

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA DESTINACIÓN INTRACELULAR DE LAS HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS A COMPARTIMENTOS ENDOSOMALES EN CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO MURINAS”

Memoria para optar al título profesional
de Bioquímica por:

ALEJANDRA SOLEDAD ALVARADO NEIRA

Directora de Memoria: María Inés Becker C., PhD

Codirectora de Memoria: Michelle Salazar L., MSc

Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo
(FUCITED)

Profesora Patrocinante: Daniela Seelenfreund H., PhD

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Chile

Santiago-CHILE

Diciembre 2020

Para mi Beatriz, mi Florencia
y mi amado Lucas

“ Si caminas solo, llegarás más rápido.
Si caminas acompañado llegarás más lejos”

Proverbio africano.

AGRADECIMIENTOS

En este largo y sinuoso camino he conocido a las personas en el momento preciso. Agradezco enormemente la oportunidad de realizar mi memoria de título bajo la dirección de la Dra María Inés Becker cuya calidad profesional es digna de admirar, pero sin lugar a duda su calidad humana la hace brillar, una persona con un espíritu positivo que irradia a todo su equipo de trabajo, me siento afortunada de haber podido trabajar con ella y con todo el grupo de FUCITED.

En esta larga senda de formación profesional agradezco a todos los profesores que formaron parte del proceso, en especial a quienes de alguna forma entendieron y me acompañaron en mi proceso de ser mamá en especial a la Dra Daniela Seelenfreund.

Agradezco enormemente a Michelle Salazar por su constante apoyo en el desarrollo de esta memoria, por su calidez y las ganas de trabajar como científica. Sin duda las mejores conversaciones de la vida, una persona íntegra y de un corazón generoso. Agradezco a todo el grupo de FUCITED y Biosonda. También agradezco a Joso, compañero de bioquímica y amigo de la vida.

Mi carrera profesional estuvo acompañada por personas que entraron a mi vida para entregarme luz y alegría quiero dar las infinitas gracias a mis mejores amigas Naria Oyanedel, Paula Muñoz y a mi hermosa Mamá Liliana Neira Luco por todo el cariño y apoyo brindado.

Por último y no menos importante quiero agradecer a mis dos motores que fueron mi empuje a luchar y ser una profesional, mis dos hijas que son y serán mi vida Beatriz y Florencia que esta alegría sea vuestra también, porque ha sido un logro para nosotras. A mi compañero de vida y amado esposo, que me ha motivado a superarme y lograr mi sueño, sin tu apoyo Lucas esto no hubiese sido posible.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada parcialmente por el Proyecto FONDECYT N° 1201600 dirigido por la Dra. María Inés Becker, titulado: **“Mechanisms of antigenic processing and presentation of mollusk hemocyanins by antigen-presenting cells and its significance on their immunostimulatory properties in mammals”**, recibiendo apoyo también, de BIOSONDA S.A., y de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	III
FINANCIAMIENTO	IV
ÍNDICE	V
ÍNDICE FIGURAS	VII
ÍNDICE TABLAS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Estructura de las hemocianinas	5
1.2 Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>	6
1.3 Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>	8
1.4 Hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>	9
1.5 Inmunogenicidad de las hemocianinas	10
1.6 Hemocianinas y endocitosis mediada por receptores de inmunidad innata	11
1.7 Presentación cruzada de antígenos	14
II. HIPOTESIS	18
III. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos específicos	19
IV. MATERIALES Y METODOLOGIA	20
4.1 Hemocianinas	20

4.2 Línea celular	20
4.3 Anticuerpos	20
4.4 Cultivo de células J774.2	21
4.5 Medición de citoquinas proinflamatorias en macrófagos tratados con hemocianinas	22
4.6 Análisis de la expresión de MHC-I, MHC-II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 por citometría de flujo en macrófagos	22
4.7 Análisis estadísticos	23
V. RESULTADOS	24
5.1 Efecto de las hemocianinas en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12p40	24
5.2 Efecto de las hemocianinas sobre la expresión inducible de MHC-I y MHC-II en la línea celular J774.2 evaluada por citometría de flujo	26
5.3 Determinación de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86	31
VI. DISCUSION	34
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. REFERENCIAS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Estructura de las hemocianinas de moluscos	7
Figura 2	Modelo de la cooperación entre el MR y TLR4 en el efecto inmunoestimulante de las hemocianinas en APCS	13
Figura 3	Vías moleculares que conducen a la presentación cruzada en células dendríticas (CD).	17
Figura 4	Efecto de las hemocianinas sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL12p40 en células J774.2	25
Figura 5	Efecto de las hemocianinas sobre la expresión de MHC-I y MHC-II en macrófagos de la línea celular J774.2 luego de 24 horas de estimulación	27
Figura 6	Efecto de hemocianinas sobre la expresión de MHC-I y MHC-II en macrófagos de la línea J774.2, luego de 48 horas de estimulación.	28
Figura 7	Expresión de MHC-I y MHC-II inducida por FLH en macrófagos J774.2	30
Figura 8	Efecto de las hemocianinas en la expresión de CD80	32
Figura 9	Efecto de las hemocianinas en la expresión de CD86	33
Figura 10	Modelo propuesto para presentación cruzada de las hemocianinas	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	
Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la evaluación moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 y los antígenos MHC-I y MHC-II	21

ABREVIACIONES

APCs	:	Células presentadoras de antígeno
BCG	:	<i>Bacillus de Calmette-Guérin</i>
BMDCs	:	Células dendríticas derivadas de precursores de médula ósea
BMDMs	:	Macrófagos derivados de precursores de médula ósea
CCH	:	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
CD	:	Células dendríticas
CLRs	:	Receptores de Lectina tipo-C
CRD	:	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
CSV	:	Carcinoma superficial de vejiga
DC-SIGN	:	Molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas-3-no integrin (<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>)
ELISA	:	Ensayo inmunoenzimático de fase sólida
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
FLH	:	Hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>
FSC	:	Luz dispersa hacia Adelante (<i>Forward-scattered light</i>)
FU	:	Unidad funcional
KLH	:	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
KO	:	Nocaut (<i>Knock-out</i>)
LPS	:	Lipopolisacárido
Mal	:	Proteína adaptadora My88 (<i>MyD88-adaptor-like</i>)
MFI	:	Intensidad de fluorescencia media

MGL	:	Lectina de macrófagos de unión a galactosa
MHC-I	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHCII	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MR	:	Receptor de manosa
OVA	:	Ovoalbúmina
PAMPs	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	:	Tampón fosfato salino
PE	:	Ficoeritrina
PFA	:	p-Formaldehído
PNGasa F	:	Péptido:N-glicosidasa F
PRRs	:	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
SFB	:	Suero fetal bovino
SSC	:	Luz de dispersión lateral (<i>Side-scattered light</i>)
TAP	:	Proteína transportadora asociado con la presentación de antígeno (<i>Transporter associated with antigen processing</i>)
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
TLR4	:	Receptor de tipo-Toll 4
TLRs	:	Receptores de tipo-Toll
WT	:	Tipo silvestre (<i>Wild-type</i>)

RESUMEN

Las hemocianinas de moluscos son ampliamente conocidas por sus efectos inmunomoduladores y, además, por ser utilizadas como carrier/adyuvante de antígenos tumorales. Sus efectos sobre el sistema inmune han sido atribuidos a su gran tamaño, xenogenicidad y estructura compleja rica en azúcares, siendo esta última característica donde se han enfocado los estudios de nuestro laboratorio. Se ha establecido que la incorporación de las hemocianinas a las células presentadoras de antígenos (APCs) ocurre por macropinocitosis y endocitosis mediada por receptores, participando el receptor de manosa (MR) y el receptor de tipo Toll 4 (TLR4), entre otros. No obstante, es poco conocida la destinación intracelular de las hemocianinas y como ocurre su procesamiento y presentación antigénica.

El objetivo de esta memoria ha sido caracterizar la línea celular de macrófagos murinos J774.2 y determinar si es adecuada para estudiar la destinación intracelular de las hemocianinas incorporadas por endocitosis en las APCs. Es de especial interés a futuro, establecer si estas glicoproteínas, como antígenos exógenos, pueden ser destinadas a compartimentos endosomales tempranos (Rab5+) para ser presentadas en moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) mediante presentación cruzada, además de ser incorporadas en endosomas tardíos (Rab7+) para su presentación por la vía canónica en MHC-II. En este contexto, la hipótesis es: **“Las hemocianinas al ser endocitadas por las células J774.2 inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12p40 y también, la expresión al alza de moléculas coestimuladoras como CD86 y CD80 y los antígenos MHC-I y MHC-II.**

En este contexto, se evaluó en la línea de macrófagos J774.2, el efecto funcional sobre algunos parámetros de la respuesta inmunológica de tres hemocianinas modelo, a saber: KLH de *Megathura crenulata*, FLH de *Fissurella latimarginata* y CCH de *Concholepas concholepas*. El efecto inmunológico de dichas hemocianinas se evaluó mediante su capacidad de inducir la secreción de algunas citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12p40, evaluadas mediante ELISA y también, la expresión al alza de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y los antígenos de histocompatibilidad MHC-I y MHC-II.

Los resultados mostraron que la línea celular de macrófagos J774.2 no es el modelo más adecuado para evaluar el efecto inmunomodulador de las hemocianinas, por cuanto se observó un aumento de la secreción de IL-6 y un incremento en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Sin embargo, en las condiciones analizadas no se encontró un aumento en la expresión de MHC-I y MHC-II, aspecto clave este último para establecer una apropiada sinapsis inmunológica con linfocitos T.

ABSTRACT

“EXPLORATORY STUDY OF THE INTRACELLULAR DESTINATION OF MOLLUSKS HEMOCYANINS TO ENDOSOMAL COMPARTMENTS IN MURINE ANTIGEN-PRESENTING CELLS”

Hemocyanins from mollusks are widely known for their immunomodulatory effects, as well as being used as carrier/adjuvants for tumor antigens. Their effects have been attributed to their large size, xenogenicity, and carbohydrate-rich complex structure. It is on this last characteristic where the studies of our laboratory have focused. It has been established that the incorporation of hemocyanins into antigen-presenting cells (APCs) occurs by macropinocytosis and receptor-mediated endocytosis, involving the mannose receptor (MR) and the Toll like receptor 4 (TLR4). However, the intracellular destination of hemocyanins and their antigenic presentation process are poorly understood.

The objective of this study has been to characterize the murine macrophage cell line J774.2, and to determine if it is a suitable model to study the intracellular destination of hemocyanins incorporated by endocytosis. It is of special interest in the future, to establish whether these glycoproteins, as exogenous antigens, can be destined to early endosomal compartments (Rab5+) to be presented in molecules of the class I histocompatibility complex (MHC-I) by cross presentation, in addition to being incorporated into late endosomes (Rab7+) for canonical presentation in MHC-II. In this context, the hypothesis is: **“Hemocyanins, when endocytosed by J774.2 cells, induce the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-12p40 and also increase the expression of costimulatory molecules such as CD86 and CD80 and the MHC-I and MHC-II antigens”**.

In this context, the functional effect on some parameters of the immune response of three model hemocyanins was evaluated in the J774.2 macrophage cell line, namely: KLH from *Megathura crenulata*, FLH from *Fissurella latimarginata* and CCH from *Concholepas concholepas*. The immunological effect of these hemocyanins was evaluated through their ability to induce the secretion of some pro-

inflammatory cytokines such as IL-6 and IL-12p40, evaluated by ELISA and the upward expression of costimulatory molecules such as CD80, CD86 and histocompatibility antigens MHC-I and MHC-II.

The results showed that the J774.2 macrophage cell line is not the most suitable model to evaluate the immunomodulatory effect of hemocyanins, since an increase in IL-6 secretion and CD80 and CD86 expression were observed. However, under the conditions analyzed, there was no increase in the expression of MHC-I and MHC-II, which are essential for establishing an appropriate immunological synapse with T lymphocytes.

I. INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son enormes metaloglicoproteínas oligoméricas con un peso molecular entre 4-8 MDa, que circulan en la hemolinfa de diferentes moluscos transportando oxígeno, entre otras funciones¹. Se destacan por sus usos clínicos y biotecnológicos, debido a sus propiedades inmunomoduladoras al ser inoculadas en mamíferos. Algunas de sus aplicaciones incluyen su uso como adyuvante/transportadores (carrier) para producir anticuerpos contra diferentes haptenos y péptidos, y también como adyuvantes para inducir la respuesta de linfocitos T en pacientes con cáncer, mediante la generación de vacunas terapéuticas basadas en células dendríticas cargadas con lisados tumorales, entre otras².

1.1 Estructura de las hemocianinas

La estructura cuaternaria de las hemocianinas de moluscos es el decámero (figura 1). Cada decámero está compuesto por 10 subunidades, y cada una de ellas incluye entre 7-8 dominios globulares que reciben el nombre de unidades funcionales (FUs) (figura 1D). Las FUs contienen dos átomos de cobre que coordinan oxígeno a través de triadas de histidina³. En los gastrópodos, de interés en este trabajo, los decámeros se asocian de a pares formando estructuras de tipo didecámero los cuales requieren la presencia de cationes divalentes en el medio de mantención para ensamblarse y mantener la estructura.

Las hemocianinas poseen oligosacáridos complejos y heterogéneos en su estructura, cuya abundancia varía entre las distintas FUs, no obstante, presentan secuencias consensuadas de N-glicosilación (Asn-X-Ser o Thr, donde X≠P)^{4,5}. Estas glicosilaciones son principalmente N-glúcidos ricos en manosa, y N-glúcidos mixtos ricos en fucosa, galactosa, y N-acetilglucosamina. Por otra parte, algunas

hemocianinas contienen O-glúcidos ricos en galactosa y N-acetilgalactosamina. Al respecto, es relevante mencionar que, además de la abundancia y heterogeneidad de estas estructuras, se ha descrito la presencia de patrones oligosacáridos altamente inmunogénicos que también se encuentran en algunos patógenos, tales como Fuc(α 1-3)GalNAc(β 1-4)[Fuc(α 1-3)]GlcNAc, y Gal(β 1-6), presente en *Schistosoma mansoni* y como parte de la cadena O del lipopolisacárido bacteriano (LPS), respectivamente⁶⁻⁸. Además, también presentan oligosacáridos que se encuentran en células tumorales, como el antígeno T⁹. Resultados previos demuestran que los carbohidratos de las hemocianinas son relevantes para conformar su estructura cuaternaria, ya que la desglicosilación de estas glicoproteínas induce la disociación de las estructuras decaméricas y didecaméricas^{10,11}.

La hemocianina más conocida por sus tempranas aplicaciones en estudios biomédicos se purifica del gastrópodo *Megathura crenulata*, una lapa que habita las costas de California, conocida como KLH (*keyhole limpet hemocyanin*)¹². Posteriormente, se ha logrado purificar y caracterizar una variedad de nuevas hemocianinas cuyas propiedades bioquímicas e inmunológicas han sido estudiadas. De interés para esta memoria de investigación son CCH y FLH, las cuales se obtienen de los gastrópodos *Concholepas concholepas* y *Fissurella latimarginata*, conocidos como Loco y Lapa negra, respectivamente, que habitan las costas chilenas y del sur del Perú¹³.

Hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH)

La estructura de KLH está formada por dos subunidades que no tienen epítopos comunes, las cuales se agrupan formando homodecámeros y consecuentemente, homodidecámeros que coexisten en la circulación del animal. Las subunidades se denominan KLH1 y KLH2 (figura 1E), con pesos moleculares de 390 kDa y 360 kDa, respectivamente¹⁴.

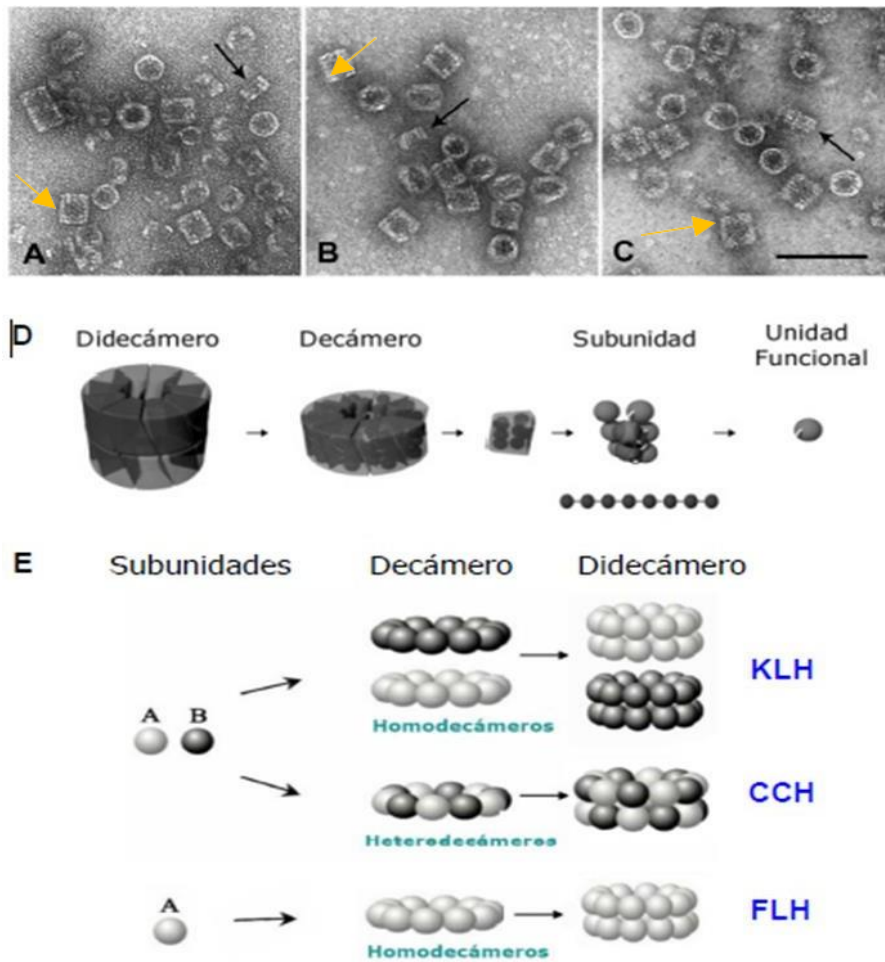


Figura 1. Estructura de las hemocianinas de moluscos. Microscopía electrónica de transmisión (MET) con tinción negativa, que muestra la estructura de cilindro hueco de las hemocianinas KLH (A), CCH (B) y FLH (C). Las estructuras circulares y rectangulares corresponden a vistas desde arriba y laterales, respectivamente. Las flechas negras muestran los decámeros y las flechas amarillas muestran los didecámeros. Barra corresponde a 100 nm. (D) Esquema de la organización de las hemocianinas desde la unidad funcional al didecámero. (E) Organización de las subunidades en KLH, CCH y FLH (Modificado de Jiménez JM, Tesis Doctorado, 2019).

Dichos homodidecámeros no solamente difieren en su peso molecular, sino también en la abundancia relativa de cada uno de ellos y en la composición de oligosacáridos presentes en cada subunidad¹⁵.

Las propiedades bioquímicas e inmunológicas de KLH han sido estudiadas durante décadas, principalmente por su uso en procedimientos clínicos para evaluar la inmunocompetencia en pacientes inmunosuprimidos y como transportador de moléculas de haptenos y péptidos. Además, al ser un inmunoestimulante no específico, se utiliza actualmente en la inmunoterapia del cáncer recurrente superficial de vejiga una vez que se ha extirpado el tumor y también, en vacunas terapéuticas contra el cáncer como carrier de antígenos tumorales, especialmente del tipo gangliósidos^{16,17}.

Hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH)

La estructura cuaternaria de CCH difiere de KLH porque sus subunidades forman un heterodecámero y un heterodidecámero, que contienen dos subunidades entremezcladas (figura 1E), denominadas CCH-A y CCH-B, con pesos moleculares de 405 kDa y 350 kDa, respectivamente¹⁸. Sus patrones de glicosilación tienen semejanzas con los de KLH, siendo ambas proteínas altamente manosiladas cuyo porcentaje de glicosilación oscila entre 3-4% p/p, sin embargo, también muestran diferencias en el contenido de algunos monosacáridos, tales como galactosa. Así mismo, los patrones de glicosilación difieren entre las subunidades; se ha observado que CCH-A tiene N- y O- glicosilaciones, mientras que en CCH-B están ausentes los azúcares de tipo O¹⁹.

Las ventajas de CCH sobre otras hemocianinas de moluscos descritas, son su gran estabilidad y solubilidad. Además, luego de ser purificada no necesita la presencia de Ca⁺² y Mg⁺² en el medio para mantener su estructura cuaternaria¹⁸.

CCH se ha utilizado exitosamente como proteína transportadora para generar anticuerpos contra haptenos de diversa naturaleza química²⁰, además, se ha utilizado en una innovadora vacuna contraceptiva en ciervos como proteína transportadora de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)²¹.

Su gran poder inmunoestimulador ha llevado a CCH a ser una alternativa al uso de KLH en vacunas terapéuticas para el tratamiento del cáncer, viéndose su efecto antitumoral en modelos murinos de distintos tipos de cáncer, tales como cáncer oral²², melanoma²³, y cáncer superficial de vejiga²⁴. Además, CCH se ha utilizado en estudios clínicos como adyuvante en vacunas de células dendríticas activadas con TRIMEL (lisado de células tumorales de melanoma), comprobándose que CCH no produce reacciones adversas a diferencia de otros adyuvantes usados comúnmente²⁵.

Hemocianina de *Fissurella latimarginata* (FLH)

La estructura de FLH comprende un solo tipo de subunidad (figura 1E), la cual conforma homodecámeros y homodidecámeros²⁶. El contenido de N- y O-oligosacáridos unidos a la FLH es mayor que en CCH y KLH, y además presentan mayor heterogeneidad, como se demostró recientemente mediante un análisis tipo ELISA usando lectinas fluorescentes²⁷.

Funcionalmente, FLH ha demostrado ser un potente inmunoestimulador debido a que presenta respuestas humorales y antitumorales superiores a CCH y KLH en modelos murinos de melanoma y de cáncer oral, resultados que han sido confirmados in vitro en cultivos de células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCS), en macrófagos peritoneales y además en líneas celulares de macrófagos murinos como la línea J774.2²⁶⁻²⁹.

1.2 Inmunogenicidad de las hemocianinas

Si bien el uso biomédico de las hemocianinas es ampliamente conocido, los mecanismos de estimulación de la respuesta inmune inducida por CCH, FLH y KLH han sido poco estudiados.

Previamente se ha demostrado que las glicosilaciones de las hemocianinas contribuyen a algunos de sus efectos inmunomoduladores. Específicamente, la remoción de N- y O-glúcidos de CCH, FLH y KLH mediante oxidación química con periodato de sodio, mostró una disminución en la secreción de citoquinas por parte de las APCs, específicamente células dendríticas y macrófagos cultivados *in vitro*. También se observó una disminución en los efectos antitumorales inducidos por las hemocianinas en el modelo murino de melanoma B16/F10³⁰. Además, la remoción enzimática de N-glicosilaciones con PNGasa F, confirmó un rol de estos azúcares en el reconocimiento y respuesta proinflamatoria inducida por las hemocianinas, principalmente FLH y KLH^{27,28}.

Por otra parte, estudios previos de nuestro laboratorio mediante MET muestran que CCH, FLH y KLH son reconocidas por APCs. Su incorporación en estas células ocurre principalmente mediante macropinocitosis y también, mediante endocitosis mediada por receptores, específicamente por familias de receptores de inmunidad innata que reconocen ligandos glicosilados³¹. Entre ellos destacan los receptores de tipo lectina C (CLRs) tales como el receptor de manosa (MR), DC-SIGN (*dendritic cell- specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non- integrin*) y el receptor *macrophage galactose-type lectin* (MGL), y los receptores de tipo Toll (TLRs), específicamente el tipo-Toll 4 (TLR4)²⁸. Estos receptores son expresados por las APCs y contribuyen al proceso de endocitosis, así como también a la destinación subcelular de sus ligandos, siendo determinantes en el curso que toma la respuesta inmune adaptativa³², mecanismos que serán detallados a continuación.

1.3 Hemocianinas y endocitosis mediada por receptores de inmunidad innata

Luego de que las hemocianinas son reconocidas por los receptores anteriormente señalados, CLRs y TLR4, ingresan en las APCs mediante vesículas conocidas como endosomas. Los receptores involucrados en este proceso incluyen el MR³¹, DC-SIGN³¹ y TLR4²⁸, que junto con mediar la endocitosis de sus ligandos, activan vías de señalización que promueven la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-6, IL-12p40 y TNF- α (figura 2). En BMDCs también se ha descrito un aumento de señales coestimuladoras inducidas por hemocianinas tales como CD86, CD80 y CD40, además de un aumento en la expresión de los antígenos de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) y de clase II (MHC-II) en la superficie de las APCs²⁸, siendo la sinapsis inmunológica que conforman este conjunto de moléculas, previo al procesamiento antigénico, la encargada de dirigir la respuesta de linfocitos T, finalmente, hacia un fenotipo Th1, Th2 y Th17³³.

En el interior de las APCs, la interacción de las hemocianinas con los CLRs y TLRs podría tener diversas consecuencias, tales como determinar la destinación subcelular y el procesamiento de CCH, FLH y KLH. Por ejemplo, se ha demostrado que los ligandos de MR y TLR4 favorecen la presentación cruzada de antígenos, en donde los antígenos exógenos que siguen una vía canónica de presentación mediante MHC-II, son presentados por MHC-I a linfocitos T citotóxicos CD8+³⁴. Así, la interacción de hemocianinas con receptores en APCs podría modular su destinación y su presentación a linfocitos T CD4+ o CD8+, evento indispensable para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa y necesaria para el efecto antitumoral de dichas hemocianinas. Diversas investigaciones han determinado que el procesamiento de un antígeno exógeno conduce a una presentación por MHC-II, y en el caso de KLH se reportó que promueve la maduración de DCs humanas in vitro a las 24 h de incubación, con un aumento en la expresión de los MHC-II y moléculas coestimuladoras. Este fenómeno fue parcialmente inhibido por la presencia de un anticuerpo anti-receptor de manosa, sugiriendo la ruta canónica de procesamiento de las hemocianinas. Sin embargo, debido a que también se observó en BMDCs un

aumento en la expresión de MHC-I, a las 24 horas de ser estimuladas con FLH y, además, se demostró la interacción de las hemocianinas con receptores quiméricos de TLR4²⁸, nuestro laboratorio ha sugerido que las hemocianinas podrían presentarse en MHC-I mediante el proceso de presentación cruzada y, así, a los linfocitos TCD8+ que poseen actividad citotóxica, lo cual podría explicar en parte su efecto antitumoral. Además, como grupo de investigación proponemos que la participación de los receptores MR y TLR4 en APCs murinas y MR y DC- SIGN en APC humanas, en la incorporación de las hemocianinas podría explicar el aumento de la expresión de MHC-I.

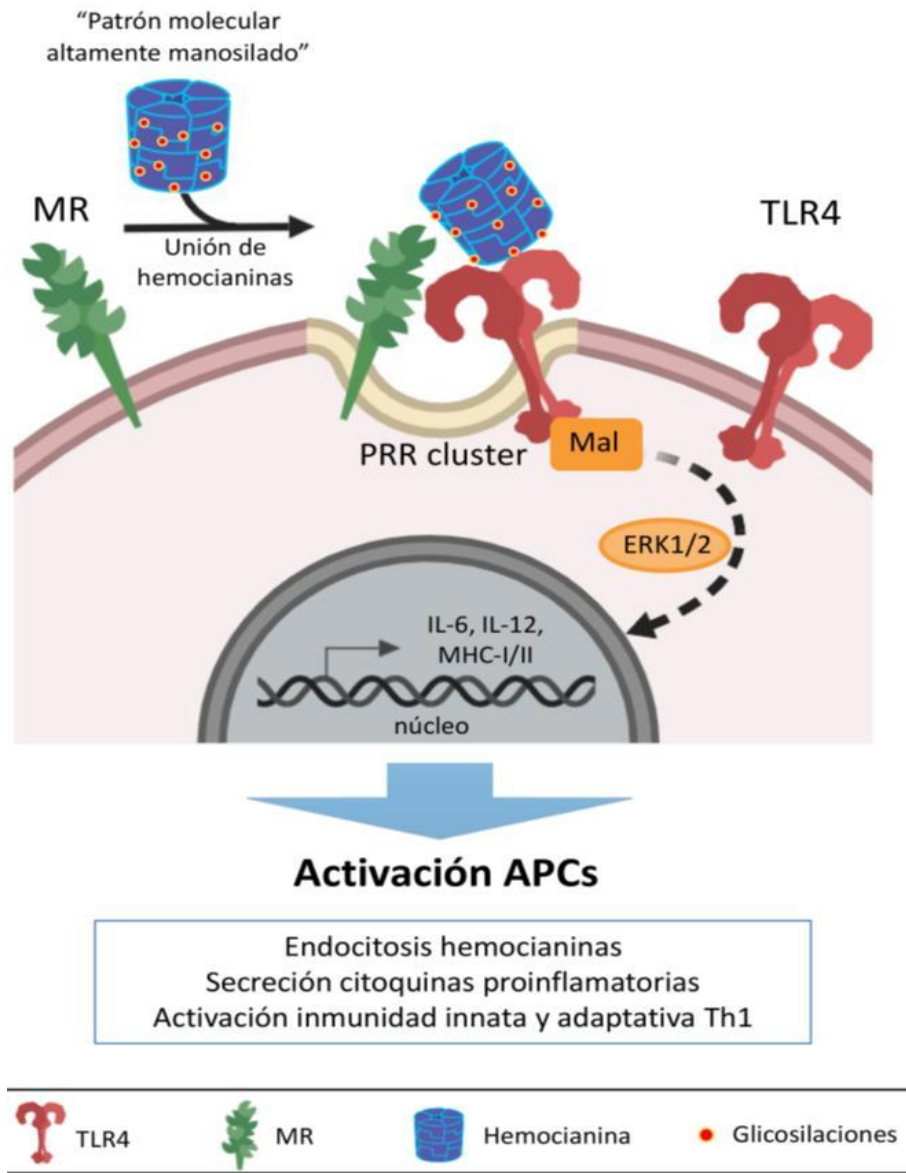


Figura 2. Modelo de la cooperación entre el MR y TLR4 en el efecto inmunoestimulante de las hemocianinas en APCs. Se muestra un posible mecanismo de cooperación entre el MR y TLR4 en el reconocimiento de las hemocianinas para iniciar la respuesta proinflamatoria. Las hemocianinas serían reconocidas primero por las APCs a través del MR por sus glicosilaciones ricas en manosa. Luego, vía agrupaciones o *clusters* con TLR4 estimulan las vías de señalización dependientes de Mal y ERK1/2, llevando a los efectos proinflamatorios benéficos de las hemocianinas (Modificado de Jiménez *et al*, 2019).

1.4 Presentación cruzada de antígenos

El procesamiento de los antígenos, una vez que ingresan vía endosomas en las APC y su posterior presentación de antígenos en MHC-I o MHC-II a linfocitos T CD4+ o CD8+, respectivamente, es un paso fundamental en la respuesta inmune adaptativa para activar a los linfocitos T. Los ligandos del MHC-II corresponden a antígenos proteicos exógenos, a menudo péptidos con una longitud de entre 15 y 20 aminoácidos, los cuales se generan principalmente por proteólisis lisosomal y son cargados en compartimentos endosomales tardíos, que a menudo se presentan como cuerpos multivesiculares, llamados MIIC. En la ruta del procesamiento clásico de antígenos exógenos, se reconocen proteínas que marcan el tráfico en las distintas etapas de su estadía en los endosomas. Destacan entre ellas Rab5, que corresponde a una GTPasa que se encuentra en endosomas tempranos; para endosomas tardíos Rab7 es la GTPasa más utilizada como marcador de este estadio; Lamp-1 es una proteína transmembrana que se encuentra en los lisosomas que serán el organelo de destinación a continuación del endosoma tardío³⁵. Los péptidos son cargados en MHC-II por chaperonas HLA-DM y en linfocitos B HLA-DO y posteriormente se trasladan a la superficie de la membrana plasmática de las APCs para ser reconocidos por linfocitos T CD4+, en la sinapsis inmunológica³⁶.

En el caso de los ligandos de los MHC-I, corresponden a péptidos endógenos que previamente a ser ubiquitinados, son procesados vía proteosomal generándose péptidos con una extensión en torno a 10 aminoácidos, los cuales desde el citosol son incorporados por proteínas transportadoras TAP (*transporter associated with antigen processing*) al interior del retículo endoplásmico, lugar donde los péptidos son cargados por chaperonas como calreticulina, Erp57, proteína disulfuro isomerasa y tapasina, conocidas como complejo de carga del péptido, en moléculas del MHC-I³⁴. Además, los antígenos extracelulares que son presentados en MHC-I se encuentran por largo tiempo en endosomas tempranos Rab5+³⁷. Así, la co-localización de FLH y KLH con Rab5+ observada en resultados preliminares utilizando cultivos primarios de APCs murinas y líneas celulares de macrófagos,

sugiere que estas proteínas pueden seguir un procesamiento no- clásico cuya consecuencia sería la presentación cruzada a linfocitos T CD8+ vía MHC-I. Se ha reportado que, antígenos de *S. cerevisiae*, ovoalbúmina (OVA), y LPS, entre otros, tienen presentación cruzada³⁸⁻⁴⁰.

La presentación cruzada es necesaria para inducir respuestas de células T CD8+ contra antígenos exógenos. Como ha sido demostrado en experimentos con células dendríticas (CDs) murinas que carecen de la capacidad de presentar antígenos (por ejemplo, debido a la deficiencia de TAP). Dichos animales no pueden generar respuestas de células T CD8+ a células tumorales⁴².

Dependiendo del compartimento subcelular donde se procesa el antígeno, se han descrito al menos dos vías de presentación cruzada. La primera corresponde a la vía citosólica, en la cual los antígenos son internalizados, se transfieren desde el lumen de los compartimentos endocíticos al citosol, y posteriormente, los productos de degradación proteosomal son transportados por las TAP, ya sea para el retículo endoplásmico o al lumen de los endosomas o fagosomas, que permiten la formación de complejos péptido-MHC-I. En la vía vacuolar, los antígenos internalizados se degradan dentro de los compartimentos endocíticos por proteasas lisosomales y moléculas cargadas⁴³ (figura 3). En experimentos preliminares usando BMDCs, se observó que CCH, FLH y KLH son destinadas mayoritariamente a endosomas tardíos (Rab7+) y lisosomas tempranos (Lamp-1+). La principal diferencia entre ellas fue la presencia de FLH y KLH, pero no de CCH, en endosomas tempranos (Rab5+), sugiriendo que la ruta endocítica que siguen estas proteínas no es la misma para todas las hemocianinas; FLH y KLH podrían estar siguiendo una ruta de procesamiento alternativa, que las conduce a la presentación en MHC-I a linfocitos T CD8+³¹.

Aunque ha habido avances en el conocimiento de los mecanismos de acción

de las hemocianinas, aún se requieren estudios adicionales para comprender sus diversos efectos en el sistema inmune. Con la finalidad de dilucidar dichos efectos, es importante determinar la ruta intracelular que siguen las hemocianinas luego de ser endocitadas mediante receptores, tales como MR, DC-SIGN o TLR4, que están involucrados en la destinación de antígenos manosilados y en la presentación cruzada^{44,45}, sugiriendo que las hemocianinas podrían seguir estas vías. De este modo, en esta memoria es de interés establecer un modelo de estudio que permita realizar esta investigación, para lo cual se ha considerado el uso de la línea celular de macrófagos J774.2 como modelo de célula presentadora de antígeno, basado en sus propiedades previamente descritas entre las que destacan su capacidad para secretar citoquinas, expresar en su superficie los receptores TLR4 y MR, además de presentar MHC-I y MHC-II en su superficie celular ^{19,67} .

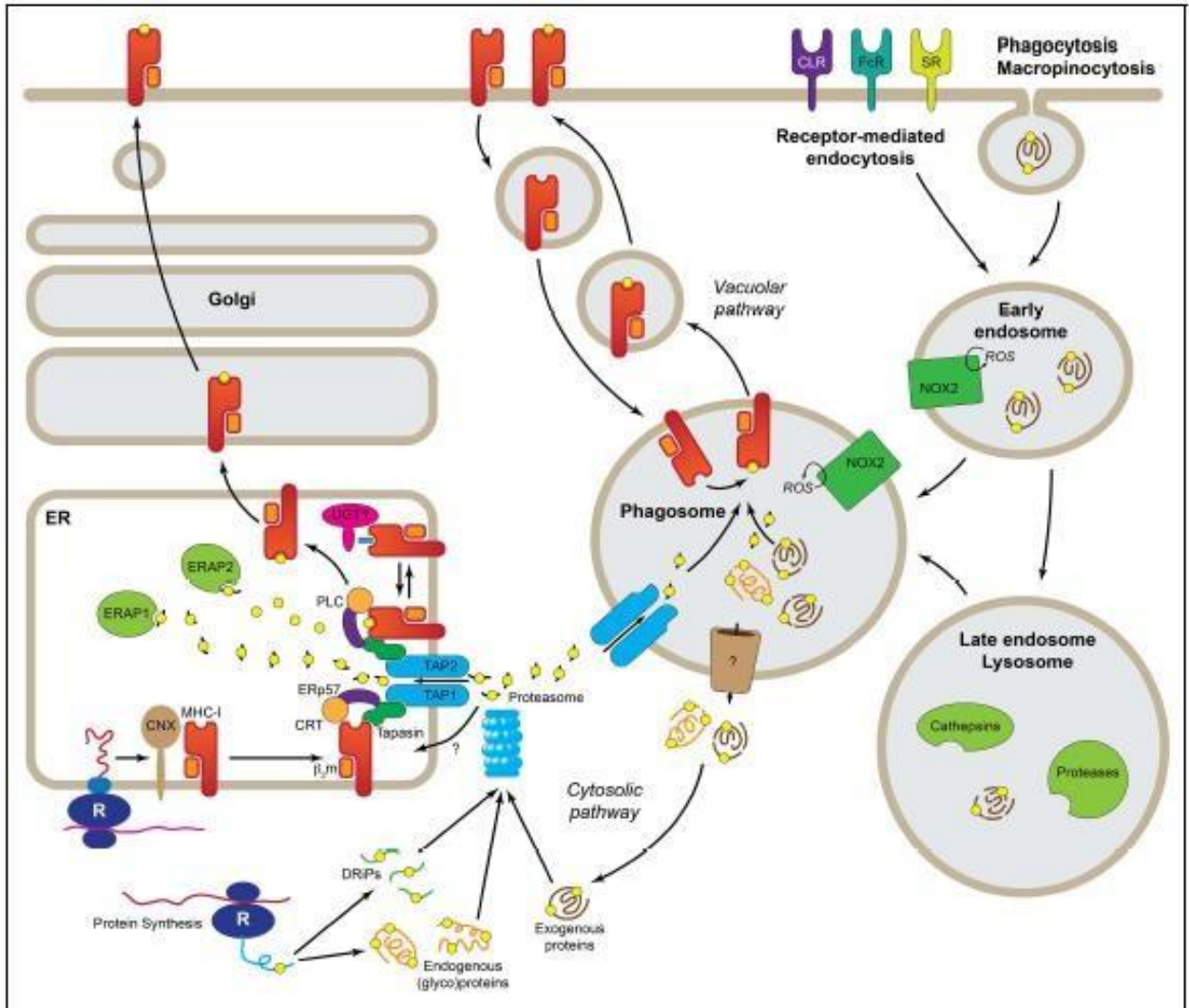


Figura 3. Vías moleculares que conducen a la presentación cruzada en las células dendríticas. Las CD incorporan los antígenos por al menos dos mecanismos: endocitosis mediada por receptores y macropinocitosis. Una vez que el antígeno alcanza la vía endolisosómica, dependiendo de la ruta específica, puede ser degradado por el ambiente de pH suave y por catepsinas y otras proteasas. En este punto, el antígeno degradado puede ser directamente cargado en MHC-I en el fagosoma (*vía vacuolar*). Si todavía necesita más procesamiento será transportado al citosol (*vía citosólica*) donde se degrada, junto con las proteínas endógenas y productos defectuosos del ribosoma o DRiP, por el proteasoma. Los péptidos generados son transportados por TAP o un transportador al RE donde se cargan en MHC-I con la ayuda del complejo de carga de péptidos. Un recorte adicional en el RE antes de la carga, es posible por la presencia de endopeptidasas localizadas en el RE (ERAP1 y 2). R, ribosoma; CNX, calnexina; CRT, calreticulina; b2m, b2microglobulina; UGT1, UDP-glucosa: glicoproteína-glicosiltransferasa1; ERAP 1/2, ER-aminopeptidasas1/2; PLC, complejo de carga de péptidos; ERp57, protein-disulfideisomerasa3; TAP1/2, transportador asociado con presentador de antígeno 1/2; DRiP, productos defectuosos ribosomales; ROS, especies reactivas de oxígeno; NOX2, NADP oxidasa2; CLR, receptores de lectina tipo C; FcR, receptores Fc; SR, receptores de barrido (Fehrer C et al, 2014).

II. HIPÓTESIS

Considerando que:

- a. Las hemocianinas son utilizadas en la inmunoterapia del carcinoma superficial de vejiga y, además, se ha probado su efecto antitumoral en modelos murinos de melanoma y cáncer oral.

- b. Estudios preliminares muestran que en APCs murinas incubadas con FLH se induce un aumento en la expresión de moléculas MHC-I.

- c. Las hemocianinas son reconocidas por los receptores MR, DC-SIGN y TLR4, los cuales están involucrados en la presentación cruzada de antígenos exógenos.

En esta memoria se plantea la siguiente hipótesis:

“Las hemocianinas al ser endocitadas por las células J774.2 inducen la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-12p40 y también, la expresión al alza de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 y los antígenos MHC-I y MHC-II”.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar si la línea celular macrofágica J774.2. es apropiada para, a futuro, realizar estudios sobre la destinación intracelular de las hemocianinas (CCH, FLH y KLH) incorporadas por endocitosis en las APCs y conducente a la presentación antigénica mediante MHC-I y MHC-II a linfocitos T.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar en células de la línea J774.2, el efecto de las hemocianinas sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 e IL-12p40) mediante ELISA, usando como control positivo un antígeno exógeno, en este caso LPS.
2. Evaluar la expresión de CD80 y CD86 y de los antígenos MHC-I, MHC-II, inducido por las hemocianinas en el contexto de los parámetros establecidos en 1, en la línea celular J774.2.

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Hemocianinas

Hemocianinas de los moluscos *Concholepas concholepas* (CCH) y *Fissurella latimarginata* (FLH), obtenidas bajo condiciones estériles y libres de endotoxina fueron proveídas por (BIOSONDA S.A, Chile) según De Ioannes *et al*, 2004 y Arancibia *et al*, 2014. En tanto KLH, la hemocianina de *Megathura crenulata*, libre de LPS fue adquirida en (Calbiochem, USA).

4.2 Línea celular

Se utilizó la línea celular J774.2, correspondiente a macrófagos murinos de la cepa BALB/c (ATCC, EE.UU)⁶⁸.

4.3 Anticuerpos

En la Tabla 1, se muestran los anticuerpos usados en esta memoria, correspondientes a los anticuerpos primarios y secundarios utilizados para identificar CD-80, CD86 y los antígenos MHC-I y MHC-II en la superficie de las células J774.2

Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la evaluación moléculas coestimuladoras CD86 y CD80 y los antígenos MHC-I y MHC-II

Anticuerpos primarios	Antígeno	Fabricante	Anticuerpos secundarios	Antígeno	Fabricante
Ratón anti-ratón MHC clase I (clon 34-1-2S)	MHC-I	Abcam.UK	Cabra anti-rata IgG-Alexa Fluor 647	IgG rata	Abcam
Rata anti-ratón MHC clase II (clon MS/114.15)	MHC-II	Abcam	Cabra anti-ratón IgG (h+L)Alexa Fluor 647	IgG ratón	Abcam
Anti-ratón CD86- Clon GL-1	CD86	Abcam			
Anti-ratón CD80- FITC Clon 16-10A1	CD80	Biolegend			

4.4 Cultivo de células J774.2

La línea celular de macrófagos J774.2 se mantuvo en condiciones de 5% CO₂, 100% y a 37°C, en medio RPMI completo que contiene: (HyClone, EE.UU), suplementado con penicilina (100 U/mL, HyClone), estreptomina (100 mg/mL, Sigma-Aldrich, EEUU), L-glutamina (2 mM, HyClone), piruvato de sodio (HyClone), aminoácidos no esenciales (HyClone) y 10% de suero fetal bovino (SFB) (HyClone), Las células se mantuvieron en crecimiento a una densidad entre 3x10⁵ a 9x10⁵ cél./mL. Las células fueron cosechadas mediante raspado o 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 RPMI sin suero. Se contaron con 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 3x10⁵ y 1x10⁶ células por condición experimental, en medio sin suero, en placas de 24 pocillos.

4.5 Medición de citoquinas proinflamatorias en macrófagos tratados con hemocianinas

Células de macrófagos J774.2 fueron sembrados a una densidad de 5×10^5 células/mL y estimuladas durante 24 horas con las distintas hemocianinas a una concentración 1 mg/mL, además de LPS de *Escherichia coli* Serotipo R515 (Enzo Life Sciences, EEUU) 100 ng/mL y RPMI como controles positivo y negativo, respectivamente. Posteriormente, los sobrenadantes fueron recolectados y congelados a -80°C hasta su análisis. Las citoquinas de ratón IL-12p40 e IL-6 se cuantificaron desde los sobrenadantes usando kits de ELISA BD OptEIA (BD Biosciences, EE.UU), según las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió a 450 nm en el lector de placas de ELISA SynergyHTX (Biotek, EE.UU). En los ensayos cada estándar o muestra fueron analizadas en triplicado y la concentración se obtuvo interpolando en la curva de calibración respectiva y posteriormente considerando la dilución correspondiente.

4.6 Análisis de la expresión de MHC-I, MHC-II y moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 por citometría de flujo en macrófagos de la línea J774.2

Las células de la línea J774.2 fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 y fueron cultivadas con las hemocianinas a una concentración de 1 mg/mL. Como control positivo se utilizó LPS (Enzo Life Sciences) 100 ng/mL y como control negativo medio RPMI durante 24 horas. Luego, las células fueron cosechadas con una solución de PBS con lidocaína 4 mg/mL (Sigma-Aldrich) y EDTA 10 mM (Invitrogen, EEUU), centrifugadas a 1800 rpm durante 5 minutos y resuspendidas en tampón FACS (PBS Dulbecco modificado que contiene SFB 2%). Posteriormente, las muestras se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos 1:100 en 100 μL de tampón FACS durante 60 minutos a 4°C en oscuridad: ratón anti-ratón MHC-I, rata anti-ratón MHC-II-FITC y ratón anti-ratón CD86. Después de ser lavadas con el tampón FACS las muestras fueron incubadas con los siguientes anticuerpos secundarios en una dilución 1:100 en 100 μL de tampón FACS: cabra anti-IgG de rata-Alexa Fluor-647, cabra anti-

IgG de ratón-Alexa Fluor-647, también se utilizó cabra anti-IgG de rata- FITC, cabra anti-IgG de ratón-FITC. Además, cada mezcla de anticuerpo secundario contenía la sonda de viabilidad eFluor780 (Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:1.000. De manera independiente se marcaron las células usando un anticuerpo anti-ratón CD80-FITC durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con tampón FACS, y fijadas con PBS-Paraformaldehído (PFA) 2%, manteniéndolas a 4°C protegidas luz hasta su lectura en el citómetro de flujo (FacsCantoll BDbioscience, USA. Laboratorio Dra. María Rosa Bono, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile).

4.7 Análisis estadístico

Los experimentos de secreción de citoquinas IL-6 e IL-12p40 a 24 horas se realizaron al menos 3 veces al igual que para el análisis de la expresión de MHC-I y MHC- II.

Para la expresión de MHC-I y MHC- II a las 48 horas, así como para la secreción de citoquinas, la expresión de CD80 y CD86, los experimentos se realizaron 2 veces de forma independiente, en duplicado o triplicado cuando fue posible.

Los resultados fueron graficados como el promedio \pm SEM, utilizando el programa GraphPad Prism 6 (California, EEUU), y analizados mediante test T de Student, según corresponda en cada caso.

V. RESULTADOS

5.1 Efecto de las hemocianinas en la secreción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12p40 evaluado por ELISA.

La línea celular J774.2, derivada de macrófagos de ratones BALB/c, se utilizó para determinar el efecto de CCH, FLH y KLH en la secreción de IL-6 e IL-12p40, mediante ELISA. Para validar esta línea celular como modelo de estudio de la respuesta inmune inducida por las hemocianinas, los macrófagos fueron estimulados con LPS a una concentración de 100 ng/mL. Para determinar el tiempo óptimo de cuantificación de citoquinas inducidas por hemocianinas, se realizó una incubación a las 3, 6, 18, y 24 horas. En estas condiciones, se midió sólo IL-6, debido a que datos previos del laboratorio mostraron que la secreción en macrófagos es mayor que IL-12p40. Para dicho experimento se utilizó solo FLH, ya que induce efectos proinflamatorios más potentes que CCH y KLH^{27,28,31,47} (figura 4A). No se observó aumento en la secreción a tiempos anteriores a las 24 horas, inducido por FLH. Para evaluar el efecto de las tres hemocianinas se realizó una estimulación de la línea J774.2 con los mismos controles, positivo y negativo mencionados anteriormente, y a una concentración de CCH, FLH y KLH de 1 mg/mL por 24 horas. Los resultados mostraron que en estas condiciones las células estimuladas con FLH y KLH aumentan significativamente la secreción de IL-6 (figura 4B), sin embargo, no aumentó la secreción de IL-12p40 (figura 4C). Como fue mencionado anteriormente, las hemocianinas son antígenos que tienen un procesamiento lento, por este motivo, se realizó una evaluación a las 48 horas de estimulación. Sin embargo, tampoco se observó un aumento de la secreción de estas citoquinas (figura 4D-E). Los resultados fueron concordantes solo con IL-6, en comparación con los obtenidos previamente en macrófagos peritoneales y BMDCs.

Así, se estableció que las células J774.2 responden a las hemocianinas luego de 24 horas de estimulación, secretando al menos una de las citoquinas proinflamatorias evaluadas en esta memoria, como es IL-6.

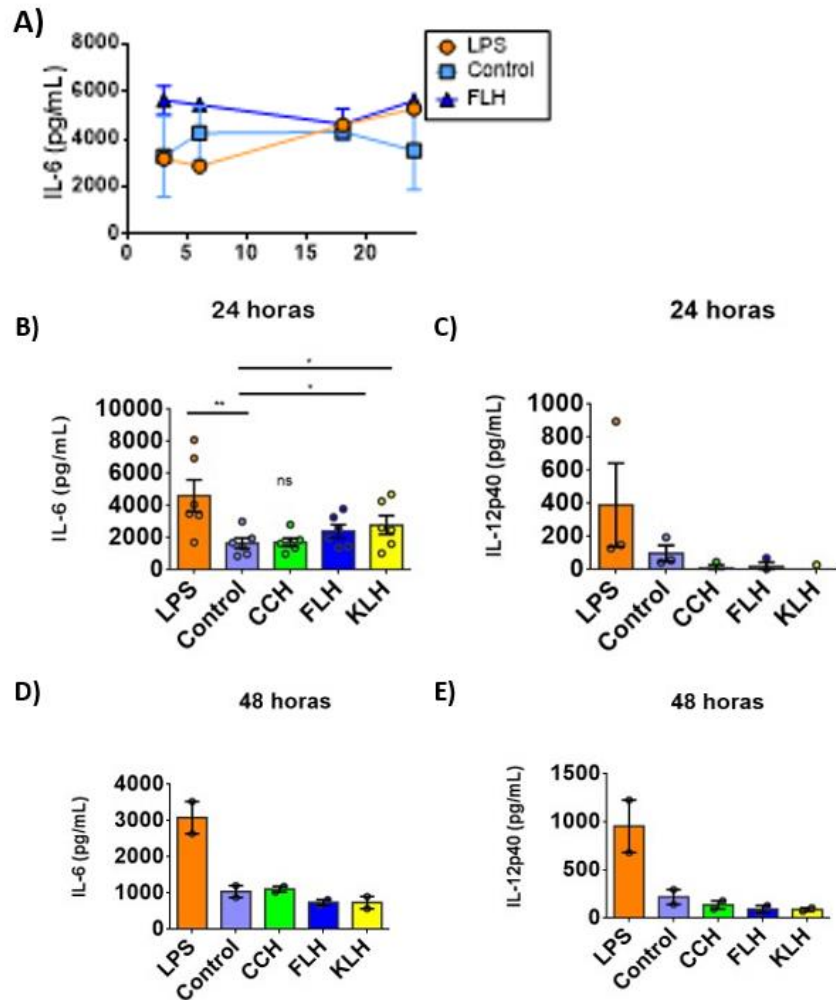


Figura 4. Efecto de las hemocianinas sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12p40 en células J774.2. Los macrófagos, a una densidad de 5×10^5 cél./mL, fueron tratados con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) y 1 mg/mL de cada hemocianina en forma independiente (CCH, FLH y KLH). Luego se recogieron los sobrenadantes y se cuantificaron las citoquinas usando kits de ELISA para IL-6 e IL-12p40. **(A)** Análisis de la secreción temporal de IL-6 inducida por FLH y los controles. Para la curva se realizaron 2 experimentos independientes. El gráfico muestra el promedio \pm SEM. **(B, C)** Secreción de IL-6 e IL-12p40 luego de 24 horas de estimulación con CCH, FLH, KLH y controles Análisis estadístico mediante prueba t de Student pareada, donde $*p < 0,1$; ns= no significativo 6 y 3 experimentos independientes, respectivamente **(D, E)** Medición de IL-6 luego de 48 horas de estimulación con hemocianinas y controles bajo las condiciones descritas anteriormente 2 experimentos independientes. Para los gráficos a 24 y 48 horas de incubación, los datos se muestran como promedio \pm SEM.

5.2 Efecto de las hemocianinas sobre la expresión inducible de MHC-I y MHC-II en la línea celular J774.2 evaluado por citometría de flujo.

Considerando que CCH, FLH y KLH son antígenos exógenos, se espera que luego de ser incorporadas por las células de la línea J774.2 sigan la vía clásica de procesamiento antigénico, esto es aumentando las moléculas de MHC-II para ser presentadas a linfocitos T CD4+. Sin embargo, ya que su incorporación en las células presentadoras de antígeno murinas está mediada por los receptores MR y TLR4, también podrían seguir la vía de presentación en MHC-I aumentando su expresión para ser presentadas a linfocitos T CD8+. Como antecedente, se debe señalar que esta línea fue utilizada previamente para determinar la incorporación de las hemocianinas y la posterior expresión de moléculas de superficie obteniéndose resultados negativos²⁷. Sin embargo, la literatura muestra una inducción de la expresión de MHC-I usando como antígeno LPS. Debido a esto se realizó una búsqueda bibliográfica de los haplotipos de los anticuerpos utilizados anteriormente y se determinó que no eran específicos para BALB/c, cepa que proviene esta línea celular. Por lo tanto, se evaluaron con nuevos anticuerpos específicos⁵¹.

Para determinar el efecto de las hemocianinas sobre la expresión inducible de MHC-I y MHC-II, usando los anticuerpos específicos para la cepa de ratones de la cual proviene la línea J774.2, las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 y luego estimuladas con hemocianinas a una concentración de 1mg/mL. Como control positivo se utilizó LPS (100 ng/mL).

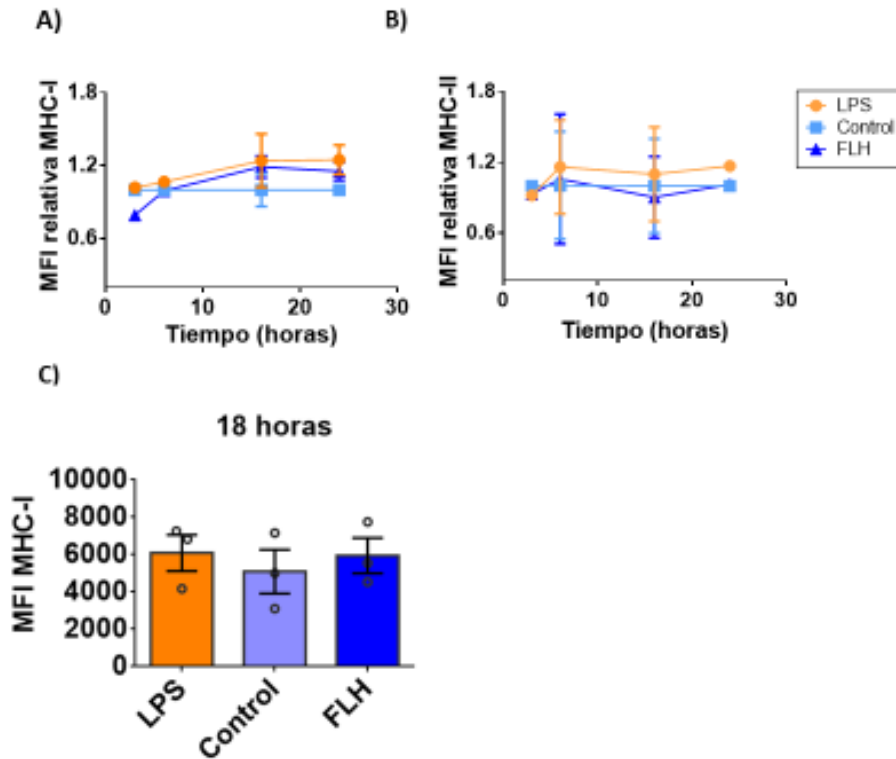


Figura 5. Expresión de MHC-I y MHC-II inducida por FLH en macrófagos J774.2. Análisis de citometría de flujo de células J774.2 tratadas con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) y 1 mg/mL de FLH. **(A, B)** Gráficos comparativos de la MFI de MHC-I y MHC-II inducidos por hemocianinas. Se midió la expresión de MHC-I y MHC-II a distintos tiempos (3, 6, 18 y 24 horas post estimulación), y se marcaron las células con un anticuerpo anti-MHC-I y un suero de cabra anti-IgG de ratón-Alexa Fluor-647. Para MHC-II se utilizó un anticuerpo anti-MHC-II y un suero de cabra anti-IgG de rata-Alexa Fluor-647. Los datos se muestran como promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes. **(C)** Gráfico comparativo de la MFI de MHC-I luego de 18 horas post-estimulación con FLH o controles. Promedio \pm SEM de 3 experimentos independientes. Análisis mediante test T de Student pareado, donde * $p < 0,1$.

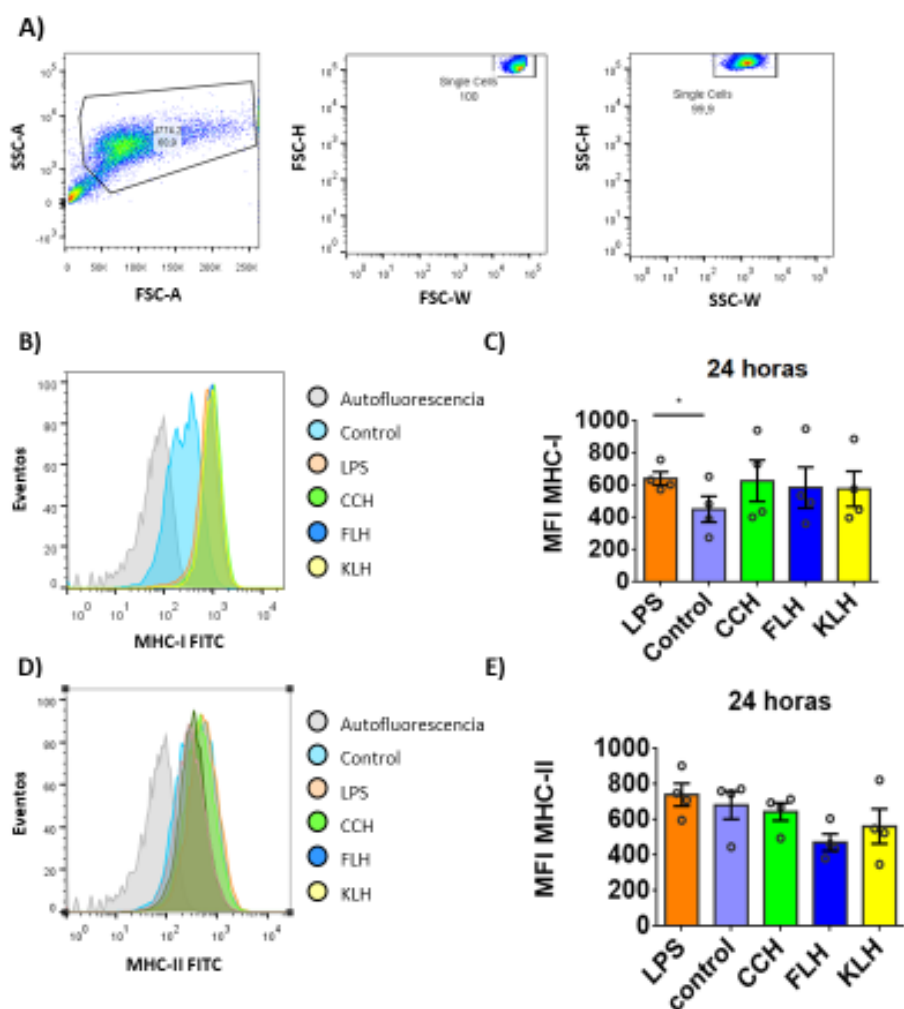


Figura 6. Efecto de las hemocianinas sobre la expresión de MHC-I y MHC-II en macrófagos de la línea celular J774.2, luego de 24 horas de estimulación *in vitro*. Análisis mediante citometría de flujo de células J774.2 tratadas durante 24 horas con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) o 1 mg/mL de CCH, FLH y KLH, y marcadas con la sonda de viabilidad eFluor780. (A) Análisis representativo de la selección de células viables a partir de la población total. Se muestra un gráfico de *dot plot* de FSC-A vs. SSC-A y la estrategia de selección de macrófagos J774.2 viables. Histograma representativo de la expresión de MHC-I inducida por hemocianinas. Las células fueron estimuladas con hemocianinas o controles durante 24 horas e incubadas con un anticuerpo anti-MHC-I y un suero de cabra anti-IgG de ratón-FITC. (C) Cuantificación de la MFI de MHC-I inducida por hemocianinas. Se muestra el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico mediante test t de Student pareado, donde $*p \leq 0,05$. (D) Histograma representativo de la expresión de MHC-II inducida por hemocianinas. Las células fueron estimuladas con hemocianinas o controles durante 24 horas e incubadas con un anticuerpo anti-MHC-II y un suero de cabra anti-IgG de rata-FITC. (E) Cuantificación de la MFI de MHC-II inducida por hemocianinas. Se muestra el promedio \pm SEM de 4 experimentos independientes.

Considerando que, estudios preliminares en macrófagos intraperitoneales sugieren que la expresión de MHC-I aumenta a las 24 horas post-estimulación con FLH, se realizó una medición a este tiempo. Adicionalmente, ya que las hemocianinas poseen características que las diferencian de otros antígenos, se cuantificaron los niveles de MHC-I a 3, 6, 18, 24 horas post-estimulación (ver figuras 5A y C), con la finalidad de determinar si FLH induce una respuesta temprana en esta línea macrofágica. Sin embargo, no se evidenció un aumento en la expresión de MHC-I. Al analizar el efecto de las tres hemocianinas a las 24 y 48 horas en la expresión de MHC-I, no se observó un incremento (ver figura 6B,C y 7A,B).

Teniendo en cuenta que las hemocianinas son antígenos exógenos y, que su procesamiento ocurre mediante la presentación antigénica por moléculas MHC-II⁴⁸, también se determinó su efecto sobre los niveles de MHC-II en macrófagos J774.2, similar a los experimentos realizados para MHC-I. Los resultados fueron negativos a las 24 y 48 horas de estimulación con CCH, FLH y KLH y con LPS (ver figura 6D,E Y 7C,D). Además, al realizar la curva de los niveles de MHC- II en tiempos anteriores a 24 horas, tampoco se observaron cambios significativos (ver figura 5B). Ya que no se observó un cambio en los niveles de MHC-II con el control positivo, se realizó una búsqueda bibliográfica, confirmándose que el LPS no induce MHC-II en esta línea celular⁵⁶.

Además, se determinó el aumento de MHC-I y MHC-II luego de 48 horas de estimulación con hemocianinas, debido a que, al ser glicoproteínas de alto peso molecular, su procesamiento es más lento²⁹ y su efecto podría ser tardío. Sin embargo, los resultados no mostraron un alza en ninguna de las condiciones ensayadas.

Se concluye que las hemocianinas no inducen la expresión de MHC-I ni de MHC-II en la línea celular J774.2. En el caso de MHC-II el alto porcentaje de células que expresaban de manera basal esta molécula indica una expresión constitutiva, por lo que no es posible observar una inducción por las hemocianinas.

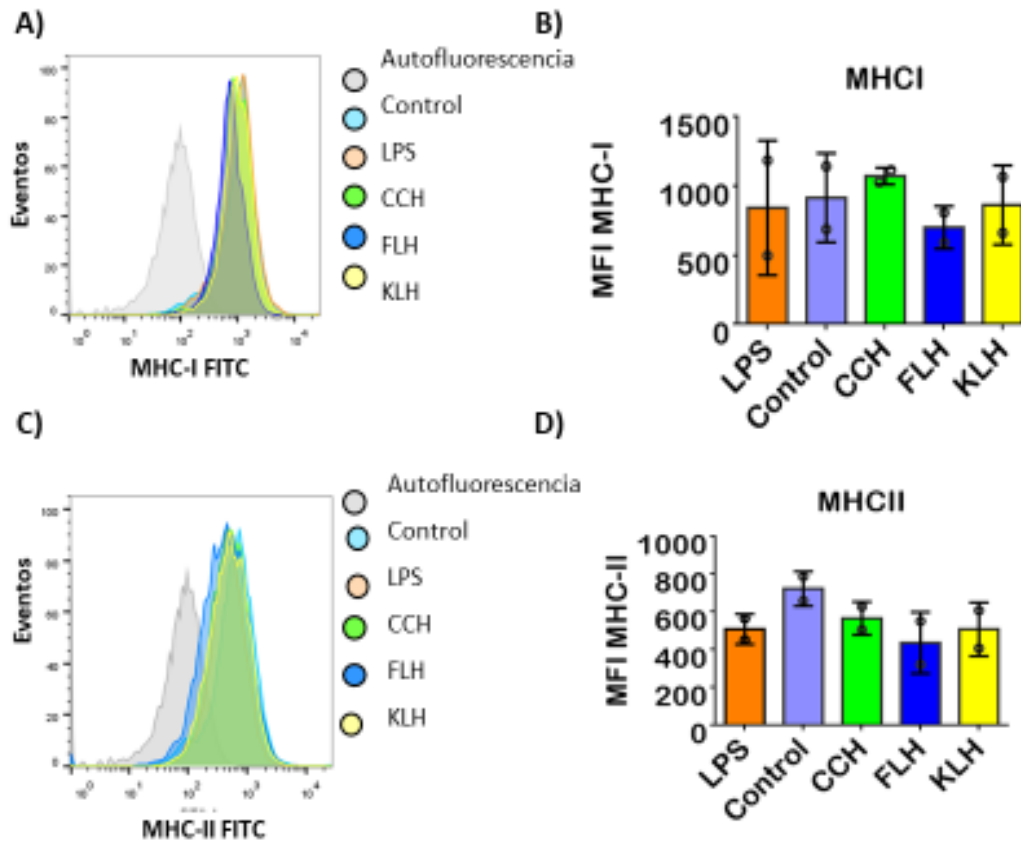


Figura 7. Efecto de las hemocianinas sobre la expresión de MHC-I y MHC-II en macrófagos de la línea J774.2, luego de 48 horas de estimulación. Análisis mediante citometría de flujo de células J774.2 tratadas durante 48 horas con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) o 1 mg/mL de CCH, FLH y KLH, y marcadas con la sonda de viabilidad eFluor780 1:1.000 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. **(A)** Histograma representativo de la expresión de MHC-I inducida por hemocianinas. Las células fueron estimuladas con hemocianinas o controles e incubadas con un anticuerpo anti-MHC-I y un suero de cabra anti-IgG de ratón-FITC. **(B)** Cuantificación de la MFI de MHC-I inducida por hemocianinas. Se muestra el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes. **(C)** Histograma representativo de la expresión de MHC-II inducida por hemocianinas. Las células fueron estimuladas con hemocianinas o controles e incubadas con un anticuerpo anti-MHC-II y un suero de cabra anti-IgG de rata-FITC. **(D)** Cuantificación de la MFI de MHC-II inducida por hemocianinas. Se muestra el promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes.

5.2 Determinación de la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 mediante citometría de flujo.

Para comprobar la activación de las células presentadoras de antígeno por efecto de las hemocianinas, además de medir las citoquinas y las moléculas MHC-I y MHC-II, se determinó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 a las 24 horas post estimulación.

Para dicho objetivo, las células fueron sembradas a una densidad de 5×10^5 cél/mL y estimuladas con una concentración de 1 mg/mL de CCH, FLH y KLH, además de LPS como control positivo. Las células se marcaron con los anticuerpos anti-ratón CD80-PE, y anti-ratón CD86 más un suero de cabra anti- IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor-647; luego se analizaron por citometría de flujo.

Como resultado preliminar, se estimó la expresión de CD80 (ver figura 8), donde se observó una tendencia al alza en la MFI de CD80 luego de la estimulación con KLH. Además, al analizar el porcentaje de células CD80+, se observó un aumento con las tres hemocianinas (ver figura 8B). En el caso de la expresión de CD86, se encontraron dos poblaciones positivas, las que se denominaron células de expresión media y de alta expresión. Al analizar las últimas, se evidencia un alza en el MFI de CD86 inducido por FLH y KLH (ver figura 9) y también, un cambio en el porcentaje de células de alta expresión de CD86+ con KLH.

Se concluye que las hemocianinas inducen la expresión de CD80 y de CD86 en la línea J774.2.

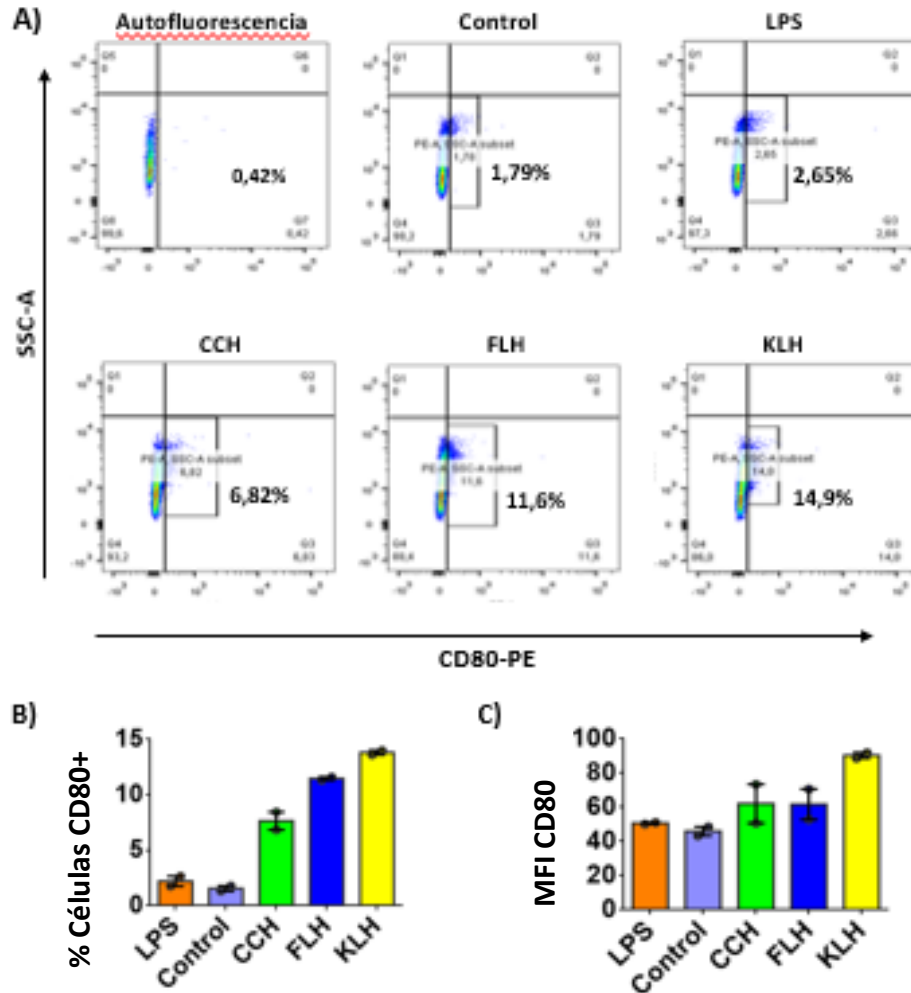


Figura 8. Efecto de las hemocianinas en la expresión de CD80. Análisis mediante citometría de flujo de células J774.2, a una densidad de 5×10^5 cél/mL, tratadas con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) y 1 mg/mL de CCH, FLH y KLH durante 24 horas. Se utilizó un anticuerpo anti CD80-PE como marcador y la viabilidad celular fue medida por la sonda eFluor 780. **(A)** Expresión de CD80 inducida por hemocianinas y controles. Gráfico *dot plot* según las condiciones de estimulación y controles descritas anteriormente. **(B)** Gráfico comparativo de MFI de CD80 inducido por hemocianinas y controles. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes. **(C)** Gráfico del porcentaje de células con alta expresión de CD80. Las barras corresponden al promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes.

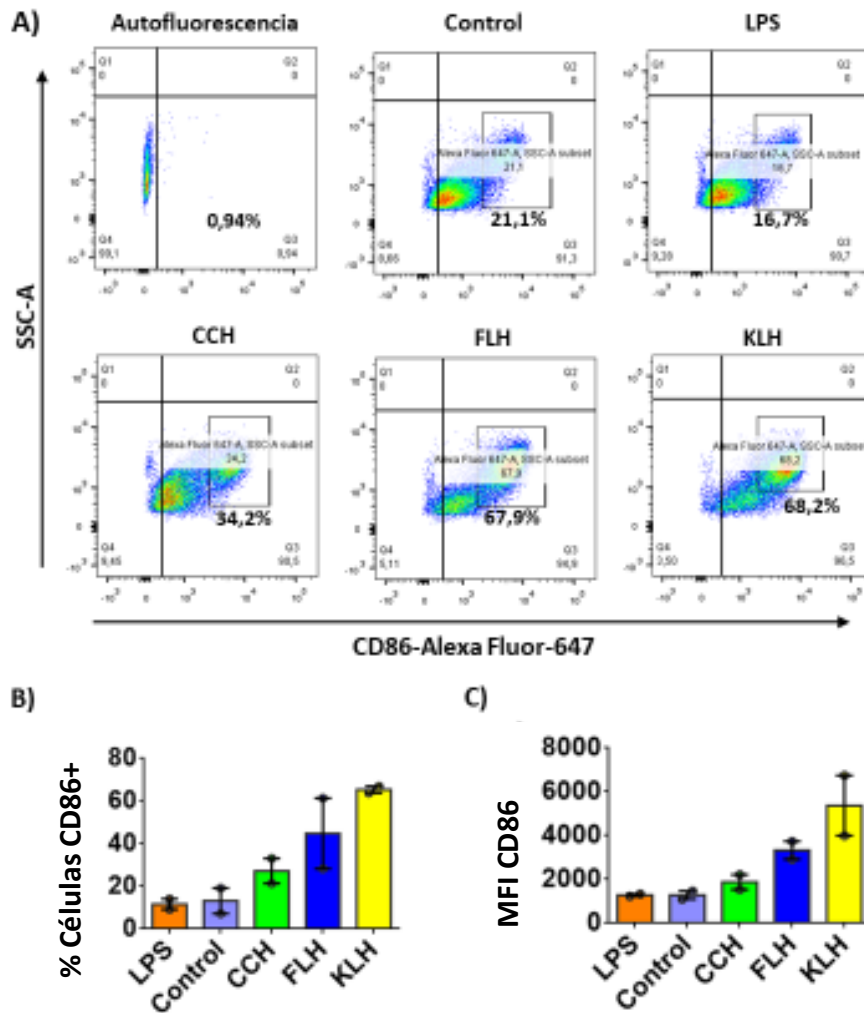


Figura 9. Efecto de las hemocianinas en la expresión de CD86. Análisis mediante citometría de flujo de células J774.2 a una densidad de 5×10^5 cél/mL, tratadas con 100 ng/mL de LPS (control positivo), RPMI (control negativo) y 1 mg/mL de CCH, FLH y KLH por 24 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-CD86 y un suero de cabra anti-IgG de rata-Alexa Fluor-647 como marcador, y la viabilidad celular fue medida por la sonda eFluor 780. **(A)** Expresión de CD86 inducida por hemocianinas y controles en células J774.2. Gráfico *dot plot* con las condiciones de estimulación y controles descritas anteriormente. **(B)** Gráfico del porcentaje de células con alta expresión de CD86⁺. Los datos se muestran como promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes. **(C)** Gráfico comparativo de MFI de CD86 inducida por hemocianinas. Los datos corresponden al promedio \pm SEM de 2 experimentos independientes.

VI. DISCUSIÓN

Las hemocianinas de moluscos son glicoproteínas conocidas por sus aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Por sus características inmunomoduladoras, que favorecen el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa de tipo Th1, las hemocianinas han sido ampliamente usadas en clínica en humanos y también en aplicaciones agropecuarias. Entre sus ventajas se puede destacar su baja toxicidad, y la ausencia de efectos adversos o reacciones alérgicas. Estas propiedades han permitido que las hemocianinas sean utilizadas como transportadoras de moléculas de haptenos (toxinas, hormonas y péptidos, entre otros), como adyuvantes en vacunas terapéuticas en base a células dendríticas, y que, además, sean utilizadas como agentes antitumorales por sí mismas, convirtiéndose en una alternativa terapéutica al *Bacillus de Calmette-Guérin* en pacientes que no toleran esta inmunoterapia post-operatoria para el carcinoma superficial de vejiga. En dichas aplicaciones, la hemocianina más utilizada es KLH, razón por la cual ha sido muy estudiada, sobre todo en cuanto a sus propiedades estructurales. Sin embargo, se han descrito hemocianinas con efectos comparables, tales como las obtenidas en nuestro laboratorio, correspondientes a CCH y FLH, además de las que se obtienen de otros moluscos gástrópodos como las de *Rapana thomasi*, *Helix aspersa* y *Haliothis tuberculata*, entre otras¹³.

Debido a que son escasas las investigaciones que abordan los mecanismos subyacentes a la respuesta inmune inducida por las hemocianinas y por sus aplicaciones clínicas, se hace necesario entender sus mecanismos de acción, para lo cual se requiere estudiar los receptores que permiten su reconocimiento y, su procesamiento y presentación antigénica en las APCs. En este contexto, nuestro grupo ha estudiado algunas de las características estructurales de las hemocianinas que contribuyen a sus efectos inmunomoduladores, focalizando la atención en la abundancia y heterogeneidad de los azúcares presentes en su estructura. Se ha demostrado que las glicosilaciones de las hemocianinas contribuyen a su interacción

con receptores de inmunidad innata que reconocen glicosilaciones en patógenos^{27,48}. Sin embargo, los mecanismos relacionados con su tráfico y destinación intracelular al interior de las APCs, así como los mecanismos mediante los cuales ocurre su presentación antigénica son escasamente conocidos.

Nuestra investigación pretende contribuir al conocimiento de la destinación intracelular de las hemocianinas y, específicamente, a las rutas de su procesamiento y presentación antigénicas en células presentadoras de antígenos, ya que son las encargadas del reconocimiento e incorporación de las hemocianinas para después iniciar la respuesta inmune innata y adaptativa inducida por dichas glicoproteínas. Conocer estos procesos ayudaría a la comprensión de las propiedades antitumorales de las hemocianinas, así como también a sus efectos inmunomoduladores. Estudios previos, usando células especializadas en la presentación antigénica, como son las BMDCs, mostraron que estas enormes glicoproteínas son incorporadas tanto por macropinocitosis como por endocitosis mediada por receptores³¹. Así mismo, se estableció que algunos CLRs están involucrados en el reconocimiento de las hemocianinas, destacando el rol del MR y DC-SIGN en este proceso³¹. Además, se observó que las hemocianinas son destinadas a endosomas tardíos, y que el procesamiento de CCH podría ser distinto al de FLH y KLH. Sin embargo, existen otros tipos celulares capaces de realizar presentación antigénica, que corresponden a los macrófagos, los cuales fueron utilizados en esta memoria, permitiendo comparar elementos comunes observables tanto en células dendríticas como en macrófagos murinos.

La línea celular de macrófagos murinos J774.2 expresa el MR y TLR4, ambos receptores involucrados en el reconocimiento e incorporación a las células presentadoras de antígenos²⁷. Además, estas células secretan citoquinas en respuestas a diversos antígenos, tales como los de *Mycobacterium avium*⁵². Se ha reportado que en células J774.2 se puede evaluar la destinación intracelular de los antígenos, usando los marcadores propuestos en esta memoria, a saber, Rab5, Rab7 y Lamp-1⁵³, para ver la incorporación en compartimentos endosomales y para

visualizar fagosomas. Dichas características fundamentaron la elección de este modelo de macrófagos murinos para investigar la destinación intracelular de las hemocianinas y su presentación antigénica.

Es importante destacar como resultado de este trabajo, el efecto inmunoestimulante parcial observado en células J774.2 cultivadas con hemocianinas. En este modelo se observó un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias, el cual fue significativo en las células tratadas con FLH y KLH durante 24 horas (figura 4). Estos resultados son similares a los obtenidos en BMDCs murinas, por lo que el efecto es comparable en el caso de IL-6 con lo observado en otros modelos de APCs^{28,48}. La citoquina IL-6 es esencial en el sistema inmune, ya que promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, y también, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B⁵⁴.

También cabe destacar el resultado de este trabajo, sobre la expresión de moléculas co-estimuladoras, tales como CD80 y CD86, inducidas por las hemocianinas en los macrófagos J774.2 (figura 8 y 9) las cuales mostraron una tendencia al alza luego de 24 horas de incubación. Esto sustenta el efecto inmunomodulador de estas glicoproteínas, ya que CD80 y CD86 son señales indispensables en la sinapsis inmunológica para la activación de los linfocitos T⁵⁵. Para que el linfocito T se active y sea capaz de elaborar una respuesta inmune contra un antígeno necesita al menos de tres señales esenciales. La señal 1 es la activación del TCR, dada por el reconocimiento de un antígeno unido al complejo MHC, ya sea I o II. La señal 2 corresponde a la unión de CD86/CD80 al co-receptor CD28. Si no ocurre dicha unión, el linfocito puede entrar en un estado de anergia llegando hasta la apoptosis. La señal 3 corresponde a la estimulación del linfocito por las citoquinas proinflamatorias. Además de estas señales, la unión del receptor de linfocitos T con el complejo antígeno-MHC es altamente específica, pero de baja afinidad; debido a esto las moléculas de adhesión como LFA-1, que es una integrina y por sus ligandos ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3, que pertenecen a la superfamilia de la inmunoglobulinas, permiten estabilizar la unión TCR-antígeno-MHC y consolidar el proceso de

activación⁶³.

Los resultados obtenidos con la línea celular J774.2 mostraron una evidente alza en dos de estas señales, correspondientes a la señal 2 y señal 3, y restaría por establecer las condiciones experimentales apropiadas para determinar la activación entre linfocitos T con TCRs que reconozcan péptidos de hemocianina presentados en MHCs-I y/o MHCs-II.

Sobre el efecto de las hemocianinas en la expresión de MHC tanto de clase I como de clase II en la línea celular J774.2, los resultados no fueron los esperados, ya que CCH, FLH y KLH no generaron un aumento de dichas moléculas en las condiciones estudiadas. En experimentos previos realizados con BMDCs estimuladas con hemocianinas, se observó un aumento al menos en MHC-II⁴⁸, resultado esperado debido a que las hemocianinas son proteínas exógenas y su procesamiento conduciría a la vía canónica de presentación restringida a MHC-II. Del mismo modo, en experimentos previos se observó un aumento significativo en la expresión de MHC-I en macrófagos peritoneales estimulados con FLH, antecedente que sugiere que las hemocianinas podrían ser presentadas por MHC-I, a través de una vía alternativa como es la presentación cruzada³¹. Aunque los resultados no fueron los esperados, no es posible concluir que las hemocianinas no siguen la vía de presentación cruzada en macrófagos, ya que esta línea celular difiere significativamente de un cultivo celular primario. Si bien los macrófagos J774.2 presentan algunas características morfológicas y funcionales similares a los cultivos primarios, existen diferencias tanto genéticas como fenotípicas que podrían dar cuenta de los resultados obtenidos.

Por otra parte, en cuanto a los resultados negativos obtenidos al cuantificar la expresión de MHC-II en los macrófagos J774.2 cultivados en presencia de las hemocianinas, y el control positivo LPS, surge la interrogante de si existe un error asociado al modelo o al diseño experimental. El uso de LPS como control positivo ha sido ampliamente documentado en este tipo de experimentos y, además, esta

molécula es reconocida tanto por TLR4 como por MR, dos de los receptores involucrados en el reconocimiento de hemocianinas. No obstante, realizando una búsqueda bibliográfica, se encontró que la expresión de MHC-II en macrófagos depende del ciclo celular en que se encuentren las células, y que, además, el LPS detiene el ciclo celular en la etapa G1, por lo que no permite la inducción de la expresión de MHC-II⁵⁶. Esto podría explicar que no exista un aumento significativo en los niveles de MHC-II al estimular con LPS y, por este motivo, se sugiere que el LPS no es el control positivo más adecuado para estudiar la expresión de MHC- II en esta línea celular. Además, otro aspecto a considerar es que prácticamente el 98% de las células eran positivas para MHC-II a nivel basal, por lo que su expresión podría ser constitutiva y no inducible. Se propone entonces que, para estudiar la expresión de MHC-II por efecto de las hemocianinas, se use otra línea celular donde esta molécula sea inducible, como por ejemplo la línea celular BM A3.1A7 (BMA) derivada de macrófago de ratón C57BL/6⁵⁷.

Con los resultados obtenidos en el primer objetivo consideramos que es importante analizar qué sucede en un cultivo primario, para lo cual se trabajaría con macrófagos peritoneales debido a dos antecedentes. Primero, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran la mejor secreción de citoquinas entre distintos tipos celulares evaluados²⁸. Segundo, estudios realizados por otros grupos de investigación, muestran que el fenotipo de macrófagos del tipo1 (M1), que se caracteriza por la secreción de citoquinas proinflamatorias y la expresión inducible de la óxido nítrico sintasa, podrían realizar presentación cruzada⁵⁸. Por otra parte, los macrófagos peritoneales expresan altos niveles de TLR4 y MR, involucrados en el reconocimiento de las hemocianinas, que además están involucrados en la presentación cruzada⁴⁵. En estos experimentos se espera que los macrófagos peritoneales muestren un fenotipo proinflamatorio, con una alta secreción de citoquinas como IL-6 al ser estimuladas con hemocianinas. El tiempo seleccionado para medir la secreción de citoquinas y la expresión de MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 sería a las 24 horas de estimulación con las hemocianinas, usando como control positivo LPS y OVA. Se propone este nuevo control debido a que esta proteína es

ampliamente utilizada como antígeno exógeno tanto en células dendríticas como en macrófagos peritoneales, porque es capaz de inducir la expresión en MHC-I y MHC-II⁶⁴⁻⁶⁶.

El uso de macrófagos peritoneales murinos permitiría acercar los resultados obtenidos a lo que sucede fisiológicamente en seres humanos que son inoculados con hemocianinas de forma terapéutica, por ejemplo, en la inmunoterapia contra algunos cánceres, tales como el cáncer superficial de vejiga y en melanoma^{23,24,59}. Si bien existen diferencias genéticas y fenotípicas entre este modelo y el humano, las pruebas en animales corresponden a una primera etapa y han permitido escalar de manera segura el uso de fármacos y vacunas⁶⁰.

La destinación intracelular de las hemocianinas en los macrófagos peritoneales permitirá conocer el procesamiento de estas glicoproteínas, cuyos efectos antitumorales sugieren fuertemente que siguen la vía de presentación cruzada, además de la ruta clásica de procesamiento en moléculas de MHC-II. Estos experimentos se realizarán determinando la colocalización, mediante la obtención del coeficiente de Manders', de las hemocianinas acopladas a fluoróforos (Alexa Fluor-488 o Alexa Fluor-594) con los distintos marcadores intracelulares (Rab5 para endosomas tempranos, Rab7 para endosomas tardíos y Lamp-1 para el compartimento lisosomal). Para ello, se debería determinar la colocalización de las hemocianinas con los marcadores a distintos tiempos, para fijar el tiempo óptimo de análisis⁶¹. Posteriormente, y tomando como referencia los trabajos anteriores realizados en BMDCs, esperaríamos localizar a las hemocianinas principalmente en endosomas tardíos (Rab7+), y en menor medida en endosomas Lamp-1+. Con este resultado se confirmaría la presentación vía MHC-II.

Estudios reportados en la literatura muestran que los macrófagos peritoneales obtenidos mediante inducción intraperitoneal de ratones con tioglicolato, realizan presentación cruzada, principalmente por la vía vacuolar⁵⁸, observándose que el antígeno está localizado en el compartimento lisosomal Lamp-1+, después de 48

horas de estimulación. Este antecedente sugiere que las hemocianinas deberían colocalizar en tiempos tardíos con Lamp-1 si siguen la vía vacuolar de presentación cruzada. Además, sería interesante determinar mediante microscopía confocal si las hemocianinas y moléculas intracelulares marcadas con fluoróforos también pueden colocalizar con MHC-I y MHC-II, describiendo así la ruta de procesamiento de las hemocianinas en macrófagos.

Como proyección de esta memoria, es relevante analizar los efectos de los distintos inhibidores de estas rutas de procesamiento y presentación antigénica, como por ejemplo leupeptina para inhibir la vía vacuolar de la presentación cruzada o epoximicina para inhibir el proteasoma y la ruta citosólica de la presentación cruzada⁴¹. Mediante la utilización de estos inhibidores, se espera establecer qué ruta o rutas de procesamiento siguen las hemocianinas que conducen a un aumento en la secreción de citoquinas y moléculas coestimuladoras, entre otros parámetros como se muestra en la figura 10. La importancia de dilucidar la destinación intracelular de las hemocianinas y su procesamiento permitiría modular la respuesta inmunológica a un fenotipo que potencie aún más la respuesta antitumoral desencadenada por estas glicoproteínas.

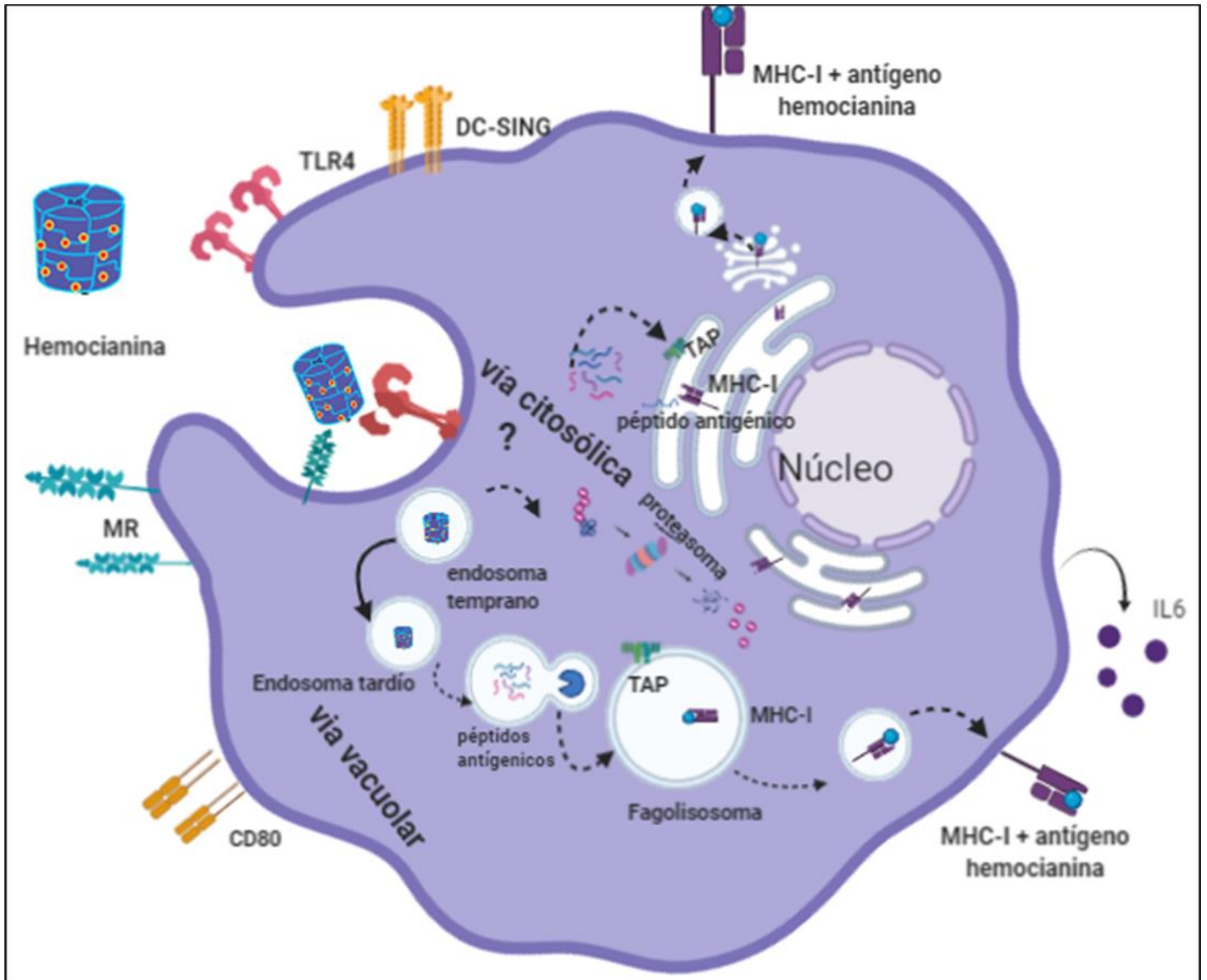


Figura 10. **Modelo propuesto para presentación cruzada de las hemocianinas.** Las hemocianinas son reconocidas por receptores de inmunidad innata, tales como TLR4 y MR, e incorporadas por las APCs en endosomas. Posteriormente, dentro de la célula podrían seguir dos rutas de procesamiento vía presentación cruzada de antígenos. 1. Vía citosólica: las hemocianinas escapan del endosoma temprano, son ubiquitinizadas y proteolizadas en el citoplasma. Luego, sus péptidos son incorporados al RE, donde se cargan a un MHC-I, siguiendo la ruta canónica por el aparato de Golgi y son presentados a la superficie. 2. Vía vacuolar: las hemocianinas siguen el procesamiento dentro de los endosomas hasta llegar al lisosoma, donde son proteolizadas por diferentes proteasas. Luego, se fusiona el lisosoma con un fagosoma que contiene MHC-I, se cargan los péptidos antigénicos de las hemocianinas en MHC-I, y son transportados en vesículas a la superficie de la APC.

VII. CONCLUSIONES

A partir del análisis teórico y del trabajo experimental desarrollado en esta memoria, las conclusiones son:

1. La línea celular de macrófagos J774.2 no es el modelo óptimo para evaluar el efecto inmunomodulador de las hemocianinas: aumentó la secreción de IL-6 e incrementó la expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Sin embargo, en las condiciones analizadas no se encontró un aumento en la expresión de MHC-I y MHC-II, requisito fundamental para la sinapsis inmunológica con linfocitos T.
2. Los antecedentes sustentan que, si ocurre la presentación cruzada en MHC-I de las hemocianinas en macrófagos, la vía vacuolar sería la más probable por la compleja estructura de estas glicoproteínas.
3. Se concluye que para futuros estudios sobre la destinación intracelular de las hemocianinas en APCs, ya sea macrófagos o células dendríticas, aunque las líneas celulares tienen ciertas ventajas, el uso de cultivos primarios sería el mejor modelo, porque reflejan mejor la complejidad genética y fenotípica de los organismos en que estas glicoproteínas son utilizadas.

VIII. REFERENCIAS

1. Radiation of Hemocyanin : Inactivation and Reactivation of Oxygen-Carrying Capacity Author (s): Jack Schubert and E. R. White Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/1720878> 2016;155(3765):1000-1003.
2. Del Campo M, Arancibia S, Nova E, et al. Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Rev Med Chil.* 2011;139(2):236-246.
3. Kato S, Matsui T, Gatsogiannis C, Tanaka Y. Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophys Rev.* 2018;10(2):191-202. doi:10.1007/s12551-017-0349-4
4. Gatsogiannis C, Markl J. Keyhole Limpet Hemocyanin: 9-Å CryoEM Structure and Molecular Model of the KLH1 Didecamer Reveal the Interfaces and Intricate Topology of the 160 Functional Units. *J Mol Biol.* 2009;385(3):963-983. doi:10.1016/j.jmb.2008.10.080
5. Idakieva K, Stoeva S, Voelter W, Gielens C. Glycosylation of *Rapana thomasiana* hemocyanin. Comparison with other prosobranch (gastropod) hemocyanins. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 2004;138(3):221-228. doi:10.1016/j.cbpc.2004.02.017
6. Staudacher E, Stepan H, Gutternigg M. Europe PMC Funders Group PROTEIN N-GLYCOSYLATION OF GASTROPODS. 2011;11(2):29-39.
7. Wuhrer M, Robijn MLM, Koeleman CAM, et al. A novel Gal(β1-4)Gal(β1-4)Fuc(α1-6)-core modification attached to the proximal N-acetylglucosamine of keyhole limpet haemocyanin (KLH) N-glycans. *Biochem J.* 2004;378(2):625-632. doi:10.1042/BJ20031380
8. Geyer H, Wuhrer M, Resemann A, Geyer R. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem.* 2005;280(49):40731-40748. doi:10.1074/jbc.M505985200
9. Wirguin I, Suturkova-Milosević L, Briani C, Latov N. Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(β1-3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 1995;40(5):307-310. doi:10.1007/BF01519630
10. Siddiqui NI, Yigzaw Y, Préaux G, Gielens C. Involvement of glycans in the immunological cross-reaction between α-macroglobulin and hemocyanin of the gastropod *Helix pomatia*. *Biochimie.* 2009;91(4):508-516. doi:10.1016/j.biochi.2008.12.006
11. Gai Z, Matsuno A, Kato K, et al. Crystal Structure of the 3.8-MDa Respiratory Supermolecule Hemocyanin at 3.0 Å Resolution. *Structure.* 2015;23(12):2204-2212. doi:10.1016/j.str.2015.09.008
12. Harris JR, Markl J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): A biomedical review. *Micron.* 1999;30(6):597-623. doi:10.1016/S0968-4328(99)00036-0

13. Becker MI, Arancibia S, Salazar F, Del Campo M, De Ioannes A. Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications. *Immune Response Act.* 2014. doi:10.5772/57552
14. Gebauer W, Harris JR, Markl J. Topology of the 10 subunits within the Decamer of KLH, the hemocyanin of the marine gastropod *Megathura crenulata*. *J Struct Biol.* 2002;139(3):153-159. doi:10.1016/S1047-8477(02)00591-9
15. Kurokawa T, Wuhrer M, Lochnit G, Geyer H, Markl J, Geyer R. Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal(β 1-6)Man-motifs. *Eur J Biochem.* 2002;269(22):5459- 5473. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03244.x
16. Dudkin VY, Miller JS, Dudkina AS, Antczak C, Scheinberg DA, Danishefsky SJ. Toward a prostate specific antigen-based prostate cancer diagnostic assay: Preparation of keyhole limpet hemocyanin-conjugated normal and transformed prostate specific antigen fragments. *J Am Chem Soc.* 2008;130(41):13598-13607. doi:10.1021/ja8028137
17. Aarntzen EHJG, De Vries IJM, GöErtz JH, et al. Humoral anti-KLH responses in cancer patients treated with dendritic cell-based immunotherapy are dictated by different vaccination parameters. *Cancer Immunol Immunother.* 2012;61(11):2003-2011. doi:10.1007/s00262-012-1263-z
18. De Ioannes P, Moltedo B, Oliva H, et al. Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J Biol Chem.* 2004;279(25):26134-26142. doi:10.1074/jbc.M400903200
19. Salazar M. Efecto de la eliminación enzimática de N-glúcidos sobre la estructura y propiedades inmunogénicas y antitumorales de las hemocianinas de moluscos en mamíferos. Tesis de Magister, Universidad de Chile 2018. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/171113>
20. Manosalva H, De Ioannes AE, Becker MI. Development of Monoclonal Antibodies Bearing the Internal Image of the Gizzerosine Epitope and Application in a Competitive ELISA for Fish Meal. *Hybrid Hybridomics.* 2004;23(1):45-54. doi:10.1089/153685904322772024
21. Powers JG, Baker DL, Davis TL, Conner MM, Lothridge AH, Nett TM. Effects of Gonadotropin-Releasing Hormone Immunization on Reproductive Function and Behavior in Captive Female Rocky Mountain Elk (*Cervus elaphus nelsoni*)1. *Biol Reprod.* 2011;85(6):1152-1160. doi:10.1095/biolreprod.110.088237
22. Román JJM, Del Campo M, Villar J, et al. Immunotherapeutic potential of mollusk hemocyanins in combination with human vaccine adjuvants in murine models of oral cancer. *J Immunol Res.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/7076942

23. Salazar-Onfray F, Pereda C, Reyes D, López MN. TAPcells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biol Res.* 2013;46(4):431-440. doi:10.4067/S0716-97602013000400014
24. Arancibia S, Salazar F, Ins M. Hemocyanins in the Immunotherapy of Superficial Bladder Cancer. *Bl Cancer - From Basic Sci to Robot Surg.* 2012;(June 2014). doi:10.5772/28281
25. Reyes D, Salazar L, Espinoza E, et al. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 2013;109(6):1488-1497. doi:10.1038/bjc.2013.494
26. Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, et al. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One.* 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0087240
27. Salazar ML, Jiménez JM, Villar J, et al. N-Glycosylation of mollusk hemocyanins contributes to their structural stability and immunomodulatory properties in mammals. *J Biol Chem.* 2019;294(51):19546-19564. doi:10.1074/jbc.RA119.009525
28. Jiménez JM, Salazar ML, Arancibia S, et al. TLR4, but neither dectin-1 nor dectin-2, participates in the mollusk hemocyanin-induced proinflammatory effects in antigen-presenting cells from mammals. *Front Immunol.* 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.01136
29. Zhong T-Y, Arancibia S, Born R, et al. Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *J Immunol.* 2016;196(11):4650-4662. doi:10.4049/jimmunol.1501156
30. Arancibia S. Participación de Receptores Tipo-Lectina en la inmunogenicidad y en el efecto antitumoral de hemocianinas de moluscos en mamíferos. Tesis doctorado Univ. de Chile 2012. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/105225>
31. Villar J, 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 de Magister Univ. de Chile. 2016. <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/152796>
32. Wang YY, Hu CF, Li J, You X, Gao FG. Increased translocation of antigens to endosomes and TLR4 mediated endosomal recruitment of TAP contribute to nicotine augmented cross-presentation. *Oncotarget.* 2016;7(25):38451-38466. doi:10.18632/oncotarget.9498
33. Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. Ninth Edition . By Kenneth Murphy and Casey Weaver; with Contributions by Allan Mowat, Leslie Berg, and David Chaplin; with Acknowledgment to: Charles A. Janeway, Jr., Paul Travers, and Mark Walport. *New York: Garland Science Vol 93.*; 2018. doi:10.1086/696793

34. Adiko AC, Babdor J, Gutiérrez-Martínez E, Guermonprez P, Saveanu L. Intracellular transport routes for MHC I and their relevance for antigen cross-presentation. *Front Immunol.* 2015;6(JUL):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00335
35. Klumperman J, Raposo G. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):1-22. doi:10.1101/cshperspect.a016857
36. Yin L, Trenh P, Guce A, et al. Susceptibility to HLA-DM protein is determined by a dynamic conformation of major histocompatibility complex class II molecule bound with peptide. *J Biol Chem.* 2014;289(34):23449-23464. doi:10.1074/jbc.M114.585539
37. Embgenbroich M, Burgdorf S. Current concepts of antigen cross-presentation. *Front Immunol.* 2018;9(JUL). doi:10.3389/fimmu.2018.01643
38. Backer R, van Leeuwen F, Kraal G, den Haan JMM. CD8- dendritic cells preferentially cross-present *Saccharomyces cerevisiae* antigens. *Eur J Immunol.* 2008;38(2):370-380. doi:10.1002/eji.200737647
39. Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Front Immunol.* 2018;9(December):2874. doi:10.3389/fimmu.2018.02874
40. Espinosa-Carrasco G, Villard M, Le Saout C, Louis-Plence P, Vicente R, Hernandez J. Systemic LPS translocation activates cross-presenting dendritic cells but is dispensable for the breakdown of CD8+ T cell peripheral tolerance in irradiated mice. *PLoS One.* 2015;10(6):1-18. doi:10.1371/journal.pone.0130041
41. Cruz-Leal Y, Grubaugh D, Nogueira C V., et al. Antigen cross-presentation induced by the pore-forming protein sticholysin II encapsulated into liposomes. *Front Immunol.* 2018;9(NOV):1-14. doi:10.3389/fimmu.2018.02473
42. Sánchez-Paulete AR, Teijeira A, Cueto FJ, et al. Corrigendum: Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy [Ann Oncol, 28, Suppl 12, (2017)] DOI:10.1093/annonc/mdx237. *Ann Oncol.* 2017;28(January 2018):xii74. doi:10.1093/annonc/mdx727
43. Blander JM. Regulation of the Cell Biology of Antigen Cross Presentation. *Annu Rev Immunol.* 2018 (Apr 26) 36: 717–753. doi:10.1146/annurev-immunol-041015-055523.R
44. Tacken PJ, De Vries IJM, Gijzen K, et al. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood.* 2005;106(4):1278-1285. doi:10.1182/blood-2005-01-0318
45. Horrevorts SK, Duinkerken S, Bloem K, et al. Toll-like receptor 4 triggering promotes cytosolic routing of DC-SIGN-targeted antigens for presentation on

- MHC class I. *Front Immunol.* 2018;9(JUN):1-13. doi:10.3389/fimmu.2018.01231
46. Fortier AH, Falk LA. Isolation of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 1994;11(1):1-9. doi:10.1002/0471142735.im1401s11
 47. Zhong T-Y, Arancibia S, Born R, et al. Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *J Immunol.* 2016;196(11):4650-4662. doi:10.4049/jimmunol.1501156
 48. Jiménez JM, Participación de los receptores de inmunidad innata Dectina-2, Dectina-1 Y TLR4 en la activación de las células presentadoras de antígeno de mamíferos inducida por hemocianinas de moluscos. Tesis de doctorado Univ. de Chile . 2019. <http://repositorio.conicyt.cl/handle/10533/236574>
 49. Kueanjinda P, Roytrakul S, Palaga T. A Novel Role of Numb as A Regulator of Pro-inflammatory Cytokine Production in Macrophages in Response to Toll-like Receptor 4. *Sci Rep.* 2015;5(August):1-14. doi:10.1038/srep12784
 50. Mayordomo AC, Silva JE, Gorlino CV, Arias JL, Berón W, Di Genaro MS. IL-12/23p40 overproduction by dendritic cells leads to an increased Th1 and Th17 polarization in a model of yersinia enterocolitica-induced reactive arthritis in TNFRp55^{-/-} mice. *PLoS One.* 2018;13(3):1-19. doi:10.1371/journal.pone.0193573
 51. Kim WS, Kim H, Kwon KW, et al. Cisplatin induces tolerogenic dendritic cells in response to TLR agonists via the abundant production of IL-10, thereby promoting Th2- and Tr1-biased T-cell immunity. *Oncotarget.* 2016;7(23):33765-33782. doi:10.18632/oncotarget.9260
 52. Zur Lage S, Goethe R, Darji A, Valentin-Weigand P, Weiss S. Activation of macrophages and interference with CD4⁺ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subspecies avium. *Immunology.* 2003;108(1):62-69. doi:10.1046/j.1365-2567.2003.01564.x
 53. Yin C, Kim Y, Argintaru D, Heit B. Rab17 mediates differential antigen sorting following efferocytosis and phagocytosis. *Cell Death Dis.* 2016;7(12):e2529-12. doi:10.1038/cddis.2016.431
 54. Saavedra Ramírez PG, Vásquez Duque GM, González Naranjo LA. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia.* 2011;24(2):157-166.
 55. Danay D, Hernández S. La molécula CD28 y su función en la activación de células T CD28 and its role in T cell activation. *Inmunol y Hemoter.* 2013;29(4):359-367. <http://scielo.sld.cu>.
 56. Xaus J, Comalada M, Barrachina M, et al. The Expression of MHC Class II Genes in Macrophages Is Cell Cycle Dependent. *J Immunol.* 2000;165(11):6364-6371. doi:10.4049/jimmunol.165.11.6364

57. Paulina Achita AB. Immortalized Murine Macrophage Cell Line as a Model for Macrophage Polarization into Classically Activated M(IFN γ +LPS) or Alternatively Activated M(IL-4) Macrophages. *J Clin Cell Immunol.* 2015;06(02):1-7. doi:10.4172/2155-9899.1000318
58. Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G. Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front Immunol.* 2020;11(July):1-12. doi:10.3389/fimmu.2020.01276
59. Palacios M, Tampe R, Del Campo M, et al. Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside. *Eur J Med Chem.* 2018;150:74-86. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.082
60. Rodríguez Yunta E. Ética De La Investigación En Modelos Animales De Enfermedades Humanas. *Acta Bioeth.* 2007;13(1):25-40. doi:10.4067/s1726-569x2007000100004
61. Sutherland MD, Kozel TR. Macrophage uptake, intracellular localization, and degradation of poly- γ -D-glutamic acid, the capsular antigen of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* 2009;77(1):532-538. doi:10.1128/IAI.01009-08
62. Macías Abraham, Consuelo. (2006). Moléculas de adhesión: Importancia en la respuesta inmune e inflamatoria. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 22(2) Recuperado en 28 de diciembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892006000200003&lng=es&tlng=es.
63. Harjunpää H, Asens ML, Guenther C, Fagerholm SC. Cell adhesion molecules and their roles and regulation in the immune and tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2019;10(MAY). doi:10.3389/fimmu.2019.01078
64. Muno D, Kominami E, Mizuochi T. Generation of both MHC class I- and class II-restricted antigenic peptides from exogenously added ovalbumin in murine phagosomes. *FEBS Lett.* 2000;478(1-2):178-182. doi:10.1016/S0014-5793(00)01849-4
65. Popovic Z V., Embgenbroich M, Chessa F, et al. Hyperosmolarity impedes the cross-priming competence of dendritic cells in a TRIF-dependent manner. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi:10.1038/s41598-017-00434-y
66. Shin S, Hyun B, Lee A, et al. Metformin suppresses MHC-restricted antigen presentation by inhibiting co-stimulatory factors and MHC molecules in APCs. *Biomol Ther.* 2013;21(1):35-41. doi:10.4062/biomolther.2012.094.
67. Broad A, Kirby JA, Jones DEJ. Toll-like receptor interactions: Tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- β production. *Immunology.* 2007;120(1):103-111. doi:10.1111/j.1365-2567.2006.02485.x
68. Ralph P, Moore MA, Nilsson K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J Exp Med.* 1976 Jun 1;143(6):1528-33. doi: 10.1084/jem.143.6.1528. PMID: 1083890; PMCID: PMC2190228.