce también en las hemocianinas en estudio, las proteínas nativas y N-desglicosiladas fueron observadas mediante microscopía electrónica de transmisión, utilizando tinción negativa (**figura 11**). Con este propósito, se tomaron entre 15 y 20 fotografías de distintos campos de cada muestra, con aumentos de 60.000x y 87.000x, y se contó en ellos el número de didecámeros. De estos análisis, se obtuvo que la formación de didecámeros disminuye significativamente en las muestras de hemocianinas N-desglicosiladas, respecto a las nativas. Este efecto se atribuye a la N-desglicosilación, y no a un efecto producido por los cambios de tampón y temperatura propios del protocolo, debido a que las hemocianinas control, sometidas al mismo proceso, pero no desglicosiladas, no presentan una disminución significativa en el número de didecámeros.

En base a estos resultados, se puede concluir que las N-glicosilaciones serían relevantes en la formación de las estructuras cuaternarias didecaméricas de CCH, FLH y KLH, como ha sido descrito para hemocianinas de otras especies de moluscos [23].

7.1.5 Estudios mediante dicroísmo circular de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas.

Con el fin de complementar los resultados ya expuestos, con la colaboración del Dr. Mauricio Baez (Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile), se estudiaron las proteínas mediante dicroísmo circular en distintas condiciones. Este análisis entrega información sobre la estructura secundaria de la proteína y también, se pueden obtener datos sobre la estabilidad de la proteína en distintas condiciones.

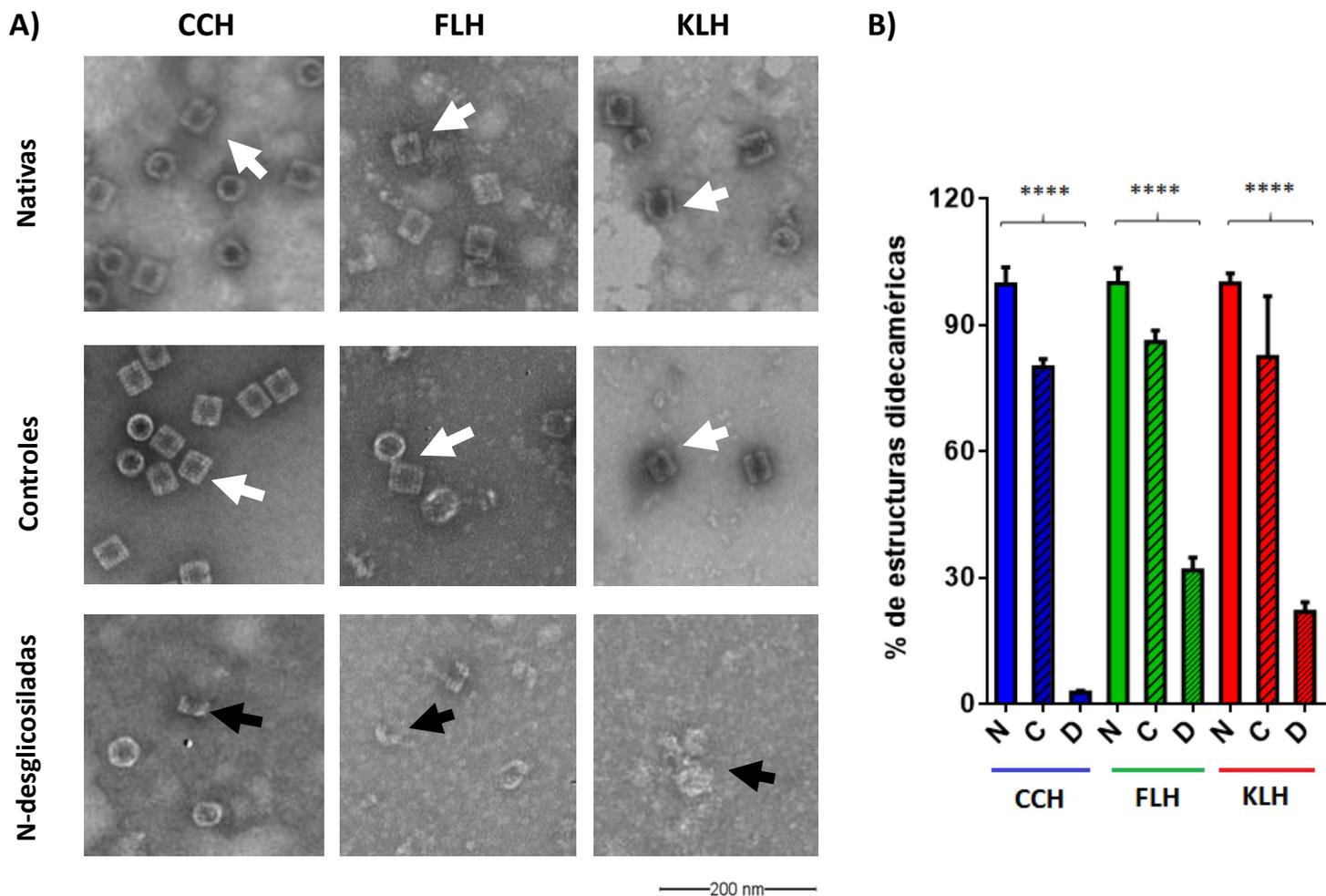


Figura 11. Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas enzimáticamente. **A.** Imágenes representativas de preparaciones de cada hemocianina a 60.000x, en las que se observan didecámeros (flechas blancas) y estructuras fragmentadas (flechas negras). Barra de escala: 200 nm. **B.** Cuantificación relativa a partir de 15 a 20 microfotografías del número de didecámeros, formados en muestras de hemocianinas nativas (N), controles (C), y N-desglicosiladas (D). Las hemocianinas control (C) corresponden a proteínas sometidas a los cambios de temperatura y tampón del protocolo de desglicosilación, pero sin el tratamiento con PNGasa F. Datos como promedio \pm SEM. Análisis estadísticos mediante test T. **** $p < 0,0001$.

Inicialmente, se realizó un espectro dentro de la zona UV-lejana (200-260 nm) para obtener la señal de las proteínas nativas y N-desglicosiladas (**figura 12**). Para CCH y KLH nativas, se observa una señal marcada en la zona negativa, con dos mínimos cercanos a 208 y 222 nm, señal que es concordante con los espectros ya reportados para KLH, en los que se observa la misma señal, dada por la presencia de estructuras de tipo α -hélice [19,68]. En el caso de FLH, el espectro presenta diferencias con KLH, con un mínimo cercano a los 205 nm.

Existen diversas herramientas para analizar la proporción de estructuras secundarias en proteínas [69], mediante las cuales se ha reportado que KLH estaría compuesta por un 29% de α -hélice, y un 31% de láminas β [19]. Para las hemocianinas en estudio, se realizó un análisis de los espectros entre 200-260 nm utilizando sólo el programa CONTINLL, pues el resto de los programas requería tener un espectro entre 180-260 nm, el cual no pudo obtenerse porque bajo los 200 nm la señal sobrepasaba el límite de voltaje del espectropolarímetro (700 V), lo que implicaba una gran exigencia del detector, pudiendo resultar en un daño al mismo. A pesar de esto, el análisis mediante CONTINLL confirmó la proporción de estructuras secundarias reportada para KLH [19], y sugiere que CCH presentaría valores similares. En el caso de FLH, su estructura secundaria estaría compuesta por aproximadamente un 18% de α -hélice, 28% de láminas β , y 46% estructuras irregulares o al azar [69]. Por otra parte, al comparar la señal obtenida en hemocianinas N-desglicosiladas, respecto a la señal obtenida en hemocianinas nativas, no se observó diferencia, sugiriendo que las proteínas N-desglicosiladas mantendrían las proporciones mencionadas para cada hemocianina nativa.

En base a este resultado y, en conjunto con los análisis mediante MET, se puede sugerir que la N-desglicosilación afectaría la re-asociación de las estructuras cuaternarias, pero no modificaría la proporción de estructuras secundarias de la proteína. Además, se puede concluir que la estructura secundaria de CCH sería muy similar a la ya descrita para KLH [19], mientras que en FLH se encontraría un menor porcentaje de estructuras α -hélice, y un mayor porcentaje de estructuras al azar. Esta diferencia observada en FLH, respecto a CCH y KLH, podría explicarse en parte debido a que el lote de FLH analizado se encontraba parcialmente fragmentado, por lo que se requieren nuevos análisis.

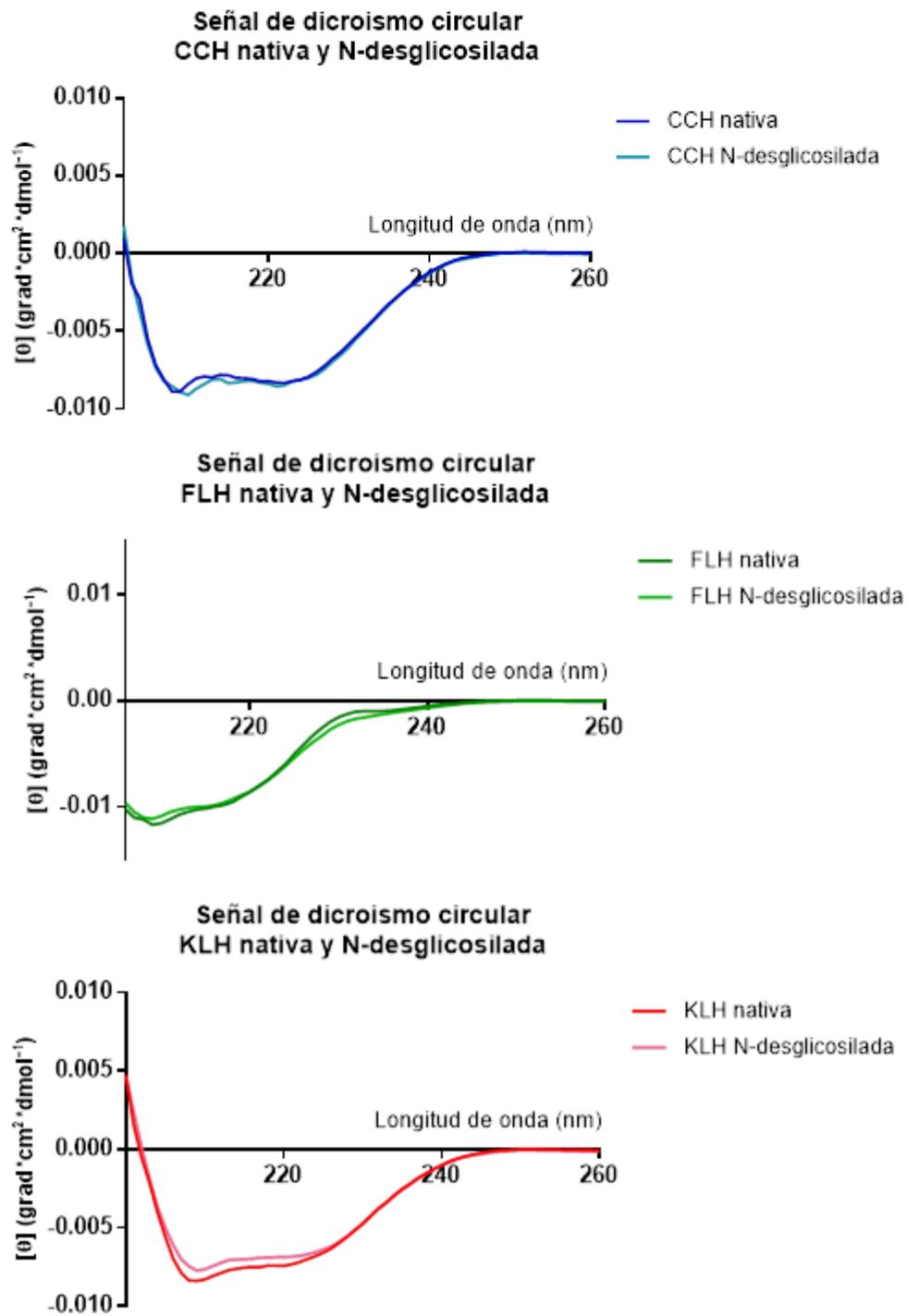


Figura 12. Espectros de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas obtenidos mediante dicroísmo circular. Hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, a una concentración de 0,25 mg/ml, en PBS pH 7,2 y a 25°C, analizadas mediante dicroísmo circular en un espectropolarímetro JASCO, modelo J-810 (JASCO, Essex, UK).

Posteriormente, continuando con los ensayos mediante dicroísmo circular, se realizaron curvas de desplegamiento y replegamiento con distintas concentraciones de cloruro de guanidinio (Gnd-HCl), para analizar diferencias en la estabilidad de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas. En el caso de FLH nativa (**figura 13**), se observa que las curvas de desplegamiento y replegamiento son diferentes, es decir, la señal de dicroísmo circular en la curva de replegamiento disminuye a menores concentraciones de Gnd-HCl, comparado con el desplegamiento. Esto sugiere que el replegamiento en esta proteína podría ser más lento, si es que recupera su estructura inicial, o bien al replegarse podría formar una estructura diferente. En el caso de FLH N-desglicosilada, se observa que las curvas de desplegamiento y replegamiento son aún más disímiles.

Además, se observa que FLH nativa se ha replegado desde la concentración de 2 M de Gnd-HCl, mientras que FLH N-desglicosilada sólo se ha replegado bajo 1 M de Gnd-HCl, sustentando que la N-desglicosilación afectaría el replegamiento de FLH. Respecto al desplegamiento, no se hallaron diferencias entre ambas muestras.

El mismo análisis se realizó para KLH (**figura 14**), donde se observa para KLH nativa que las curvas de desplegamiento y replegamiento son similares. Sin embargo, al observar los resultados de KLH N-desglicosilada, se observa una diferencia entre ambas curvas, observándose una tendencia similar a FLH N-desglicosilada, donde la hemocianina sólo se repliega a las mínimas concentraciones de Gnd-HCl. De modo similar a FLH, no se observan diferencias sustanciales en las curvas de desplegamiento de KLH nativa y N-desglicosilada.

Estos resultados, en conjunto, indican que la N-desglicosilación afecta el replegamiento de FLH y KLH, pudiendo afectar la velocidad de replegamiento o la estructura formada, aunque tendría un efecto mínimo en su desplegamiento. Este análisis no pudo realizarse con CCH, debido a que en la etapa de replegamiento, esta proteína se agrega, lo que impide una correcta lectura en el espectropolarímetro.

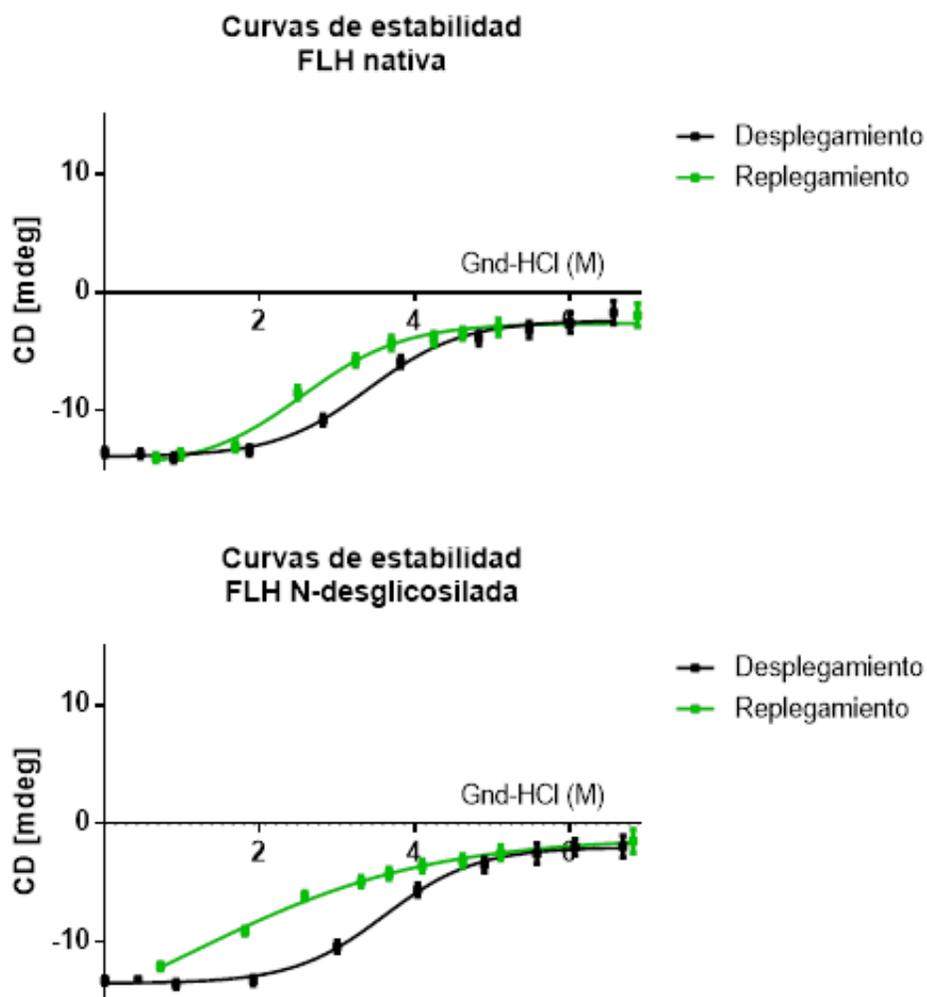
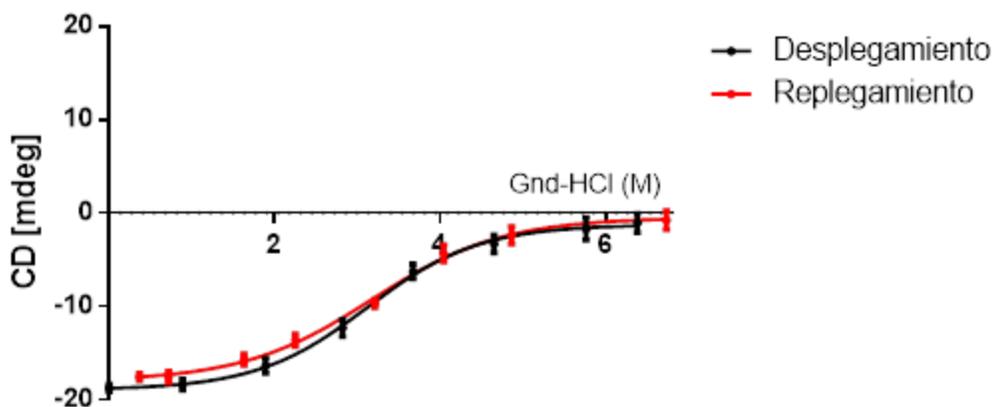


Figura 13. Curvas de estabilidad de FLH nativa y N-desglicosilada, obtenidas mediante dicroísmo circular. (A) Para realizar la curva de desplegamiento, muestras de FLH nativa y N-desglicosilada fueron tratadas con concentraciones crecientes (0 – 6,7 M) de cloruro de guanidinio (Gnd-HCl), durante 24 horas a temperatura ambiente. Así mismo, para realizar las curvas de replegamiento, muestras de FLH nativa y N-desglicosilada fueron tratadas con cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) 6,7 M durante 24 horas a temperatura ambiente, y luego fueron diluidas en PBS. Los datos se muestran como promedio \pm SEM de al menos 20 mediciones de la señal a 222 nm, en dos experimentos independientes. Todas las muestras fueron analizadas en el espectropolarímetro JASCO, modelo J-810 (JASCO, Essex, UK).

Curvas de estabilidad KLH nativa



Curvas de estabilidad KLH N-desglicosilada

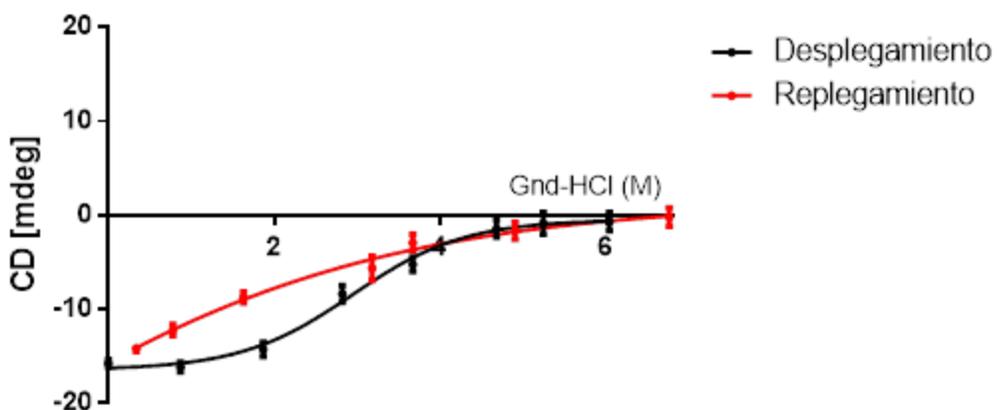


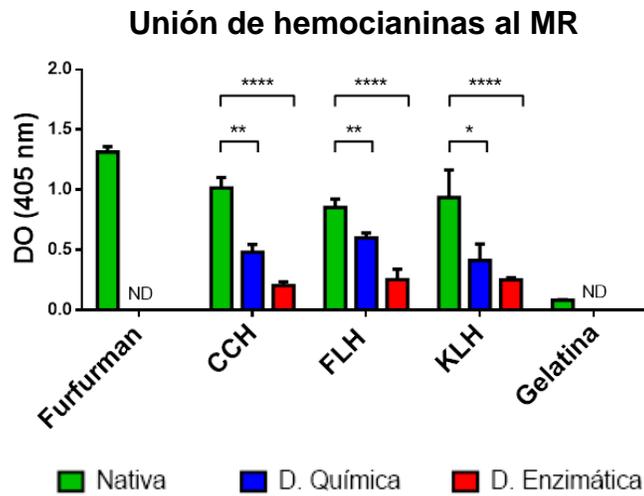
Figura 14. Curvas de estabilidad de KLH nativa y N-desglicosilada, obtenidas mediante diámetro circular. Para realizar la curva de despliegamiento, muestras de KLH nativa y N-desglicosilada fueron tratadas con concentraciones crecientes (0 – 6,7 M) de cloruro de guanidinio (Gnd-HCl), durante 24 horas a temperatura ambiente. Así mismo, para realizar las curvas de replegamiento, muestras de KLH nativa y N-desglicosilada fueron tratadas con cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) 6,7 M durante 24 horas a temperatura ambiente, y luego fueron diluidas en PBS. Los datos se muestran como promedio \pm SEM de al menos 20 mediciones de la señal a 222 nm, representativos de dos experimentos independientes. Todas las muestras fueron analizadas en el espectropolarímetro JASCO, modelo J-810 (JASCO, Essex, UK).

7.2 Análisis del efecto de la N-desglicosilación de hemocianinas sobre su unión a receptores de inmunidad innata *in vitro*.

7.2.1 Unión de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas a receptores lectina tipo-C quiméricos (MR, Dectina-1 y Dectina-2).

Estudios previos de nuestro laboratorio, demuestran que las hemocianinas se unen a algunos receptores de lectina tipo-C *in vitro* con una alta afinidad, siendo esta unión dependiente de sus azúcares [47]. Para evaluar la contribución de las N-glicosilaciones en este proceso, se realizó un ensayo de unión mediante ELISA. En este ensayo, concentraciones crecientes de hemocianinas nativas, N-desglicosiladas y desglicosiladas químicamente como control, se incubaron con receptores de lectina tipo-C quiméricos, esto es, que están unidos al fragmento Fc de una IgG humana (MR-Fc, Dectina-1-Fc y Dectina-2-Fc). Así mismo, a partir de la escala de concentraciones se realizaron gráficos de barra representativos, considerando la unión de hemocianinas, a una concentración de 2 µg/ml, a los distintos receptores. En estos gráficos de barra se analizó estadísticamente la diferencia de unión de cada hemocianina con su receptor, y además se incluyeron los controles positivos y negativos para asegurar la funcionalidad de los receptores y la especificidad de la unión. A modo general, en todas las curvas de unión se observó una señal mayor en hemocianinas nativas, entre 1 y 2 unidades de densidad óptica (DO), respecto a las hemocianinas N-desglicosiladas y desglicosiladas químicamente, que presentaron valores entre 0,5 y 1,5 unidades de DO. En un análisis más específico, en el ensayo realizado con MR (**figura 15**), se observó que las hemocianinas nativas se unen al receptor de forma similar al control positivo (furfurman), y que la unión a hemocianinas desglicosiladas químicamente disminuye significativamente para todas las proteínas ensayadas. Por otra parte, se observó que la unión de todas las hemocianinas N-desglicosiladas también disminuye significativamente, presentando una señal menor a la de hemocianinas desglicosiladas químicamente. En el ensayo realizado con Dectina-1 (**figura 16**), se observó que la unión de las hemocianinas N-desglicosiladas al receptor es significativamente menor, respecto a las hemocianinas nativas. Para las hemocianinas desglicosiladas químicamente, la unión de FLH y KLH al receptor disminuye, mientras que la unión de CCH presenta una tendencia a la baja, respecto a la unión de hemocianinas nativas.

A)



B)

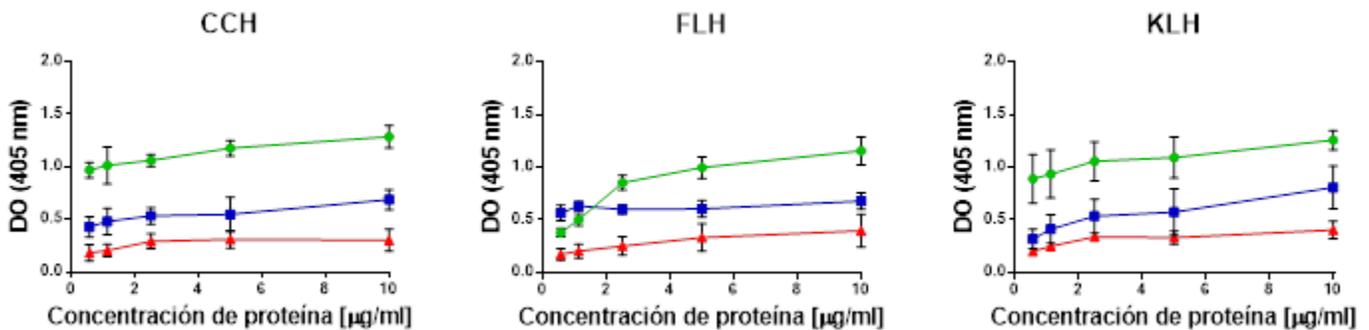
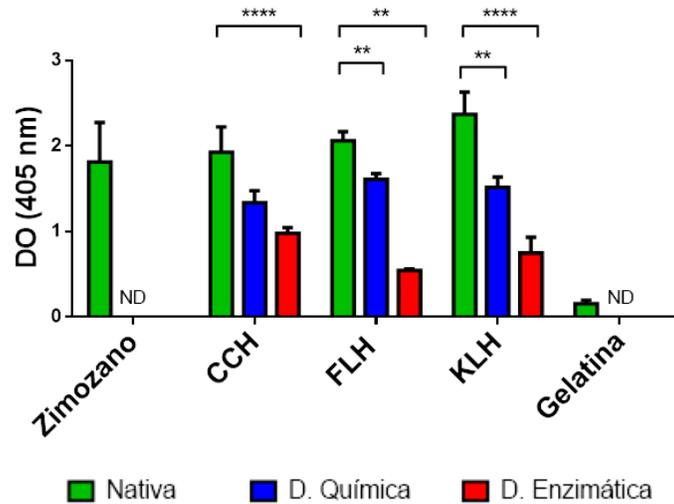


Figura 15. Análisis de la unión de hemocianinas al MR mediante ELISA. (A) Las hemocianinas nativas (verde), desglucosiladas químicamente (azul) y N-desglucosiladas enzimáticamente (rojo), a una concentración de 2 µg/ml, fueron incubadas con el receptor quimérico (MR-Fc, 1 µg/ml). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. Se utilizó como control positivo la unión del MR a furfurman, y como control negativo la unión a gelatina, ambos a 2 µg/ml. **(B).** Curvas de unión en función de la concentración de hemocianina. Se ensayó la unión de concentraciones variables de hemocianina (0,5-10 µg/ml) al receptor quimérico (MR-Fc, 1 µg/ml). Los datos se muestran como promedio ± SEM de dos experimentos independientes. Análisis mediante ANOVA de dos vías. *p<0,5. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001.

A)

Unión de hemocianinas a Dectina-1



B)

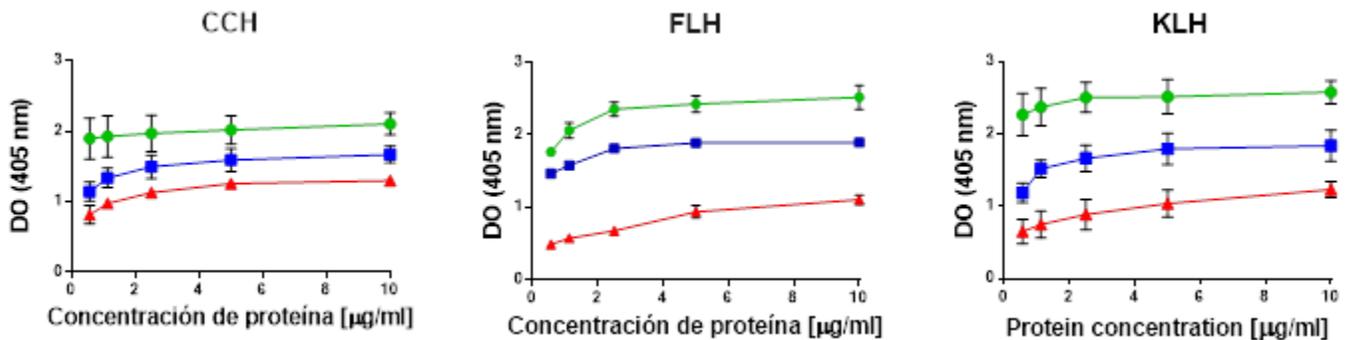


Figura 16. Análisis de la unión de hemocianinas a Dectina-1 mediante ELISA. (A) Las hemocianinas nativas (verde), desglucosiladas químicamente (azul) y N-desglucosiladas enzimáticamente (rojo), a una concentración de 2 µg/ml, fueron incubadas con el receptor quimérico (Dectina-1-Fc, 2,5 µg/ml). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. Se utilizó como control positivo la unión del receptor a zimozano, y como control negativo la unión a gelatina, ambos a 2 µg/ml. **(B)** Curvas de unión en función de la concentración de hemocianina. Se ensayó la unión de concentraciones variables de hemocianina (0,5-10 µg/ml) al receptor quimérico (Dectina-1-Fc, 2,5 µg/ml). Los datos se muestran como promedio ± SEM de dos experimentos independientes. Análisis mediante ANOVA de dos vías. *p<0,5. **p<0,01. ***p<0,001. ****p<0,0001.

Así mismo, la unión de todas las hemocianinas nativas fue comparable a la unión del control positivo. Finalmente, en los ensayos con Dectina-2 (**figura 17**), se observó que las hemocianinas N-desglicosiladas también presentan una unión significativamente menor, respecto a las hemocianinas nativas. En el caso de las hemocianinas desglicosiladas químicamente, CCH y FLH presentan una disminución significativa en la unión, mientras que KLH presenta una tendencia a la baja, respecto a las hemocianinas nativas.

Se debe señalar que la unión de hemocianinas desglicosiladas a los receptores ensayados no alcanza el valor del control negativo, indicando que puede persistir un grado de unión, probablemente por la presencia de azúcares remanentes en su estructura, como se demostró en experimentos anteriores.

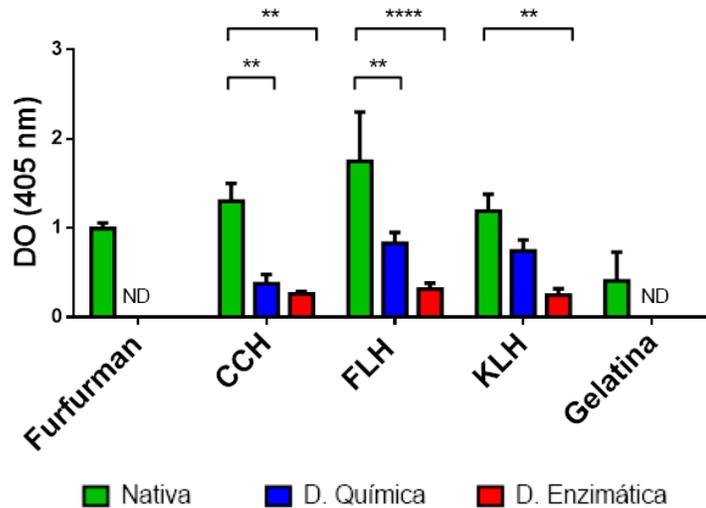
El conjunto de estos resultados permite concluir que la desglicosilación de CCH, FLH y KLH, tanto en forma química como enzimática, disminuye su unión a los receptores de lectina tipo C estudiados y, por ende, sugieren fuertemente que los azúcares participarían en la unión de estas proteínas a dichos receptores.

7.2.2 Especificidad de la unión a receptores de lectina tipo C mediante ensayos de competencia con D-(+)-Manosa y D-(+)-Galactosa.

En este ensayo, los receptores quiméricos ya mencionados fueron pre-incubados con distintas concentraciones (0-40 mM) de D-(+)-manosa, su ligando natural, y D-(+)-galactosa, monosacárido que no es un ligando preferente para estos receptores. Posteriormente, los receptores fueron incubados con una concentración fija de hemocianinas (10 µg/ml), y se analizó la unión mediante un ELISA. Los ensayos realizados con el MR muestran que la incubación con D-(+)-manosa inhibe completamente la unión de las hemocianinas, incluso a concentraciones tan bajas como 1-2 mM de este monosacárido (**figura 18**). Por el contrario, se observa que la incubación con D-(+)-galactosa no produce inhibición de la unión, o bien, la inhibición que se observa no es total, pues no alcanza los niveles del control negativo, ni siquiera a altas concentraciones del inhibidor (40 mM).

Unión de hemocianinas a Dectina-2

A)



B)

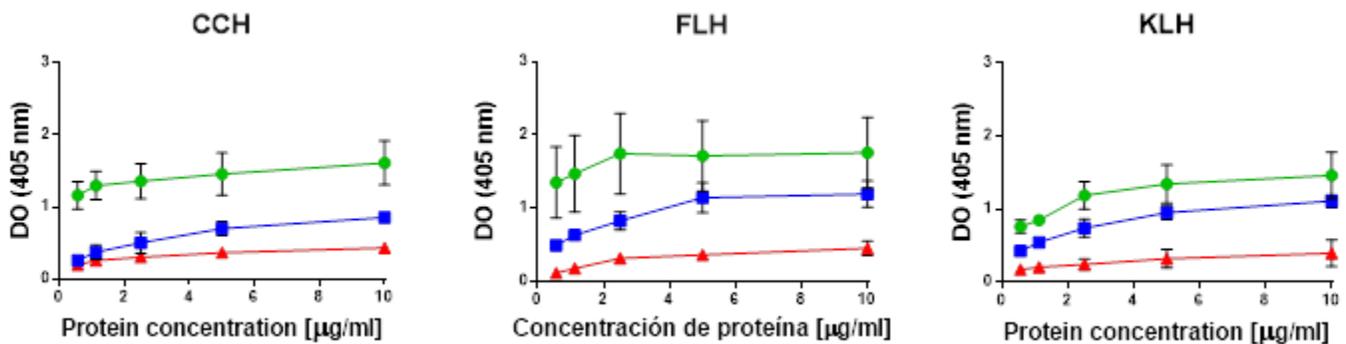


Figura 17. Análisis de la unión de hemocianinas a Dectina-2 mediante ELISA indirecto. Las hemocianinas nativas (verde), desglucosiladas químicamente (azul) y N-desglucosiladas enzimáticamente (rojo), fueron incubadas con el receptor quimérico humano (Dectina-2-Fc, 1 µg/ml). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. **A.** Curvas de unión a Dectina-2-Fc, a distintas concentraciones de hemocianina (0,5-10 µg/ml). **B.** Gráfico representativo, considerando sólo la unión de Dectina-2-Fc a hemocianinas incubadas a 10 µg/ml. Control positivo: furfurman. Control negativo: gelatina. Datos como promedio \pm SEM. Análisis mediante ANOVA de dos vías. * $p < 0,5$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. **** $p < 0,0001$.

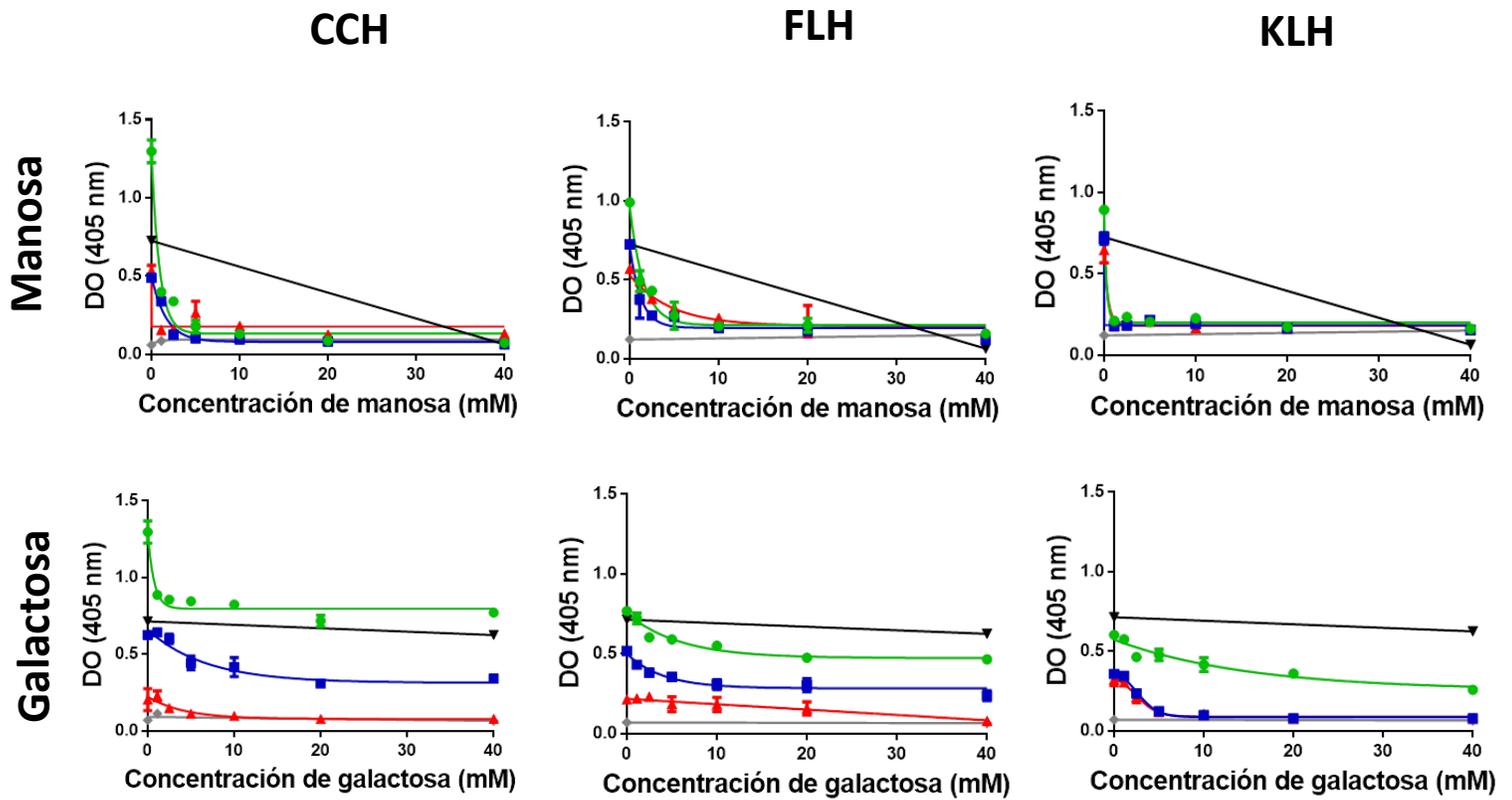


Figura 18. Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas al MR, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución. El receptor quimérico (MR-Fc, 1 $\mu\text{g/ml}$) fue incubado con concentraciones crecientes de manosa o galactosa (0-40 mM), y luego con las hemocianinas (10 $\mu\text{g/ml}$) nativas (verde), desglucosiladas químicamente (azul) y N-desglucosiladas enzimáticamente (rojo). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. Control positivo: furfurman (negro). Control negativo: gelatina (gris). Datos como promedio \pm SEM.

Estos resultados, que son consistentes para las 3 hemocianinas en estudio, sugieren que el ligando preferente del receptor sería manosa, y que se trata de una unión específica para este azúcar presente en las N-glicosilaciones de hemocianinas. Por otra parte, en el caso de las hemocianinas desglicosiladas química y enzimáticamente, se observa que la unión residual al receptor también es inhibida por el pre-tratamiento con D-(+)-manosa, indicando que, probablemente la unión remanente sea debido a los azúcares que permanecen en su estructura.

Los resultados utilizando el receptor Dectina-1, muestran que la pre-incubación tanto con D-(+)-manosa como con D-(+)-galactosa inhiben su unión a las hemocianinas (**figura 19**). Utilizando ambos monosacáridos, se observa una inhibición parcial a bajas concentraciones (5-10 mM), y esta inhibición tiende a ser total a altas concentraciones (40 mM). En este caso, es posible que la unión a Dectina-1 no sea específica para manosa ni para N-glicosilaciones, y puede existir unión mediada por otros monosacáridos [70].

Finalmente, con Dectina-2, los resultados son similares a los obtenidos con el MR. Se observa que la incubación con D-(+)-manosa inhibe completamente la unión de las hemocianinas, pero a diferencia del MR, donde la inhibición es completa a una concentración de 1-2 mM de D-(+)-manosa, en Dectina-2 la inhibición es completa a una mayor concentración, de 10 mM de D-(+)-manosa, es decir, se requiere una concentración más alta para lograr una inhibición total, indicando que posee una menor afinidad (**figura 20**). Además, en el caso de FLH, se observa unión remanente al inhibir con D-(+)-manosa. Esto puede relacionarse con la mayor diversidad de azúcares que posee FLH, demostrada en los análisis mediante *Lectin array blot* (véase **figuras 8 y 9**), que pueden ser ligando del receptor en estudio. Por otra parte, se observa que la incubación con D-(+)-galactosa no produce inhibición de la unión, o esta es residual y no alcanza los niveles del control negativo, ni siquiera a altas concentraciones del inhibidor (40 mM). Esto indica que la unión de las tres hemocianinas a este receptor también es específica para N-glicosilaciones ricas en manosa, aunque no se puede descartar la contribución de otros monosacáridos, especialmente en FLH.

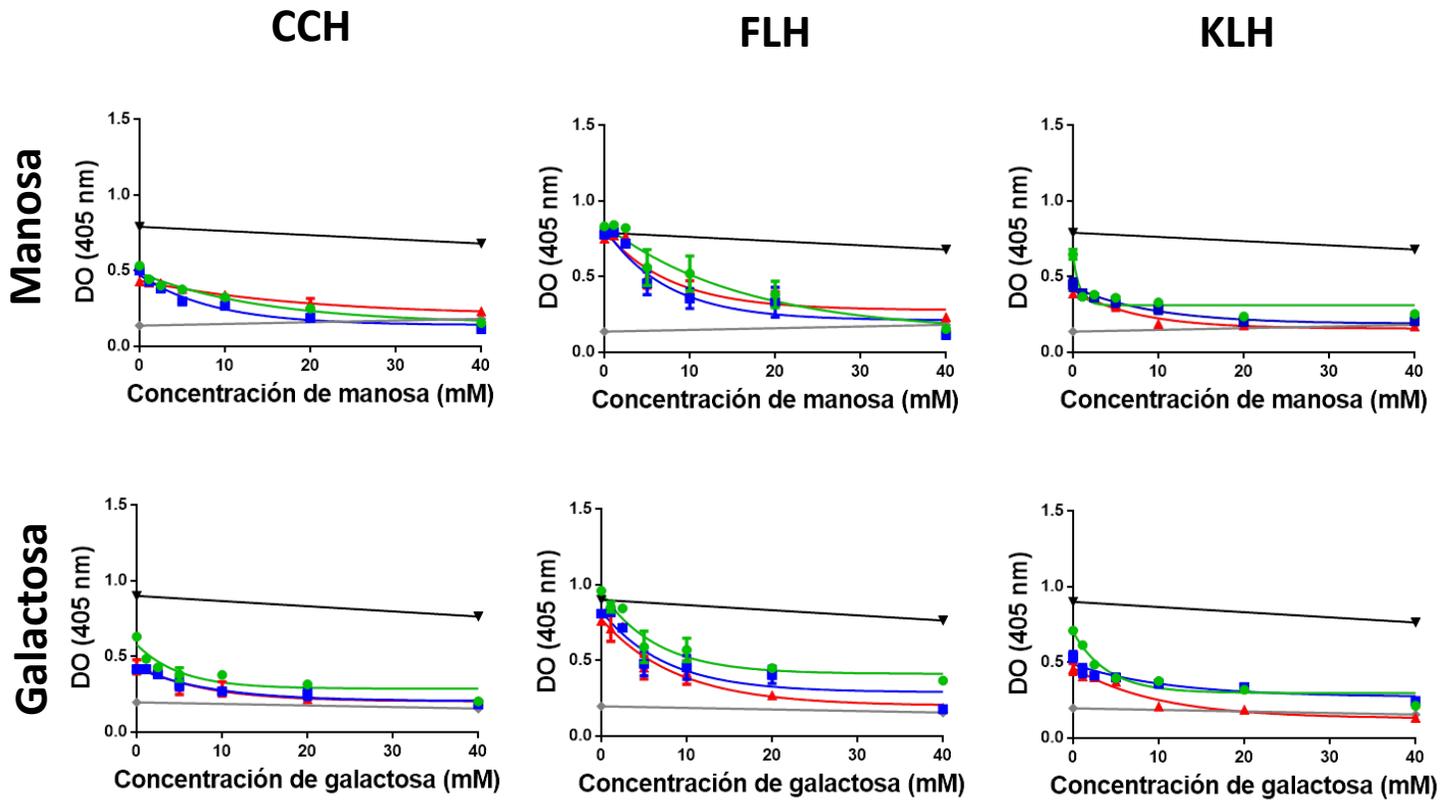


Figura 19. Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas a Dectina-1, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución. El receptor quimérico (Dectina-1-Fc, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fue incubado con concentraciones crecientes de manosa o galactosa (0-40 mM), y luego con las hemocianinas (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) nativas (verde), desglucosiladas químicamente (azul) y desglucosiladas enzimáticamente (rojo). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. Control positivo: zimosano (negro). Control negativo: gelatina (gris). Datos como promedio \pm SEM.

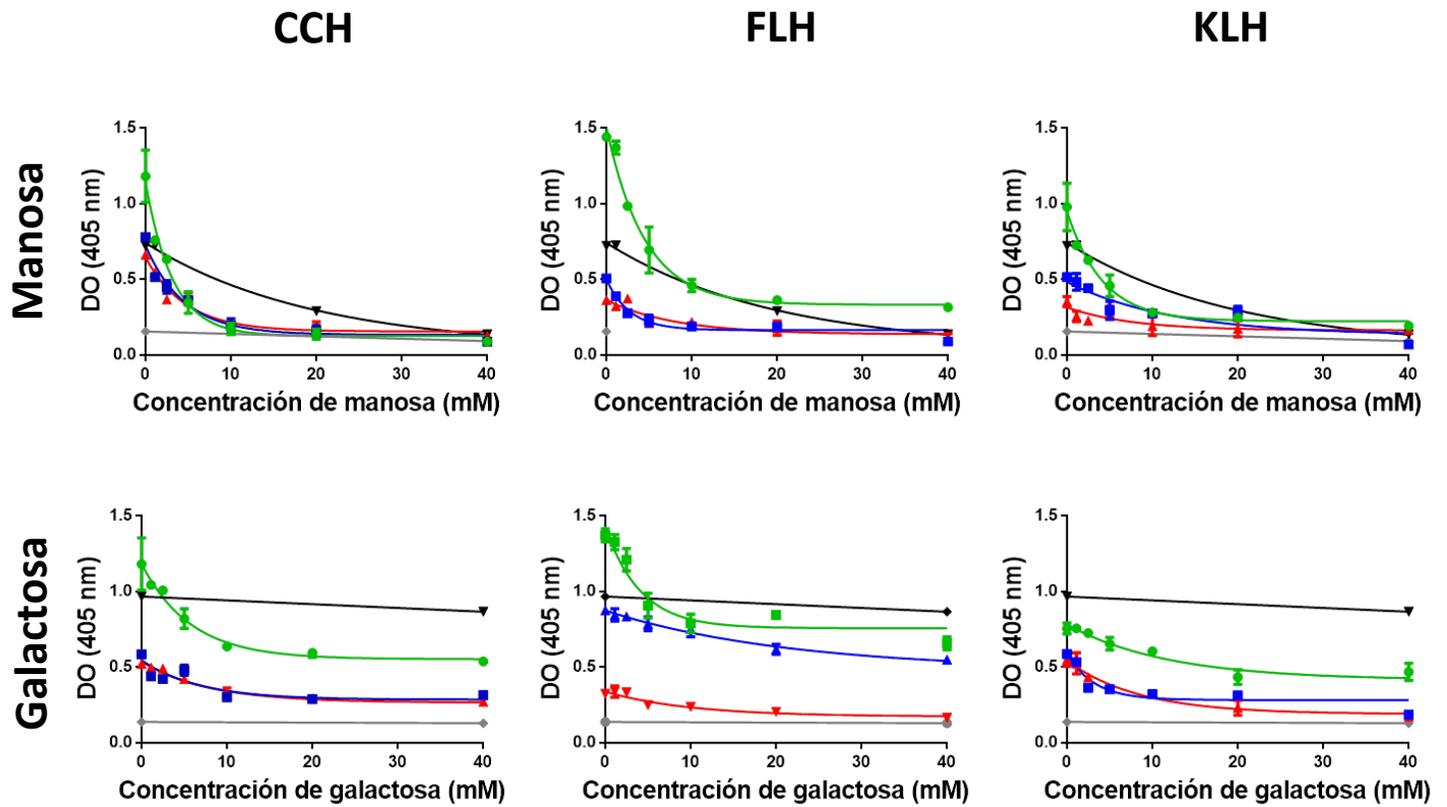


Figura 20. Análisis de la especificidad de la unión de hemocianinas a Dectina-2, mediante ensayos de competencia con azúcares en solución. El receptor quimérico (Dectina-2-Fc, 1 $\mu\text{g/ml}$) fue incubado con concentraciones crecientes de manosa o galactosa (0-40 mM), y luego con las hemocianinas (10 $\mu\text{g/ml}$) nativas (verde), desglicosiladas químicamente (azul) y desglicosiladas enzimáticamente (rojo). La unión fue revelada con un suero de cabra anti-Fc humano-FAL. Control positivo: furfurman (negro). Control negativo: gelatina (gris). Datos como promedio \pm SEM.

7.3 Determinación del efecto de las N-glicosilaciones de hemocianinas, en la unión/incorporación a células presentadoras de antígenos y su efecto en la producción de citoquinas *in vitro*.

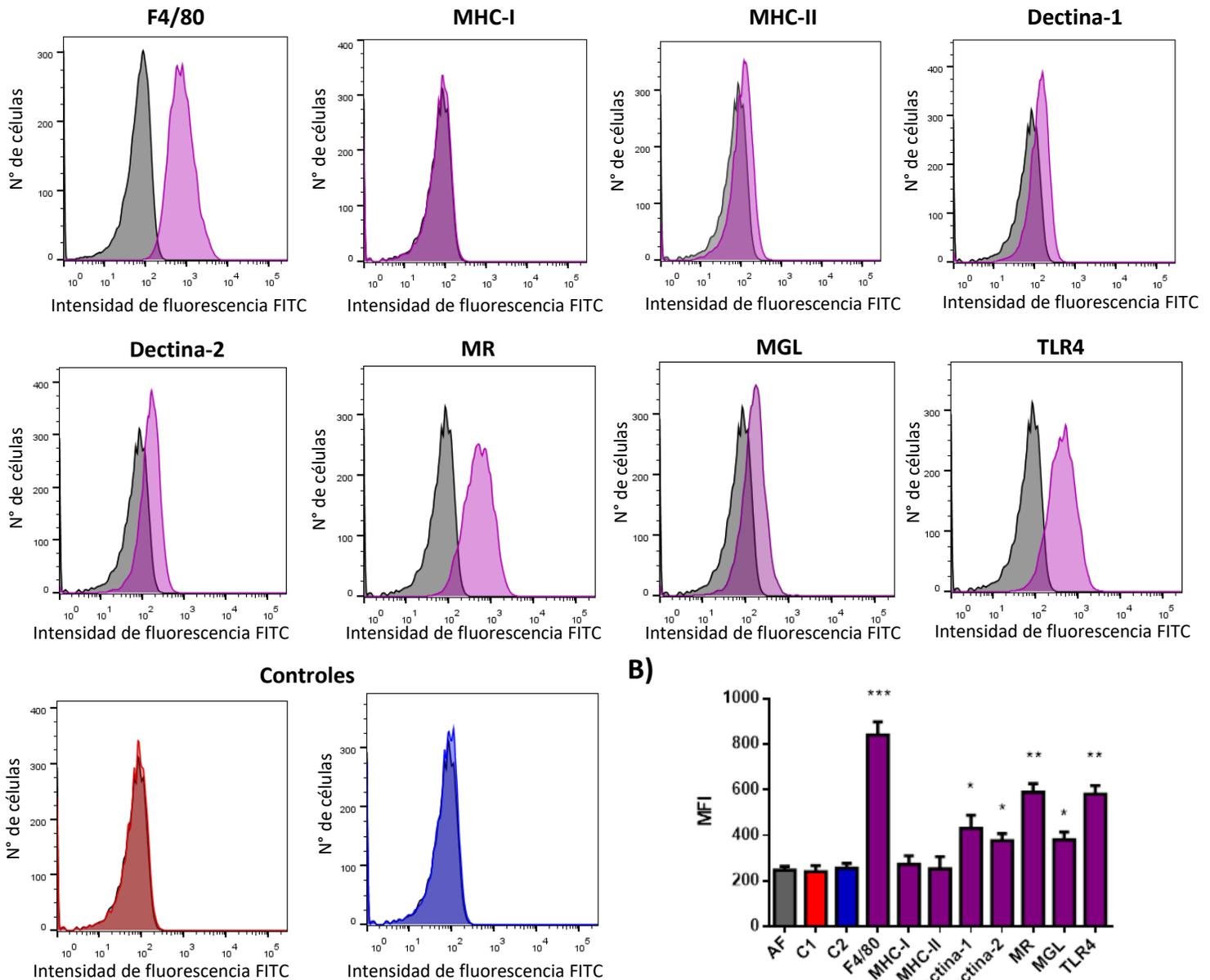
7.3.1 Caracterización de la línea celular de macrófagos murinos J774.2.

El primer paso para estudiar el efecto de la N-desglicosilación en la incorporación de hemocianinas, fue disponer de una línea celular que fuese apropiada como modelo de estudio. Se consideró utilizar distintas líneas de macrófagos (Raw264.7 y J774.2) y células dendríticas (DC2.4 y MutuDC), debido a que existe evidencia bibliográfica de que estas líneas expresan receptores de inmunidad innata, incluyendo los de lectina tipo C, que son capaces de incorporar y presentar antígenos, y además son productoras de citoquinas proinflamatorias [71,72]. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, se optó por los macrófagos murinos de la línea J774.2 (**figura 21**). Se observó que la línea J774.2 disponible en nuestro laboratorio presenta, como ha sido reportado, una alta expresión del marcador de macrófagos F4/80, además de una alta expresión de MR y TLR-4. También presentan MGL, Dectina-1, Dectina-2, aunque en menor medida que los receptores nombrados anteriormente. No se observó MHC de clase I y II. Estos resultados indicaron, que esta línea era apropiada para continuar los estudios, debido a que expresan algunos de los receptores de interés para este trabajo.

7.3.2 Estudio de la unión/incorporación de hemocianinas nativas en la línea celular de macrófagos murinos J774.2 mediante citometría de flujo.

Para determinar si la línea celular J774.2 era capaz de unir/incorporar hemocianinas (ya sea que estén en la superficie o en el interior de las células), se realizó un ensayo con las proteínas nativas. Para esto, las células se incubaron con un pulso de CCH, FLH y KLH, marcadas con la sonda fluorescente AlexaFluor-488, a distintas concentraciones (0, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$), durante 1 hora y luego se analizaron mediante citometría de flujo. Se observó que la unión/incorporación de hemocianinas presenta un efecto dosis-respuesta (**figura 22**), en el que aumenta la intensidad de fluorescencia media (MFI) al aumentar la concentración de hemocianinas.

A)



B)

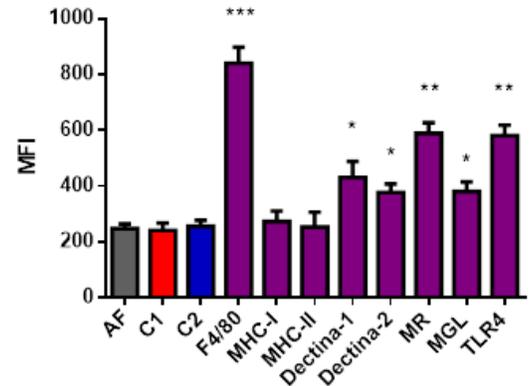
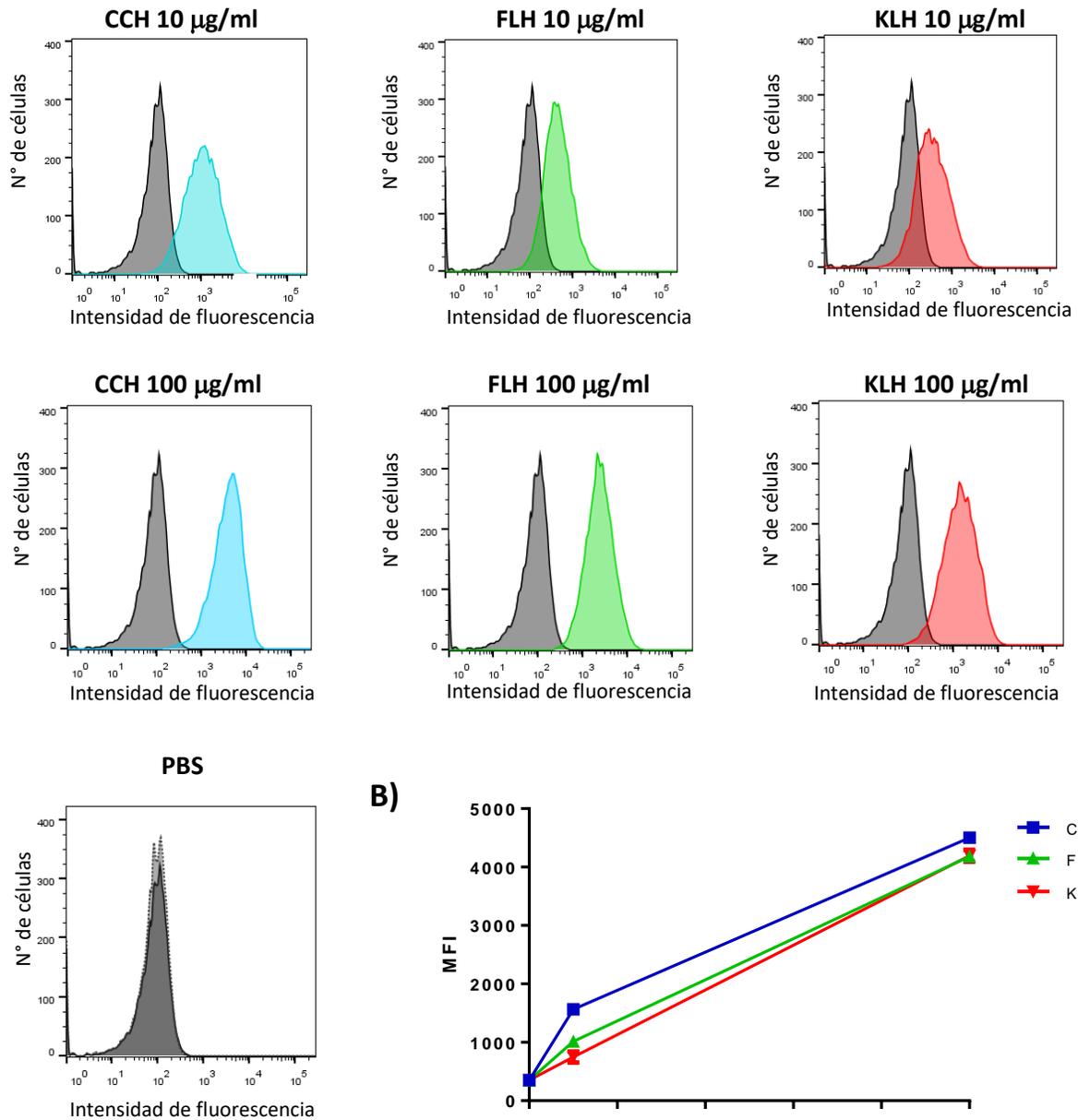


Figura 21. Caracterización de la línea celular de macrófagos murinos J774.2 por citometría de flujo. (A) Se evaluó la expresión de marcadores de superficie y de receptores de lectina tipo C en células de la línea J774.2. El análisis se realizó utilizando los siguientes anticuerpos: anti-F4/80-AlexaFluor647 (propio de macrófagos), anti-MHC-I-FITC y anti-MHC-I-FITC. En el caso del análisis de receptores (Dectina-1, Dectina-2, MR, MGL y TLR4), las células se incubaron con los anticuerpos primarios sin marca fluorescente, y luego con el suero de cabra anti-IgG de rata-FITC. En todas las figuras se observa la señal de autofluorescencia en gris, y la señal correspondiente a la expresión de los distintos marcadores y receptores en morado. El control en que se usó sólo el anticuerpo secundario se observa en rojo, mientras que el control de isotipo se observa en azul. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de todos los marcadores y receptores, incluyendo la señal de autofluorescencia (AF), y los controles sólo con anticuerpo secundario (C1) y el control de isotipo (C2). Los datos representan la media \pm SEM de dos experimentos. Análisis mediante ANOVA de una vía, comparación respecto a la señal de autofluorescencia (AF), donde * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A)



B)

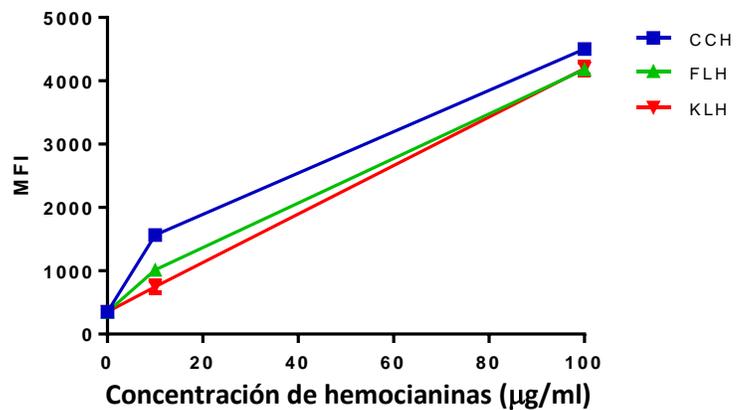


Figura 22. Estudio de la unión/incorporación de hemocianinas en células de la línea J774.2 mediante citometría de flujo. CCH, FLH y KLH, conjugadas al fluoróforo AlexaFluor-488, fueron incubadas a 10 y 100 µg/ml, durante 1 hora, en células de la línea J774.2. **(A)** Histogramas representativos de la unión/incorporación de hemocianinas. Se observa el control de autofluorescencia (gris), y la incorporación de CCH (celeste), FLH (verde) y KLH (rojo), además del control en que se incubó sólo con PBS (línea punteada). **(B)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) en función de la concentración de hemocianinas. Los datos se muestran como media ± SEM y son representativos de 2 experimentos independientes.

En una siguiente aproximación experimental, se realizó un análisis mediante citometría de flujo de la unión/incorporación de hemocianinas en células de la línea J774.2, tratándolas previamente con el inhibidor de macropinocitosis 5-(N,N)-Dimetilamilorida (DMA). Este reactivo produce la inactivación del antitransportador de Na^+/H^+ , lo que ocasiona una disminución del pH intracelular y, por tanto, una inactivación de las GTPasas que promueven el remodelamiento del citoesqueleto de actina [73]. De este modo, el tratamiento con DMA, en las condiciones experimentales utilizadas, inhibiría la macropinocitosis de forma significativa, aunque no total, sin afectar la endocitosis mediada por receptores, ni la unión de hemocianinas a los mismos.

En los resultados, se observó que tanto para CCH como para FLH y KLH, las células tratadas con DMA presentan una disminución parcial en la señal de fluorescencia (**figura 23**), de aproximadamente un 50%, sugiriendo que la incorporación de hemocianinas en la línea J774.2 podría ser por más de un mecanismo. Continuando con este razonamiento, se realizó un experimento de inhibición de la unión/incorporación en presencia de azúcares. Para esto, se preincubaron las células con D-(+)-manosa, D-(+)-fucosa y D-(+)-galactosa a una concentración de 100 mM, y posteriormente se realizó el ensayo de unión/incorporación de hemocianinas mediante citometría de flujo. A diferencia del experimento anterior, los resultados fueron variables entre las distintas hemocianinas (**figura 24**). En el caso de CCH, se observó que la unión/incorporación no es inhibida por ninguno de los azúcares. En cambio, para FLH, se observó que la unión/incorporación es parcialmente inhibida por manosa. Finalmente, para KLH se observó que la unión/incorporación es inhibida parcialmente por los tres monosacáridos, aunque la inhibición es significativamente mayor en presencia de manosa y fucosa, respecto a la inhibición que se produce con galactosa. Debido a que las inhibiciones observadas fueron parciales, se consideró que estos resultados eran consistentes con los resultados del ensayo anterior, confirmando que las hemocianinas podrían unirse a estas células e incorporarse vía receptores que tienen como ligando diferentes azúcares, y también de forma inespecífica mediante macropinocitosis. Alternativamente, y para corroborar los resultados obtenidos, se realizó un tercer experimento de inhibición de la unión/incorporación, en el que los macrófagos J774.2 fueron tratados con DMA y azúcares en conjunto (manosa, fucosa y galactosa 100 mM), y posteriormente incubados con hemocianinas y analizados mediante citometría de flujo (**figura 25**).

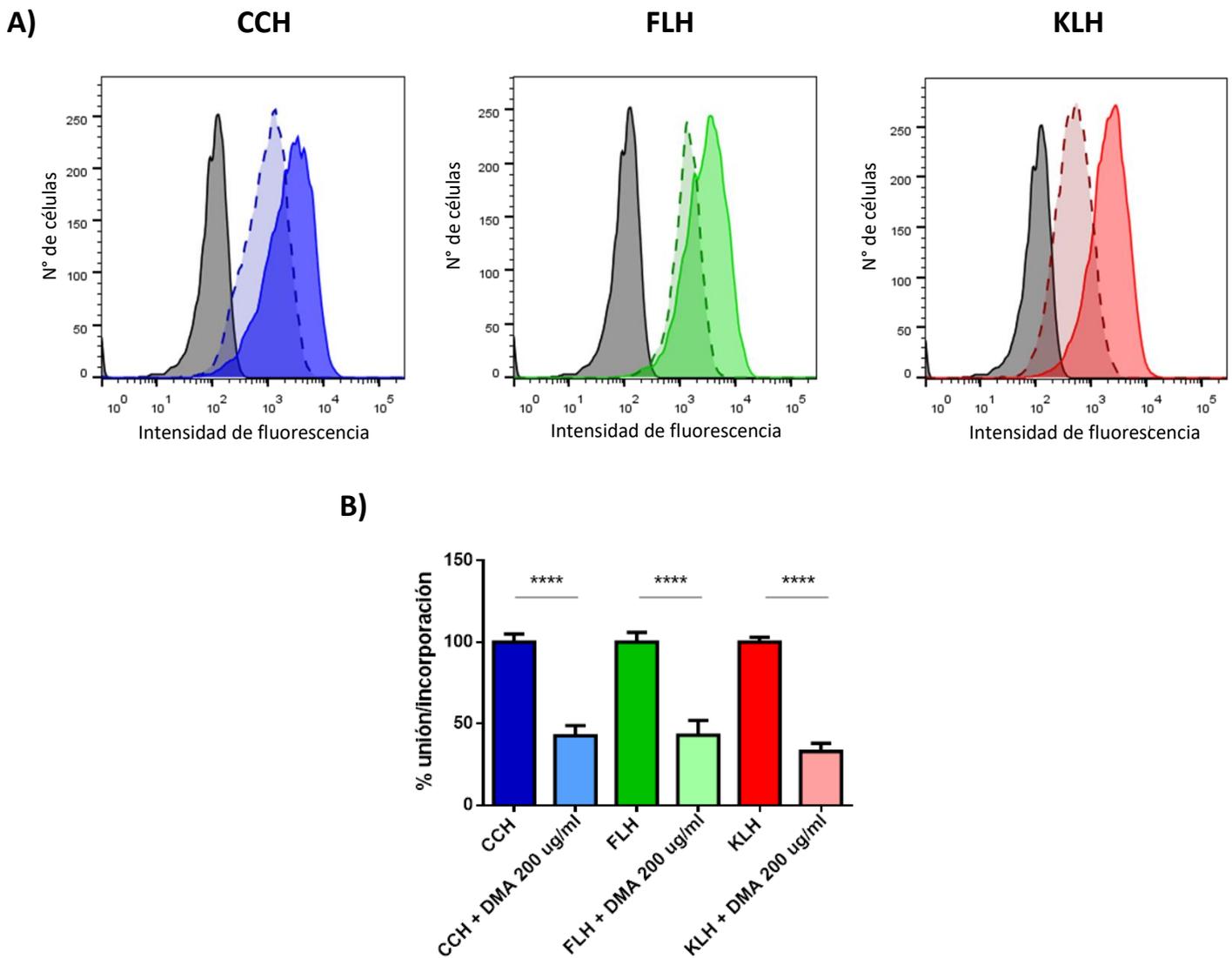


Figura 23. Efecto del inhibidor de macropinocitosis N,N-Dimetilamilorida (DMA) sobre la unión/incorporación de hemocianinas en macrófagos de la línea celular J774.2. CCH, FLH y KLH, conjugadas al fluoróforo AlexaFluor-488, fueron incubadas a 50 µg/ml, durante 1 hora, en presencia de DMA 200 µg/ml. Se analizó la incorporación en células con y sin DMA mediante citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de la unión/incorporación de hemocianinas. Se observa el control con PBS (gris), y la unión/incorporación de CCH (azul), FLH (verde) y KLH (rojo). Los histogramas con líneas punteada corresponden a la condición con DMA, mientras que los histogramas con línea sólida corresponden a la condición sin DMA. **(B)** Porcentaje de inhibición de la unión/incorporación de hemocianinas en células con y sin DMA. El cálculo de los porcentajes se realizó en base a la intensidad de fluorescencia media (MFI), considerando como 100% al grupo de células que no fueron tratadas con DMA. Análisis mediante test T. ****p<0,0001. Las barras representan la media de dos experimentos independientes ± SEM.

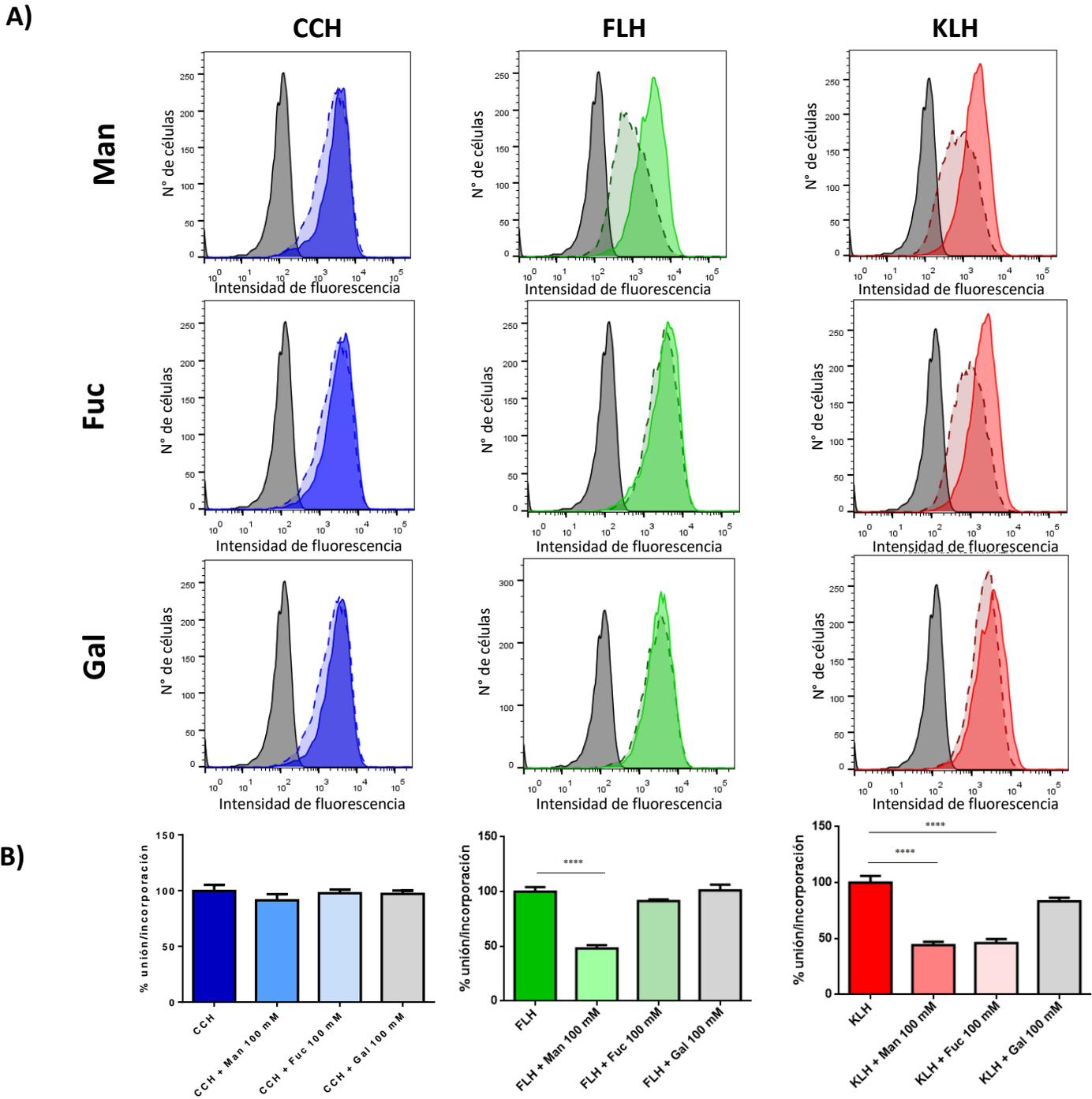


Figura 24. Efecto de azúcares en solución sobre la unión/incorporación de hemocianinas, en macrófagos de la línea celular J774.2. Las hemocianinas conjugadas al fluoróforo AlexaFluor-488, fueron incubadas a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 1 hora, en presencia de D-(+)-manosa (Man), D-(+)-fucosa (Fuc) o D-(+)-galactosa (Gal) 100 mM. **(A)** Histogramas representativos de la unión/incorporación de hemocianinas, estudiada mediante citometría de flujo. Se observa el control con PBS (gris), y la unión/incorporación de CCH (azul), FLH (verde) y KLH (rojo). Los histogramas con líneas punteada corresponden a la condición con el azúcar respectivo, mientras que los histogramas con línea sólida corresponden a la condición sin azúcares. **(B)** Porcentaje de inhibición de la unión/incorporación de hemocianinas en células con y sin azúcares. El cálculo de los porcentajes se realizó en base a la intensidad de fluorescencia media (MFI), considerando como 100% las células que no fueron incubadas con los monosacáridos utilizados. Análisis mediante test T. ** $p < 0,01$. **** $p < 0,0001$. Las barras representan la media de dos experimentos \pm SEM.

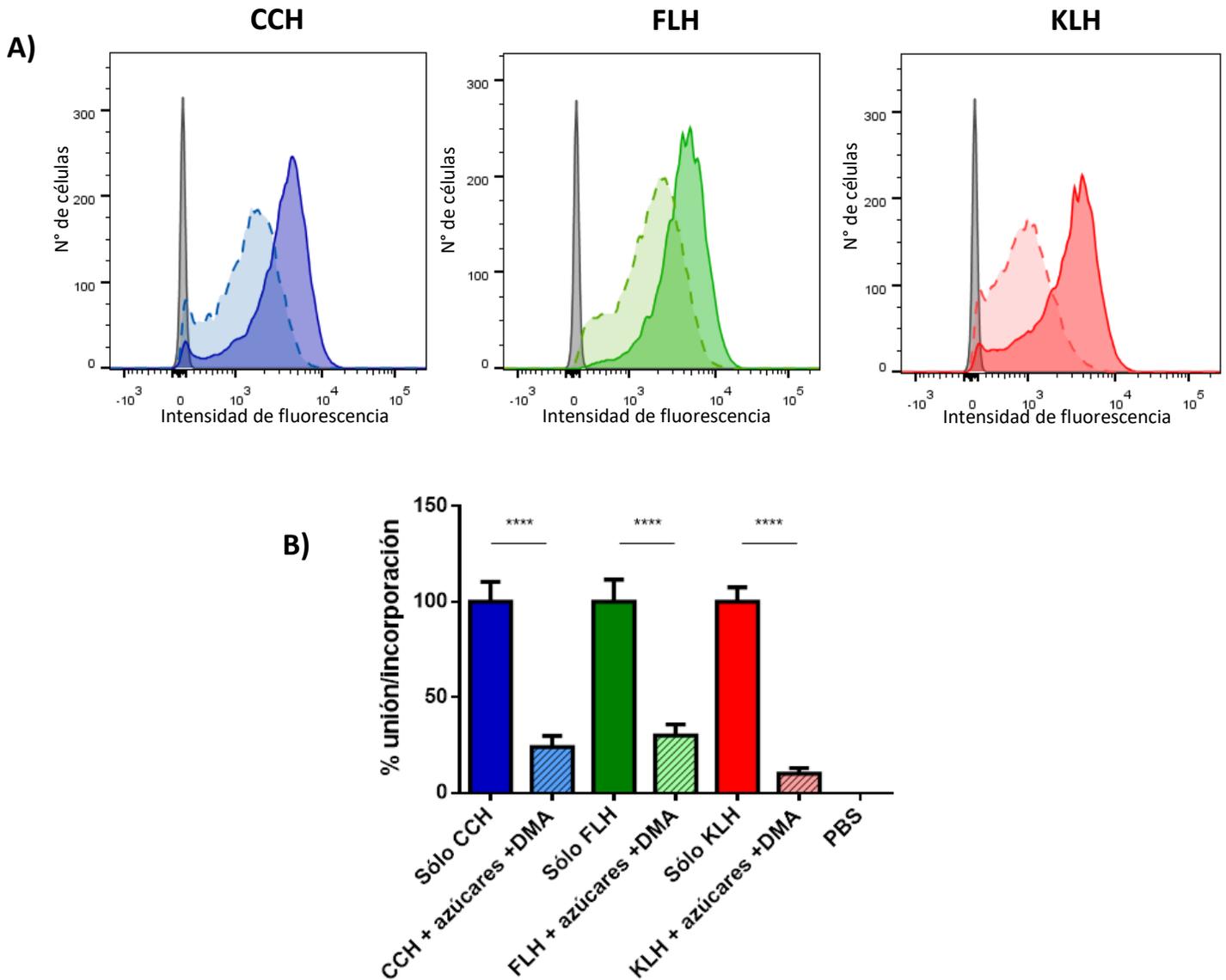


Figura 25. Efecto de la co-incubación de azúcares y del inhibidor de macropinocitosis N,N-Dimetilamilorida (DMA) sobre la unión/incorporación de hemocianinas en macrófagos de la línea celular J774.2. CCH, FLH y KLH, conjugadas al fluoróforo AlexaFluor-488, fueron incubadas a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, durante 1 hora, en presencia de DMA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y azúcares (manosa, fucosa y galactosa) 100 mM, y se analizó la unión/incorporación mediante citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de la unión/incorporación de hemocianinas. Se observa el control con PBS (gris), y la unión/incorporación de CCH (azul), FLH (verde) y KLH (rojo). Los histogramas con líneas punteada corresponden a la condición de inhibición, mientras que los histogramas con línea sólida corresponden a la condición sin inhibir. **(B)** Porcentaje de inhibición de la unión/incorporación de hemocianinas en células con y sin inhibición con azúcares y DMA. El cálculo de los porcentajes se realizó en base a la intensidad de fluorescencia media (MFI), considerando como 100% a las células que no fueron tratadas. Análisis mediante test T. **** $p < 0,0001$. Las barras representan la media de dos experimentos independientes \pm SEM.

En los resultados se observó que la inhibición es aditiva para todas las hemocianinas en estudio, alcanzando una inhibición de aproximadamente 70% para CCH y FLH, y de aproximadamente un 90% para KLH. Estos resultados sugieren que CCH y FLH podrían unirse a estas células de forma inespecífica, o bien, a través de receptores diferentes a los estudiados, cuyos ligandos no sean azúcares. Además, no se puede descartar que persista un grado de macropinocitosis debido a la concentración de DMA utilizada. Aun así, se confirma que hay una contribución de los azúcares en la unión/incorporación de hemocianinas, aunque el mecanismo predominante sería el de macropinocitosis.

Finalmente, se estudió la unión/incorporación de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en macrófagos J774.2 previamente tratados con DMA 200 µg/ml (**figura 26**). Este tratamiento previo se realizó para inhibir la incorporación mediante macropinocitosis, y observar principalmente la participación de los azúcares. En este experimento, no se observó diferencia significativa entre la intensidad media de fluorescencia (MFI) de macrófagos tratados con CCH nativa y N-desglicosilada. Sin embargo, la unión/incorporación de FLH y KLH N-desglicosiladas disminuyó en aproximadamente un 20%, respecto a las hemocianinas nativas, sugiriendo una contribución de los N-glúcidos.

Ya que la disminución observada fue parcial, es probable que los glúcidos remanentes de las hemocianinas N-desglicosiladas sean suficientes para su unión/incorporación, o bien, en este proceso pueden participar otros receptores cuyos ligandos no sean carbohidratos. Aun así, estos resultados en conjunto sugieren una contribución de los azúcares en la unión de FLH y KLH a CLRs y su posterior endocitosis.

7.3.3 Análisis de la producción de citoquinas inducida por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en macrófagos de la línea J774.2.

Macrófagos J774.2 fueron incubados con las hemocianinas nativas y N-desglicosiladas a 500 µg/ml, y con LPS y medio de cultivo como controles positivo y negativo, respectivamente, y se analizó la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12p40, citoquinas que son inducidas por hemocianinas [48].

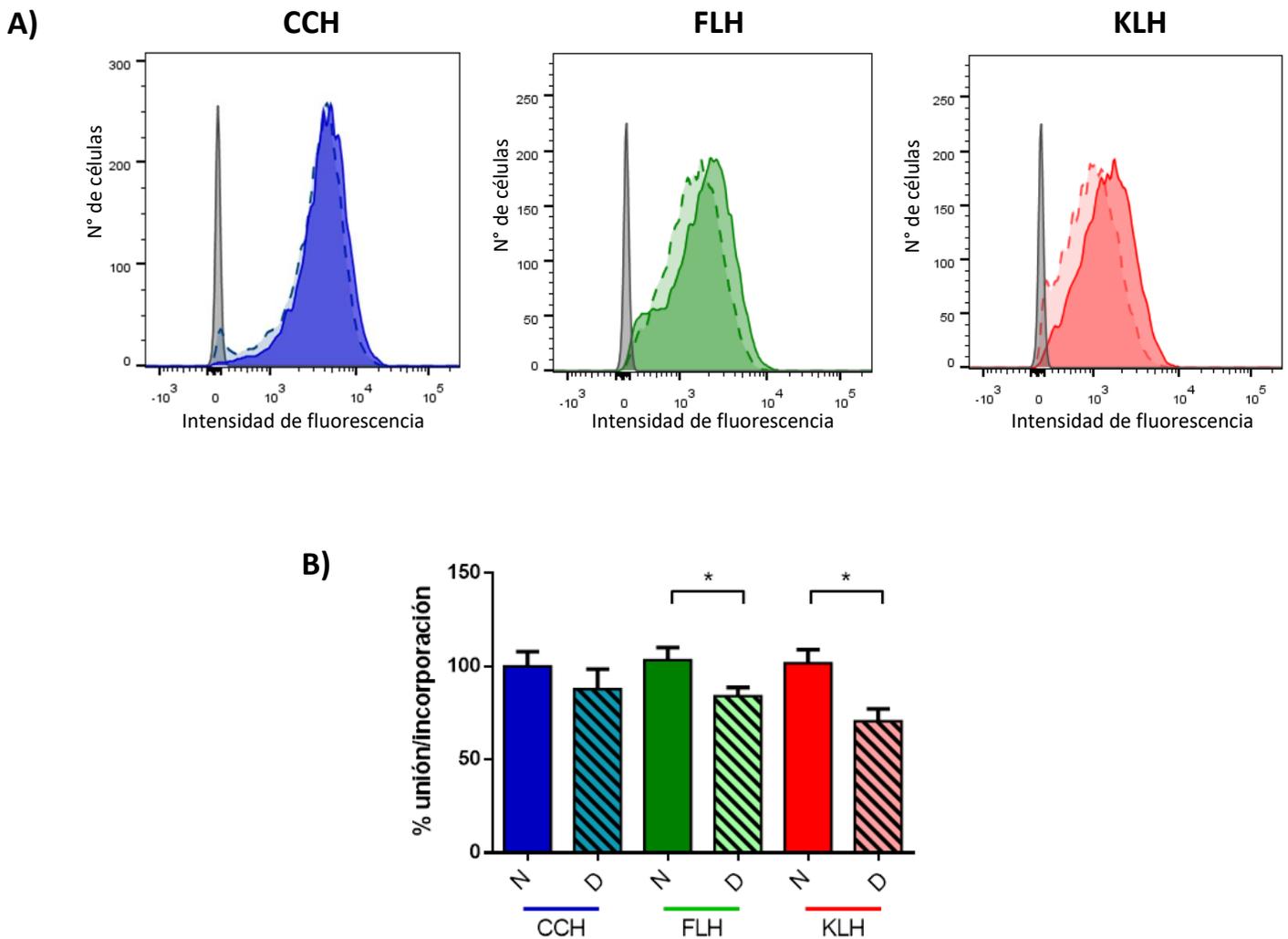


Figura 26. Efecto de la N-desglicosilación de las hemocianinas sobre su unión/incorporación en macrófagos J774.2. Los macrófagos J774.2 fueron tratados con DMA 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y posteriormente incubados con hemocianinas nativas (N) usadas como control y N-desglicosiladas (D), conjugadas al fluoróforo AlexaFluor-488, a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 1 hora, y se analizó la unión/incorporación mediante citometría de flujo. **(A)** Histogramas representativos de la unión/incorporación de hemocianinas. Se observa el control con PBS (gris), y la unión/incorporación de CCH (azul), FLH (verde) y KLH (rojo). Los histogramas con líneas punteada corresponden a hemocianinas N-desglicosiladas, mientras que los histogramas con línea sólida corresponden a hemocianinas nativas. **(B)** Porcentaje de unión/incorporación de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas. El cálculo de los porcentajes se realizó en base a la intensidad de fluorescencia media (MFI), considerando como 100% la unión/incorporación de hemocianinas nativas. Análisis estadístico mediante el test T. * $p < 0,05$. Las barras representan el promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes.

Si bien se analizaron los sobrenadantes de los cultivos a distintos tiempos, entre 1 y 24 horas, se observó una producción significativa de citoquinas sólo después de las 16 horas de incubación. Por esto, se recogieron los sobrenadantes a las 16 y 24 horas de incubación con hemocianinas, y se cuantificaron las citoquinas presentes mediante ELISA (**figura 27**).

Los primeros estudios, realizados para cuantificar TNF- α , muestran que a las 16 horas la producción de esta citoquina inducida por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas no presenta diferencias significativas, aunque FLH y KLH N-desglicosiladas tienden a producir menos TNF- α que las proteínas nativas. A pesar de esto, las señales están muy cerca del último punto de la curva de calibración (16 pg/ml), incluyendo la del control positivo. Por otra parte, al analizar el mismo experimento a las 24 horas de incubación, se observa que hay una producción significativa de TNF- α , tanto en el control positivo como en las células tratadas con hemocianinas nativas, producción que disminuye significativamente en células tratadas con FLH y KLH N-desglicosiladas, no así en las células tratadas con CCH N-desglicosilada.

Posteriormente, se realizó un ensayo para evaluar la producción de IL-6. Esta citoquina fue detectada en cantidades más altas que TNF- α a las 16 y 24 horas, cuando las células fueron tratadas con el control positivo y con las tres hemocianinas. A las 16 horas de incubación, se observó que la producción de FLH y KLH N-desglicosiladas disminuyó significativamente, respecto a las células tratadas con hemocianina nativa. A las 24 horas de incubación, se mantuvo la diferencia entre FLH nativa y N-desglicosilada, sin embargo, los niveles de IL-6 inducidos por KLH N-desglicosilada fueron similares a los inducidos por KLH nativa. Los niveles de IL-6 inducidos por CCH nativa y N-desglicosiladas se mantuvieron similares a las 16 y 24 horas.

Finalmente, en el ensayo realizado para detectar IL-12p40, los niveles de esta citoquina fueron muy bajos a las 16 horas, estando las señales muy cerca del último punto de la curva de calibración (16 pg/ml), al igual que lo observado con TNF- α . Sin embargo, al evaluar los niveles de citoquinas a las 24 horas, se observa una producción importante de IL-12p40 cuando las células fueron tratadas con LPS (400 pg/ml). La producción de IL-12p40 inducida por hemocianinas fue menor, cercana a 100 pg/ml, producción que fue menor cuando las células fueron tratadas con FLH y KLH N-desglicosiladas. En el caso de CCH, los niveles de IL-12p40 inducidas por la proteína nativa y N-desglicosilada fueron similares.

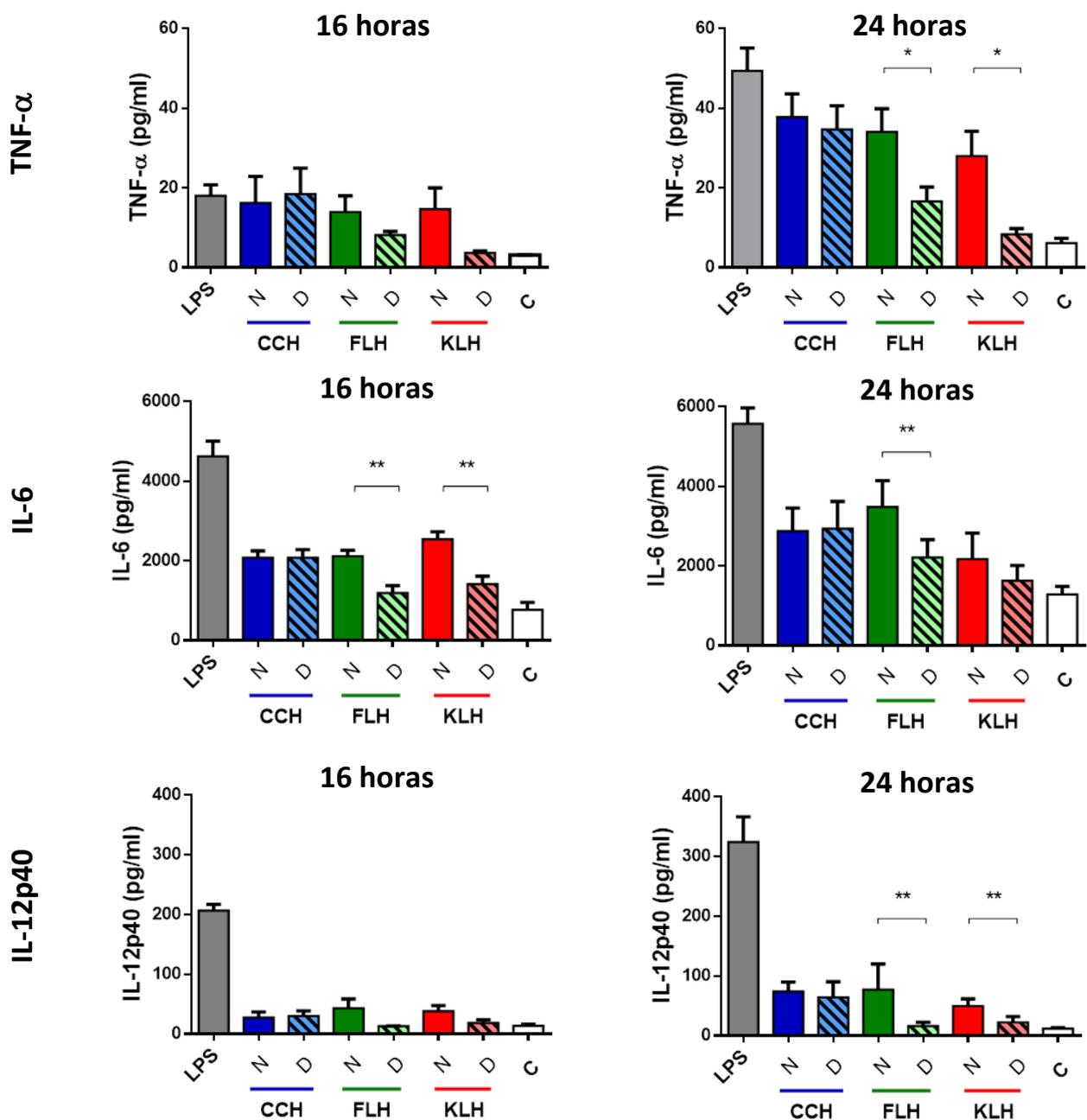


Figura 27. Análisis de la producción de citoquinas proinflamatorias, inducidas por hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en macrófagos J774.2. Las hemocianinas nativas (N) y N-desglicosiladas (D) fueron incubadas a 500 µg/ml, durante 16 y 24 horas, en la línea celular J774.2 y se cuantificó la presencia de TNF-α, IL-6 e IL-12p40 en los sobrenadantes de los cultivos. Como control positivo, las células fueron incubadas con el lipopolisacárido de *E. Coli* (LPS, gris), y como control negativo se utilizó el medio de cultivo sin hemocianinas (C, blanco). Las barras representan el promedio ± SEM de tres experimentos independientes. Análisis mediante test T de Student. *p<0,05. **p<0,01.

En conjunto, estos resultados demuestran que los N-glúcidos de FLH y KLH participan en la inducción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, tales como TNF- α , IL-6 e IL-12p40. En el caso de CCH, los resultados podrían atribuirse a que los azúcares remanentes son suficientes para inducir las citoquinas estudiadas. Así mismo, por los efectos de estas citoquinas, tanto en células del sistema inmune como en otros tejidos [74,75,76], se puede sugerir que los N-glúcidos de hemocianinas potenciarían su rol inmunoestimulante, favoreciendo la respuesta proinflamatoria producida en las APCs.

7.4 Análisis del efecto de las N-glicosilaciones de hemocianinas sobre la respuesta inmune humoral y antitumoral *in vivo*.

7.4.1 Estudio del efecto de la remoción de N-glicosilaciones de hemocianinas sobre la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas.

Se inmunizó intraperitonealmente a ratones C57BL/6, con 200 μ g de cada hemocianina nativa y N-desglicosilada, y además se incluyó un grupo control que sólo se inoculó con PBS, vehículo de las hemocianinas. La inmunización intraperitoneal se realizó los días 1 y 15 del experimento. El día 25 se realizó la sangría de los ratones, y se midió la respuesta inmune humoral mediante un ELISA, realizando diluciones seriadas de los sueros en base dos. Al analizar los títulos de anticuerpos correspondientes a la respuesta secundaria, se observó que fueron relativamente bajos en todos los ratones inmunizados, en torno a 1:200 diluciones o menores. Por este motivo, se optó por realizar una tercera inmunización, para lo cual se dio un refuerzo de 200 μ g de cada hemocianina nativa y N-desglicosilada, y 15 días después se realizó una nueva sangría. Al analizar la respuesta terciaria (**figura 28**), no se observó una diferencia significativa entre los grupos experimentales, sin embargo, se observó una tendencia a la baja en el título de anticuerpos de los sueros provenientes de ratones inmunizados con hemocianinas N-desglicosiladas, respecto a los sueros de los ratones inmunizados con hemocianinas nativas.

Título de anticuerpos anti-hemocianinas

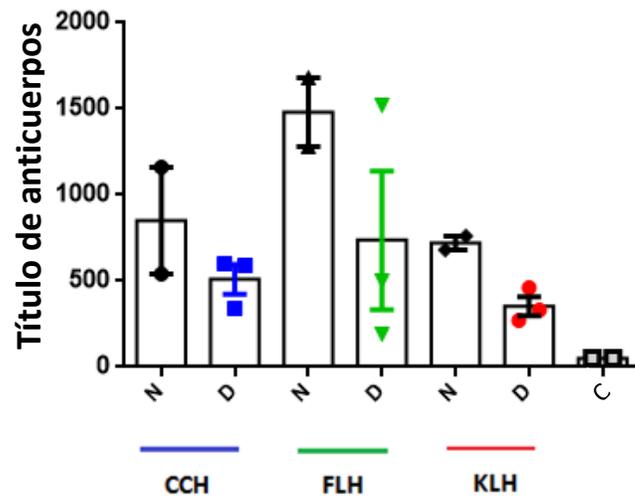


Figura 28. Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas nativas y N-desglicosiladas. 3 ratones por grupo se inmunizaron con 200 μ g de CCH, FLH y KLH nativa (N) y N-desglicosilada (D), o sólo con PBS como control del vehículo de las hemocianinas (C), los días 15, 25 y 40 del experimento. Posteriormente, se obtuvieron los sueros y se analizó el título de anticuerpo mediante ELISA. El título se definió como la dilución a la cual se alcanza la mitad de la DO máxima. Resultado de un experimento, los datos se muestran como promedio \pm SEM.

7.4.2 Estudio del efecto de la remoción de N-glicosilaciones de hemocianinas, sobre su potencial antitumoral en un modelo murino de melanoma.

Se inmunizó intraperitonealmente a grupos de 5 ratones C57BL/6, con 400 µg de cada hemocianina nativa y N-desglicosilada a modo de sensibilización, pues estudios previos demuestran que en la respuesta antitumoral de las hemocianinas participa la respuesta adaptativa [77]. Además, se incluyó un grupo control que sólo se inoculó con PBS, vehículo de las hemocianinas. Luego de 14 días, todos los ratones recibieron subcutáneamente $1,5 \times 10^5$ células B16F10, y los días posteriores recibieron 6 dosis de inmunoterapia, de 100 µg de cada hemocianina nativa y N-desglicosilada. Al analizar el volumen tumoral durante los 25 días de experimento, se observaron diferencias entre los resultados obtenidos con las distintas hemocianinas (**figura 29**). En el caso de CCH y FLH, los animales inmunizados con la proteína N-desglicosilada no presentaron diferencias significativas respecto a los inmunizados con la proteína nativa, sugiriendo que en estas proteínas la N-desglicosilación no afectaría su efecto antitumoral. En el caso de KLH, los animales inmunizados con la proteína N-desglicosilada presentaron un volumen tumoral significativamente mayor, comparado con el grupo inmunizado con hemocianina nativa, sugiriendo que para esta hemocianina los N-glúcidos sí participarían en el efecto antitumoral de esta proteína. Se observó, además, que todos los grupos inmunizados con hemocianina, nativa o N-desglicosilada, presentaron un menor volumen tumoral respecto al grupo control (PBS), confirmando el potente efecto antitumoral que presentan estas proteínas.

Por otra parte, al analizar el porcentaje de animales que presentaron tumor, se observa que en el grupo control (PBS) sólo el 60% de los animales desarrolló tumor, indicando que el número de células inyectado no fue suficiente para producir el crecimiento tumoral en todos los animales. De todos modos, este parámetro se midió también en los grupos inmunizados con hemocianina, donde se observó que para CCH y KLH nativas y N-desglicosiladas el porcentaje de animales con tumor al final del experimento fue de 60%. Este resultado fue distinto para FLH, donde la incidencia de tumores en el grupo inmunizado con proteína nativa fue de 80%, mientras que para el grupo de hemocianina N-desglicosilada fue de un 100%. Así mismo, en el grupo inmunizado con FLH nativa, la aparición de tumor fue significativamente más lenta, respecto al grupo de FLH N-desglicosilada.

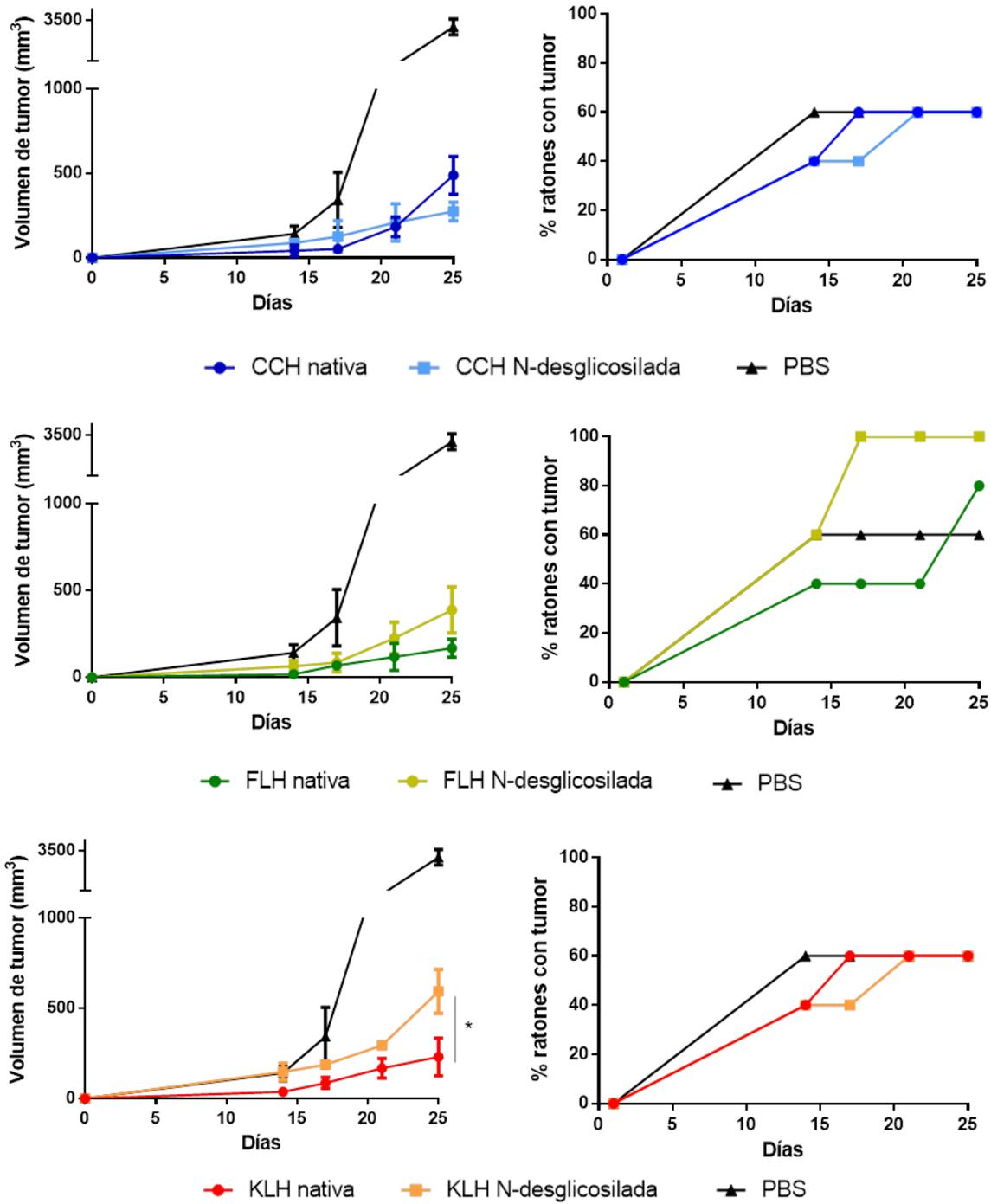


Figura 29. Evaluación del potencial antitumoral de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en un modelo de melanoma murino. 5 ratones por grupo se sensibilizaron con 400 µg de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, o sólo con PBS como control, y dos semanas después fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16F10. En los 18 días posteriores al desafío, se administraron 6 dosis de 100 µg de hemocianina a modo de inmunoterapia, y se monitoreó el porcentaje de animales con tumores, así como su volumen. Resultado de un experimento, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Análisis mediante test T. * $P < 0,05$.

En base a los resultados expuestos se puede sugerir que los N-glúcidos podrían contribuir en la respuesta antitumoral inducida por KLH, debido al aumento del volumen tumoral cuando estos azúcares son eliminados. En el caso de FLH, se observó un retardo en la cinética del porcentaje de animales con tumor, sin embargo, esto no permite afirmar que existe un efecto de la N-desglicosilación, porque el control del experimento sólo alcanzó un 60% de incidencia de tumores, y no un 100% como se hubiese esperado. Finalmente, para CCH no se observó diferencia significativa en ninguno de los parámetros estudiados, indicando que el potencial antitumoral de esta hemocianina no es dependiente de sus N-glúcidos, o bien, que las N-glicosilaciones remanentes son suficientes para inducir una respuesta antitumoral.

Antes de eutanasiar a los animales de este bioensayo se realizó una sangría, con el fin de estimar el título de anticuerpos específicos anti-hemocianina, ya que recibieron una dosis más alta de hemocianina, en comparación al primer ensayo de respuesta humoral (apartado 7.4.1). El título se estimó mediante ELISA, siguiendo el mismo protocolo descrito para el primer análisis. Los resultados de este experimento (**figura 30**), mostraron que los grupos inmunizados con CCH nativa y N-desglicosilada no presentaron diferencias significativas en el título de anticuerpos. Por el contrario, los resultados de FLH y KLH mostraron que los animales de los grupos inmunizados con proteínas N-desglicosiladas desarrollaron un título de anticuerpos significativamente menor, en comparación a los grupos inmunizados con hemocianinas nativas.

En conjunto, con los resultados de este experimento, no se puede elaborar conclusiones. A modo general se podría decir que hay diferencias entre las hemocianinas estudiadas. Por una parte, se demostró que las N-glicosilaciones contribuyen a la respuesta humoral y antitumoral inducida por FLH y KLH, las cuales disminuyen o tienden a disminuir cuando las hemocianinas son N-desglicosiladas. Por el contrario, no se observaron diferencias entre CCH nativa y N-desglicosilada en los parámetros analizados.

Título de anticuerpos anti-hemocianinas

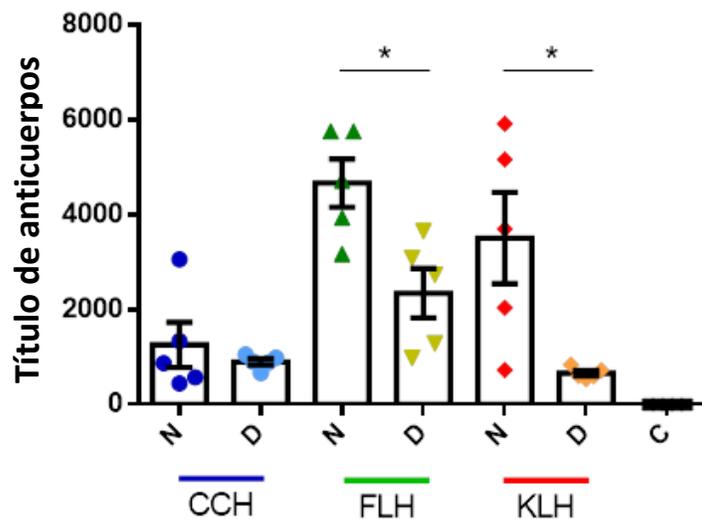


Figura 30. Evaluación de la respuesta inmune humoral anti-hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en un modelo de melanoma murino. 5 ratones por grupo se sensibilizaron con 400 μg de hemocianinas nativas (N) y N-desglicosiladas (D), o sólo con PBS como control (C), y dos semanas después fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16F10. En los 18 días posteriores al desafío, se administraron 6 dosis de 100 μg de hemocianina a modo de inmunoterapia. El día 25 se obtuvieron los sueros y se analizó el título de anticuerpos mediante ELISA. El título se definió como la dilución a la cual se alcanza la mitad de la DO máxima. Resultado de un experimento, los datos se muestran como promedio \pm SEM. Análisis mediante test T de Student. * $P < 0,05$.

8. DISCUSIÓN

Las hemocianinas de moluscos son glicoproteínas ampliamente utilizadas en biotecnología y biomedicina por sus efectos adyuvante e inmunoestimulante no específico, sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estas proteínas ejercen sus efectos inmunomoduladores no han sido completamente dilucidados. En esta tesis, se estudió el rol de los azúcares en la estructura de tres hemocianinas modelo, a saber, CCH, FLH y KLH, así como su contribución al potencial inmunogénico en la respuesta inmune humoral específica y antitumoral no específica en un modelo murino de melanoma.

Estudios previos de nuestro laboratorio, sugieren una participación de los azúcares en la respuesta inmune inducida por hemocianinas, entre ellos, estudios de la unión de dichas hemocianinas a los receptores de inmunidad innata MR, DC-SIGN y MGL mostraron que la unión es dependiente de los oligosacáridos ricos en manosa presentes en su estructura [47]. Así mismo, se realizaron estudios en macrófagos peritoneales y células dendríticas derivadas de médula ósea que mostraron una disminución del potencial inmunogénico y antitumoral de hemocianinas desglicosiladas químicamente con peryodato de sodio [78]. Sin embargo, existen ciertas limitaciones en la desglicosilación química mediante este procedimiento. En una primera instancia, se ha descrito que una cantidad significativa de azúcares ricos en manosa son resistentes a este tratamiento. En efecto, estudios con fetuína mostraron que la oxidación con peryodato de sodio elimina ácidos siálicos, sin embargo, más de un 80% de las manosas y hexosaminas permanecen intactas luego de este tratamiento y, dependiendo de la composición del árbol de glicosilación, también una proporción similar de galactosas permanecerían invariables luego de este tratamiento [54]. Adicionalmente, se observó que este método no es selectivo para azúcares, sino que también puede oxidar residuos de aminoácidos en las proteínas, formando bases de Schiff que permiten el entrecruzamiento de estos residuos y estabilizan la estructura didecamérica [8]. Así mismo, estudios en células dendríticas derivadas de médula ósea determinaron que, luego de ser incorporada, CCH desglicosilada químicamente es procesada más lentamente que CCH nativa. Además, esta investigación demostró que CCH tratada con peryodato de sodio presenta un mayor potencial inmunoestimulante a nivel de

respuesta humoral y potencial antitumoral [2]. Sin embargo, estudios con FLH demostraron que la producción de citoquinas y el potencial antitumoral de esta proteína disminuyen cuando es desglicosilada químicamente [8]. Por esto, si bien los estudios realizados con hemocianinas desglicosiladas químicamente han sido relevantes para estudiar la contribución de los azúcares, poseen las limitaciones mencionadas, ya que se tienen dos variables, por un lado se eliminan parcialmente los azúcares y por otro se rigidiza la molécula, haciendo necesario un método alternativo de desglicosilación que sólo afecte a los carbohidratos presentes en la proteína, para poder efectivamente estudiar su contribución en las propiedades inmunogénicas y antitumorales de hemocianinas.

8.1 La N-desglicosilación enzimática es selectiva, parcial, y afecta la estructura cuaternaria de las hemocianinas.

La desglicosilación seleccionada para realizar este trabajo fue la N-desglicosilación enzimática mediante un tratamiento con PNGasa F. Esta enzima remueve los N-glúcidos, que corresponden a los azúcares más abundantes en hemocianinas, cuando estos no poseen fucosas cercanas al residuo de asparagina [56]. Estudios estructurales en hemocianinas han descrito que los sitios de glicosilación son conservados, por lo que algunos azúcares podrían ubicarse en la cara externa de los didecámeros [14,16,18]. Sin embargo, hay evidencia de que estos glúcidos podrían ubicarse también en los *clusters* de unión a oxígeno y en los *loops* de unión entre FUs [23], sitios que no son del todo accesibles para la enzima. Considerando este aspecto, las subunidades de las hemocianinas en estudio fueron disociadas antes de ser desglicosiladas, ya que las moléculas completas no pudieron ser denaturadas o reducidas durante el tratamiento, pues formaron agregados, dando cuenta de que la desglicosilación, entre otros efectos, puede disminuir su solubilidad, como se ha dado cuenta en publicaciones previas [24]. Con estas consideraciones, se optó por realizar la desglicosilación en condiciones de disociación pues, aunque pudiesen quedar glúcidos inaccesibles para la enzima, las hemocianinas desglicosiladas mantenían su solubilidad, permitiendo posteriores análisis tanto de tipo estructurales como inmunológicos.

Por otra parte, es relevante considerar que múltiples proteínas, entre ellas KLH, contienen fucosas cercanas al residuo de asparagina, específicamente, fucosas unidas a N-acetilglucosamina, estructuras que en disposición $\alpha(1-3)$ inhiben a la enzima e imposibilitan la remoción de aquellos árboles de glicosilación [8,19,21], sugiriendo que el uso de PNGasa F produciría una desglicosilación parcial. Si bien dichas estructuras no se han descrito para CCH y FLH, mediante *Lectin array blot* se observó que en CCH las fucosas no eran removidas, mientras que en FLH eran removidas parcialmente, indicando que dichos monosacáridos podrían inhibir a la enzima debido a su disposición con respecto al residuo de asparagina. Los aspectos mencionados dan cuenta de la dificultad existente para desglicosilar totalmente una hemocianina, sin embargo, este trabajo demuestra que mediante el protocolo establecido se logró una desglicosilación parcial y selectiva.

Del mismo modo, los resultados de este trabajo contribuyeron a caracterizar los monosacáridos que componen los azúcares de hemocianinas, entre ellos, centros complejos de N-acetilglucosamina compuestos por más de 3 unidades de este monosacárido. Además, se confirmó la presencia de α -manosa, y se detectó la presencia de fucosas unidas a glúcidos complejos, principalmente a manosa y N-acetilglucosamina. Por otra parte, se observó una alta señal de β -galactosa en todas las hemocianinas, mientras que N-acetilgalactosamina se detectó sólo en FLH. Ambas señales disminuyeron luego del tratamiento con PNGasa F, confirmando que CCH, FLH y KLH podrían contener N-glúcidos mixtos abundantes en galactosa [16]. Además, se detectó la presencia del antígeno T en todas las hemocianinas. El hecho de que estas proteínas tengan glúcidos tan complejos y heterogéneos sustenta la hipótesis de que puedan interactuar con varios CLRs, comportándose como multiligandos, como ya se ha descrito, produciendo así un amplio espectro de respuestas como se detallará en el apartado 8.2. Del mismo modo, los análisis de las hemocianinas nativas y desglicosiladas con PNGasa F mediante SDS-PAGE, aportaron evidencia sobre el porcentaje de N-glicosilaciones de FLH, dato que no había sido estimado y que estaría en torno al 4,1% p/p. Del mismo modo, considerando que los N-glúcidos corresponden aproximadamente a un 75-80% de los glúcidos totales de las hemocianinas en estudio [20,65], se estimó que el porcentaje total de azúcares de FLH estaría cercano al 5,4%. Los resultados en conjunto demuestran que FLH posee una mayor cantidad de glúcidos y más

heterogéneos que CCH y KLH, aspecto importante a considerar dado que FLH posee un mayor potencial inmunoestimulante y antitumoral [8,10].

Desde otra perspectiva, los análisis estructurales mediante MET y dicroísmo circular demostraron que la N-desglicosilación afecta la estructura cuaternaria de las hemocianinas, disminuyendo significativamente la formación de didecámeros, sin embargo, no tiene efecto en su estructura secundaria. Numerosos estudios han demostrado que las proteínas desglicosiladas sufren alteraciones en distintos aspectos, tales como el plegamiento, tráfico, solubilidad y susceptibilidad a ser proteolizadas [79]. Sin embargo, se ha descrito también que el grado de desglicosilación influiría en estos parámetros, tal como en el caso de la β 2 glicoproteína I, proteína plasmática humana, donde se observó que la señal de dicroísmo de dicha proteína nativa y desglicosilada enzimáticamente de forma parcial no mostraba cambios, sin embargo, el espectro presentaba modificaciones al remover más del 96% de los glúcidos [80]. Del mismo modo, se ha descrito que la presencia de pocos azúcares, tanto N- como O-oligosacáridos, es suficiente para estabilizar la estructura de las proteínas, tales como la proteína polimórfica de membrana C (PMP-C), la gonadotropina coriónica humana (hCG) y el *cluster* de diferenciación humano 2 (CD2) [81,82,83]. Ya que la desglicosilación de las hemocianinas en este trabajo fue parcial, es probable que los N-glúcidos remanentes y de difícil acceso para la enzima, en conjunto con los O-glúcidos, fuesen suficientes para mantener su estructura secundaria.

Respecto a la estructura cuaternaria, se ha descrito que distintas proteínas son estabilizadas por la presencia de N-glúcidos, pues las glicosilaciones disminuirían las fluctuaciones dinámicas de su estructura. En el caso de los decámeros, se ha descrito en diversas hemocianinas, tales como la de *T. pacificus*, que cada FU posee distintos niveles de glicosilación, sin embargo, la mayoría de los glúcidos se ubican en el extremo C-terminal de las FUs. Al asociarse las subunidades, los extremos C-terminales de las FUs, altamente glicosilados, quedan ubicados en la interfase de unión entre subunidades, sugiriendo que los azúcares podrían reforzar o estabilizar dicha unión. Es probable que la remoción de los N-glúcidos debilite la unión entre las subunidades, siendo esta una posible explicación para el efecto observado en CCH, FLH, y KLH, donde se obtuvo una disminución del número de didecámeros por efecto de la N-desglicosilación, y que es comparable a los resultados obtenidos por Gai y cols. [23].

En relación con los resultados obtenidos en las curvas de estabilidad, se observó que la N-desglicosilación modifica el replegamiento de FLH y KLH. La literatura disponible sugiere que, si bien los azúcares no participarían directamente en el replegamiento de proteínas en solución, sí estabilizarían ciertas estructuras intermediarias, guiando el proceso de replegamiento para alcanzar la estructura final [84]. Por ejemplo, estudios mediante dinámica molecular concluyeron que en la proteína aglutinina del poroto de soya (SBA), las estructuras intermediarias formadas durante el desplegamiento de dicha proteína con y sin glicosilaciones eran muy similares, sin embargo, las correspondientes a la SBA glicosilada mostraron una energía libre menor, parámetro que indica mayor estabilidad, respecto a la SBA sin sus azúcares [85]. Así mismo, estudios de replegamiento en la lectina de *Erythrina corallodendron* (ECorL) con y sin sus azúcares, demostraron que los oligosacáridos de esta proteína afectaban el proceso de replegamiento, aunque la estructura final obtenida para ambas proteínas fue la misma [86]. Por esto, es probable que las diferencias en las curvas de replegamiento de hemocianinas N-desglicosiladas, respecto a hemocianinas nativas, se deba a que las estructuras intermediarias serían menos estables, haciendo más lento el replegamiento hacia una estructura similar a la de hemocianinas nativas, o bien, llevando a la formación de estructuras disímiles, e incluso a la formación de agregados como se observó para CCH.

8.2 Las hemocianinas se unen a distintos CLRs, y la unión es dependiente de sus azúcares.

En nuestro laboratorio se ha demostrado la unión de hemocianinas al MR, DC-SIGN y MGL mediante SPR, y la dependencia de los azúcares en esta unión [47]. Sin embargo, debido a lo heterogéneas que son las glicosilaciones de las hemocianinas, no se descarta su unión a otros CLRs. En este trabajo, se confirmó la unión de hemocianinas al MR, y también se estudió su interacción con los receptores Dectina-1 y Dectina-2. Además, se demostró que la unión al MR y a Dectina-2 ocurre en forma específica con los N-glúcidos, mientras que la unión a Dectina-1 es dependiente de los azúcares de hemocianinas, pero no se pudo determinar con qué tipo de glicosilación. Esto puede explicarse en parte porque se ha descrito que Dectina-1 reconoce azúcares en disposición β (β -glúcidos), sin embargo, no se han identificado sus monosacáridos

preferentes, sugiriendo que Dectina-1 reconoce azúcares por su estructura, más allá de su composición [87].

La unión de CCH, FLH y KLH a los receptores descritos en esta tesis y en trabajos anteriores [47], posee gran relevancia a nivel inmunológico, pues explica en parte los efectos descritos en la respuesta inmune anti-hemocianinas y, además, sugiere que esta respuesta sería potenciada gracias a sus N-glúcidos [8,48]. Se ha descrito que los ligandos del MR que están altamente manosilados, son presentados de forma más eficiente a linfocitos T, en MHC-I/II, respecto a sus ligandos no manosilados [88]. Dectina-1 y Dectina-2 por su parte, favorecen la activación de la respuesta inmune innata a través de la quinasa Syk, por lo que una menor unión de hemocianinas N-desglicosiladas, respecto a hemocianinas nativas, podría relacionarse con efectos moderados de estos CLRs, tales como menor eficiencia en la presentación antigénica o en la producción de citoquinas por parte de las APCs.

Los análisis realizados mediante *Lectin array blot* confirmaron la presencia de N-glúcidos ricos en manosa, N-acetilglucosamina y fucosa, además de galactosa en las hemocianinas. Debido a que estas proteínas se unen a variados CLRs, no se puede descartar su unión a otros receptores a través de sus azúcares, tales como otras proteínas de la familia SIGN, DCIR, BDCA-2, entre otros, receptores que también reconocen glúcidos y producen efectos inmunomoduladores en las APCs que los expresan [89,90,91]. Así mismo, aunque los azúcares de hemocianinas han sido descritos clásicamente como ricos en manosa, los resultados de este trabajo muestran que también poseen abundantes galactosas, ligandos del MGL, cuya unión a FLH y KLH ha sido descrita [47]. Este receptor, de modo similar al MR, favorece la endocitosis de sus ligandos y posterior presentación antigénica, por lo que la contribución de las galactosas, tanto de N- como de O-glúcidos, a la incorporación y presentación antigénica de estas hemocianinas no se puede descartar [92].

Adicionalmente, es necesario considerar que estudios en monocitos humanos THP-1 han sugerido que las hemocianinas no sólo producirían la activación de la quinasa Syk luego de unirse a receptores, sino que también activan la quinasa Erk, proteína que es parte de la vía de las quinasas asociadas a mitógenos (MAPK) [93]. Si bien la quinasa Erk está río abajo de Syk, también puede activarse por la vía de los TLRs, específicamente TLR2 o TLR4, por lo que no se descarta

que estos receptores participen en la respuesta anti-hemocianinas, considerando además que el MR no tiene motivos de señalización y que requiere acoplarse con otros receptores para transducir su señal [94]. Aunque el ligando preferente de TLR2 y TLR4 es el lipopolisacárido bacteriano (LPS), se ha descrito un amplio espectro de virus, bacterias y moléculas que se unen a ellos, tales como polisacáridos, incluyendo zimosano [95,96]. De este modo, también se ha descrito que los CLR y TLRs podrían colaborar en su respuesta, presentando un efecto sinérgico cuando ambos son activados mediante ligandos fúngicos [97].

Aunque las hemocianinas se unen a múltiples CLR, y probablemente interactúen con otros tipos de receptores, el estudio realizado en esta tesis permite concluir que dicha unión es dependiente de sus azúcares, y aunque los residuos de carbohidratos remanentes produzcan una unión basal a algunos de los CLR estudiados, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que esta unión ocurriría con menor afinidad, induciendo una respuesta inmune menos eficiente, en comparación a una hemocianina altamente glicosilada.

8.3 Los N-glúcidos participan en la producción de citoquinas inducida por hemocianinas en APCs, y contribuyen parcialmente a su unión/incorporación.

Las hemocianinas son incorporadas en APCs mediante macropinocitosis y mediante endocitosis mediada por receptores, como se ha descrito en macrófagos peritoneales y en células dendríticas derivadas de médula ósea [2,8]. En el primer caso, las células incorporan moléculas y antígenos de forma no selectiva, mediante extensiones de la membrana plasmática que forman macropinosomas [98]. En el segundo mecanismo, los receptores de membrana se unen al ligando con alta afinidad, y se forman invaginaciones de la membrana plasmática, recubiertas de moléculas como clatrina o caveolina, que posteriormente forman endosomas tempranos, endosomas tardíos y finalmente se fusionan con lisosomas formando fagolisosomas [99].

En esta tesis, se analizó la unión/incorporación de hemocianinas nativas y N-desglicosiladas en macrófagos murinos J774.2 en los cuales la macropinocitosis fue inhibida mediante un tratamiento con DMA, observándose una disminución en la unión/incorporación

de FLH y KLH N-desglicosilada, de aproximadamente un 20-30%. En el caso de CCH, no se observó una diferencia significativa en este proceso entre la hemocianina nativa y N-desglicosilada. Aunque estos resultados sugieren una contribución de los glúcidos en la unión e incorporación mediada por receptores de las hemocianinas a dichas células, demuestran que cuando ellas son N-desglicosiladas también logran unirse e incorporarse a ellas. Una explicación posible, como se mencionó en el apartado 8.2, es que los oligosacáridos remanentes de la N-desglicosilación pueden ser suficientes para mediar la interacción de estas proteínas con los receptores, pues las hemocianinas se unen a múltiples CLRs. Así mismo, el tratamiento con DMA en las condiciones descritas produce una inhibición mayoritaria de la macropinocitosis, pero esta inhibición no es total, por lo que no es posible descartar un grado basal de incorporación de hemocianinas por otros mecanismos independiente de sus azúcares [100]. Para explicar este punto es necesario considerar que la macropinocitosis, a modo general, es inhibida significativamente cuando el pH intracelular es menor a 7,2, en comparación a la endocitosis vía receptores, que es inhibida cuando el pH es menor a 6,4. Esto se explica pues, si bien en ambos procesos influye el remodelamiento del citoesqueleto de actina, poseen diferentes mecanismos y proteínas reguladoras, cuya sensibilidad al cambio de pH también es distinta [73]. En células J774.2 se ha estimado que el pH intracelular es aproximadamente 7,5, y dadas las condiciones experimentales, se estima que el pH disminuiría aproximadamente 0,5 unidades, siendo el pH intracelular cercano a 7 posterior al tratamiento con 200 $\mu\text{g/ml}$ de DMA [101,102,103]. En estas condiciones, el tratamiento con DMA no afectaría la unión a receptores y posterior incorporación, permitiendo así estudiar la contribución de los azúcares. Sin embargo, en las condiciones ensayadas la inhibición de la macropinocitosis es significativa, pero no total, no descartándose así un grado basal de incorporación en forma inespecífica. Cabe mencionar que la concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de DMA fue establecida experimentalmente durante el curso de este estudio, pues a concentraciones mayores disminuía la viabilidad celular.

Es relevante mencionar también que, en los experimentos realizados mediante citometría de flujo, el análisis se describió como un estudio de la unión/incorporación. Evidencias de nuestro laboratorio han demostrado mediante MET, que macrófagos peritoneales y células dendríticas derivadas de médula ósea cultivadas *in vitro* con hemocianinas, incorporan completamente estas proteínas luego de 1 hora de incubación. De este modo, podemos suponer

que a este tiempo de incubación, las hemocianinas fluorescentes ya están en el interior de las células. Sin embargo, como los análisis mediante citometría de flujo no permiten comprobarlo, el parámetro a analizar se describió como unión/incorporación, considerando de este modo tanto la unión de hemocianinas a receptores en la membrana plasmática, así como la incorporación ya sea en vesículas recubiertas de clatrina o mediante macropinocitosis.

Desde otro punto de vista, aunque estos resultados sugieren que los azúcares participarían en la unión/incorporación de hemocianinas en APCs, es necesario mencionar que estas células no sólo incorporan antígenos mediante receptores, sino que además están continuamente incorporando antígenos inespecíficamente mediante macropinocitosis [98]. Es por esto que, probablemente en un contexto fisiológico las hemocianinas serían incorporadas en APCs preferentemente mediante macropinocitosis, sin embargo, los glúcidos en su estructura tendrían que ver con los efectos moduladores de estas proteínas y con las vías de señalización de las mismas para inducir un microambiente proinflamatorio.

Como ya se ha mencionado, la unión de hemocianinas a CLRs, dependiente de sus azúcares, tiene consecuencias inmunológicas tales como estimular la producción de citoquinas proinflamatorias, generando un microambiente proinflamatorio benéfico que favorece la presentación antigénica a linfocitos T. Es por esta razón, que se evaluó la contribución de los N-glúcidos en la producción de citoquinas proinflamatorias en los macrófagos J774.2. A modo general, se observó una disminución en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-12p40 inducida por FLH y KLH N-desglicosiladas, respecto a hemocianinas nativas, demostrando que la disminución en la unión a CLRs se correlaciona con una menor respuesta de las APCs en cuanto a producción de mediadores proinflamatorios. Se evaluaron estas citoquinas pues son producidas por macrófagos, entre otras APCs, y tienen funciones efectoras relacionadas con la respuesta inmune anti-hemocianinas. En el caso de TNF- α , esta citoquina produce la activación de NF- κ B y de las vías de MAPK en células del sistema inmune, tales como linfocitos T efectores y reguladores, favoreciendo la supervivencia, proliferación y diferenciación de células inmunes y también de otros tejidos. Así mismo, puede conducir a la apoptosis de células, aunque este proceso está normalmente enmascarado por el efecto anti-apoptótico de NF- κ B [74]. En el caso de IL-6, esta citoquina posee efectos pleiotrópicos, siendo relevante su rol como inductor del desarrollo de

linfocitos T CD4+ y CD8+ efectores, así como su rol estimulador de la producción de anticuerpos en linfocitos B, entre otros [75]. Finalmente, entre los efectos de IL-12p40 destacan la activación de la respuesta citotóxica de células NK y de linfocitos T CD8+ y, además, la activación de la respuesta adaptativa de tipo Th1 [76].

Pensando nuevamente en un contexto fisiológico, aunque las hemocianinas N-desglicosiladas fuesen incorporadas mediante macropinocitosis de forma inespecífica, la menor unión a CLRs y menor producción de las citoquinas señaladas podría conllevar a una respuesta efectora disminuida, en comparación a la respuesta de hemocianinas nativas. Una menor producción de TNF- α podría relacionarse con una menor respuesta sistémica, sin embargo, la menor producción de IL-6 e IL-12 podrían relacionarse con una respuesta humoral disminuida y una respuesta adaptativa de tipo Th1 desfavorecida [74,75,76]. Es relevante considerar, respecto a los fenotipos efectores de linfocitos T CD4+, que una disminución en los glúcidos no sólo podría desfavorecer una respuesta de tipo Th1, sino que una variación en la composición de los azúcares también puede alterar la respuesta inmunomoduladora. Como se mencionó, las hemocianinas N-desglicosiladas perdieron manosas, N-acetilglucosaminas y galactosas, sin embargo, poseen fucosas remanentes. Por esto, las hemocianinas N-desglicosiladas son proteínas abundantes en fucosa. Se ha descrito que los azúcares cuyo monosacárido mayoritario es fucosa también son capaces de unirse a CLRs, sin embargo, a diferencia de los glúcidos ricos en manosa, los ligandos altamente fucosilados inducen vías alternativas de activación de Nf- κ B, que favorecen la respuesta adaptativa de tipo Th2 y desfavorecen la respuesta Th1 [104]. Por esto, no se descarta que las hemocianinas parcialmente desglicosiladas, además de desfavorecer la respuesta de tipo Th1 favorezcan otros fenotipos.

Respecto a CCH, no presentó diferencias en la unión/incorporación ni en la producción de citoquinas al ser N-desglicosilada. Considerando que en FLH y KLH se demostró una participación de los N-glúcidos en la respuesta anti-hemocianinas, es probable que los azúcares remanentes de CCH sean suficientes para inducir las respuestas mencionadas. Como se señaló en el apartado 8.1, los efectos de la desglicosilación en ocasiones son variables según el grado de desglicosilación alcanzado [80], por lo que no se puede descartar que CCH requiera un tratamiento más exhaustivo para observar un efecto a este nivel. Esta idea es sustentada en los

análisis mediante SPR realizados en nuestro laboratorio, en los que se estudió la afinidad de la unión de hemocianinas a MR, DC-SIGN y MGL, determinada según la constante de disociación. En estos experimentos se observó que FLH y KLH desglicosiladas químicamente no se unían a ninguno de los receptores estudiados. Por el contrario, habiéndose sometido a la desglicosilación química, la unión de CCH a DC-SIGN aún persistía. Por esto, no se descarta que los glúcidos remanentes de esta proteína sean suficientes para mediar la unión a CLR y producir los efectos inmunomoduladores descritos [47].

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren fuertemente que la endocitosis mediada por receptores, así como la producción de citoquinas que favorecen una respuesta de tipo Th1 estarían influenciadas por los N-glúcidos de CCH, FLH y KLH, evidencia que sustenta el rol modulador de los azúcares presentes en estas glicoproteínas.

8.4 Los N-glúcidos de hemocianinas contribuyen a la respuesta humoral y participarían en la respuesta antitumoral no específica.

La respuesta inmune humoral anti-hemocianinas se analizó en dos series experimentales, en la primera oportunidad en ratones C57BL/6 *naive*, y en la segunda en ratones de la misma cepa que habían sido desafiados con células de melanoma de la línea B16F10. En el primer caso, los ratones (3 por grupo) recibieron 600 µg totales de cada hemocianina, no observándose una diferencia significativa en la respuesta humoral, estimada mediante el título de anticuerpos, aunque sí una tendencia a la baja en los ratones inmunizados con las hemocianinas N-desglicosiladas. En cambio, en el segundo caso, los ratones (5 por grupo) recibieron 1 mg total de cada hemocianina y sí se observó una disminución significativa en la respuesta humoral en los animales inmunizados tanto con FLH como KLH N-desglicosilada, no así en CCH, en que solo se observó una leve disminución, respecto a los grupos inmunizados con hemocianina nativa. Estos resultados sugieren una participación de los glúcidos en la respuesta humoral anti-hemocianinas. Como se mencionó inicialmente, la respuesta humoral se caracteriza por la producción de anticuerpos por los linfocitos B, cuyo receptor de antígenos puede reconocer epítomos en proteínas, lípidos o azúcares [30]. En el caso de las infecciones por

algunos parásitos, se ha descrito que los organismos infectados desarrollan anticuerpos de tipo IgM e IgG que son, en su mayoría, anticuerpos anti-glicotopos. Esto ha sido demostrado en las infecciones por *Schistosoma mansoni*, *Toxocara canis*, y *Haemonchus contortus*, entre otros helmintos, que corresponden a patógenos cuya superficie se encuentra altamente glicosilada [105,106]. Ya que las hemocianinas se pueden considerar "organismos altamente glicosilados", es probable que la respuesta humoral contra estas proteínas esté compuesta por una cantidad significativa de anticuerpos contra glicotopos, pues por su heterogeneidad podrían ser reconocidos por un amplio repertorio de BCRs. Sin embargo, la unión de hemocianinas a los BCR por sí sola no sería suficiente para activar a linfocitos B, pues corresponden a antígenos timo-dependientes, es decir, requieren la colaboración de linfocitos T CD4+ para producir la activación de linfocitos B [107]. Teniendo en cuenta esta evidencia, una opción es que inicialmente las hemocianinas N-desglicosiladas sean reconocidas por un menor espectro de BCRs, respecto a las hemocianinas nativas. Así mismo, la menor producción de citoquinas en la respuesta inmune podría desfavorecer el ambiente proinflamatorio, disminuyendo la activación tanto de linfocitos B como de linfocitos T colaboradores.

Otro aspecto por considerar al momento de evaluar la respuesta inmune humoral es la naturaleza de los epítomos que reconocen los anticuerpos, que pueden ser lineales o conformacionales, y que coexisten en el suero de un organismo inmunizado [108]. Como se ha descrito mediante MET, las hemocianinas N-desglicosiladas no se encuentran como didecámeros, a diferencia de las hemocianinas nativas, lo que podría generar neoepítomos. Por esto, no se puede descartar que sean reconocidas por BCRs distintos a los que reconocen hemocianinas nativas, pues además de haber perdido sus azúcares, su conformación a nivel de estructura cuaternaria es diferente. Así mismo, considerando que los N-glúcidos se unen a residuos de asparagina, los que se transforman en residuos de ácido aspártico cuando el glúcido es removido, no se puede descartar una modificación en la secuencia de hemocianinas, especialmente ante el hecho de que una hemocianina puede tener más de 120 asparaginas glicosiladas [18]. Por lo tanto, no se puede descartar que el cambio en el residuo de un aminoácido pueda afectar el reconocimiento de epítomos lineales de algún BCR específico. Estas modificaciones a nivel de secuencia y estructura cuaternaria podrían implicar que las

hemocianinas N-desglicosiladas sean reconocidas por un menor repertorio de BCRs, además de los aspectos mencionados respecto a sus azúcares.

Finalmente, existe evidencia de que en ocasiones un antígeno glicosilado o desglicosilado no sólo produce distintos títulos de anticuerpos, sino que también produce distintas clases y subclases de los mismos. Se observó en un modelo de infección con *Echinostoma caproni* glicosilado, N- y O-desglicosilado, que los sueros de mamíferos inmunizados con el parásito desglicosilado presentaron altos niveles de IgM y bajos niveles de IgG, mientras que el parásito glicosilado presentó una alta producción tanto de IgM como de IgG. Esto sugiere que el parásito en su forma glicosilada produciría la diferenciación de células B y maduración de sus anticuerpos. Del mismo modo, el parásito N-desglicosilado presentó niveles muy bajos de IgG3, respuesta predominante en el modelo de estudio, mientras que el parásito O-desglicosilado no presentó cambios respecto al parásito glicosilado. Los niveles de IgG1, por otra parte, no presentaron variaciones [106]. Estos resultados sugieren que, además del título de anticuerpos, los N-glúcidos pueden modular las respuestas, activando distintas clases y subclases de anticuerpos.

Respecto al potencial terapéutico de las hemocianinas, se ha descrito que estas proteínas poseen propiedades antitumorales por sí solas en distintos modelos de cáncer, tales como melanoma y cáncer superficial de vejiga, entre otros [8,10,77,109]. Básicamente, al producirse la respuesta inmune contra las hemocianinas, se generaría un ambiente proinflamatorio benéfico, que estimularía el desarrollo de respuestas inmunes latentes que se estén produciendo contra células tumorales o infectadas por patógenos, efecto conocido como *bystander*, en este caso, positivo. Es así que las APCs, luego de incorporar hemocianinas vía CLRs gracias a sus azúcares, pueden presentarlas procesadas en MHC-II, pero también existe la posibilidad que se presenten en MHC-I vía presentación cruzada, activando linfocitos T CD8+ y promoviendo sus efectos citotóxicos contra células tumorales [47]. Así mismo, también se ha propuesto que la producción de IL-12 inducida por la interacción de hemocianinas con sus CLRs a través de sus azúcares, es capaz de estimular a células citotóxicas, tales como células NK y linfocitos T CD8+ [76]. Las células NK activadas, junto a los linfocitos T CD4+ activados mediante la presentación antigénica, producen IFN- γ , citoquina esencial en la respuesta antitumoral. Esta citoquina, además de mantener un ambiente proinflamatorio, puede actuar directamente contra las células

tumorales deteniendo su proliferación, induciendo su apoptosis, o favoreciendo la expresión de MHC-I en las mismas células del tumor, promoviendo de este modo su reconocimiento mediante linfocitos T CD8+ [110]. Este aumento en los niveles de IFN- γ han sido detectados en modelos murinos de cáncer superficial de vejiga inmunizados con hemocianinas, así como en pacientes con este cáncer, inmunizados con KLH [77,111]. Del mismo modo, estudios con KLH han demostrado que, gracias a sus epítomos cruzados con células tumorales, los anticuerpos anti-KLH reconocen a las células tumorales, permitiendo su destrucción mediante citotoxicidad celular mediada por anticuerpos [112]. Si bien existe evidencia que sustenta estos mecanismos, casi todos se basan en que el inicio de la respuesta anti-hemocianinas sería a través de la unión de hemocianinas a los CLRs mediante sus azúcares. No obstante, también se ha descrito la presencia de anticuerpos naturales en donantes humanos, que presentan reacción cruzada con KLH, CCH y FLH, que activan la vía clásica del complemento [113].

En los resultados obtenidos, mediante estudios en un modelo murino de melanoma B16F10, se observó que los animales inmunizados con KLH N-desglicosilada presentaron un mayor volumen tumoral, en comparación a los animales inmunizados con KLH nativa. Este resultado sustenta que para esta hemocianina los N-glúcidos pueden contribuir en su potencial antitumoral, sin embargo, por tratarse de sólo un bioensayo, esta propiedad de los carbohidratos de las hemocianinas no es concluyente. No obstante, considerando el/los posibles mecanismos antitumorales de las hemocianinas, estos resultados podrían explicarse por el menor título de anticuerpos producidos por KLH N-desglicosilada, que reaccionan en forma cruzada con el tumor [10], disminuyendo la citotoxicidad mediada por anticuerpos, así como por los niveles bajos de IL-12, que podrían conllevar una menor activación de células citotóxicas. En el caso de CCH y FLH, sin embargo, no se observó diferencia entre las hemocianinas nativas y N-desglicosiladas, en cuanto al volumen tumoral de los animales en experimentación. Este resultado podría explicarse en parte por los azúcares remanentes de dichas hemocianinas, que podrían ser capaces de inducir una respuesta antitumoral. Como se mencionó en el apartado 8.3, en este trabajo se analizaron las citoquinas características para la respuesta inmune anti-hemocianinas que promueven una respuesta de tipo Th1, sin embargo, no se puede descartar una polarización hacia un fenotipo distinto que también conlleve a una respuesta antitumoral. Al respecto, existe evidencia de que, si bien la respuesta de tipo Th1 produce un mayor efecto citotóxico, otras

respuestas tales como Th2 son capaces de eliminar igualmente los tumores, favoreciendo la necrosis de los mismos mediante infiltración de granulocitos en el tumor, tales como eosinófilos [114,115]. Por esto, es probable que CCH y FLH sean capaces de modular otro tipo de respuestas gracias a los glúcidos remanentes luego de la desglucosilación parcial.

Es relevante mencionar que el análisis de incidencia tumoral, correspondiente al porcentaje de ratones con tumor en cada grupo, no resultó concluyente pues en el grupo control sólo un 60% de los animales desarrolló tumores. Una interpretación posible es que, la cantidad de células inyectada fue muy baja y el sistema inmune de los ratones control se defendió del tumor, sugiriendo que en los próximos experimentos, se debe realizar el desafío con un número mayor de células tumorales. De todos modos, en los grupos inmunizados con CCH y KLH nativa y N-desglucosilada se observó un 60% de incidencia tumoral, sugiriendo que el tratamiento con hemocianinas no inhibe la aparición del tumor, pero sí inhibe significativamente su crecimiento, respecto al control con el vehículo de estas proteínas. En el caso de FLH, el grupo inmunizado con proteína N-desglucosilada alcanzó un 100% de ratones con tumor en los primeros días, mientras que el grupo tratado con FLH nativa mostró un 80% sólo al final del experimento. Esto podría sugerir un efecto de los N-glúcidos en la aparición del tumor, sin embargo, no se puede concluir debido a las razones ya expuestas.

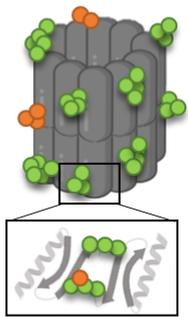
Los resultados de este trabajo, como se ha descrito, muestran las diferencias que existen entre las distintas hemocianinas. Por una parte, se observó que la N-desglucosilación prácticamente no influye en los efectos inmunomoduladores de CCH, mientras que en FLH y KLH, la N-desglucosilación disminuyó su unión/incorporación en células J774.2, disminuyó la producción de citoquinas en estas células, produjo una baja en la respuesta humoral, y aunque hacen falta análisis adicionales, sugieren una participación en el potencial antitumoral. Estos resultados son concordantes con las diferencias que existen entre estas hemocianinas, pues CCH forma heterodidecámeros altamente estables que no dependen de cationes divalentes en el medio, mientras que FLH y KLH forman homodidecámeros que tienden a disociarse y agregarse ante cambios de temperatura y pH [2]. Así mismo, los resultados con hemocianinas desglucosiladas químicamente mostraron que FLH oxidada tendía a disminuir sus propiedades inmunoestimulantes [8], mientras que CCH oxidada tendía a aumentarlas [2]. Esto demuestra

que CCH es una proteína altamente estable, cuyos azúcares podrían estar menos accesibles para ser removidos, dejando glúcidos remanentes que sean suficientes para unirse a CLRs y activar variadas respuestas como se discutió en apartados anteriores.

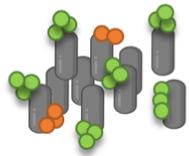
Finalmente, los antecedentes experimentales y los análisis desarrollados en esta tesis, que se presentan en la **figura 31**, contribuyen a comprender los mecanismos mediante los cuales las hemocianinas ejercen sus efectos, demostrando que los azúcares de tipo N- contribuyen tanto en la estabilidad estructural de estas proteínas, así como en la respuesta inmunoestimulante. Además, sugieren fuertemente que los N-glúcidos tendrían un rol modulador en la respuesta, como se ha discutido. Por esto, el alto contenido de azúcares en hemocianinas es probablemente uno de los factores que explica sus efectos inmunomoduladores y, como tal, debe ser un aspecto esencial por considerar para el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas de estas fascinantes proteínas.

A) N-glicosilaciones y estructura de las hemocianinas

Hemocianina nativa

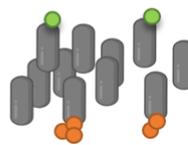


Disociación

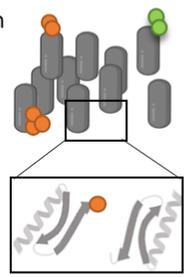


N-desglicosilación

PNGasa F



Re-asociación



- Unión entre subunidades estabilizada por azúcares.
- **Estructura didecámerica preferente.**

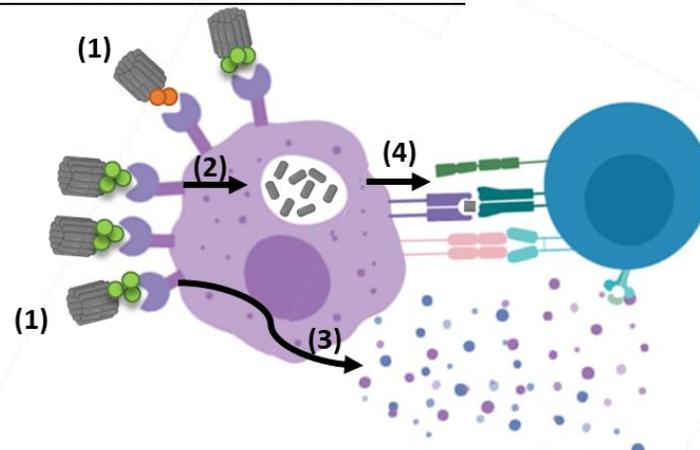
- Unión menos estable entre subunidades
- ↓ **Formación de didecámeros**

B) N-glicosilación e inmunomodulación de las hemocianinas

➤ Hemocianinas nativas

Inmunidad innata

- (1) Unión a múltiples CLR
- (2) Incorporación vía receptores y macropinocitosis
- (3) Producción de citoquinas proinflamatorias
- (4) Presentación antigénica



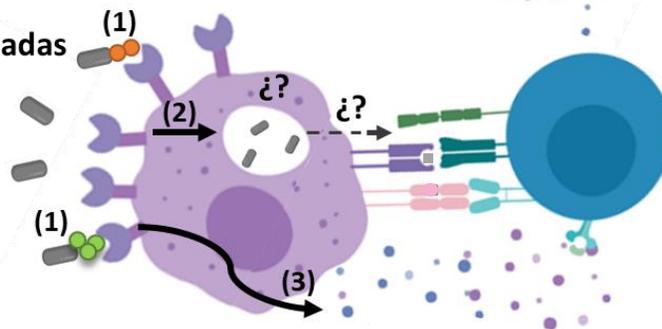
Inmunidad adaptativa

- Respuesta inmune adaptativa Th1
- Activación de células citotóxicas
- Respuesta humoral
- Respuesta antitumoral

➤ Hemocianinas N-desglicosiladas

Inmunidad innata

- (1) ↓ Unión a CLR
- (2) ↓ Incorporación vía receptores
- (3) ↓ Producción de citoquinas proinflamatorias



Inmunidad adaptativa

- ↓ Respuesta inmune adaptativa Th1
- ↓ Respuesta humoral
- ¿? Respuesta antitumoral



Figura 31. Modelo propuesto sobre el rol de los azúcares en la estructura y propiedades inmunogénicas y antitumorales CCH, FLH y KLH. En los esquemas se resumen los principales resultados de esta tesis. **A.** Efecto a nivel de la estructura. Se observó una disminución en la formación de didecámeros luego de la N-desglicosilación. **B.** Efecto a nivel de sus propiedades inmunológicas. Se observó que la N-desglicosilación de hemocianinas disminuía la unión a CLR (MR-Fc, Dectina 1-Fc y Dectina 2-Fc) y la incorporación mediante dichos receptores, produciendo niveles más bajos de citoquinas. Así mismo, se observó una disminución en la respuesta humoral, faltando antecedentes para confirmar el rol en su potencial antitumoral.

9. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que:

1. Los métodos de desglicosilación en proteínas tan complejas como las hemocianinas estudiadas en esta tesis, a saber, CCH, FLH, y KLH, son parciales. Sin embargo, con el procedimiento enzimático utilizando PNGasa F se logró una desglicosilación significativa y selectiva, evidenciadas tanto en los cambios estructurales como en los efectos inmunológicos inducidos por estas glicoproteínas *in vitro* e *in vivo*.
2. El análisis de los glúcidos de CCH, FLH y KLH, mostró que poseen azúcares heterogéneos, principalmente N-glúcidos ricos en manosa, los que también son abundantes en N-acetilglucosamina, fucosa y β -galactosa. Además, todas presentan el antígeno T en su estructura, un epítipo compartido con células tumorales, dando cuenta que parte de los mecanismos inmunomoduladores que ellas producen se explicarían por reacciones cruzadas.
3. La N-desglicosilación de las tres hemocianinas mencionadas, disminuyó el número de didecámeros, sugiriendo que los N-glúcidos participan en la estabilidad de la estructura cuaternaria, aunque no influyen en la proporción de estructuras secundarias. Así mismo, la N-desglicosilación de dichas hemocianinas afectó su replegamiento, sin un efecto significativo en su desplegamiento.
4. Las tres hemocianinas N-desglicosiladas presentaron una unión significativamente menor a MR, Dectina-1 y Dectina-2, demostrando que su unión a dichos CLR es dependiente de sus N-glúcidos.

5. Los N-glúcidos de hemocianinas participan en la respuesta inmunoestimulante, favoreciendo su unión a APCs, su incorporación vía CLRs y la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como TNF- α , IL-6 e IL-12.

6. La N-desglucosilación de las hemocianinas afectó la respuesta inmune humoral específica anti-FLH y anti-KLH, reflejada en una disminución significativa del título de anticuerpos.

7. Los N-glúcidos podrían contribuir al efecto antitumoral de FLH y KLH, sin embargo, se requiere evidencia experimental adicional para demostrarlo.

8. El conjunto de los resultados obtenidos es una contribución al conocimiento del papel de las N-glicosilaciones en la estructura y las propiedades inmunomoduladoras no específicas de las hemocianinas de moluscos en mamíferos.

10. REFERENCIAS

1. Del Campo, M., et al. (2011). Hemocianinas: una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Rev Med Chile*. 139: 236-246.
2. Arancibia, S., et al. (2012). Enhanced structural stability of *Concholepas* hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur. J. Immunol.* 42: 688–699.
3. Arancibia, S., et al. (2012). Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer. *Bladder Cancer - From Basic Science to Robotic Surgery*, Dr. Abdullah Canda (Ed.), InTech, [Available from: <https://www.intechopen.com/books/bladder-cancer-from-basic-science-to-robotic-surgery/hemocyanins-in-the-immunotherapy-of-superficial-bladder-cancer>].
4. Van Holde, KE and Miller, KI. (1995). Hemocyanins. *Adv Protein Chem.* 47: 1-81.
5. Becker, MI., et al. (2014). Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications, Immune Response Activation, Dr. Ht Duc (Ed.), InTech, [Available from: <https://www.intechopen.com/books/immune-response-activation/mollusk-hemocyanins-as-natural-immunostimulants-in-biomedical-applications>].
6. Harris, J.R., et al. (1999). *Keyhole limpet* hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 30(6): 597–623.
7. De Ioannes, P., et al. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J. Biol. Chem.* 279: 26134–26142.
8. Arancibia, S., et al. (2014). A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One*. 9: e87240.
9. Lieb, B., et al. (2001). Structures of two molluscan hemocyanin genes: significance for gene evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 4546–4551.
10. Palacios, M., et al. (2018). Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside. *Eur J Med Chem.* 25(150):74-86.
11. Decker, H., et al. (2007). Minireview: Recent progress in hemocyanin research. *Integr Comp Biol.* 47:631–644.
12. Swerdlow, RD., et al. (1996). *Keyhole limpet* hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 113: 537-48.

13. Idakieva, K., et al. (2008). Spectroscopic properties and conformational stability of *Concholepas concholepas* hemocyanin. *J Fluoresc.* 18: 715-25.
14. Staudacher, E., et al. (2009). Protein N-glycosylation of gastropods. *Curr Top Biochem Res.* 11(2):29-39.
15. Dolashka, P., et al. (2010). Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. *Carbohydr Res.* 345(16):2361-2367.
16. Velkova, L., et al. (2017). N-glycan structures of β -HIH subunit of *Helix lucorum* hemocyanin. *Carbohydr Res.* 449:1-10.
17. Velkova, L., et al. (2011). Glycan structures of the structural subunit (HtH1) of *Haliotis tuberculata* hemocyanin. *Glycoconj J.* 28(6):385-395.
18. Gatsogiannis, C and Markl, J. (2008). *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.* 385:963–983.
19. Stoeva, S., et al. (1999) Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of *keyhole limpet* hemocyanin (KLH). *Biochim. Biophys.* 1435:94–109.
20. Kurokawa, T., et al. (2002). Hemocyanin from the *keyhole limpet Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(b1–6)Man-motifs. *Eur. J. Biochem.* 269:5459–5473.
21. Wuhrer, M., et al. (2004). A novel Gal(β 1-4)Gal(β 1-4)Fuc(α 1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of *keyhole limpet* haemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem. J.* 378:625–632.
22. Wirguin, I., et al. (1995). *Keyhole limpet* hemocyanin contains Gal(beta 1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 40:307–310.
23. Gai, Z., et al. (2015). Crystal Structure of the 3.8-MDa Respiratory Supermolecule Hemocyanin at 3.0 Å Resolution. *Structure.* 23:1-9.
24. Varki, A., et al. (2009). Biological Roles of Glycans. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; Chapter 6.
25. Piraino, MS., et al. (2015). Single molecule Förster resonance energy transfer studies of the effect of EndoS deglycosylation on the structure of IgG. *Immunol Lett.* 167(1):29-33.
26. Liu, H., et al. (2008). Structural effect of deglycosylation and methionine oxidation on a recombinant monoclonal antibody. *Mol Immunol.* 45(3):701-8.

27. Amon, R., et al (2014). Glycans in immune recognition and response. *Carbohydr Res.* 7:(389)115-122.
28. Fierz, W. (2016). Conceptual Spaces of the Immune System. *Front Imm.* 7:551.
29. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 449(7164): 819-826.
30. Janeway, CA., et al. (2005). Immunobiology. (6th ed. edición). Garland Science. ISBN 0-443-07310-4.
31. Litman, G., et al. (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol.* 5(11):866-879.
32. Sun, JC., et al. (2014). Immunological memory within the innate immune system. *EMBO J.* 33(12): 1295-1303.
33. Pancer, Z., and Cooper, M. (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 24: 497-518.
34. Joffre, O., et al. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 12(8):557-569.
35. Fehres, C., et al. (2014). Understanding the Biology of Antigen Cross-Presentation for the Design of Vaccines Against Cancer. *Front Immunol.* 5:1664-3224.
36. Weis, W., et al. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Imm Rev.* 163:19-34.
37. Taylor, ME., (1993). Carbohydrate-recognition proteins of macrophages and related cells. *Plennm Press.* S:347-370.
38. Drummond, RA., et al. (2011). The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol.*14(4):392–9.
39. Brown, GD., et al. (2003). Dectin-1 mediates the biological effects of betaglucans. *J Exp Med.* 197(9):1119-24.
40. Ifrim, D., et al. (2014). Role of Dectin-2 for Host Defense against Systemic Infection with *Candida glabrata*. *Infect. Immun.* 82(3):1064-1073.
41. McGreal, E., et al. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr Opin Immunol.* 17(1):18–24.
42. Zizzari, I., et al. (2015). MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference. *J Imm Res*, Article ID 450695, 8 pages.

43. Kerrigan, AM., Brown, GD. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiol.* 214(7):562–575.
44. Hoving, J., et al. (2014). Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cell Microbiol.* 16(2),185–194.
45. Figdor, C., et al. (2002). C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells. *Nature Rev Imm.* 2:77-84.
46. Presicce, P., et al. (2007). Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol.* 45(4):1136-45.
47. Villar, J. (2016). Participación de receptores lectina tipo C en el reconocimiento de hemocianinas de moluscos por células presentadoras de antígeno y consecuencias en la presentación antigénica. Tesis Magíster en Bioquímica, Universidad de Chile. 1-136.
48. Zhong, T., et al. (2016). Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *J Immunol.* 196:4650-4662.
49. Nakamura, K., et al. (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci.* 70(7):791-8.
50. Lam, J., et al. (2009). Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages. *Biophys J.* 96(1), 248–254.
51. Martinez-Pomares L., et al. (2006). Carbohydrate-independent recognition of collagens by the macrophage mannose receptor. *Eur J Immunol.* 36(5):1074-82.
52. Graham, LM., et al. (2006). Soluble Dectin-1 as a tool to detect β -glucans. *J Immunol Methods.* 314:164–169.
53. McGreal, EP., et al. (2006). The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology.* 16(5):422–430.
54. Spiro, R. (1964). Periodate Oxidation of the Glycoprotein Fetuin. *J Biol Chem.* 239(2):567-573.
55. Schumacher, U., et al. (1992). A dot blot technique for the analysis of interactions of lectins with glycosaminoglycans. *Histochem J.* 24(7):453-455.

56. Etxebarria, J., et al. (2012). Lectin-Array Blotting: Profiling Protein Glycosylation in Complex Mixtures. *ACS Chem Biol*, 7(10): 1729–1737.
57. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
58. Kelly, SM., et al. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta*. 1751:119-139.
59. Royer, PJ., et al. (2010). The Mannose Receptor Mediates the Uptake of Diverse Native Allergens by Dendritic Cells and Determines Allergen-Induced T Cell Polarization through Modulation of IDO Activity. *J Immunol*. 185(3):1522-1531.
60. Morelle, W., and Michalski, JC. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nat protoc*. 2:1585-1602.
61. Harvey, D.J., et al. (2000). Composition of N-linked carbohydrates from ovalbumin and co-purified glycoproteins. *J am soc mass spectr*. 11(6):564-571.
62. Kobata, A. (2000). A journey to the world of glycobiology. *Glycoconjugate J*. 17(7-9): 443-464.
63. Takahashi M. (2015). Glycation of Proteins. *Glycoscience, Biol Med*. Springer, Tokyo. 1339-1345.
64. Hamilton, JV., et al. (1999). Periodate-sensitive immunological cross-reactivity between keyhole limpet haemocyanin (KLH) and serodiagnostic *Schistosoma mansoni* egg antigens. *Parasitology*. 118(1):83-89.
65. Becker, MI., et al. (2009). Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas hemocyanin* is associated with unique biochemical properties. *Int Immunopharmacol*. 9:330-339.
66. Van Kuik, J., et al. (1990). Carbohydrate analysis of hemocyanins. Invertebr dioxygen carries. *Leuven University Press, Belgium*. 157-163.
67. Cummings, RD., and Etzler, ME. (2009). Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 45.
68. Greenfield, N. (2004). Analysis of Circular Dichroism Data. *Method Enzymol*. 383:282-317.

69. Yang, J.T., et al. (1986). Calculation of protein conformation from circular dichroism. *Methods Enzymol.* 130:208-69.
70. Palma, A., et al. (2005). Ligands for the β -Glucan Receptor, Dectin-1, Assigned Using "Designer" Microarrays of Oligosaccharide Probes (Neoglycolipids) Generated from Glucan Polysaccharides. *J Biol Chem.* 281: 5771-5779.
71. Chamberlain, L.M., et al. (2009). Phenotypic non-equivalence of murine (monocyte-) macrophage cells in biomaterial and inflammatory models. *J Biomed Mater Res A.* 88(4):858-71.
72. Fuertes-Marraco, S.A., et al. (2012). Novel Murine Dendritic Cell Lines: A Powerful Auxiliary Tool for Dendritic Cell Research. *Front Immunol*, 3:331.
73. Koivusalo, M., et al. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J Cell Biol.* 188(4):547–563.
74. Wajant, H., et al. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 10(1):45–65.
75. Tanaka, T., et al. (2014). IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *CSH Perspec Biol.* 6(10):a016295.
76. Lasek, W., et al. (2014). Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immun.* 63(5):419–435.
77. Moltedo, B., et al. (2006). Immunotherapeutic Effect of Concholepas Hemocyanin in the Murine Bladder Cancer Model: Evidence for Conserved Antitumor Properties Among Hemocyanins. *J Urol.* 176: 2690-2695.
78. Arancibia, S. (2012). Participación de receptores tipo lectina en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral de hemocianinas de moluscos en mamíferos. Tesis de Doctorado en Bioquímica, Universidad de Chile.
79. Varki, A., Lowe, J.B. (2009). *Essentials of Glycobiology.* (2nd edition). Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Chapter 6.
80. Walsh, M.T., et al. (1990). Effect of the carbohydrate moiety on the secondary structure of .beta.2-glycoprotein. I. Implications for the biosynthesis and folding of glycoproteins. *Biochemistry.* 29(26):6250–6257.
81. Wyss, D.F., et al. (1995). Conformation and function of the N-linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science.* 269:1273-1278.

82. DeBeer, T. (1996). Structural studies of human ribonuclease U s and human chorionic gonadotropin c~-subunit. PhD thesis, University of Utrecht.
83. Mer, G., et al. (1996). Stabilization of proteins by glycosylation examined by NMR analysis of a fucosylated proteinase inhibitor. *Nat Struct Bio.* 3:45-53.
84. Jayaprakash, NG., Surolia, A. (2017). Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability. *Biochem J.* 474:2333–2347.
85. Sinha, S., Surolia, A. (2007). Attributes of glycosylation in the establishment of the unfolding pathway of soybean agglutinin. *Biophys J.* 92:208–216.
86. Mitra, N., et al. (2003). Role of N-Linked Glycan in the Unfolding Pathway of *Erythrina corallodendron* Lectin. *Biochemistry.* 42(42):12208–12216.
87. Plato, A., et al. (2013). C-Type Lectin-Like Receptors of the Dectin-1 Cluster: Ligands and Signaling Pathways. *Int Rev Immunol.* 32(2):134-156.
88. Engering, AJ., et al. (1997). Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 417:183-187.
89. Kopple, EA., et al. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. *Cell Microbiol.* 7(2):157–165.
90. Dzionek, A., et al. (2001). BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med.* 194(12):1823-34.
91. Kanazawa, N., et al. (2002). DCIR Acts as an Inhibitory Receptor Depending on its Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibitory Motif. *J Invest Dermatol.* 118(2):261-266.
92. Denda-Nagai, K., et al. (2010). Distribution and Function of Macrophage Galactose-type C-type Lectin 2 (MGL2/CD301b). *J Biol Chem.* 285:19193-19204.
93. Yasuda, K., Ushio, H. (2016). Keyhole limpet hemocyanin induces innate immunity via Syk and Erk phosphorylation. *EXCLI Journal.* 15:474–481.
94. Gazi, U., et al. (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiol.* 214:554–561.
95. Oliveira-Nascimento, L., et al. (2012). The Role of TLR2 in Infection and Immunity. *Front Immunol.* 3:79.
96. Yu, L., et al. (2010). Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J Cell Mol Med.* 14(11):2592–2603.

97. Tan, RST., et al. (2014). TLR Cross-talk Confers Specificity to Innate Immunity. *Int Rev Immunol*, 33(6):443–453.
98. Lim, JP., Gleeson, P. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol*. 89:836–843.
99. Lodish, H., et al. (2000). Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W.H.Freeman. Section 17.9, Receptor-Mediated Endocytosis and the Sorting of Internalized Proteins.
100. Irannejad, R., et al. (2015). Effects of endocytosis on receptor-mediated signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 35:137–143.
101. Haka, AS., et al. (2009). Macrophages Create an Acidic Extracellular Hydrolytic Compartment to Digest Aggregated Lipoproteins. *Mol Biol Cell*. 20(23):4932–4940.
102. Gladhaug, IP., Christoffersen, T. (1990). Amiloride Inhibits Constitutive Internalization and Increases the Surface Number of Epidermal Growth Factor Receptors in Intact Rat Hepatocytes. *J Cell Phys*. 143:188-195.
103. Moolenaar, WH., et al. (1983). Na⁺/H⁺ Exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature*. 304:645-648.
104. Gringhuis, SI., et al. (2014). Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via IKKε- and CYLD-dependent Bcl3 activation. *Nat Commun*. 5:3898.
105. Van Die, I., Cummings, D. (2010). Handbook of Glycomics. Academic Press, Elsevier. Chapter 15.
106. Sotillo, J., et al. (2014). The effect of glycosylation of antigens on the antibody responses against *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology*. 141:1333–1340.
107. Kawai, R., et al. (2013). Evaluation of primary and secondary responses to a T-cell-dependent antigen, keyhole limpet hemocyanin, in rats. *J Immunotoxicol*. 10(1):40-8.
108. Forsström, B., et al. (2015). Dissecting Antibodies with Regards to Linear and Conformational Epitopes. *PLoS ONE*. 10(3):e0121673.
109. Gesheva, V., et al. (2014). Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. *BMC Immunol*. 15:34.
110. Ikeda, H., et al. (2002). The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth F R*. 13:95-109.
111. Molto, LM., et al. (1991). Keyhole limpet hemocyanine can enhance the natural killer activity of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol*. 19: 74–78.

112. Geyer, H., et al. (2005). Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating crossreactivity with *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 280:40731–40748.
113. Pizarro-Bauerle, J., et al. (2017). Molluskan Hemocyanins Activate the Classical Pathway of the Human Complement System through Natural Antibodies. *Front Immunol.* 24(8):188.
114. Nishimura, T., et al. (1999). Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *J Exp Med.* 190(5):617–628.
115. Ellyard, JI., et al. (2007). Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe?. *Tissue Antigens.* 70(1):1-11.