

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***Participación del receptor tipo Toll-4 en la secreción de citoquinas proinflamatorias mediada por hemocianinas de moluscos en células presentadoras de antígenos murinas***

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

***BYRON NICOLÁS CASTILLO PINTO***

Director de Tesis: Dra. María Inés Becker C.  
Co-director: Dr. Dante Miranda Wilson

Santiago-CHILE

Enero 2022

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

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

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

**BYRON NICOLÁS CASTILLO PINTO**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Proteínas Recombinantes y Biotecnología y Título de Químico Farmacéutico, en el examen público rendido el día

**Directora de Tesis:**

**Dra. María Inés Becker C.**

---

**Co-director de Tesis:**

**Dante Miranda Wilson**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Javier Puente (presidente)**

---

**Dr. Mauricio Farfán**

---

**Dr. Guillermo Díaz**

---

## AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, quisiera agradecerle a mi mamá, papá y hermano por apoyarme en este largo camino llamado “la educación superior”. Es una honra para mí convertirme en el primer profesional de toda mi familia. Le dedico este trabajo y título, a todas las generaciones de mis antepasados que no pudieron tener una educación básica, media y universitaria, tan linda y completa como la tuve yo. Donde la cuna de la educación pública forjó cada uno de mis ideales, y en cada institución que estuve, mi paso dejó una marca.

Durante la universidad conocí grandes amigas que me acompañaron en este proceso formativo; Karla Guzmán, Javiera Cano y Camila Ferrando. Cada una de ustedes hicieron que mi camino por la universidad tuviese un sentido mucho más que solo académico, si no, también, un sentido más humano, de amistad, de acompañamiento y cariño. Por esas cosas de la vida, en algún momento estuve muy cerca de ustedes y sus familias, y haberme compartido ese espacio en sus núcleos íntimos y fraternos, es algo que atesoro muy felizmente en mis recuerdos. Maratónicos días y noches de estudio. Tardes de conversa. Despedidas tristes y fúnebres. Risas y cantos. Me hicieron sentir acompañado cuando aun así me sentí solo y perdido. Por eso y todo, siempre les estaré agradecido.

En el laboratorio donde desarrollé mi Tesis, muchas personas me ayudaron a comprender el significado del hacer ciencia. Dentro de estas, quisiera agradecerle a mi compañera de laboratorio, Michelle Salazar, quién me instruyó en el quehacer científico enseñándome mucho de su conocimiento. Además de tener un espíritu muy noble, Michelle es una excelente científica y todo un modelo a seguir en este ámbito. A su vez, quisiera también darle las gracias a mi directora de Tesis, la Dra. María Inés Becker, cuyo aporte a la construcción de este escrito fue indispensable. Y no solo eso, su carácter dócil y gentil hicieron que mi paso por el laboratorio fuese muy ameno. Su manera de ver las cosas siempre fueron una inspiración para continuar trabajando, experimento a

experimento. También agradecerle al Dr. Dante Miranda, que también muy amablemente trabajó conmigo para mejorar el escrito y mis presentaciones, además de aportar con su mirada crítica al desarrollo de esta Tesis, así como también su sentido del humor. Quisiera también nombrar al Dr. Augusto Manubens, quién fue un pilar fundamental en cada reunión de trabajo, y a mis compañeros Daniel y Diego, cuyos aportes con ideas siempre fueron bienvenidas al desarrollo de esta Tesis.

## 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).

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESO

Durante el desarrollo de la Tesis, se participó en las investigaciones que generaron las siguientes comunicaciones a congresos:

- **Diego A. Díaz-Dinamarca, Michelle L. Salazar, Daniel F. Escobar, Byron Castillo, Ricardo A. Manzo, Augusto Manubens, Abel E. Vasquez, María Inés Becker.** “Analysis of protein-based adjuvants agonist of TLR4, Hemocyanin and SIP, in the MyD88 and TRIF signaling pathways leading to immunostimulation and proinflammatory responses”. XLIV ANNUAL MEETING Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology. 24 - 28 Octubre de 2021. Resumen Sección Biomedicina BM4.3.
- **Michelle L. Salazar, Alejandra Alvarado, Diego Díaz-Dinamarca, Byron Castillo, Daniel Navarro, Augusto Manubens, María Inés Becker.** “Mechanisms underlying hemocyanin antigen processing and presentation through MHC-I and MHC-II dependent pathways”. XLIV ANNUAL MEETING Chilean Society for Biochemistry and Molecular Biology. 24 - 28 Octubre de 2021. Resumen Sección Biomedicina BM4.2.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	iii
FINANCIAMIENTO .....	v
PARTICIPACIÓN EN CONGRESO .....	vi
ÍNDICE GENERAL .....	vii
ÍNDICE DE MATERIAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ABREVIATURAS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
ABSTRACT.....	xvii

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
- Estructura y glicosilaciones de las hemocianinas de moluscos .....	1
- Inmunogenicidad de las hemocianinas .....	5
- Interacción y efecto de las hemocianinas con receptores de inmunidad innata .....	6
- Receptores de inmunidad innata expresados en células presentadoras de antígenos que reconocen motivos de carbohidratos en las hemocianinas .....	8
- Receptores de lectina tipo-C .....	8
- Receptores tipo Toll .....	8
- El gen, la estructura y función del TLR4 .....	9
o El rol de TLR4 en la inflamación .....	10
- Silenciamiento de genes y TLR4 .....	13
- ARN interferentes pequeños (siRNA) .....	13

<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	16
<b>3. OBJETIVO GENERAL</b> .....	16
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>5. MATERIALES Y REACTIVOS</b> .....	17
- Anticuerpos y citoquinas.....	17
- Hemocianinas.....	17
- Líneas celulares .....	17
- Cultivos primarios .....	18
- Reactivos de transfección .....	18
- Partidores.....	18
- Medios de cultivo.....	18
- Tampones.....	18
- Reactivos de viabilidad celular .....	18
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	19
- Animales de experimentación .....	19
- Cultivo de la línea de macrófagos J774.2 .....	19
- Cultivo de macrófagos derivados de precursores de médula ósea .....	19
- Citometría de flujo .....	20
- Determinación de citoquinas mediante ELISA .....	20
- Ensayo de interferencia del RNA para TLR4 y condiciones de transfección .....	20
- Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) .....	21
- Viabilidad celular.....	21
- Análisis estadístico .....	22
<b>7. RESULTADOS</b> .....	23
- Evaluación de la expresión del receptor TLR4 en la línea celular de macrófagos J774.2 .....	23

- Evaluación de los niveles de citoquinas IL-6, IL-12p40 y TNF inducidos por hemocianinas en macrófagos J774.2 .....	23
- Análisis del mRNA que codifica para TLR4 en la línea celular de macrófagos J774.2.....	26
- Diseño de partidores.....	26
- RT-qPCR con los partidores de TLR4 .....	29
- Estandarización de un protocolo de silenciamiento para TLR4 .....	31
- Caracterización de TLR4 en cultivos primario de macrófagos diferenciados <i>ex vivo</i> .....	43
- Efecto proinflamatorio de las hemocianinas en un cultivo primario de macrófagos diferenciados <i>ex vivo</i> .....	43
- Silenciamiento de TLR4 en un cultivo primario de BMDMs.....	46
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
- La expresión de TLR4 en la línea celular J774.2 es alta y constitutiva. ....	49
- Las hemocianinas CCH y FLH inducen un aumento de IL-6 pero no de IL-12p40 y TNF en la línea J774.2. ....	49
- La utilización de Lipofectamina en las células J774.2 permite incorporar un siRNA fluorescente 50	
- El silenciamiento génico de TLR4 en la línea J774.2 mediante el uso de un siRNA/Lipofectamina no es eficiente .....	51
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>55</b>
<b>10. REFERENCIAS .....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estructura de las hemocianinas de moluscos.	3
<b>Figura 2</b>	Sitios putativos de N-glicosilación del homodidecámero KLH-A.	4
<b>Figura 3</b>	Modelo teórico de la activación de linfocitos por efecto de las hemocianinas	7
<b>Figura 4</b>	Receptor tipo Toll 4	11
<b>Figura 5</b>	Vías de señalización intracelular de TLR4	12
<b>Figura 6</b>	Mecanismo de acción de los siRNA	15
<b>Figura 7</b>	Determinación de los niveles de TLR4 mediante citometría de flujo en la línea de macrófagos murinos J774.2	24
<b>Figura 8</b>	Determinación de los niveles de citoquinas inducido por las hemocianinas CCH y FLH mediante ELISA	25
<b>Figura 9</b>	Análisis electroforético del ARN extraído de la línea celular J774.2 en gel de agarosa	27
<b>Figura 10</b>	Evaluación de los partidores para TLR4 y GAPDH mediante qPCR	30
<b>Figura 11</b>	Evaluación mediante citometría de flujo de la fluorescencia de las células J774.2 transfectadas con un siRNA conjugado con fluoresceína	32
<b>Figura 12</b>	Evaluación al microscopio de fluorescencia, la incorporación de un siRNA fluorescente en células J774.1 como control del procedimiento de transfección	32
<b>Figura 13</b>	Evaluación del silenciamiento génico de TLR4 mediante citometría de flujo	34
<b>Figura 14</b>	Evaluación mediante citometría de flujo, del tiempo necesario para obtener un silenciamiento de TLR4 en células de la línea J774.2 mediante una transfección con un siRNA	35
<b>Figura 15</b>	Evaluación de los niveles de TLR4 mediante citometría de flujo en la línea celular J774.2 transfectada con un siRNA	36
<b>Figura 16</b>	Evaluación de los niveles de TLR4 en células J774.2 transfectadas con un	

siRNA-TLR4 en alta concentración	38
<b>Figura 17</b> Evaluación de la viabilidad de los cultivos de células J774.2 transfectados con el Kit de siRNA de Thermo Fischer	39
<b>Figura 18</b> Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión relativa de TLR4 en las células J774.2 transfectadas con un siRNA	39
<b>Figura 19</b> Evaluación mediante citometría de flujo de la expresión del receptor TLR4 en un cultivo primario de macrófagos	44
<b>Figura 20</b> Evaluación mediante ELISA de los niveles de citoquinas inducidos por CCH y FLH en BMDMs.	45
<b>Figura 21</b> Evaluación mediante citometría de flujo de los niveles de TLR4 en BMDMs transfectados con un siRNA	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Anticuerpos para citometría de flujo	17
<b>Tabla 2</b>	Purificación y cuantificación de ARN extraído de la línea de macrófagos J774.2	27
<b>Tabla 3</b>	Características fisicoquímicas de los partidores diseñados para evaluar la expresión de TLR4 mediante qPCR	28
<b>Tabla 4</b>	Viabilidad de los cultivos de células de la línea de macrófagos J774.2 transfectados con vehículos liposomales/siRNA para TLR4	41
<b>Tabla 5</b>	Resumen de los experimentos de Inhibición de TLR4 usando siRNA en células de la línea de macrófagos murinos J774.2.	42

## ABREVIATURAS

APCs	:	Células presentadoras de antígeno
BMDMs	:	Macrófagos derivados de precursores de médula ósea
CCH	:	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
CLRs	:	Receptores de Lectina tipo-C
CRD	:	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
DAMPs	:	Patrones moleculares asociados a daño o peligro
DC-SIGN	:	<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	:	<i>Forward-scattered light</i> (tamaño celular)
FU	:	Unidad funcional
GAPDH	:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
KLH	:	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
KO	:	<i>Knock-out</i>
LPS	:	Lipopolisacárido
Mal	:	<i>MyD88-adapter-like</i>
MFI	:	Intensidad de fluorescencia media
MGL	:	Lectina de macrófagos de unión a galactosa
MHC-I	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
MHC-II	:	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
MR	:	Receptor de manosa
MyD88	:	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
PAMPs	:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	:	Tampón fosfato salino

PE	:	Ficoeritrina
PFA	:	p-Formaldehído
PRRs	:	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
siRNA	:	<i>Small interfering RNA</i> (ARN interferente pequeño)
SFB	:	Suero fetal bovino
SSC	:	<i>Side-scattered light</i> (complejidad celular)
Th1	:	Respuesta de linfocitos T <i>helper</i> (CD4 <sup>+</sup> ) tipo 1
TLR4	:	Receptor de tipo-Toll 4
TLRs	:	Receptores de tipo-Toll
WT	:	<i>Wild-type</i> (tipo silvestre)

## RESUMEN

Las hemocianinas son glicoproteínas de gran tamaño presentes en la hemolinfa de algunos moluscos, utilizadas ampliamente con fines clínicos en el desarrollo de vacunas experimentales y en la inmunoterapia de ciertos cánceres, así como en aplicaciones biotecnológicas como transportadores (*carrier*) en la producción de anticuerpos contra péptidos y moléculas de hapteno. Estas glicoproteínas son capaces de activar al sistema inmune, actuando como inmunoestimulantes no específicos que direccionan la respuesta inmune en mamíferos hacia un perfil T *helper* 1 (Th1), conociéndose escasamente cómo desarrollan dicha respuesta. Nuestro laboratorio ha mostrado que, durante la respuesta inmune innata, las hemocianinas interaccionan con algunos receptores de reconocimiento de patrones asociados a patógenos (PRRs) que se expresan en células presentadoras de antígeno (APCs), cuya interacción es dependiente de glicosilaciones. Entre estos receptores se encuentran algunos de la familia de las lectinas tipo-C, como el receptor de manosa (MR), DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*), MGL (*macrophage galactose-type lectin*) y de la familia de receptores Toll, como el receptor *Toll-like* 4 (TLR4). Estos receptores están involucrados en la endocitosis de las hemocianinas de *Concholepas concholepas* (CCH), *Fissurella latimarginata* (FLH) y *Megathura crenulata* (KLH), vía sus residuos oligosacáridos ricos en manosa, enviándolas a compartimentos subcelulares donde son procesadas y presentadas por antígenos de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) a linfocitos T CD4+. Sin embargo, datos preliminares muestran que también podrían seguir una vía alterna de presentación a linfocitos T citotóxicos CD8+, conocida como presentación cruzada, la cual sería relevante en la respuesta antitumoral generada por las hemocianinas. En la presentación cruzada, es determinante la interacción de ligandos con receptores de inmunidad innata como el MR, que se asocia con otros receptores porque no tiene motivos de señalización, entre ellos TLR4, para inducir la liberación de citoquinas proinflamatorias.

Se ha utilizado el silenciamiento génico para identificar la función que ejerce TLR4 en APCs, sin embargo, la interacción de las hemocianinas con APCs en ausencia de este receptor no se ha estudiado. Por esta razón, en esta Tesis se decidió evaluar el efecto proinflamatorio de las hemocianinas y la presencia de TLR4 en un modelo celular con altos niveles de expresión de este receptor y que además, indujera niveles significativos de citoquinas para un análisis posterior utilizando un siRNA anti-TLR4, proponiendo la siguiente hipótesis: “El silenciamiento génico de TLR4 mediado por un siRNA y Lipofectamina en células presentadoras de antígeno murinas, disminuirá significativamente la secreción de citoquinas proinflamatorias inducida por hemocianinas”. Con este propósito, primeramente, se determinó la presencia de TLR4 mediante citometría de flujo en la línea celular de macrófagos murinos J774.2 y en un cultivo primario de macrófagos derivados de médula ósea de ratón (BMDMs). Se encontró altos niveles de expresión en la línea celular (~ 70%) y bajos niveles (~30%) en las BMDMs. Además, se evaluó la respuesta proinflamatoria inducida por las hemocianinas CCH y FLH en ambos tipos celulares, observando niveles significativos de IL-6 a 0,1 mg/ml de FLH y 0,5 mg/ml de CCH en la línea celular, y una tendencia al alza de IL-6, IL-12p40 y TNF con FLH a 2,0 mg/ml en las BMDMs a las 24 horas.

Posteriormente, se diseñó un protocolo de silenciamiento génico de TLR4 mediante un siRNA y Lipofectamina para ambos tipos celulares. cuyos resultados -que incluyeron qPCR y citometría de flujo para determinar la expresión de TLR4- mostraron una baja eficiencia de silenciamiento inclusive utilizando altas concentraciones de siRNA.

Los resultados obtenidos permiten concluir que, las transfecciones realizadas en la línea J774.2 mediante Lipofectamina y siRNA para TLR4, mostraron resultados variables y poco eficientes para inhibir la expresión de TLR4 y, que dada su baja expresión y la ineficacia de la transfección en las BMDMs, se concluyó que ambos tipos celulares no son buenos modelos de estudio para poder evaluar el efecto de las hemocianinas en células presentadoras de antígeno en ausencia de este receptor.

Finalmente, es importante señalar que, como proyección de esta Tesis, se propone explorar otros sistemas, como podría ser el silenciamiento de TLR4 vía CRISPR-Cas9 y utilizar las líneas JAWSII de células dendríticas y THP-1 de macrófagos humanos.

## ABSTRACT

### **Role of the Toll-4 receptor in mollusk hemocyanin-mediated secretion of pro-inflammatory cytokines in murine antigen-presenting cells**

Hemocyanins are large glycoproteins present in the hemolymph of some mollusks, widely used for clinical purposes in developing experimental vaccines and in the immunotherapy of certain cancers, and biotechnological applications as a carrier in the production of antibodies against peptides and hapten molecules. When inoculated in mammals, these glycoproteins can activate the immune system, acting as non-specific immunostimulants that direct the immune response towards a T helper 1 (Th1) profile, although how this response develops is poorly understood. Our laboratory has shown that to induce this response, the hemocyanins interact with some innate immunity receptors expressed on antigen presenting cells (APCs), whose interaction is glycosylation-dependent. Among these receptors are some of the C-type lectin family, such as the mannose receptor (MR), DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin), and macrophage galactose-type lectin (MGL), as well as the Toll-like receptor 4 (TLR4) belonging to the Toll family. These receptors are involved in the endocytosis of hemocyanins from *Concholepas concholepas* (CCH), *Fissurella latimarginata* (FLH), and *Megathura crenulata* (KLH), via their mannose-rich oligosaccharide residues, sending them to subcellular compartments where they are processed into histocompatibility class II antigens (MHC-II) and presented to CD4+ T lymphocytes. However, preliminary data show that they could also follow an alternative presentation pathway to CD8+ cytotoxic T lymphocytes, known as cross-presentation, which would be relevant in the antitumor response generated by hemocyanins. In cross-presentation, the interaction of ligands with innate immunity receptors such as MR, which associates with other receptors because it has no signaling motifs, including TLR4, to induce the release of proinflammatory cytokines, is decisive.

Gene silencing has been used to identify the function exerted by TLR4 on APCs; however, the interaction of hemocyanins with APCs in the absence of this receptor has not been studied. For this reason, in this Thesis it was decided to evaluate the proinflammatory effect of hemocyanins and the presence of TLR4 in a model expressing high levels of the receptor and inducing significant levels of cytokines for subsequent analysis with an anti-TLR4 siRNA. First, the presence of the TLR4 receptor was determined by flow cytometry in a J774.2 macrophage cell line and a primary culture of mouse bone marrow-derived macrophages (BMDMs), finding high levels in the cell line ~70% and low levels in the BMDMs ~30%. In addition, the proinflammatory response induced by CCH and FLH was evaluated in both cell types, achieving significant levels of IL-6 at 0.1 mg/ml of FLH and 0.5 mg/ml of CCH in the cell line, and an upward trend of IL-6, IL-12p40, and TNF with FLH at 2.0 mg/ml in the primary culture. Subsequently, a TLR4 gene silencing protocol was designed using siRNA and Lipofectamine for the J774.2 cell line and BMDMs. The results obtained in this Thesis indicate that the transfections performed in both cell types are not efficient when transfected with Lipofectamine even at high siRNA concentrations.

Finally, it is important to point out that, as a projection of this Thesis, we proposed exploring other systems, such as the silencing of TLR4 via CRISPR-Cas9 and using the JAWSII lines dendritic cells and THP-1 of human macrophages.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son glicoproteínas de gran tamaño presentes en la hemolinfa de algunos moluscos, que durante las últimas décadas han sido ampliamente investigadas y utilizadas en aplicaciones clínicas y biotecnológicas (1). Estas moléculas son capaces de activar al sistema inmune cuando son inoculadas en mamíferos, actuando como inmunoestimulantes no específicos, generando, una marcada respuesta celular del tipo T helper 1 (Th1) caracterizada por la secreción de Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), citoquina pivotal para eliminar células tumorales e infectadas por patógenos (2). Debido a estas propiedades, las hemocianinas se han utilizado como adyuvantes en el desarrollo de vacunas experimentales contra muchos tipos de cáncer, entre ellos, de ovario, mamas y próstata, así como también frente a patógenos como las bacterias *Pseudomona aeruginosa*, *Cryptococcus neoformans* y el virus de influenza (3,4,5,6,7). Además, por su naturaleza xenogénica y enorme tamaño, se han utilizado ampliamente como proteínas transportadoras para el desarrollo de anticuerpos policlonales y monoclonales contra péptidos y moléculas de haptenos (8).

En moluscos, la función fisiológica más conocida de las hemocianinas es el transporte de oxígeno (9). Estas moléculas poseen varios dominios globulares o unidades funcionales (FUs) que permiten la unión de moléculas de O<sub>2</sub>, mediante un grupo prostético formado por dos átomos de cobre coordinados por tres histidinas cada uno, en cuyo estado oxidado (Cu<sup>+2</sup>) le otorgan una característica coloración azul (10).

A la fecha, la hemocianina más estudiada y utilizada en aplicaciones biomédicas, proviene de Lapa californiana *Megathura crenulata*, conocida como *Keyhole limphet* (KLH). No obstante, debido a su alta demanda y a que no ha sido posible expresarla en forma recombinante, aun conociendo su secuencia, se han realizado investigaciones para hallar hemocianinas alternativas. Es así que, en las costas de Chile, se han encontrado dos especies que tienen hemocianinas que complementan o sustituyen a KLH en algunos de sus usos como proteína transportadora y adyuvante, como son la hemocianina del Loco, *Concholepas concholepas* (CCH) y de la Lapa negra, *Fissurella latimarginata* (FLH).

### 1.1 Estructura y glicosilaciones de las hemocianinas de moluscos

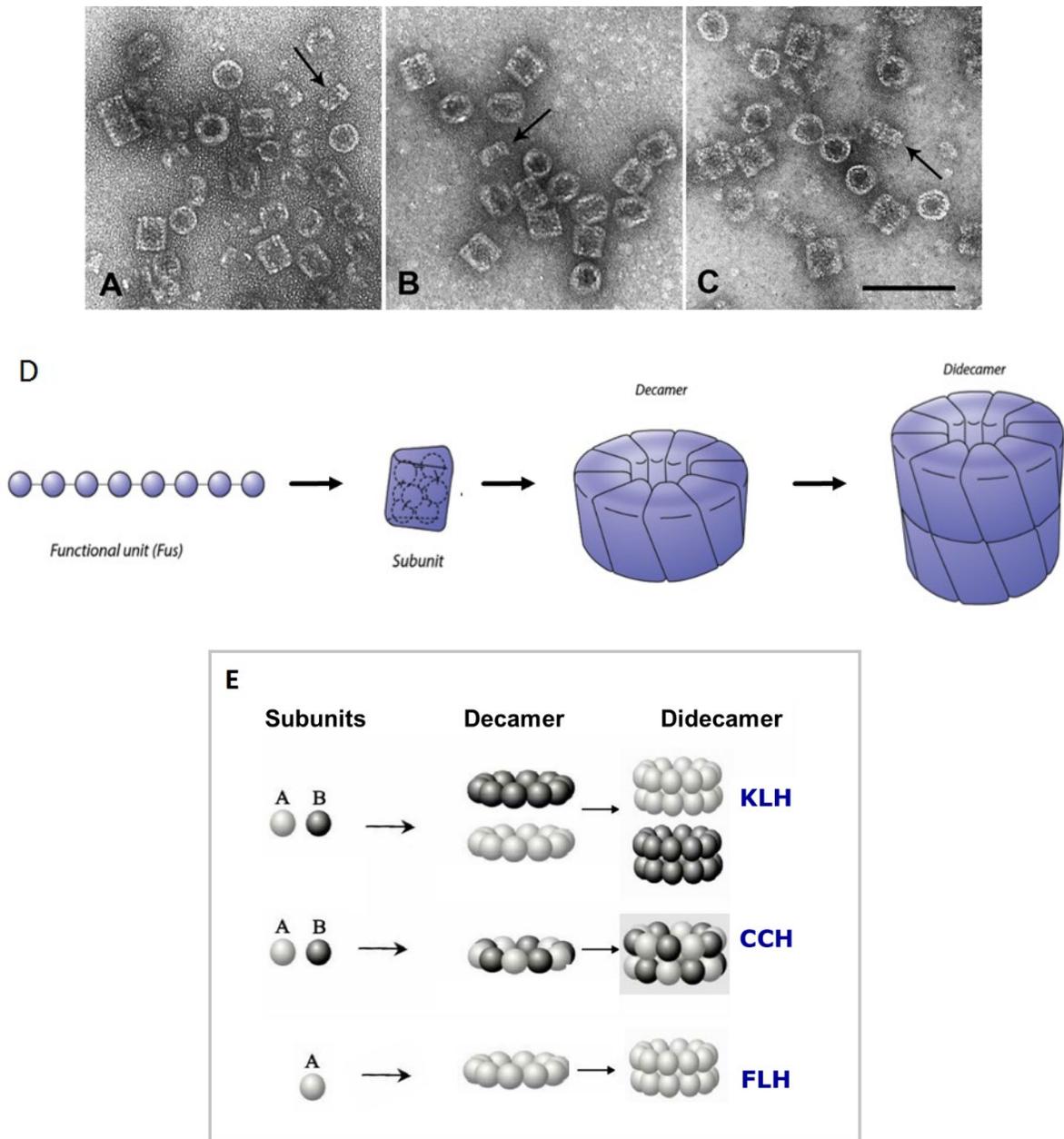
Las hemocianinas de moluscos poseen una estructura básica denominada **decámero**, que está formada por 10 subunidades, cuyo tamaño se encuentran entre los 350 y 450 kDa, las cuales adoptan la forma de un cilindro hueco de 35 nm de diámetro (**Figura 1A,1B,1C**). Cada subunidad está formada por 8

FUs, de tamaño entre los 35 y 55 kDa, enlazadas por un péptido conector de 10 a 15 residuos aminoacídicos entre ellas. A su vez, los decámeros pueden auto ensamblarse formando didecámeros, como es el caso de las hemocianinas anteriormente señaladas, lo cual aumenta significativamente su masa molecular llegando a valores entre los 8 a 9 MDa (**Figura 1B**) (10).

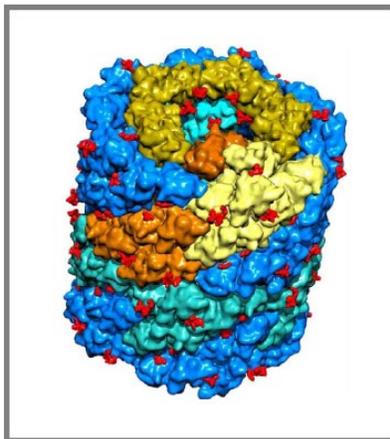
Estructuralmente KLH es una mezcla de dos isoformas que coexisten en la circulación de los animales constituidas por las subunidades llamadas KLH-A y KLH-B, cuyas masas moleculares son de 449 kDa y 392 kDa, respectivamente (11). Estas subunidades pueden auto ensamblarse formando homodidecámeros, como se puede observar en la **Figura 1E** (12). Los azúcares de KLH han sido investigadas con mayor detalle por el gran interés biotecnológico de esta hemocianina. Se ha determinado que KLH contiene una gran cantidad de N-glicanos únicos, con motivos estructurales Gal( $\beta$ 1-6)-Man, que pueden ser encontrados en O-glicosilaciones de las cadenas laterales del lipopolisacárido (LPS) de *Salmonella sp.*, polisacáridos de la cápsula de *Klebsiella pneumoniae* y glicoglicerolípidos de *arqueabacteria* (13). Dentro de los oligosacáridos caracterizados en KLH, se han encontrado azúcares como D-manosa, D-galactosa, L-fucosa, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina y Xilosa, alcanzando alrededor de un 3,0% (p/p) en KLH-A y 3,4% (p/p) en KLH-B (14).

En el caso de CCH, posee dos 2 subunidades, CCH-A y CCH-B, siendo sus tamaños 405 kDa y 350 kDa, respectivamente. Estas isoformas se entremezclan para formar heterodecámeros, que a su vez pueden asociarse en parejas para formar heterodidecámeros (**Figura 1E**) (15). CCH posee patrones N- y O- glicosilaciones, encontrando en su estructura azúcares como D-manosa, L-fucosa y N-acetil-D-glucosamina, que alcanzan los 3,6% (p/p) en CCH-A y 2,5% (p/p) CCH-B (15).

Respecto a FLH, posee solo un tipo de subunidad de aproximadamente 350 kDa, cuya estructura básica puede auto ensamblarse formando homodecámeros y homodidecámeros (**Figura 1E**). Esta hemocianina se destaca por contener el mayor porcentaje de glicosilaciones entre las hemocianinas descritas, alcanzando hasta un 4,1% de N-glicosilaciones. De modo similar a KLH y CCH, FLH contiene azúcares ricos en manosa y fucosa, sin embargo, sus glicosilaciones son aún más heterogéneas (16).



**Figura 1. Estructura de las hemocianinas de moluscos.** Microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa, en donde se observa la estructura de cilindro hueco para las hemocianinas KLH (**A**), CCH (**B**) y FLH (**C**). Las estructuras circulares y rectangulares corresponden a vistas desde arriba y laterales de estas glicoproteínas. Las flechas muestran los decámeros. La barra corresponde a 100 nm. (**D**) Representación de los distintos niveles de organización estructural de las hemocianinas. (**E**) Combinación de las subunidades en KLH, CCH y FLH (modificado de del Campo *et al.* (1) y Becker *et al.* (2)).



**Figura 2. Sitios putativos de N-glicosilación del homododecámero KLH-A.** Se muestra un modelo obtenido mediante criomicroscopía electrónica a 9-Å de resolución, de los 120 sitios putativos de N-glicosilación, mostrados en rojo (Tomado de Gatsogiannis y cols., 2008 (11)).

## 1.2 Inmunogenicidad de las hemocianinas

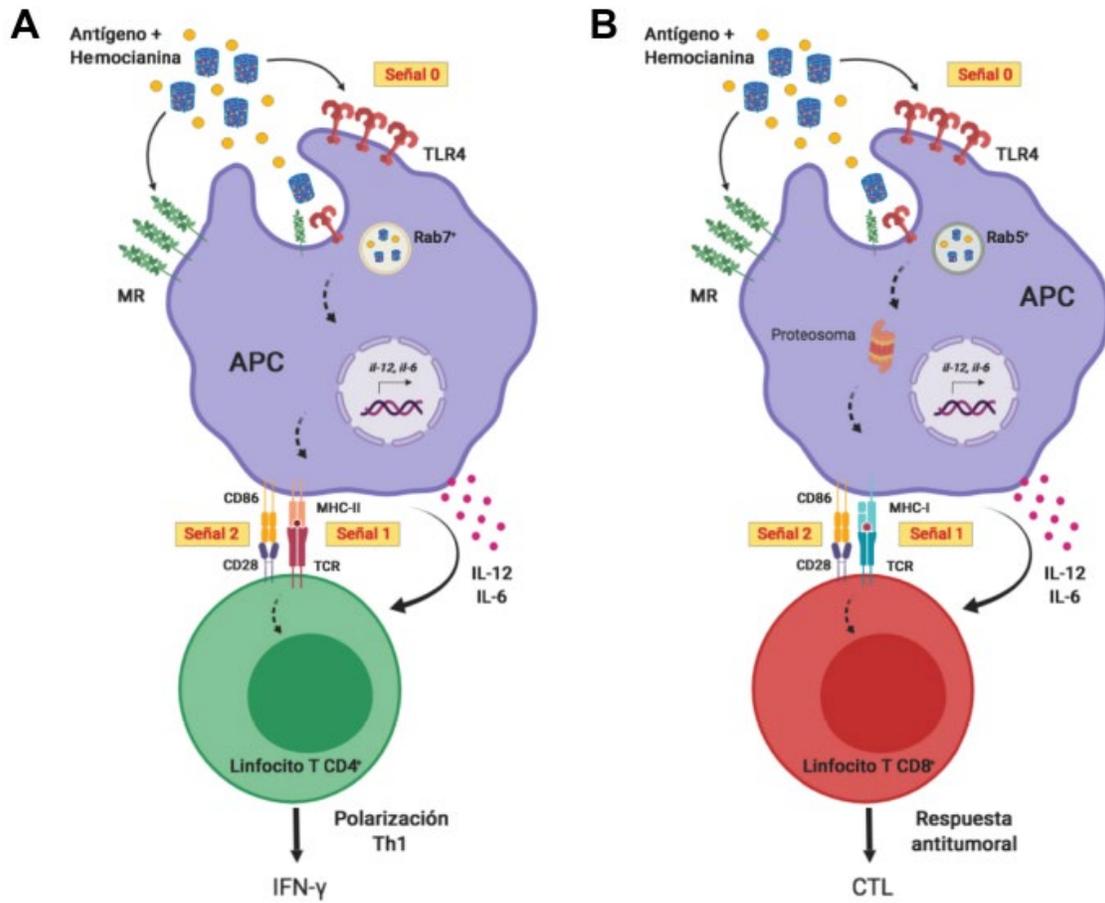
Como anteriormente se mencionó, las hemocianinas generan una respuesta del tipo celular al ser inoculadas en mamíferos, con un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$ , característico de la respuesta tipo Th1 (1). IL-12 es una citoquina clave en la inducción de la respuesta adaptativa Th1, la cual puede ser secretada por las células presentadoras de antígenos (APCs) una vez que son activadas, promoviendo la diferenciación de los linfocitos y la liberación de IFN- $\gamma$  (17). A partir de esta respuesta celular, se generan los efectos inmunoestimulantes no específicos benéficos de las hemocianinas, que potenciarían otras respuestas inmunes locales en los ganglios linfoides durante la presentación antigénica (efecto *bystander*). No obstante, los mecanismos moleculares involucrados en la inmunogenicidad de las hemocianinas no están completamente descritos, postulándose que, algunos factores como su xenogenicidad, gran tamaño, presencia de azúcares y su compleja estructura cuaternaria con múltiples epítomos repetidos, serían los responsables de su efecto inmunomodulador (1,2).

En trabajos anteriores se ha reportado que las hemocianinas presentan una marcada reactividad cruzada con algunos antígenos de patógenos, desencadenada principalmente por la presencia de complejas cadenas de oligosacáridos compartidos. Es el caso de *Schistosoma mansoni*, un parásito que produce la enfermedad de esquistosomiasis, en donde se ha utilizado la reactividad cruzada con KLH para generar el diagnóstico en pacientes infectados, cuyo resultado discrimina entre infecciones agudas y crónicas (18). Por otra parte, se ha descrito que el suero de los ratones inmunizados con KLH presentan reacción cruzada con otros antígenos de naturaleza glucídica, tales como el lipoarabinomanano (LAM) de *Mycobacterium tuberculosis*, glucoronoxilomanano de *Cryptococcus neoformans*, el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* y también, oligosacáridos presentes en células tumorales como el tetrasacárido de Lewis Y (19). Asimismo, KLH posee oligosacáridos que contienen el motivo terminal Gal( $\beta$ 1-3)-GalNAc y, por lo tanto, la inmunización con KLH induce anticuerpos que presentan reacción cruzada con el antígeno tumoral de Thomsen-Friedenreich, conocido como antígeno T (20), que también está presente en CCH y FLH (21). Por lo tanto, considerando que la respuesta adaptativa está mediada por la inmunidad innata, y que esta se desencadena por señales de peligro o inflamación, autores han descrito que algunos de los epítomos de las hemocianinas que gatillan la fructífera respuesta adaptativa contra ella, corresponderían a los carbohidratos y su interacción con los receptores de inmunidad innata, favoreciendo así la respuesta inmune celular por las APCs (22,23,24).

### 1.3 Interacción y efecto de las hemocianinas con receptores de inmunidad innata

Estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que los azúcares son de vital importancia para la actividad inmunoestimulantes intrínseca de las hemocianinas de moluscos (21). En efecto, algunas de estas proteínas glicosiladas como CCH, FLH y KLH, son endocitadas por APCs mediadas por PRRs que conducen a la activación de la respuesta inmune. Dentro de los receptores de inmunidad innata que reconocen motivos de azúcares presentes en las hemocianinas, se encuentra el receptor de manosa (MR), *Macrophage galactose lectin* (MGL) y *Dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN), cuya unión se caracteriza por tener gran afinidad, encontrándose valores de  $K_a$  (constante de afinidad) en los rangos de nano y pico molar para MR y DC-SIGN, respectivamente (25). Es importante señalar que, siendo la manosa el azúcar mayoritariamente presente en las hemocianinas, y que el MR no tiene motivos de señalización intracelulares, MR requiere asociarse con otros receptores para ejercer su efecto (26,27,28). En este contexto, se ha visto que las hemocianinas interactúan con el receptor TLR4 promoviendo la liberación de IL-12 e IFN- $\gamma$  en APCs murinas tales como macrófagos y células dendríticas (25).

Considerando que las hemocianinas son proteínas extracelulares, trabajos anteriores de nuestro laboratorio han propuesto una ruta clásica de presentación antigénica, en donde las hemocianinas son reconocidas por TLR4 y MR para inducir la secreción de las citoquinas IL-6 e IL-12, favoreciendo así la polarización Th1 (25). En efecto, estas glicoproteínas son internalizadas en endosomas tardíos Rab7+ generando un aumento en moléculas de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y, en consecuencia, la presentación de antígenos hacia linfocitos T CD4+. La interacción de moléculas co-estimuladoras y presentación de MHC-II por parte de las APCs a linfocitos T CD4+, induce la polarización hacia un ambiente de citoquinas Th1 y la secreción de IFN- $\gamma$ . Sin embargo, resultados preliminares de nuestro laboratorio, han llevado a proponer una ruta alternativa de procesamiento y presentación antigénica cruzada de hemocianinas a moléculas MHC-I (29). Consecuentemente, las hemocianinas reconocidas por TLR4 y MR podrían ser internalizadas hacia endosomas tempranos Rab5+, siendo procesadas por la vía proteosomal. Esta vía induciría un aumento de MHC-I y la presentación hacia linfocitos T CD8+, los cuales podrían reconocer a células tumorales o infectadas con virus, véase **Figura 3** (25). Esta respuesta conduciría a la proliferación de linfocitos T citotóxicos (CTL), especialmente importantes para la actividad antitumoral de las hemocianinas. Sin embargo, este último punto no se ha corroborado experimentalmente.



**Figura 3. Modelo teórico de la activación de linfocitos por efecto de las hemocianinas.** En la imagen **A** se observa la vía clásica de presentación antigénica. Las hemocianinas son internalizadas por receptores (MR y TLR4) hacia endosomas tardíos (Rab7+), promoviendo la secreción citoquinas (IL-6 e IL-12) y la presentación de antígenos por moléculas MHC-II a linfocitos T CD4+, induciendo la polarización de estos a una respuesta inmune del tipo Th1. En la imagen **B** se describe la vía alternativa de presentación antigénica cruzada. Las hemocianinas son internalizadas por receptores (MR y TLR4) hacia endosomas tempranos (Rab5+), promoviendo la secreción de citoquinas (IL-6 e IL-12) y la degradación de las hemocianinas por el proteosoma, para luego cargar los péptidos a moléculas MHC-I y presentarlos a linfocitos T CD8+ (Tomado de Jiménez, *et al.* 2018 (25)).

## 1.4 Receptores expresados en células presentadoras de antígenos que reconocen motivos de carbohidratos en las hemocianinas

Para que el sistema inmune innato active los mecanismos de respuesta frente a la invasión de un patógeno o señales de peligro tales como necrosis celular, las APCs deben ser alertadas a través de sus receptores por diferentes ligandos (30). La captación antigénica es promovida por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). A la fecha, se han caracterizado 4 familias de PRRs, entre ellos, los receptores de tipo-NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos o NLRs), receptores de tipo-RIG-I (gen inducible por ácido retinoico o RLRs), receptores de lectina tipo-C (CLRs) y receptores de tipo-Toll (TLRs). De los receptores mencionados anteriormente, CLRs y TLRs reconocen motivos de carbohidratos en patógenos (31), siendo los TLRs de especial interés en el desarrollo de esta Tesis.

### *Receptores de lectina tipo-C*

Se expresan principalmente en células del sistema inmune de linaje mieloide, como monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas (32). Estos receptores participan en el reconocimiento de PAMPs y DAMPs que presentan estructuras glicosiladas, entre otras. Los receptores lectinas tipo-C, son una gran superfamilia de proteínas clasificada en 17 grupos, que reconocen una alta diversidad de ligandos y están definidos por la presencia de un dominio “*C-type lectin-like*” (CTLD) (33). La función más común del CTLD es la unión a carbohidratos en forma dependiente de  $Ca^{+2}$ . En estos casos, se habla de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD), el cual presenta cuatro sitios de unión a  $Ca^{+2}$ , siendo dos los claves en la función como lectina. Basándose en su estructura molecular, los receptores de transmembrana se han clasificado en 2 grupos: el grupo I, que tienen la orientación N-terminal hacia el medio extracelular y contienen varias repeticiones del dominio de CRD como, por ejemplo, el receptor de manosa (MR) y DEC-205; y el grupo II que tienen la orientación N-terminal hacia el citoplasma y solo presentan un único CRD, como, por ejemplo, Dectina-1 y Dectina-2 (34). La activación de los CLRs induce una respuesta coordinada por parte de las APCs, las cuales conducen la diferenciación de los linfocitos T *helper* en los diversos tipos de respuesta como Th1, Th2 o Th17, según sea la naturaleza de los patógenos reconocidos y el tipo de receptor involucrado (35,36).

### *Receptores tipo Toll*

Los receptores tipo Toll son una familia de proteínas que forman parte del sistema inmune innato. La primera evidencia sobre la existencia de estos receptores se observó en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, cuya deficiencia en TLRs las volvía más sensibles a la infección por el hongo *Aspergillus*

*fumigatus* (37). Desde entonces se han caracterizado 10 tipos de TLRs funcionales en la especie humana (TLR1-TLR10) y 13 en ratones (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (38). Los TLRs se expresan en algunas células como fibroblastos y células epiteliales, así como en células del sistema inmune especialmente en células dendríticas y macrófagos. Estos receptores se clasifican en dos grandes subfamilias basadas en su localización subcelular y sus ligandos respectivos; TLRs de superficie celular y TLRs intracelulares. Estructuralmente, estos receptores son proteínas de transmembranas tipo I con una estructura tripartita: poseen un dominio extracelular o ectodominio N-terminal con repeticiones ricas en leucina, que se pliegan en una estructura característica tipo-herradura y que media el reconocimiento del ligando; un dominio transmembrana; y un dominio citoplasmático globular carboxilo C-terminal llamado TIR (receptor Toll-interleuquina-1), que desencadena la señal intracelular (39). Una vez que los diversos TLRs son estimulados en la célula presentadora de antígeno, se produce una activación río abajo que direcciona la respuesta inmune hacia una polarización particular para los linfocitos T *helper*, ya sea Th1, Th2 o Treg (40). En general, se ha descrito que la mayoría de los TLRs inducen una potente secreción de IL-12 en las células dendríticas, lo que gatilla una diferenciación hacia una respuesta Th1 con la secreción concomitante de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T. Sin embargo, se ha especificado que ciertos ligandos para TLR2 también pueden inducir una polarización de tipo Th2 o incluso de Treg, además de la clásica respuesta Th1 (41).

En esta tesis es de particular interés el receptor TLR4 porque trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que interactúa con hemocianinas (25).

#### *El gen, la estructura y función del TLR4*

El gen que codifica el TLR4 humano está formado por 20.309 pares de bases y se localiza en brazo largo del cromosoma 9 (42). Posee tres exones y se transcribe a un pre-ARNm largo de 11.467 pares de bases. Hasta la fecha, se han descrito 4 transcritos (variantes de *splicing*) de este gen, de los cuales 3 codifican para proteínas (43). TLR4 es un PRR que participa en la respuesta inmune innata reconociendo PAMPs, en especial de bacterias Gram negativas como el lipopolisacárido (LPS) (44). Además de LPS, se ha visto que este receptor participa en el reconocimiento de mananos de patógenos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*, así como polímeros de ácido manurónico de bacterias Gram-negativas, la proteína F del virus sincicial y la proteína de la envoltura del virus de tumor mamario (45,46,47). Estructuralmente este receptor se puede dividir en tres dominios: un dominio extracelular (1–624 aa), un dominio transmembrana (625-658 aa) y un dominio Toll / receptor de interleucina-1 (TIR) (659–838 aa), véase **Figura 4**.

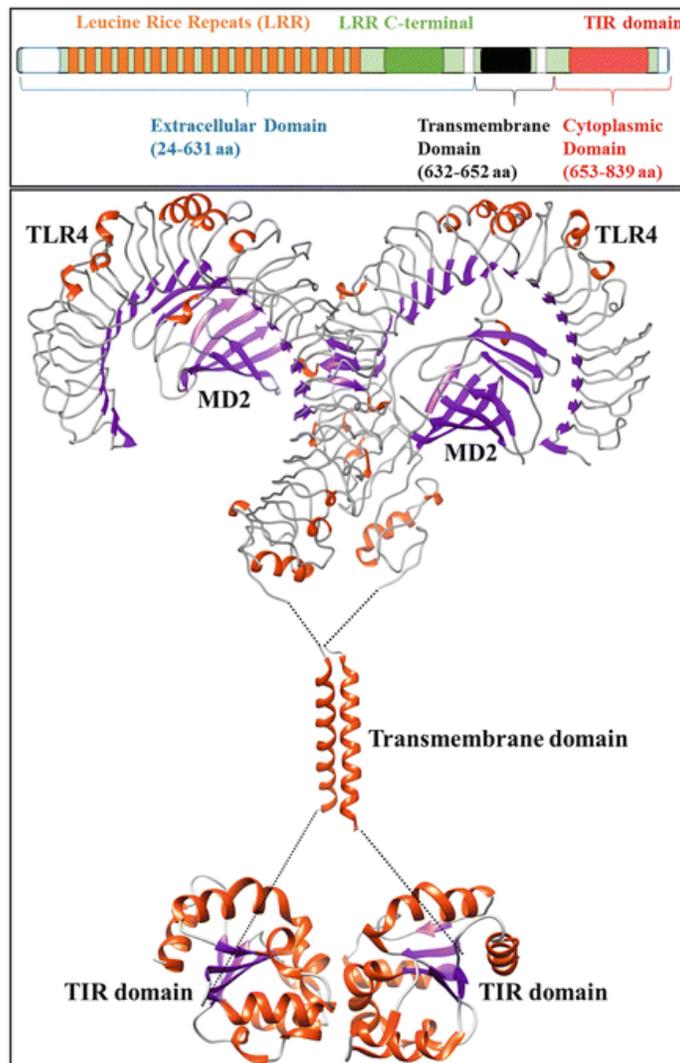
La señalización del TLR4 inicia con la dimerización del receptor, generada por el reconocimiento de LPS y la unión de su co-receptor, la proteína de diferenciación mieloide tipo 2 (MD2) formándose el complejo receptor TLR4 / MD2 (48,49). Tras la activación del receptor, los dominios citosólicos de TLR4

reclutan las proteínas adaptadoras MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) y MAL (*MyD88-adaptor-like*) accionando la vía dependiente de MyD88 e induciendo la producción de citocinas proinflamatorias. No obstante, existe una vía independiente de MyD88 que recluta a las moléculas TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) y TRIF (*TRI domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ) induciendo la producción de interferones tipo I (50), véase **Figura 5**. En el caso del TLR4 murino, este se encuentra formado por 749 residuos de aminoácidos, y posee un 68% de identidad con el TLR4 humano (51).

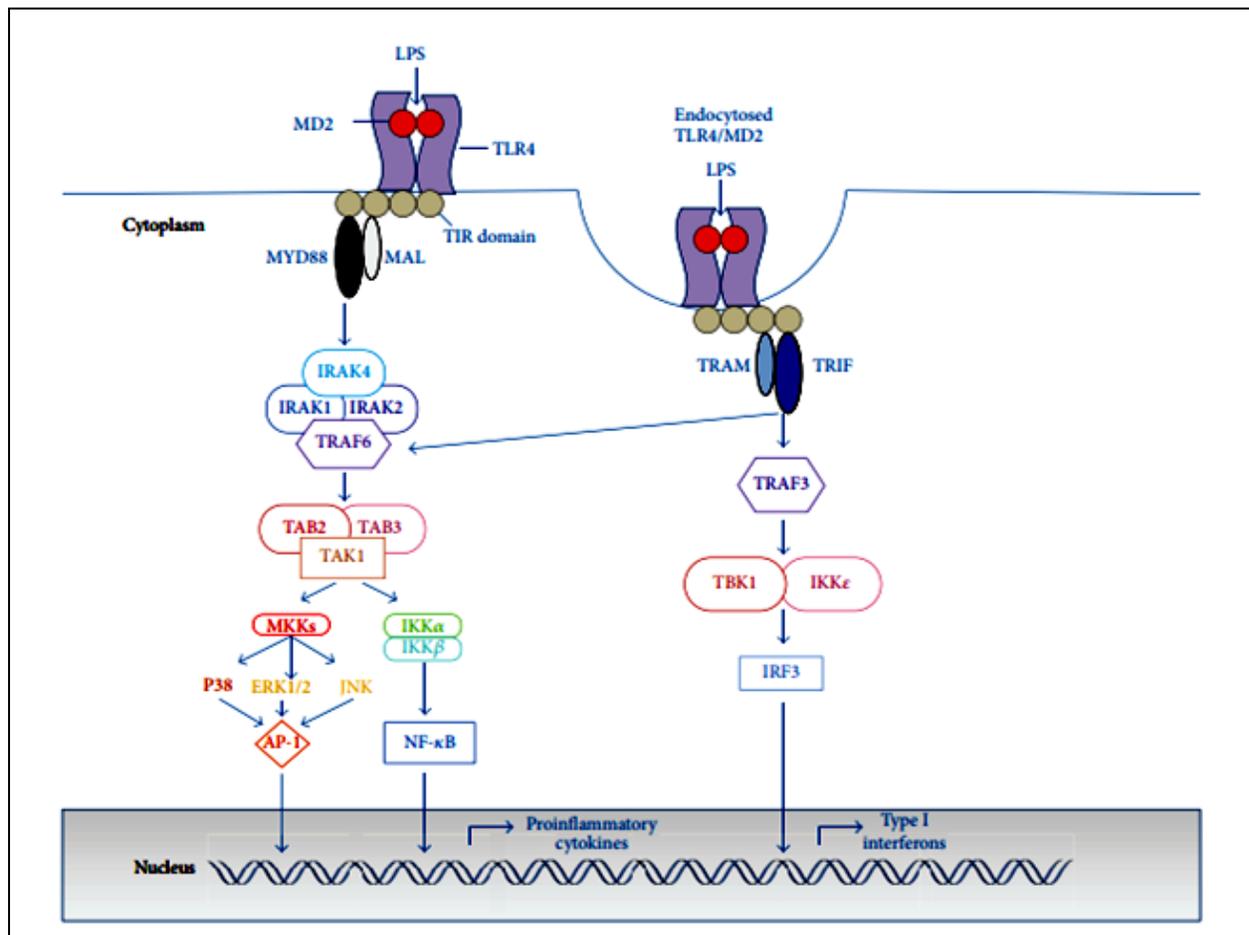
#### *El rol de TLR4 en enfermedades inflamatorias*

Los DAMPs son moléculas que activan los distintos TLRs y se asocian al progreso de patologías inflamatorias. En efecto, se ha visto que la activación de TLR4 mediada por estas moléculas influye en el avance de enfermedades como arterosclerosis, artritis reumatoide y neuroinflamación. Una de las patologías más graves que activa TLR4 por medio de PAMPs, es la sepsis, la cual corresponde a una respuesta excesiva y desregulada del organismo huésped frente a patógenos externos, generando una disfunción orgánica aguda que pone en riesgo la vida (52, 53). El shock séptico con un incremento de LPS en la sangre, el aumento de citoquinas proinflamatorias, el aumento de la coagulación sanguínea y el aumento de productos de degradación del fibrinógeno generan una alteración de la hemodinámica local y general del organismo, acompañada de una disfunción endotelial que se gatilla por la activación de los distintos receptores tipo Toll (54).

Dado que la familia de receptores tipo Toll participa en el progreso de diversas enfermedades, durante las últimas décadas éstos han sido investigado como objetivo terapéutico. Muy recientemente, TLR4 se ha sugerido como una diana prometedora para el abuso de drogas y los trastornos depresivos mayores, así como la esclerosis lateral amiotrófica (55, 56, 57, 58). También se ha discutido la posible aplicación de antagonistas de TLR4 en el tratamiento del dolor neuropático periférico (59, 60). Algunas moléculas que inhiben la activación de TLR4 generan una disminución de la inflamación. Entre ellas, quercetina y berberina inhiben la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1 inducida por LPS, a partir de la disminución en la actividad de NF- $\kappa$ B/IRF1 y el antagonismo farmacológico de este receptor, respectivamente (61, 62).



**Figura 4. Receptor tipo Toll 4.** En la sección superior de la imagen se muestra la organización estructural de TLR4, que representa sus diversos dominios y motivos. La longitud del dominio respectivo se indica entre paréntesis. En la sección inferior, se muestra la estructura cristalina de TLR4. No existe una estructura cristalina completa de TLR4 que defina todos sus dominios y motivos; por lo tanto, para representar la longitud y posición relativas, el dominio TM y el dominio TIR se han adoptado de otras estructuras cristalinas. El ectodominio, el dominio TM y el dominio TIR se han adoptado de (3FXI), (2KPF) y las estructuras cristalinas del dominio TLR6-TIR (4OM7), respectivamente. LRR repeticiones ricas en leucina; MD2 proteína de diferenciación mieloide 2; Dominio de homología del receptor TIR Toll / interleukin-1; TLR4 *Toll-like receptor 4* (Tomado de Krishnan J. *et al* (63)).



**Figura 5. Vías de señalización intracelular de TLR4.** La señalización de TLR4 se desencadena por la dimerización inducida por ligando de los receptores. Los dominios TIR de TLR4 reclutan proteínas adaptadoras que contienen dominios TIR MyD88 y MAL (vía dependiente de MyD88) o TRIF y TRAM (vía independiente de MyD88). La ruta dependiente de MyD88 implica el reclutamiento y la activación de IRAK (IRAK1, IRAK2 e IRAK4) y TRAF6 que inducen la activación de TAK1. TAK1, a su vez, conduce a la activación mediada por MAP quinasa quinasa (MKK-) de MAPK (p38, JNK y ERK1 / 2) y la activación del complejo IKK. El complejo MAPK e IKK induce la activación y translocación en el núcleo de factores de transcripción como NF-κB y AP-1. La ruta independiente de MyD88 implica proteínas adaptadoras TRIF y TRAM, y a través de TRAF3, el reclutamiento de TBK1 / IKKε, seguido de la activación y translocación en el núcleo del factor de transcripción IRF3. La vía dependiente de MyD88 induce la producción de citocinas proinflamatorias, y la vía independiente de MyD88 induce la producción de interferones tipo I (Tomado de Molteni, *et al.* 50).

## 1.5 Silenciamiento de genes y TLR4

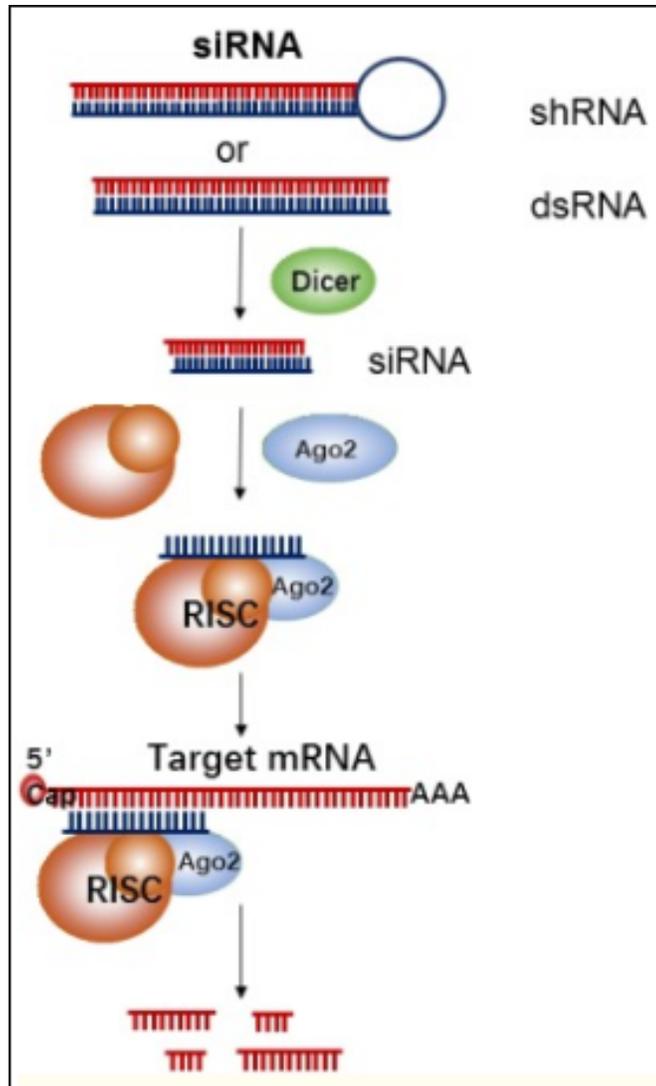
Durante las últimas décadas, se ha utilizado ampliamente el silenciamiento de genes post transcripcionalmente por medio de ARN interferentes (RNAi), para estudiar la funcionalidad de proteínas en células eucarióticas (64). Un descubrimiento que les significó el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el 2006 a Craig Mello y Andrew Fire, por sus trabajos con ARN de doble hebra (dsRNA) en *Caenorhabditis elegans*. El mecanismo del RNAi fue descrito por primera vez *in vitro* utilizando extractos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Estos estudios revelaron que moléculas de dsRNA eran cortadas en fragmentos pequeños, cuya composición poseía una estructura regular: dos cadenas de 21 a 25 nucleótidos interaccionado en forma de dúplex, donde 19 nucleótidos se encuentran formando RNA de doble cadena y dos nucleótidos sin aparearse en los extremos. Estas moléculas fueron denominadas RNA interferentes pequeños (siRNA) y se demostró que son las mediadoras del proceso de interferencia (65). Se han descrito varias clases de moléculas pequeñas de RNA que desencadenan el proceso de silenciamiento por interferencia, las más ampliamente utilizadas son los siRNA y microRNA (miRNA). En esta tesis se usó un siRNA para TLR4, razón por la cual se darán más detalles a continuación.

### *ARN interferentes pequeños (siRNA)*

El tamaño de los siRNA varía entre 21 a 25 nucleótidos, y son producidas a partir de precursores de dsRNA que pueden diferir en largo de pares de base y origen. Estos precursores son procesados por miembros de la familia de enzimas que degradan RNA, conocidas como la familia RNAsa tipo III. La enzima con actividad endoribonucleasa que degrada los precursores de dsRNA hasta siRNA, se conoce como *DICER*, la cual produce cortes escalonados dejando los extremos 3'-OH con extendidos de dos a tres nucleótidos, permitiendo así su incorporación a un complejo multiproteico denominado siRISC (*RNA-induced silencing complex*) (66). La incorporación del siRNA al siRISC está acoplada a la separación de las dos cadenas en cadenas sencillas, de la cual una (cadena guía) se mantiene asociada al complejo y sirve para identificar el mRNA con la secuencia complementaria. Cuando las moléculas de mRNA complementarias son encontradas, la interacción entre el siRNA y este mRNA desemboca en el corte del mRNA y su posterior degradación, véase **Figura 6** (67,68). Debido al mecanismo de los siRNA, estos interferentes se han investigado durante los últimos años como estrategia terapéutica en el desarrollo de anticancerígenos, utilizando vehículos como nanopartículas y liposomas para su administración en humanos (69). Algunos ensayos clínicos realizados, incluyen la utilización de siRNAs para el tratamiento del carcinoma hepatocelular, el cáncer de páncreas, el cáncer de riñón, la leucemia mieloide crónica y el melanoma (70).

En estudios anteriores se ha utilizado el silenciamiento génico para identificar la función que ejerce TLR4 en APCs. Resultados revelan que, el silenciamiento de este receptor genera una caída en la respuesta proinflamatoria producida en macrófagos murinos, disminuyendo la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$  (71). Si bien existe información sobre la participación de TLR4 y su interacción con las hemocianinas, usando un anticuerpo monoclonal bloqueador anti-TLR4 e inhibidores farmacológicos de la vía de señalización de TLR4 (25), no existen antecedentes realizados en ausencia de dicho receptor en APCs (*knockdown*), sobre todo considerando que TLR4, tiene más de un dominio interactivo o vinculante, por lo cual, su falta de expresión conduciría a la pérdida de sus múltiples funciones y, entre las que interesan, su asociación con el MR y su participación en la respuesta inflamatoria inducida por las hemocianinas.

**Por las razones anteriormente expuestas, en esta Tesis se utilizó dos modelos murinos para estudiar el efecto de las hemocianinas en ausencia de TLR4, mediada por la transfección de un siRNA y Lipofectamina. Se espera que los resultados contribuyan a la comprensión y a dimensionar la importancia de la participación de TLR4 en el efecto inmunomodulador de estas glicoproteínas en las APCs.**



**Figura 6. Mecanismo de acción de los siRNA.** Los precursores de la RNase *Dicer* (shRNA o dsRNA) son reconocidos por *Dicer* e incorporados al complejo silenciador inducido por ARN (RISC). El complejo siRNA-RISC puede unirse al sitio de direccionamiento del ARNm y ser sustrato de una escisión específica de secuencia por la endonucleasa Argonaute-2 (AGO2), disminuyendo así las expresiones de una proteína objetivo. (Tomado de Yao-Xin *et al.* (67)).

## **2. HIPÓTESIS**

“El silenciamiento génico de TLR4 mediado por un siRNA en células presentadoras de antígeno murinas, disminuirá significativamente la secreción de citoquinas proinflamatorias inducida por hemocianinas”.

## **3. OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto del silenciamiento de TLR4, en la respuesta proinflamatoria inducida por las hemocianinas (CCH, FLH y KLH) en una línea celular de macrófagos y contrastar los resultados con el silenciamiento de TLR4 en cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea de ratón.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar una línea celular de macrófagos evaluando la expresión de TLR4 mediante qPCR y citometría de flujo y la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por las hemocianinas mediante ELISA.
2. Establecer las condiciones experimentales de transfección usando un siRNA para TLR4 y Lipofectamina en la línea celular utilizada en el objetivo 1 mediante qPCR y citometría de flujo, y evaluar los niveles de citoquinas inducidas por las hemocianinas en ausencia del receptor.
3. Evaluar los niveles de citoquinas y TLR4 de la misma manera que en el objetivo 1 y establecer las condiciones de transfección de la misma manera que en el objetivo 2 en un cultivo primario de macrófagos.

## 5. MATERIALES Y REACTIVOS

### 5.1 Anticuerpos y citoquinas

El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) fue obtenido por Milteny Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania).

La **Tabla 1** resume los anticuerpos utilizados para realizar las determinaciones mediante citometría de flujo.

**Tabla 1:** Anticuerpos para citometría de flujo

Anticuerpo	Origen	Fabricante
Anti-TLR4/MD2	Rata	ABCAM
Anti-Mouse-FITC	Rata	Thermo Fischer
Anti-TLR4/MD2 MTS510	Ratón	Thermo Fischer
Anti-TLR4-PE	Ratón	ABCAM
Anti-F4/80	Ratón	ABCAM
Anti-Cd11b	Ratón	ABCAM
Anti-IgG-FITC	Cabra	ABCAM

### 5.2 Hemocianinas

La hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) en PBS y libre de endotoxinas (0.5 EU/mg) se obtuvo de EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Las hemocianinas de *Concholepas concholepas* (CCH, Inmunocyanine®) en tampón fosfato salino (cloruro de sodio 0.15M, fosfato de sodio 0.1M, pH 7.2) y de *Fissurella latimarginata* (FLH, Blue-Vac®) en tampón fosfato salino (PBS) o tampón Tris (hidroximetilaminometano 1M, pH 7), purificadas bajo condiciones libres de pirógenos, fueron suministradas por Biosonda S.A. (Santiago, Chile).

### 5.3 Líneas celulares

Se usó la línea celular de macrófagos murinos J774.2, de la cepa BALB/C disponible en FUCITED (72).

#### **5.4 Cultivos primarios**

A partir de ratones C57BL/6 se diferenciaron *ex-vivo*, macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) (73).

#### **5.5 Reactivos de transfección**

El siRNA anti-TLR4 dirigido a la secuencia de ratón, el reactivo de transfección, el medio reducido en suero, el siRNA-FITC y el siRNA-CA control negativo se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology (SCB). El *Silencer™ Select Pre-Designed siRNA*, *Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent* y *Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium* se obtuvieron de Thermo Fischer.

#### **5.6 Partidores**

Las secuencias de los partidores diseñados en esta Tesis fueron enviadas a la empresa Operon en España para su síntesis.

#### **5.7 Medios de cultivo**

Los medios de cultivos RPMI-1640 o DMEM, el suero fetal bovino (SFB), la L-glutamina, la mezcla de penicilina y estreptomina se obtuvieron de HyClone, USA, y el piruvato de sodio y la solución de aminoácidos no esenciales (MEM) de Corning, USA.

#### **5.8 Tampones**

Las soluciones utilizadas de fosfato de sodio y fosfato de sodio modificado (Dulbecco's modificado) se obtuvieron de Thermo Fischer.

#### **5.9 Reactivos viabilidad celular**

Para la determinación de viabilidad se utilizó el colorante Alamar-Blue (Thermo Fischer), el colorante Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience™, Thermo Fischer) o yoduro de propidio (PI) (Biolegend, Usa).

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Animales de experimentación

Ratones C57BL/6 silvestres (*wild-type*, WT) de 8-12 semanas fueron adquiridos en el Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida (Santiago, Chile). Los ratones fueron mantenidos en un área resguardada con restricción de acceso en Biosonda S.A., entre 22-24 °C, con ciclos de luz y oscuridad de 12 h cada uno, agua y alimento *ad libitum*. Los procedimientos experimentales desarrollados con los animales fueron llevados en conformidad con las normas bioéticas exigidas por el comité de bioética de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED, Santiago, Chile) y aprobadas por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) en el contexto del proyecto FONDECYT N° 1201600.

### 6.2 Cultivo de la línea de macrófagos J774.2

Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 1 mM penicilina y estreptomina (HyClone, USA), 1 mM piruvato de sodio y 1 mM solución de aminoácidos no esenciales (MEM), a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, células fueron removidas con un raspador celular, centrifugadas a 1.600 rpm por 5 minutos a 4 °C, y resuspendidas en 5 o 10 mL de RPMI-1640. Finalmente, se realizó un conteo de las células en duplicado (10 µl/campo) en una cámara de Neubauer para los experimentos posteriores, sembrándose habitualmente a una densidad de 500.000 células /ml. Se realizaron inóculos de respaldo recolectando y centrifugando las células a 1.600 RPM por 5 minutos y, posteriormente, resuspendiéndolas en medio criopreservante que contiene 10% DMSO, 40% RPMI y 50% SFB y congelando los inóculos a -80 °C.

### 6.3 Cultivo de macrófagos derivados de precursores de médula ósea

Los macrófagos derivados de precursores de médula ósea (BMDMs) se obtuvieron según lo descrito por Zhang *et al.* con modificaciones (73). Brevemente, médula ósea de fémur y tibia de ratones C57BL/6 fueron aisladas y disgregadas en medio RPMI suplementado, el cual contiene RPMI con 10% (v/v) SFB, antibióticos 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina, 1mM de piruvato sódico, 1 ml de aminoácidos no esenciales, 25 mM de b-mercaptoetanol (Merck) y 20 ng/ml de M-CSF. Las células se centrifugaron a 1.500 rpm por 5 min a temperatura ambiente y luego se contaron y cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> a una densidad de 2,5 por 10<sup>6</sup> células por placa bacteriológica de 100 mm de diámetro (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) en un volumen de 10 mL de medio suplementado. Posteriormente, al día 3 de cultivo se agregaron 5 mL de medio suplementado. Al día 7 de cultivo, el medio fue descartado y las células se incubaron a 37 °C con 2 ml de Tripsina durante 5 a 10 min y posteriormente

recolectadas en un tubo cónico con el doble de medio con suero para neutralizar la Tripsina. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 1.500 rpm x 5 min, contadas y sembradas para los experimentos posteriores de estimulación con las hemocianinas y ensayos de inhibición.

#### **6.4 Citometría de flujo**

Los distintos tipos celulares fueron recolectados para la caracterización mediante citometría de flujo según se describe a continuación. Se colocaron entre  $2 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células por condición en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se agregó una dilución 1:100 del anticuerpo primario anti-TLR4 solo o conjugado con PE y de manera similar para el control de isotipo IgG2a de rata y se incubaron 1 h a 4° C en oscuridad. Luego, las células se lavaron una vez con 0.5 ml de PBS-SFB 2% y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG-FITC en una dilución de 1:100 en PBS-SFB 2 % durante 30 min a 4° C en oscuridad. De la misma manera, las células BMDMs fueron marcadas con los siguientes anticuerpos para determinar su fenotipo: anti-CD11b y anti-F4/80-AlexaFluor647 de ratón e incubados con la sonda de viabilidad eFluor™ 780 1:1.000. Finalmente, las células fueron lavadas dos veces con PBS-SFB 2% y fijadas con PBS-PFA 2%, manteniéndolas en esta solución a 4°C protegidas de la luz hasta su lectura en el citómetro. Las muestras fueron adquiridas en el citómetro FACSort de BD (Servicio de Citometría de Flujo, Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile) y analizadas utilizando el programa FlowJo 10.1 o en el mismo servicio de Citometría de Flujo.

#### **6.5 Determinación de citoquinas mediante ELISA**

Los sobrenadantes de la línea celular J774.2 y de BMDMs se midieron inmediatamente o se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Los niveles de las citoquinas murinas IL-6, IL-12p40 y TNF se cuantificaron en los sobrenadantes, por duplicado o triplicado, mediante un ELISA de captura, utilizando kits comerciales de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD OptEIA ELISA Set, BD Biosciences).

#### **6.7 Ensayo de interferencia de TLR4 y condiciones de transfección**

Se utilizó un protocolo de silenciamiento génico para TLR4 por medio de un siRNA comercial proveniente de Santa Cruz Biotechnology o Thermo Fischer siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente,  $2,0 - 5,0$  por  $10^5$  células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos con medio RPMI-1640 suplementado, sin antibióticos, hasta alcanzar una confluencia del 60-80%. Posteriormente, se preparó una mezcla entre 20 y 2.000 pmol de siRNA con 6 a 12  $\mu$ l de reactivo de transfección en un volumen final de 1 ml y se incubó por 15 a 30 minutos. Luego, las células fueron lavadas con 2 ml de medio de transfección reducido en suero y transfectadas con 1 ml de la mezcla,

logrando una concentración final por pocillo de siRNA entre 0,02 y 2,0  $\mu\text{M}$  durante 5-7 horas. Alcanzado este tiempo, se agregó 2 ml de medio suplementado con antibióticos y se dejó incubando por 18 - 24 horas. El medio fue retirado y cambiado cada 24 horas por 2 ml de RPMI-1640 suplementado. Para evaluar la transfección y los niveles de TLR4, la línea celular J774.2 fue lavada con PBS-Dulbecco modificado (PBS-EDTA 5mM) por 5 minutos y posteriormente removidas con un raspador celular para ser recolectadas en tubos de microcentrifuga a las 24, 36 y/o 48 horas después de la transfección. Como controles de la transfección, se utilizó un cultivo transfectado con un siRNA de origen no mamífero (siRNA-control), un control con células sin tratar (TLR4) y un control solo con reactivo de transfección (Mock). Además, paralelo a la transfección se realizó un control de incorporación con un siRNA fluorescente (siRNA-FITC). A las 6 horas en promedio, las células transfectadas con el siRNA-FITC fueron lavadas 3 veces con PBS-SFB 2% y llevadas vivas al citómetro para su análisis, previa marcación con PI según las condiciones del fabricante.

## **6.8 Extracción de RNA y reacción en cadena de la polimerasa (RT-qPCR)**

Se procedió a aislar *RNA* de la línea celular J774.2 con un kit comercial (*Total RNA Purification Kit, Norgen, Canada*) que purifica *RNA* mediante una cromatografía en columna de centrifugación. Brevemente, 1 por  $10^6$  células fueron lisadas con 350  $\mu\text{l}$  de *Buffer RL* durante 5 minutos y mezcladas con 200  $\mu\text{l}$  de etanol. De la mezcla, 550  $\mu\text{l}$  fueron cargados en la columna y centrifugados a 6.000 RPM por 1 minuto. La columna fue lavada y centrifugada 3 veces con la solución de lavado otorgada por el fabricante en las mismas condiciones anteriores. Posteriormente, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de solución de elución, y se centrifugó a 2.000 rpm por 2 minutos seguido de 14.000 RPM por 1 minuto para recolectar el *RNA* purificado. El líquido extraído fue cuantificado mediante microgota por espectrofotometría (*DeNovix Ds-11 FX +, Wilmington, USA*). Finalmente, 5  $\mu\text{l}$  de ARN fueron cargados en un gel de agarosa al 2 % con 2  $\mu\text{l}$  *SafeView Plus (Applied Biological Materials (abm))* para observar la integridad del *RNA* purificado. Para confirmar la funcionalidad de los partidores construidos, se procedió a realizar un RT-qPCR. Para ello, se mezclaron 1  $\mu\text{l}$  de partidador *forward* (10  $\mu\text{M}$ ) y 1  $\mu\text{l}$  partidador *reverse* (10  $\mu\text{M}$ ) de las parejas TLR4 o GAPDH, 10  $\mu\text{l}$  de buffer PCR (SensiFAST SYBR® No-ROX mix 2x) que contiene la polimerasa, 1  $\mu\text{M}$  de ARN total y  $\text{H}_2\text{O}$  hasta completar 20  $\mu\text{l}$  de volumen final. El programa qPCR constó de 35-40 ciclos y las siguientes características: 95°C por 5 segundos, 60°C por 10 segundos, 72°C por 5 segundos, *Melt* de 60°C y *Rise* de 1°C. Como control negativo se usó  $\text{H}_2\text{O}$ .

## **6.9 Viabilidad celular**

Células J774.2 y BMDMs fueron sembradas en placas de 96 pocillos incubadas durante 24 horas con el inhibidor de TLR4 TAK-242. Posteriormente, el medio fue removido y las células fueron incubadas con el reactivo de viabilidad Alamar-Blue al 10% en RPMI-1640 durante tres horas hasta la medición de absorbancia a 570 y 600 nm.

## **6.10 Análisis estadístico**

Los resultados se expresarán como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de al menos tres experimentos realizados de forma independiente. Los gráficos y su análisis estadístico fueron realizados usando el programa GraphPad Prism 8.0 (La Jolla, California, USA), utilizando el test t de Student para comparar la media de dos grupos o el test de ANOVA de una o dos vías, según se indique, al comparar tres o más grupos, con el post-test de Bonferroni. La significancia para todos los casos se determinará con  $p \leq 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

**7.1 Objetivo Especifico 1:** Caracterizar una línea celular de macrófagos evaluando la expresión de TLR4 mediante qPCR y citometría de flujo y la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por las hemocianinas mediante ELISA.

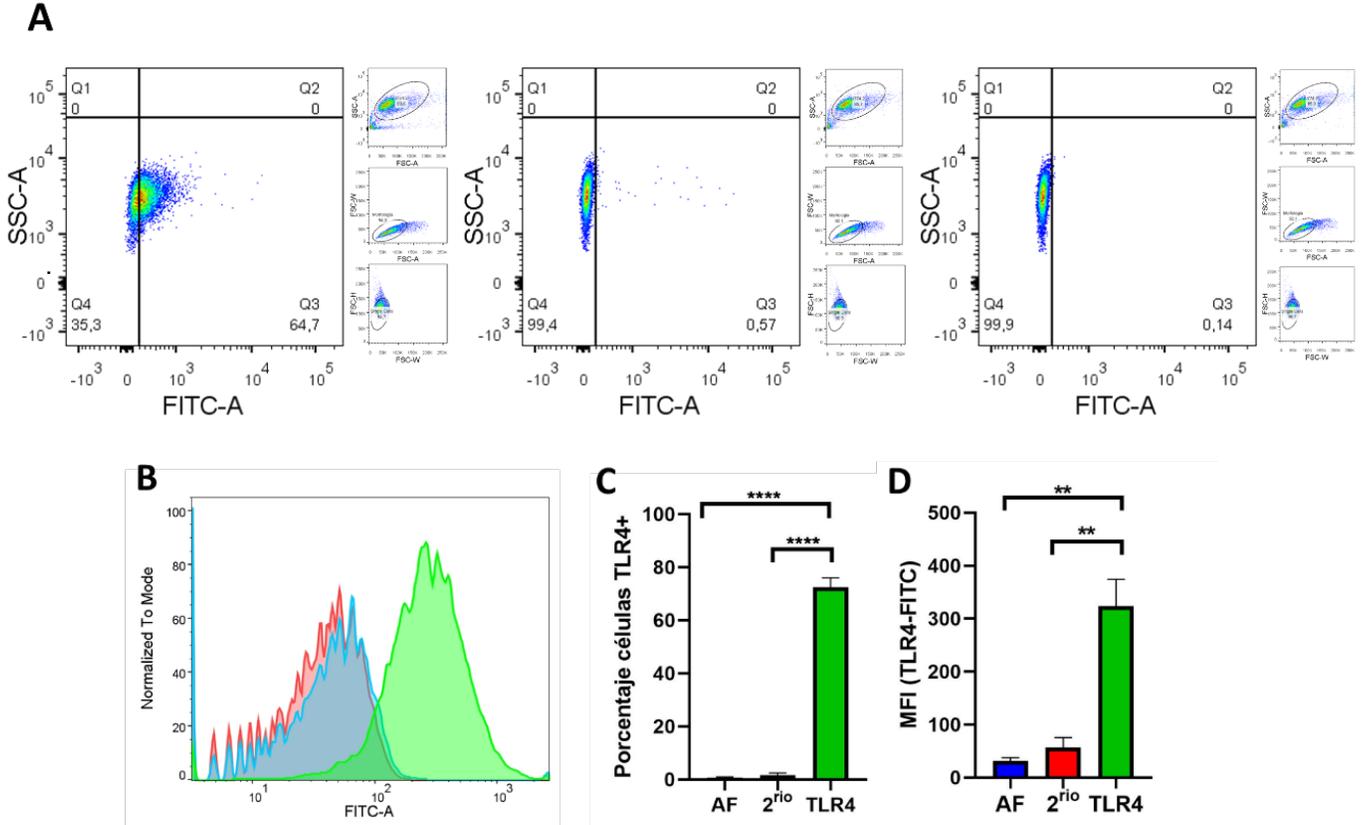
### 7.1.1 Evaluación de la expresión del receptor TLR4 en la línea celular de macrófagos J774.2

Para verificar la expresión de TLR4 en las células J774.2, se realizó un análisis por citometría de flujo y los resultados se presentan en la **Figura 7**. Como controles de especificidad se utilizaron células incubadas solo con el anticuerpo secundario (denominadas en adelante control 2<sup>rio</sup>) y células sin marcar para evaluar la autofluorescencia (denominadas en adelante AF). En la **Figura 7A**, se muestra que la población de células J774.2 es homogénea por sus características de tamaño (*forward scatter*) y rugosidad (*side scatter*). En el histograma de la **Figura 7B**, se observa un aumento en la fluorescencia de las células incubadas con el anticuerpo anti-TLR4 (verde), a diferencia de los controles (rojo, control 2<sup>rio</sup> y azul, AF). Al graficar el porcentaje de células positivas para TLR4, se observa que alrededor del 70% de las células es estadísticamente significativa para este receptor (**Figura 7C**). Estos datos se correlacionan con los mostradas en la **Figura 7D**, donde se observa que la intensidad de fluorescencia media (MFI) es mayor para las células marcadas con el anticuerpo anti-TLR4, respecto a los controles AF y 2<sup>rio</sup>.

### 7.1.2 Evaluación de los niveles de citoquinas IL-6, IL-12p40 y TNF inducidos por hemocianinas en macrófagos J774.2

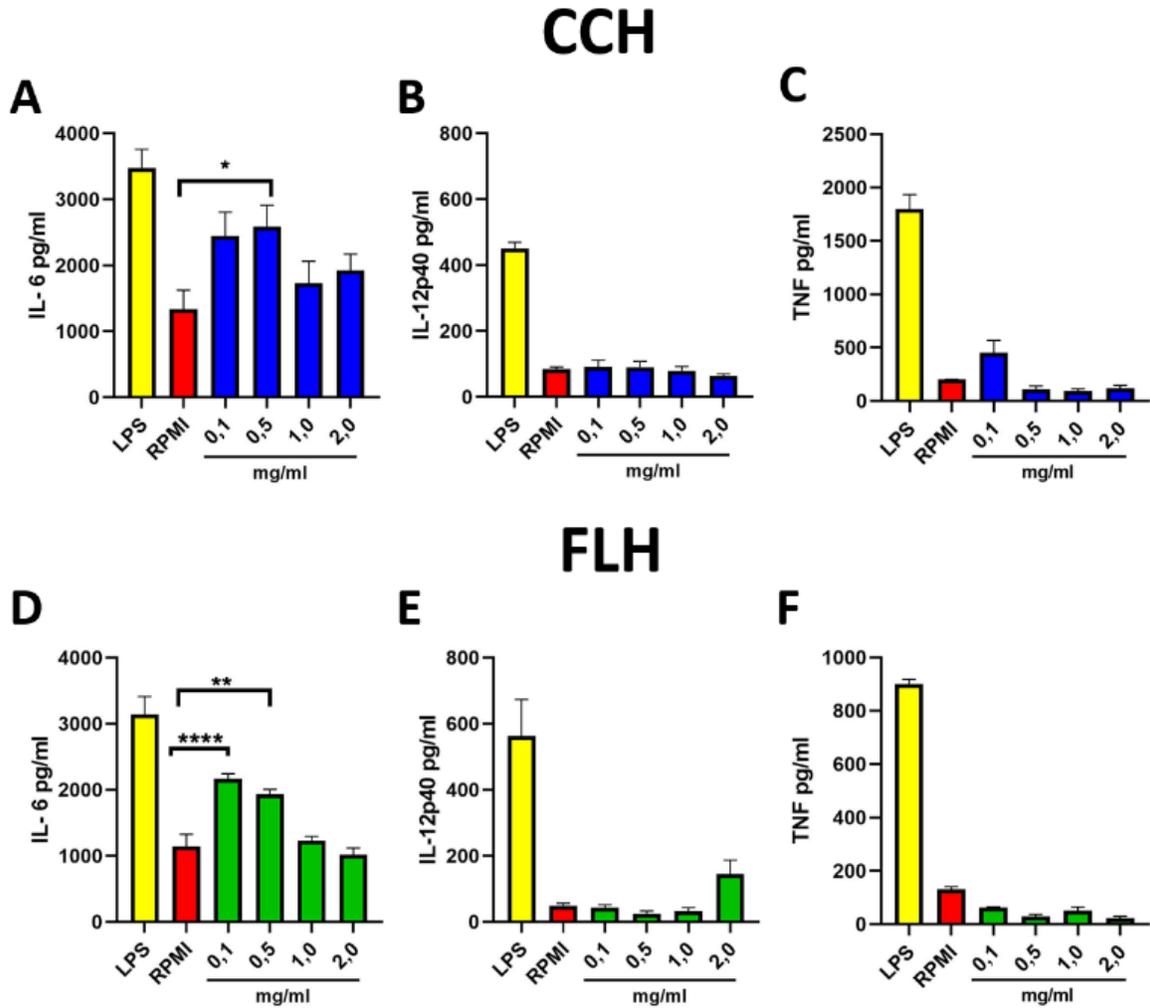
Cultivos de la línea J774.2 fueron estimulados con concentraciones crecientes (0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/ml) de CCH y FLH y en los sobrenadantes se cuantificó la concentración de IL-6, IL-12p40 y TNF mediante un ensayo de ELISA de captura. Como control positivo se utilizó LPS a 1 µg/ml y como control negativo solo medio de cultivo.

Los resultados muestran que CCH a una concentración de 0,1 mg/ml presentan una tendencia al alza de IL-6 y que a 0,5 mg/ml induce un aumento del 100% estadísticamente significativa de esta citoquina (**Figura 8A**). En cambio, FLH a una concentración de 0,1 mg/ml induce el mayor aumento IL-6 y del 100% respecto al control. (**Figura 8B**). Sin embargo, ni FLH ni CCH indujeron un aumento significativo en la secreción de IL-12p40 y TNF luego de 24 horas de incubación (**Figuras 8C y 8D**). Es importante destacar que, a mayor concentración de hemocianinas la producción de citoquinas disminuye, por lo que el rango de efecto dosis-respuesta es acotado y no se observa a mayores concentraciones de las hemocianinas.



**Figura 7. Determinación de los niveles de TLR4 mediante citometría de flujo en la línea de macrófagos murinos J774.2.**

Cultivos de células J774.2 fueron crecidas *in vitro* para evaluar la expresión el receptor de superficie TLR4 por medio de citometría de flujo. Las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-TLR4 de rata y posteriormente con un secundario anti-IgG de rata-FITC. Como control de especificidad se utilizaron células incubadas solo con el anticuerpo secundario (Control 2<sup>rio</sup>) y un cultivo sin anticuerpos como control de autofluorescencia (AF). **A.** Análisis de la población células. Se muestra en cuadros más pequeños el proceso de selección en base a sus características morfológicas. **B.** Histograma representativo de la expresión de TLR4. Histograma normalizado (todos los canales escalados como un porcentaje del recuento máximo). En verde, células marcadas con anticuerpo anti-TLR4, en azul autofluorescencia y en rojo control 2<sup>rio</sup>. **C.** Porcentaje de células TLR4 positivas. El gráfico indica el porcentaje de células que fueron marcadas por el anticuerpo anti-TLR4 y secundario-FITC. **D.** Cuantificación de la expresión de TLR4. El gráfico corresponde a la intensidad media de fluorescencia (MFI) de los controles y TLR4. Los datos estadísticos fueron generados a partir de 3 experimentos independientes. La diferencia de las barras se representa como el promedio de  $\pm$  SEM (error estándar de la media), y el análisis estadístico se realizó mediante t-test con \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .



**Figura 8. Determinación de los niveles de citoquinas inducido por las hemocianinas CCH y FLH mediante ELISA.** Cultivos de la línea J774.2 fueron estimulados con concentraciones crecientes de ambas hemocianinas y cuantificadas mediante ELISA a las 24 horas. Como controles de todos los experimentos se empleó un control positivo con LPS (1 µg/ml) y un control negativo solo con medio de cultivo (RPMI). **A y B.** Niveles de IL-6 e IL-12p40, respectivamente, inducidos por CCH a distintas concentraciones. **C y D.** Niveles de IL-6 e IL-12, respectivamente inducidos por FLH a diferentes concentraciones. Los datos generados se obtuvieron de al menos 3 experimentos independientes. La diferencia en las barras está dada por el promedio del error estándar de la media (SEM) y el análisis de significancia se realizó mediante ANOVA con \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$

Por problemas de citotoxicidad encontrados en los cultivos estimulados con KLH, reportados previamente por otros autores (74, 75) no se utilizó esta proteína en los experimentos posteriores.

### 7.1.3 Análisis del mRNA que codifica para TLR4 en la línea de macrófagos J774.2

Se procedió a aislar *RNA* de la línea celular J774.2 con un kit comercial que purifica mediante una cromatografía en columna de centrifugación.

Los resultados presentados en la **Tabla 2**, muestran una alta concentración de *RNA* de alta pureza al tener una relación de absorbancias 260/280 mayor que 2. Además, en el gel presentado en la **Figura 9**, se observa la existencia de dos bandas que corresponden a las bandas de 28S y 18S de eucariontes, lo que destaca la integridad del *RNA* obtenido.

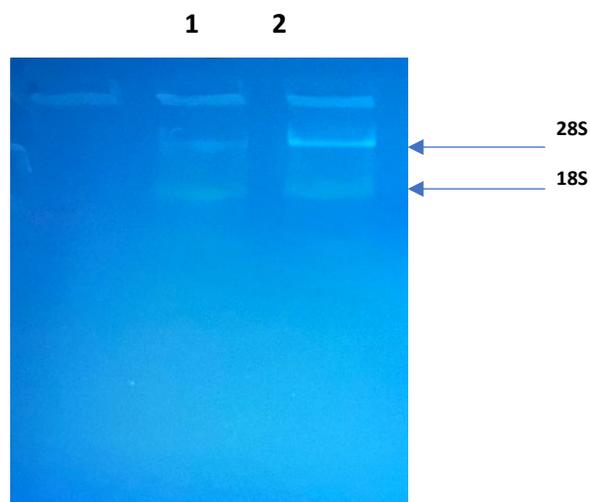
### 7.1.4 Diseño de partidores

Para el análisis del mRNA de TLR4 se diseñaron 2 parejas de partidores para ser ensayados mediante qPCR y 2 parejas de partidores de GAPDH como control. Se utilizó la secuencia de referencia NM-021297.3, obtenida de la base de datos NUCLEOTIDE de NCBI para el diseño de partidores de TLR4. Debido a las isoformas existentes del TLR4 murino, previamente se realizó un alineamiento entre las secuencias existentes para obtener las regiones conservadas y trabajar con ellas. La secuencia de los partidores se realizó con la herramienta web Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Se consideró la utilización de partidores cercanos a la región 5' y 3' del mRNA alineado, con un tamaño de nucleótidos no menor a 19 ni mayor a 23, con  $T_m$  cercanas a los 60°C y cuya máxima diferencia en las  $T_m$  fuese de 5°C. Posteriormente se realizó un análisis de las características fisicoquímicas mediante las herramientas Web *Tmcalculator* (<https://tmcalculator.neb.com>) y estructuras secundarias con *Oligoevaluator* (<http://www.oligoevaluator.com/LoginServlet>). A partir del diseño bioinformático, se verificó que los partidores diseñados no formaran dímeros ni tampoco estructuras secundarias, o, en su defecto, con una interacción débil. De la misma manera se realizó el diseño de los partidores para GAPDH. La **Tabla 3** resume las características fisicoquímicas de los partidores diseñados.

**Tabla 2. Purificación y cuantificación de ARN extraído de la línea de macrófagos J774.2**

Número de muestra	Concentración (ng/ $\mu$ l)	260/280	260/230
1	388.680	2.14	1.92
2	343.488	2.11	1.94

Cultivos de células J774,2 fueron lisados y purificados mediante una cromatografía en columna de centrifugación. La cuantificación de ARN se realizó mediante espectrofotometría en el equipo DeNovix Ds-11 FX. Se muestra la concentración de RNA y la pureza de dos cultivos lisados y purificados de forma independiente.



**Figura 9. Análisis electroforético del ARN extraído de la línea celular J774.2 en gel de agarosa.** El gel de agarosa se preparó al 2% y se mezcló con 5  $\mu$ l del colorante *SafeView Plus* para el revelado en una cámara UV. Para cargar las muestras se mezclaron 2  $\mu$ l del tampón de carga con 5  $\mu$ l de muestra. El gel se corrió a 100 V durante al menos 15 minutos. Los carriles 1 y 2 corresponden a las dos purificaciones de ARN independientes de la línea celular J774.2 presentadas en la Tabla 2. Las flechas indican las dos bandas de 28S y 18S de eucariontes.

**Tabla 3. Características fisicoquímicas de los partidores diseñados para evaluar la expresión de TLR4 mediante qPCR**

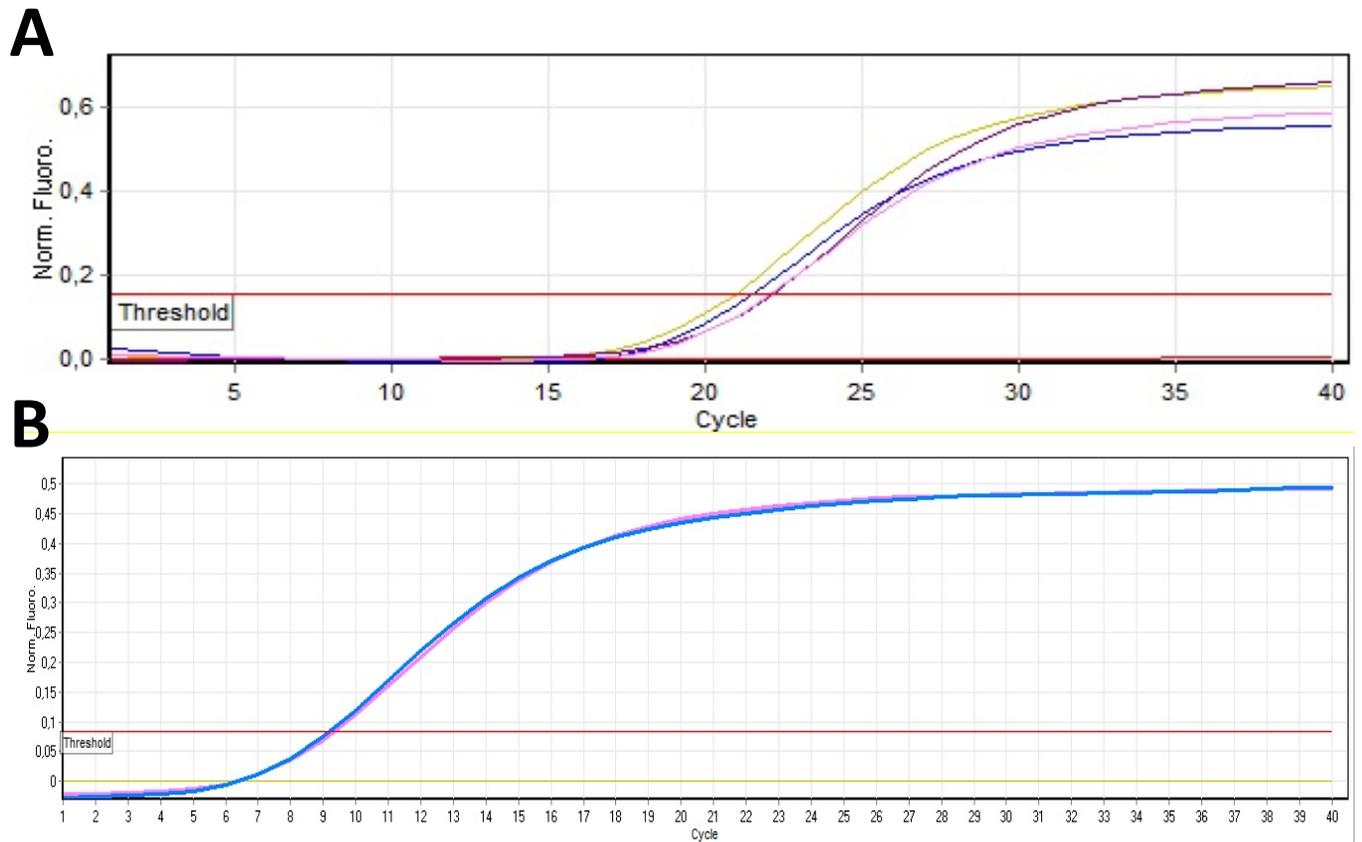
Nombre	Secuencia	Tamaño (nucleótidos)	Tm (°C)	GC (%)	Hibridación o Annealing (°C)	Estructuras secundarias	Formación de dímeros
TLR4F1	GCTTTCACCTCTGCCTTCAC	20 nucleótidos	59	55	51	Ninguna	Ninguna
TLR4R1	GAAACTGCCATGTTTGAGCA	20 nucleótidos	56	45		Débil	Ninguna
TLR4F2	GCATGGATCAGAACTCAGCA	21 nucleótidos	65	48	66	Ninguna	Ninguna
TLR4R2	TTCAAGGGGTTGAAGCTCAGA	21 nucleótidos	66	48		Débil	Ninguna
GAPDHF1	GTCAAATCTAAGTGGATCAAGG	22 nucleótidos	41	60	60	Débil	Ninguna
GAPDHR1	CCCATATCTTCAAGGCTTTT	20 nucleótidos	40	59		Ninguna	Ninguna
GAPDHF2	GTTCCAGAGACAGCCGCATC	20 nucleótidos	60	69	67	Ninguna	Ninguna
GAPDHR2	TTCACACCGACCTTCACCATT	21 nucleótidos	48	66		Ninguna	Ninguna

El diseño de los partidores se realizó por medio de la herramienta web Primer3Plus, y la obtención de los parámetros fisicoquímicos mediante los programas Tmcalculator y Oligoevaluator. TLR4F1 (*forward*) y TLR4R1 (*Reverse*) corresponden a la primera pareja de partidores y TLR4F2 y TLR4R2 a una segunda pareja de partidores de TLR4. GAPDHF1/GAPDHR1 y GAPDHF2/GAPDHR2 corresponden a las parejas de partidores de GAPDH.

### 7.1.5 RT-qPCR con los partidores de TLR4

Para confirmar la funcionalidad de los partidores señalados en la **Tabla 3**, se procedió a realizar un RT-qPCR con el mRNA extraído de la línea J774.2.

Los resultados de la **Figura 10A** muestran 4 curvas de amplificación en duplicado, que corresponden a la pareja de partidores 1 y 2 de TLR4. De la misma manera, la **Figura 10B** se muestra las amplificaciones para GAPDH usada como control. Se concluye entonces, que los partidores diseñados son apropiados para evaluar la expresión de TLR4 en los futuros experimentos de silenciamiento.



**Figura 10. Evaluación de los partidores para TLR4 y GAPDH mediante qPCR.** Las curvas del gráfico muestran la amplificación del cDNA que codifica para TLR4 y GAPDH en la línea de macrófagos J774.2. **A.** En amarillo y violeta se indican los partidores TLR4F1/TLR4R1, y en rosado y azul los partidores TLR4F2/TLR4R2. **B.** En celeste y rosado se indican los partidores GAPDHF1/GAPDHR1. Para ambas pruebas, se utilizó un control negativo solo con H<sub>2</sub>O, el cual está indicado en color rojizo en la línea basal (0,0). La línea roja “*threshold*”, indica el umbral de amplificación.

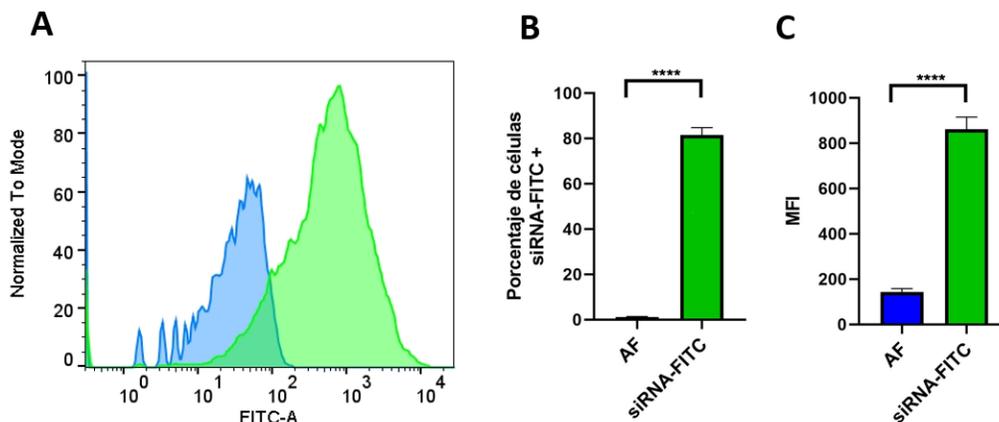
**7.2 Objetivo Específico 2:** Establecer las condiciones experimentales de transfección usando un siRNA para TLR4 y Lipofectamina en la línea celular utilizada en el objetivo 1 mediante qPCR y citometría de flujo, y evaluar los niveles de citoquinas inducidas por las hemocianinas en ausencia del receptor.

### 7.2.1 Estandarización de un protocolo de silenciamiento para TLR4

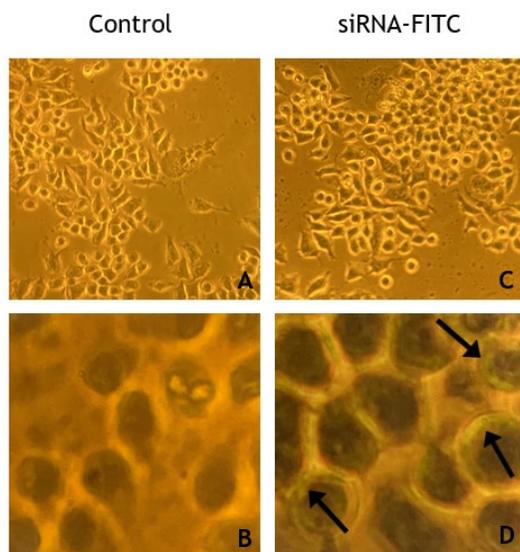
Se utilizó un protocolo de silenciamiento génico para TLR4 por medio de un siRNA comercial siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describió en materiales y métodos, utilizando la línea J744.2. Respecto a los controles de la transfección, se utilizó un cultivo transfectado con un siRNA de origen no mamífero (siRNA-control) y un control de células sin tratar (TLR4). Además, paralelamente a la transfección se realizó un control de incorporación con un siRNA fluorescente (siRNA-FITC). A las 6 horas en promedio, las células transfectadas con el siRNA-FITC fueron lavadas y llevadas vivas al citómetro para su análisis.

En la **Figura 11** se muestran los resultados medidos por citometría de flujo. En **11A** se observa un aumento en la fluorescencia de las células transfectadas (verde), respecto a las células no transfectadas (azul). Además, se comprueba que la incorporación del siRNA por las células J774.2 medida a las 6 horas en promedio después de la transfección, es de alrededor de un 80%, siendo significativa al igual que la intensidad de fluorescencia media (**Figuras 11B y 11C**). Adicionalmente, estos datos se correlacionan con la **Figura 12** en que se muestran algunas imágenes tomadas al microscopio de luz equipado con epifluorescencia, donde **12A y 12B** corresponden a células sin tratar y **12C y 12D** a las células tratadas con el siRNA fluorescente, respectivamente. Con flechas negras se distingue el siRNA-FITC en las células (**Figura 12D**), sugiriendo fuertemente incorporación, lo cual no se observa en las células sin tratar (**Figura 12B**). Los resultados de la **Figura 13A y 13B** muestran los valores de TLR4 obtenidos para la primera transfección. En estos se observa que el siRNA de origen mamífero no afecta la expresión del receptor TLR4, y que los controles de citometría se encuentran dentro de los rangos esperables, esto es, el anticuerpo 2<sup>no</sup> e Isotipo cercanos a la AF. Sin embargo, ni a una concentración de 0,02 o 0,06  $\mu\text{M}$  el siRNA inhibió la expresión de TLR4, lo cual se observa tanto en el gráfico del porcentaje de células TLR4+ como en el de MFI. (**Figura 13A y 13B**, respectivamente).

Dado que la inhibición de TLR4 no fue mayor a un 70% en la concentración y los tiempos analizados previamente, se realizaron experimentos posteriores con modificaciones para optimizar el protocolo de transfección en la misma línea celular. Los cambios introducidos fueron aumentar la concentración de siRNA, logrando una concentración final por pocillo de 0,1 o 0,25 y 0,5  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 1 ml. Los resultados del silenciamiento se analizaron a las 24, 36 y 48 horas después



**Figura 11. Evaluación mediante citometría de flujo de la fluorescencia de las células J774.2 transfectadas con un siRNA conjugado con fluoresceína.** Las células fueron transfectadas con un siRNA-FITC y posteriormente lavadas 3 veces con PBS-SFB 2% para ser analizadas por citometría de flujo a las 6 horas. **A.** Células incubadas con siRNA-FITC. Histograma representativo normalizado que muestra la fluorescencia de células transfectadas. En azul cultivos de J774.2 sin transfectar y en verde células transfectadas. **B.** Cuantificación de las células fluorescentes. El gráfico muestra el porcentaje de células fluorescentes. Autofluorescencia en azul (AF) y el siRNA-FITC en verde **C.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia. El gráfico muestra la intensidad de fluorescencia media. En azul AF y en verde las células transfectadas. El análisis estadístico se realizó a partir de 3 experimentos independientes. La diferencia en las barras está dada por el promedio de SEM y la significancia se realizó mediante t-test con \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

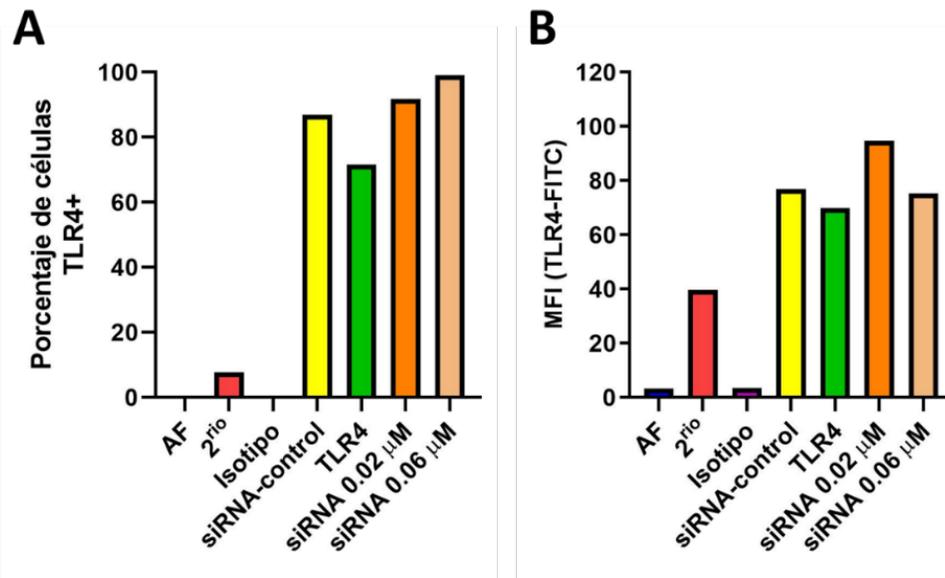


**Figura 12. Evaluación al microscopio de fluorescencia, la incorporación de un siRNA fluorescente en células J774.1 como control del procedimiento de transfección.** Las células creciendo a un 60% de confluencia, fueron transfectadas durante 5 horas y observadas directamente en los pozos de la placa de cultivo utilizando un microscopio invertido NIKON equipado con epifluorescencia. **A y B.** Aspecto del cultivo control, sin tratamiento a menor y mayor aumento, respectivamente. Se observan células adheridas al sustrato de formas característicamente fusiformes y también algunas redondeadas. **C y D.** Aspecto del cultivo transfectado con menor y mayor aumento, respectivamente. Las células transfectadas con el siRNA-FITC muestran una morfología normal. Las flechas destacan el color verde del siRNA en las células. Las imágenes fueron tomadas con el dispositivo iPhone Pro-11 con los aumentos de 10X y 400X.

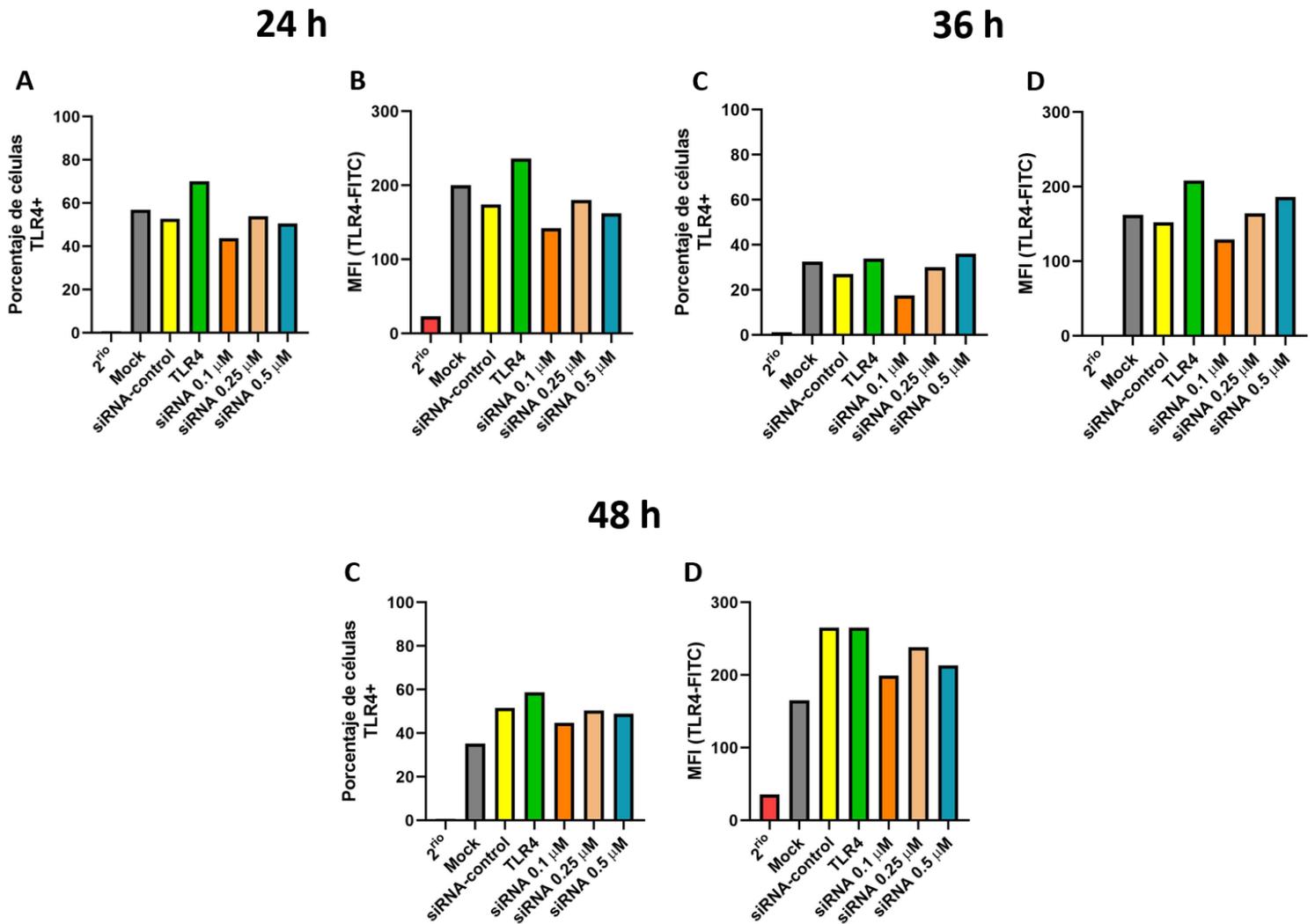
de la transfección, y se incluyeron como controles un cultivo con siRNA de origen no mamífero (siRNA-control), un control solo con reactivo de transfección (Mock) y un control con células sin tratamiento (TLR4). Finalmente, los cultivos fueron incubados con anticuerpos de la misma forma que en el acápite **5.3** para ser analizados por citometría de flujo, utilizando los mismos controles e incluyendo un colorante extra, eFluor™ 780, para determinar la viabilidad de los cultivos y así, realizar el análisis posterior considerando solo las células vivas.

Los gráficos de las **Figuras 14A y 14B** muestran el porcentaje de células positivas para TLR4 y su MFI a las 24 horas. Se observa una tendencia a la baja de TLR4 en una concentración de siRNA 0,1  $\mu\text{M}$ , sin embargo, su inhibición no es mayor a un 70%, tomando como referencia el control positivo o células sin tratar (TLR4). Los gráficos **14C y 14D** corresponden a las mismas mediciones evaluadas a las 36 horas. En **14C** existe una disminución en las proporciones de todas las condiciones experimentales, dada la baja viabilidad del grupo (como se muestra en la **Tabla 4**). Considerando la baja expresión del control TLR4, los datos obtenidos no permiten discriminar los resultados de este punto. Sin embargo, el gráfico **14D** mantiene las proporciones del gráfico **14B**, donde se destaca que la MFI se mantiene indiferente a la viabilidad celular, apoyando la idea de que la inhibición no fue significativa a las 36 horas. Los gráficos **14E y 14F** muestran los datos generados a las 48 horas. Al igual que en los tiempos anteriores, no se observa una diferencia mayor al 70% en la disminución de la expresión de TLR4 de los cultivos transfectados. Además, se observa que las proporciones de la MFI, al igual que los porcentajes, comienzan a igualarse con el control positivo, lo que podría sugerir una posible pérdida de efectividad a tiempos más tardíos. Respecto a los controles siRNA-control y Mock, se observa que a todos los tiempos no hay un cambio mayor en los porcentajes de expresión de TLR4, respecto al control positivo. Al igual que en la **Figura 13**, se observa que estos controles no producen una disminución de los niveles de TLR4 en los tiempos analizados.

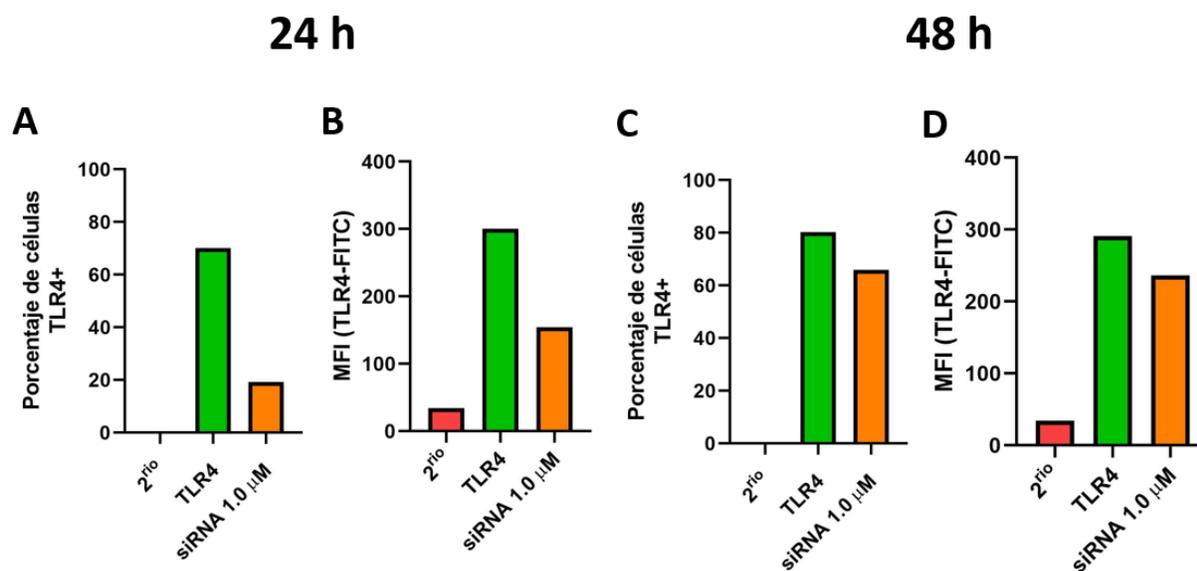
A partir de los resultados de la curva de tiempo y porque no se obtuvo la inhibición esperada de TLR4 en los cultivos transfectados con siRNA-TLR4, se prosiguió a modificar nuevamente el protocolo de silenciamiento. En esta oportunidad, se aumentó la concentración de siRNA a 1  $\mu\text{M}$  y se analizaron a las 24 y 48 horas. Finalmente, se prosiguió al igual que en acápite **5.3** para analizar las células por citometría de flujo. Los resultados de la **Figura 15** muestran los datos obtenidos a las 24 horas (**15A y 15B**) y 48 horas (**15C y 15D**). En el gráfico **15A** se observa que a 1  $\mu\text{M}$  de siRNA, se inhibe la expresión de TLR4 en un 72,4 %. Sin embargo, en **15C** solo se observa una disminución de un 17,9 %, lo cual sugiere que a ese tiempo el efecto inhibitorio del siRNA sobre la expresión de TLR4 a la misma concentración no es efectivo. Para el caso de la MFI a las 24 horas, se observa una disminución a la mitad respecto al control positivo, en cambio, a las 48 horas no existe tal cambio en la media de MFI del cultivo transfectado (**Figura 15B y 15C**).



**Figura 13. Evaluación del silenciamiento génico de TLR4 mediante citometría de flujo.** Cultivos de la línea celular J774.2 fueron incubados con siRNA durante 48 horas y posteriormente marcados con anticuerpos para ser analizados por citometría de flujo. Ambos gráficos incluyen un control de autofluorescencia (AF), anticuerpo secundario (2<sup>no</sup>), anticuerpo isotipo (Isotipo), células sin tratamientos (TLR4) y siRNA de origen no mamífero (siRNA-control). **A.** Porcentaje de células que expresan TLR4. El gráfico muestra el porcentaje de células positivas para el receptor TLR4. **B.** Intensidad de fluorescencia media para TLR4. Los resultados se obtuvieron a partir de un experimento, por esta razón no se incluye análisis estadístico.



**Figura 14. Evaluación mediante citometría de flujo, del tiempo necesario para obtener un silenciamiento de TLR4 en células de la línea J774.2 mediante una transfección con un siRNA.** Células de la línea celular J774.2 fueron transfectadas con un siRNA a concentraciones de 0,1, 0,25, 0,5 μM, y analizadas mediante citometría de flujo a las 24, 36 y 48 horas. Como controles de transfección se incluyó un cultivo solo con reactivo de transfección (Mock), un cultivo transfectado con un siRNA de origen no mamífero (siRNA-control) y un cultivo positivo o sin tratamientos (TLR4) y como control de especificidad se utilizó un anticuerpo secundario (2<sup>no</sup>). **A y B.** Gráficos del porcentaje de expresión de TLR4 y MFI a las 24 horas. **C y D.** Gráficos del porcentaje de expresión de TLR4 y MFI a las 36 horas. **E y F.** Gráficos del porcentaje de expresión de TLR4 y MFI a las 48 horas. Los datos obtenidos corresponden a un experimento, por esta razón no se incluye análisis estadístico.

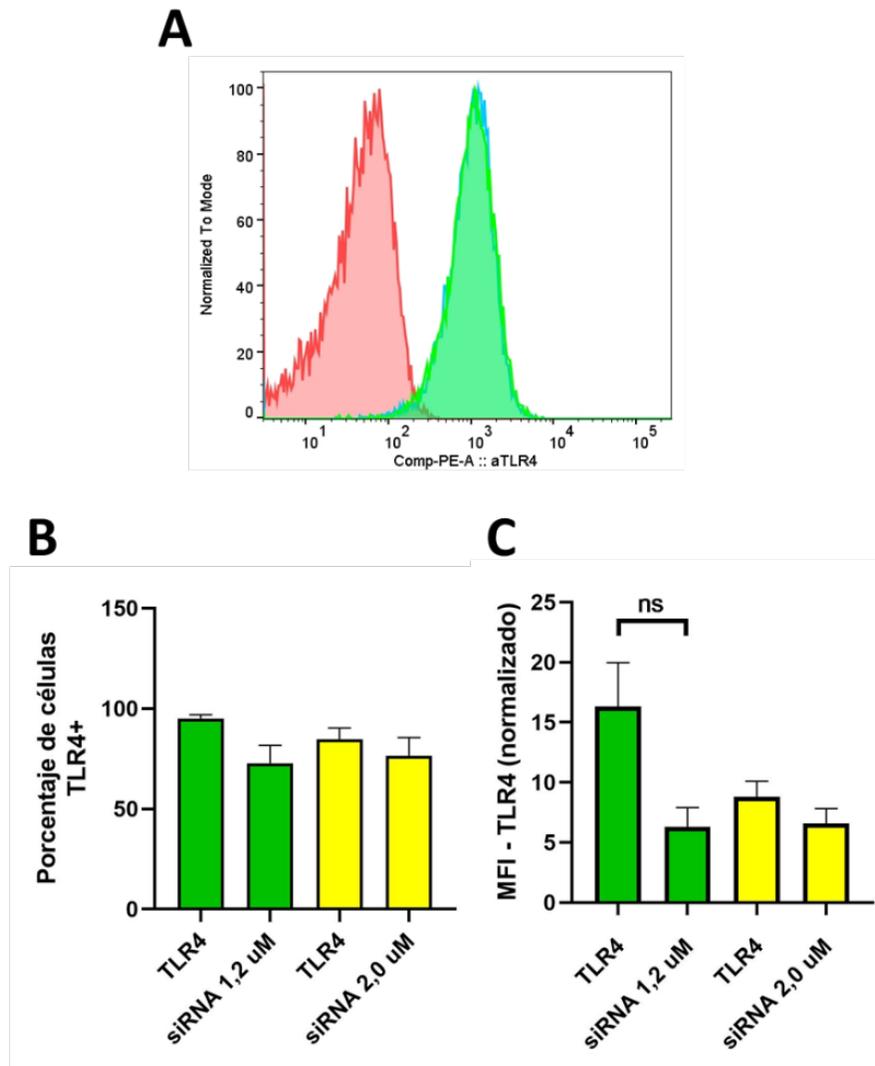


**Figura 15. Evaluación de los niveles de TLR4 mediante citometría de flujo en la línea celular J774.2 transfectada con un siRNA.** Cultivos fueron transfectados con un siRNA para TLR4 a una concentración de 1 μM durante 24 y 48 horas, y analizados por citometría de flujo. En ambos experimentos se utilizó un control negativo con un anticuerpo secundario (2<sup>o</sup>) y un control positivo con las células sin tratar (TLR4). **A y B.** Gráficos del porcentaje de expresión de TLR4 y MFI a las 24 horas. **C y D.** Gráficos del porcentaje de expresión de TLR4 y MFI a las 48 horas. Los gráficos muestran los resultados de 1 experimento, por esta razón no se realizó un análisis estadístico.

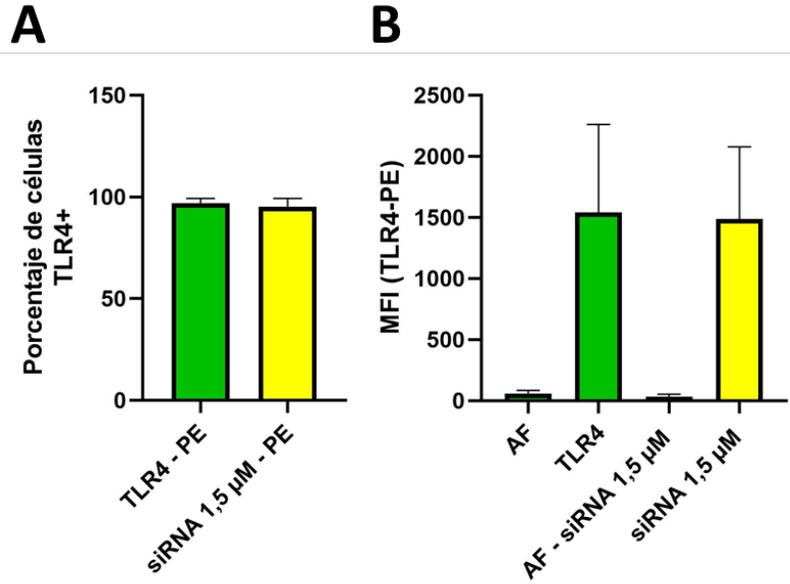
Dado los resultados anteriores (**Figura 15**), se prosiguió con transfecciones a concentraciones mayores de siRNA para superar el límite del 70% alcanzado a las 24 horas. Para ello, los cultivos fueron transfectados a concentraciones 1,2 y 2,0  $\mu\text{M}$  durante 7 horas, completado con 2 ml de medio suplementado y analizadas a las 24 horas. La **figura 16A** muestra un histograma representativo de una transfección realizada a 2,0  $\mu\text{M}$ . Se observa un desplazamiento de las células transfectadas (color celeste) y no transfectadas (color verde), respecto al control de autofluorescencia (rojo), sin embargo, no existe diferencia entre los picos verde y celeste. En el gráfico **16B** se observa que, el promedio de datos de las células transfectadas a 1,2 y 2,0  $\mu\text{M}$  tiene una leve tendencia a la baja, pero no disminuye según lo esperado respecto a sus controles. Por otra parte, en la figura **16C** se observa una pequeña disminución de los promedios de las células transfectadas a 2,0  $\mu\text{M}$ , la cual es mayor a 1,2  $\mu\text{M}$ , pero que esta última no es significativa por análisis de test-t. Con estos resultados e intentando identificar el problema por el cual las transfecciones no fueron eficientes, inclusive a altas concentraciones de siRNA, se pensó que los reactivos de Santa Cruz Bioechnology no eran los adecuados y se decidió utilizar otro kit comercial, en este caso obtenido de Thermo Fischer.

Utilizando el nuevo kit, las placas de 6 pocillos con cultivos de células J774.2 al 60% de confluencia fueron transfectadas con un volumen de 1 ml a una concentración de 1,5  $\mu\text{M}$  durante 7 horas. En el gráfico **17A** se observa que el porcentaje de células TLR4+ en las células transfectadas no difieren de su control TLR4 – PE. Concordante con lo anterior, en el gráfico **17B** no hay una caída de la MFI en las células transfectadas, respecto a su control.

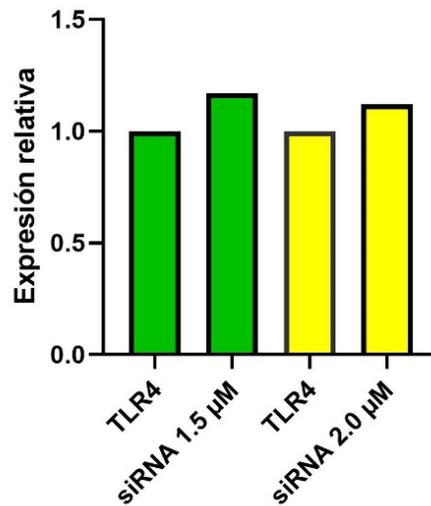
Para corroborar la información obtenida en la **Figura 16** y **17** se realizó un RT-qPCR y para el análisis cuantitativo se utilizó el método de *Pfaffl*. La **Figura 18** muestra el cambio de expresión para una transfección realizada a 2,0  $\mu\text{M}$  y 1,5  $\mu\text{M}$  de siRNA (condiciones utilizadas en la **Figura 16** y **17**, respectivamente). En el gráfico **19** se observa que para ambas transfecciones no disminuye la expresión del mensajero de TLR4, comparado con su respectivo control, concordante con los datos de la citometría en **16B** y **17A**.



**Figura 16. Evaluación de los niveles de TLR4 en células J774.2 transfectadas con siRNA-TLR4 en alta concentración.** Los cultivos fueron transfectados a una concentración de 1,2  $\mu$ M y 2,0  $\mu$ M durante 24 horas, y analizadas por citometría de flujo. Para ambos gráficos, se muestran en colores los grupos experimentales. **A.** Histograma representativo de una transfección a 2,0  $\mu$ M. En rojo se muestra autofluorescencia, en verde células sin transfectar y en celeste células transfectadas. **B.** Gráficos del porcentaje de células TLR4 positivas. **C.** Gráfico de la intensidad media de fluorescencia. Los gráficos muestran los resultados de 3 experimentos independientes para la condición en verde y 5 experimentos independientes para la condición en color amarillo. El análisis de significancia se realizó mediante t-test. ns indica no significativo.



**Figura 17.** Evaluación de la viabilidad de los cultivos de células J774.2 transfectados con el Kit de siRNA de Thermo Fischer. Cultivos fueron transfectados a una concentración de 1,5 μM durante 24 horas y analizados por citometría de flujo. **A.** Gráfico del porcentaje de células TLR4 positivas. **B.** Gráfico de la intensidad media de fluorescencia. Los gráficos muestran los resultados de 2 experimentos independientes. El error está dado por el promedio de SEM.



**Figura 18.** Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión relativa de TLR4 en las células J774.2 transfectadas con un siRNA. Cultivos fueron transfectados a una concentración de 1,5 μM (verde) y 2,0 μM (amarillo) durante 24 horas y analizadas mediante qPCR. El gráfico indica la expresión relativa de mTLR4. Los resultados se obtuvieron a partir de un experimento, por esta razón no se incluye análisis estadístico.

La **Tabla 5** muestra la viabilidad de las transfecciones realizadas a la fecha. A partir de los datos se observa que en la transfección número 11 fue donde disminuyó mayormente la viabilidad con un 33%. Sin embargo, se aprecia que la mayoría de las transfecciones tuvieron una relación mayor al 0,8 y 0,9, indicando que existe un porcentaje de muerte celular, pero no significativo, asociada al tratamiento y/o manejo de las células.

Como síntesis del punto **1.4**, la **Tabla 5** resume todos los datos de las transfecciones para las células TLR4 positivas y sus MFI. Además, se incluye un análisis comparativo sobre el porcentaje de inhibición de ambos grupos, destacando el valor de la MFI como control del porcentaje de inhibición de TLR4, ya que este valor no depende del analista, sino netamente del programa. A partir de los datos mostrados, se observa que solo en la transfección número 3 a las 24 horas, se alcanzó el objetivo de inhibición sobre el 70%, resultado que no se pudo reproducir en los experimentos posteriores.

**Tabla 4. Viabilidad de los cultivos de células de la línea de macrófagos J774.2 transfectados con vehículos liposomales/siRNA para TLR4.**

N° experimento	Tiempo de Transfección	Viabilidad de las células transfectadas (%)	Viabilidad de las células sin transfectar (%)	Relación de viabilidad (células transfectadas / células sin transfectar)
<b>1</b>	48 horas	31,9	No determinado	No determinado
		46,9	No determinado	No determinado
<b>2</b>	24 horas	75,6	75,1	1,01
		76,8	75,1	1,02
		71,2	75,1	0,95
	36 horas	98,5	20,1	4,80
		47,3	20,1	2,35
		36,9	20,1	1,84
48 horas	73,4	65,6	1,11	
	76,5	65,6	1,17	
	76,7	65,6	1,17	
<b>3</b>	24 horas	82,3	99,4	0,83
	48 horas	95,6	97,1	0,99
<b>4</b>	24 horas	68,0	89,9	0,75
	24 horas	81,6	88,5	0,92
<b>5</b>	24 horas	71,2	91,7	0,77
<b>6</b>	24 horas	92,6	85,8	1,07
	24 horas	85,3	85,8	0,99
<b>7</b>	24 horas	85,4	92,8	0,92
	24 horas	80,2	92,1	0,87
<b>8</b>	24 horas	82,6	89,1	0,93
	24 horas	75,4	87,8	0,86
<b>9</b>	24 horas	92,4	92,9	0,99
<b>10</b>	24 horas	60,0	89,0	0,67

Cultivos de la línea celular J774.2 fueron transfectados con un siRNA para TLR4, marcados con el colorante de viabilidad eFluor 780 (1:1.000) y posteriormente cuantificados en el programa FlowJo 10. La tabla muestra las transfecciones realizadas, los tiempos de incubación, la viabilidad para las células transfectadas y no transfectadas. Se señala la relación entre la viabilidad de las células transfectadas y sin transfectar.

**Tabla 5. Resumen de los experimentos de Inhibición de TLR4 usando siRNA en células de la línea de macrófagos murinos J774.2**

Número de Experimento	Tiempo de Transfección	Concentración de siRNA utilizado (µM)	Niveles de TLR4 en células sin transfectar (%)	Niveles de TLR4 en células transfectadas (%)	Inhibición de TLR4 (%)	MFI-FITC-TLR4 de células sin transfectar normalizado (%)	MFI-FITC-TLR4 de células transfectadas normalizado (%)	Inhibición de MFI (%)
1	48 horas	0,02	71,6	91,7	0,0	19,47	26,4	0,0
		0,06	71,6	99,0	0,0	19,47	25,9	0,0
2	24 horas	0,1	70,1	43,7	37,7	10,2	4,8	52,9
		0,25	70,1	53,9	23,1	10,2	4,7	53,9
		0,5	70,1	50,5	28,0	10,2	4,1	59,8
	36 horas	0,1	33,9	17,5	51,6	4,7	2,5	46,8
		0,25	33,9	30,0	11,5	4,7	2,3	51,0
		0,5	33,9	36,0	0,0	4,7	2,3	51,0
	48 horas	0,1	58,7	44,7	23,9	7,4	2,0	71,4
		0,25	58,7	50,4	14,1	7,4	1,8	75,7
		0,5	58,7	48,9	16,7	7,4	2,3	68,9
3	24 horas	1,0	70,0	19,3	72,4	8,8	2,4	72,7
	48 horas	1,0	80,3	65,9	17,9	8,6	5,1	40,7
4	24 horas	1,2	92,8	61,4	33,8	12,64	3,85	69,5
	24 horas	1,2	93,8	66,8	28,7	12,91	5,68	56,0
5	24 horas	1,2	98,7	90,3	8,5	23,62	9,35	60,4
6	24 horas	1,0	62,9	81,4	0,0	3,76	6,4	0,0
	24 horas	2,0	62,9	41,8	34,0	3,76	2,2	41,5
7	24 horas	2,0	91,4	78,3	14,3	10,3	6,06	41,1
	24 horas	2,0	90,8	90,2	0,7	10,4	7,49	28,0
8	24 horas	2,0	88,5	87,9	0,0	10,4	9,44	9,2
	24 horas	2,0	90,6	84,7	6,5	9,2	7,8	20,4
9	24 horas	1,5	96,6	97,0	0,0	18,2	19,0	0,0
10	24 horas	1,5	94,7	91,3	3,6	23,6	17,1	27,5

Se muestra un resumen de los datos obtenidos mediante el programa FlowJo 10, de todas las transfecciones realizadas. El porcentaje de inhibición de TLR4 y MFI se calculó con la fórmula  $((100 - (\text{porcentaje de células transfectadas} * 100 / \text{porcentaje de células sin transfectar}))$ ). Los números negativos se dejaron como valor 0.

**6.3 Objetivo específico 3: Evaluar los niveles de citoquinas y TLR4 de la misma manera que en el objetivo 1 y establecer las condiciones de transfección de la misma manera que en el objetivo 2 en un cultivo primario de macrófagos.**

### **7.3.1 Caracterización de TLR4 en cultivos primario de macrófagos diferenciados ex vivo**

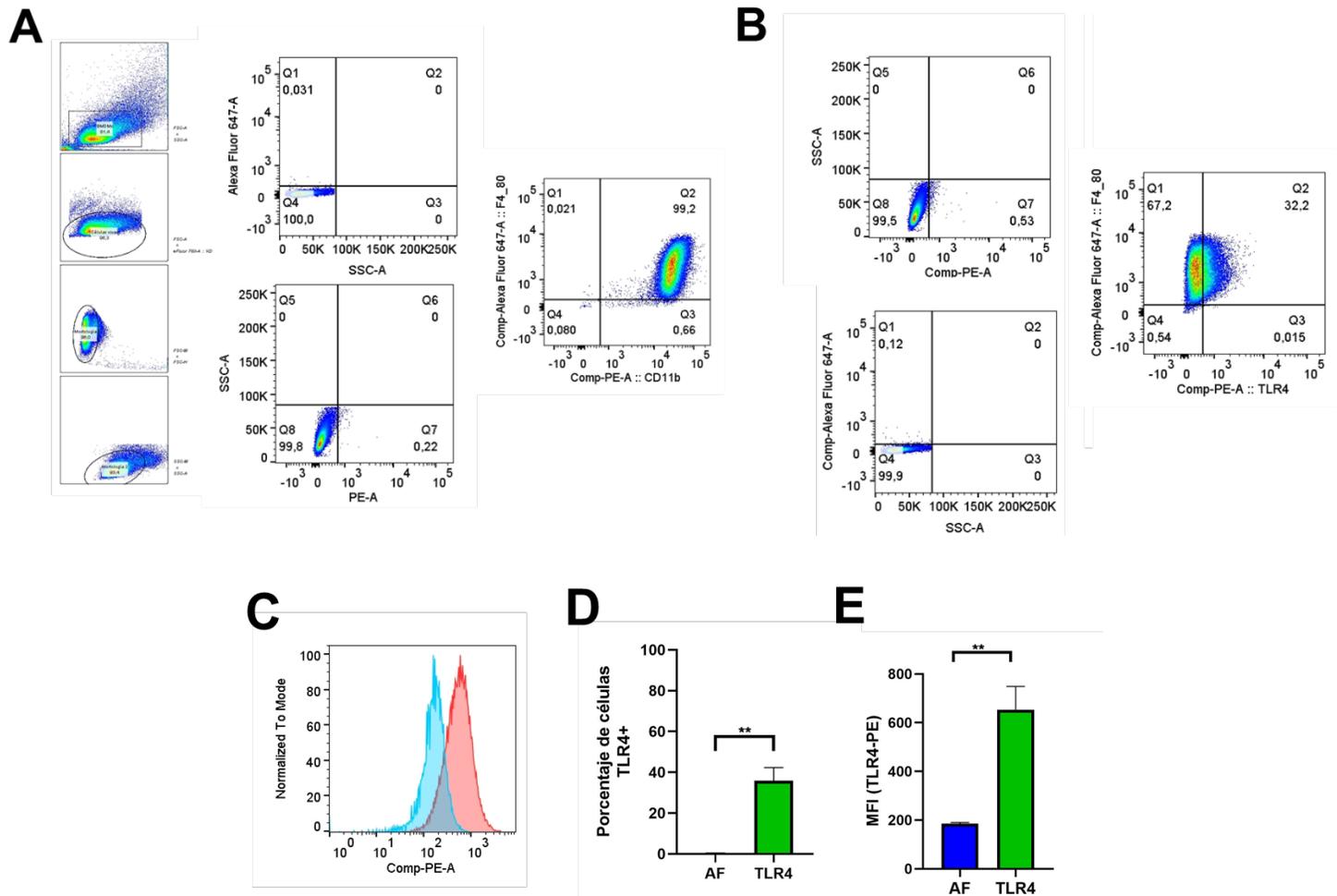
En forma paralela a los experimentos de transfección en la línea J774.2 se inició los experimentos del objetivo 3, caracterizando un cultivo primario de macrófagos murinos para determinar los niveles de TLR4. Brevemente, a partir de ratones C57BL/6 se extrajeron las células precursoras desde la médula ósea y se dejaron en cultivo con medio DMEM conteniendo 20 ng/ml de M-CSF por 7 días. Al cabo de los 7 días de cultivo se evaluó la diferenciación a macrófagos y los niveles de TLR4 usando los anticuerpos para sus marcadores característicos CD4/80, CD11b y TLR4 respectivamente.

La **Figura 19** muestra los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. En **19A** se observa en cuadros más pequeños el análisis de poblaciones para las BMDMs seleccionadas por sus características de rugosidad y tamaño. En los ejes de los cuadros más grandes, se muestran la presencia de los marcadores de superficie F4/80 y CD11b, los cuales son altamente expresados en este tipo de células (>99%) (**19A**). En **19B** se observa que la población positiva para F4/80 y TLR4 es de alrededor de un 32%. En **19C** se muestra un histograma representativo de TLR4, donde el pico celeste representa el control de AF y el rojo de TLR4. En ellos se puede observar una diferencia en la intensidad de ambos picos, pero también se identifica una zona de cruce entre ambos. El gráfico **19D** muestra el porcentaje de células BMDMs TLR4+, cuyo resultado es significativo y de aproximadamente un 30% para las células marcadas con el anticuerpo anti-TLR4. La figura **19E** muestra que los valores de la MFI para TLR4 son significativos respecto a su control AF, complementando la información del gráfico **19D**.

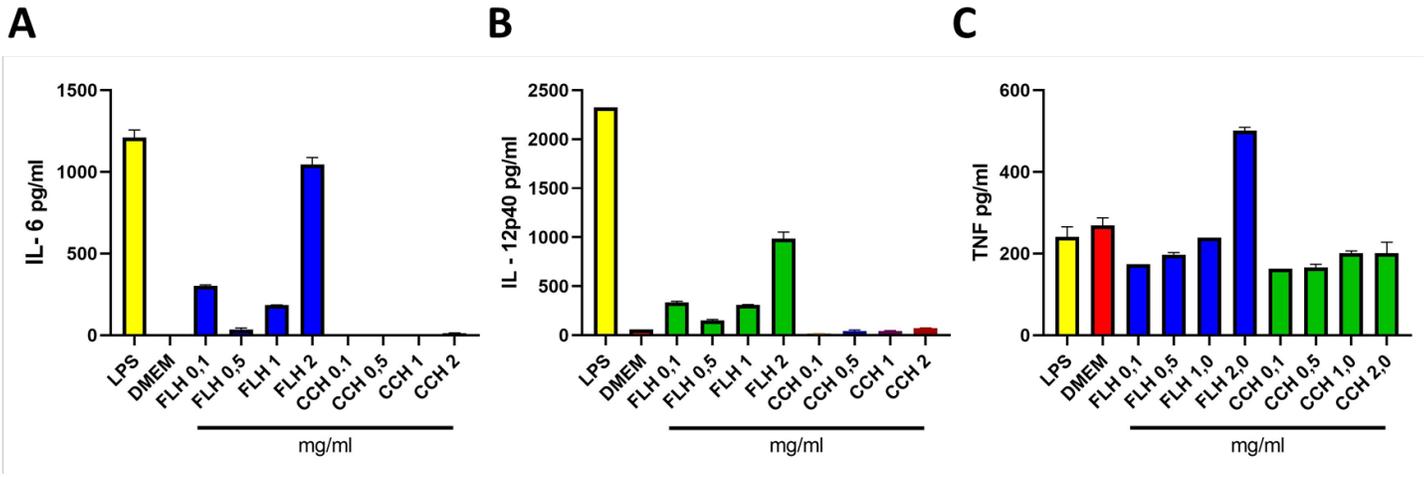
### **7.3.2 Efecto proinflamatorio de las hemocianinas en un cultivo primario de macrófagos diferenciados ex vivo**

Cultivos de BMDMs fueron estimulados con concentraciones crecientes (0,1, 0,5, 1,0 y 2,0 mg/ml) de CCH y FLH y en los sobrenadantes se cuantificó la concentración de IL-6, IL-12p40 y TNF mediante un ensayo de ELISA de captura. Como control positivo se utilizó LPS a 1 µg/ml y como control negativo solo medio de cultivo.

La **Figura 20** muestra los resultados obtenidos de la estimulación con las hemocianinas. Para las 3 citoquinas, se observa que los controles se encuentran en los rangos esperados (**20A, 20B, 20C**). Además, se muestra que CCH a ninguna concentración indujo un alza en los niveles de citoquinas. Por el contrario,



**Figura 19. Evaluación mediante citometría de flujo de la expresión del receptor TLR4 en un cultivo primario de macrófagos.** Cultivos de BMDMs fueron diferenciadas *ex vivo* para evaluar la expresión el receptor de superficie TLR4 por medio de citometría de flujo. Las células fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal anti-TLR4-PE de ratón y el colorante de viabilidad eFluor 780. Como control de autofluorescencia se utilizó un cultivo sin anticuerpos (AF). **A.** Análisis de la población células. Se muestra en cuadros más pequeños el proceso de selección en base a sus características de rugosidad y tamaño. En los cuadros más grandes se muestran las poblaciones tanto negativas como positivas para F4/80 y CD11b. **B.** Análisis de TLR4. Se muestran las poblaciones negativas y positivas para F4/80 y TLR4. **C.** Histograma representativo de la expresión de TLR4. Histograma normalizado. En celeste autofluorescencia y en rojo células marcadas con anticuerpo anti-TLR4. **D.** Porcentaje de células TLR4 positivas. El gráfico indica el porcentaje de células que fueron marcadas por el anticuerpo anti-TLR4 y su control AF. **E.** Cuantificación de la expresión de TLR4. El gráfico corresponde a la MFI de AF y TLR4. Los datos estadísticos fueron generados a partir de 3 experimentos independientes. La diferencia de las barras se representa como el promedio de  $\pm$  SEM y el análisis estadístico se realizó mediante t-test con  $**p < 0,01$ .



**Figura 20. Evaluación mediante ELISA de los niveles de citoquinas inducidos por CCH y FLH en BMDMs.** Cultivos de BMDMs fueron estimulados con concentraciones crecientes de ambas hemocianinas y cuantificadas mediante ELISA a las 24 horas. Como controles de todos los experimentos se empleó un control positivo con LPS (1  $\mu$ g/ml) y un control negativo solo con medio de cultivo (DMEM). **A.** Niveles de IL-6. **B.** Niveles de IL-12p40. **C.** Niveles de TNF. Los datos generados se obtuvieron de 1 experimento, razón por la cual no hay análisis estadístico. La diferencia en las barras está dada por el promedio de SEM.

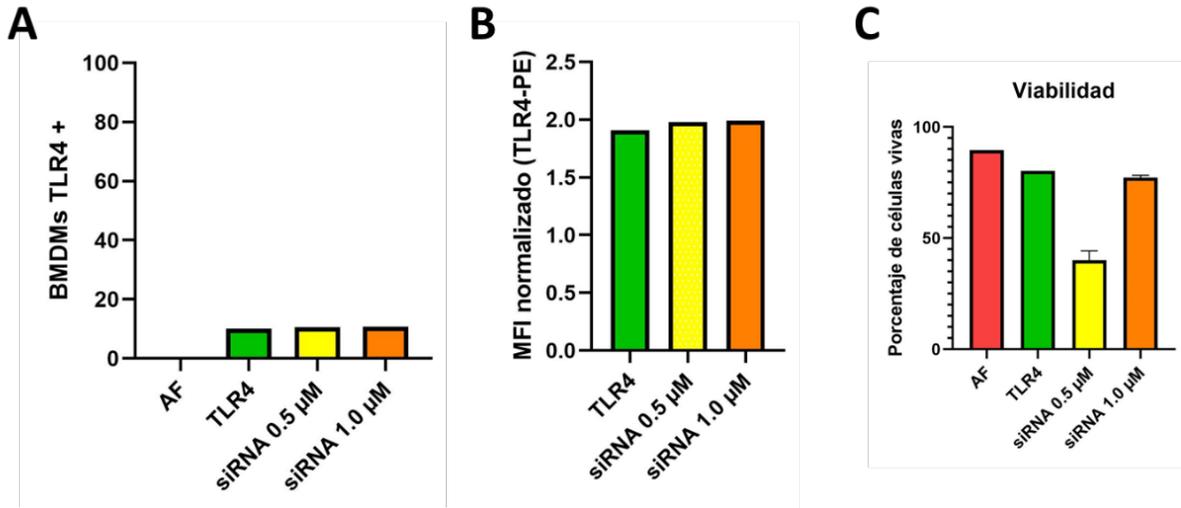
se observa que FLH genera un alza, pero no significativa de las 3 citoquinas a una concentración de 2,0 mg/ml.

### 7.3.3 Silenciamiento de TLR4 en un cultivo primario de BMDMs

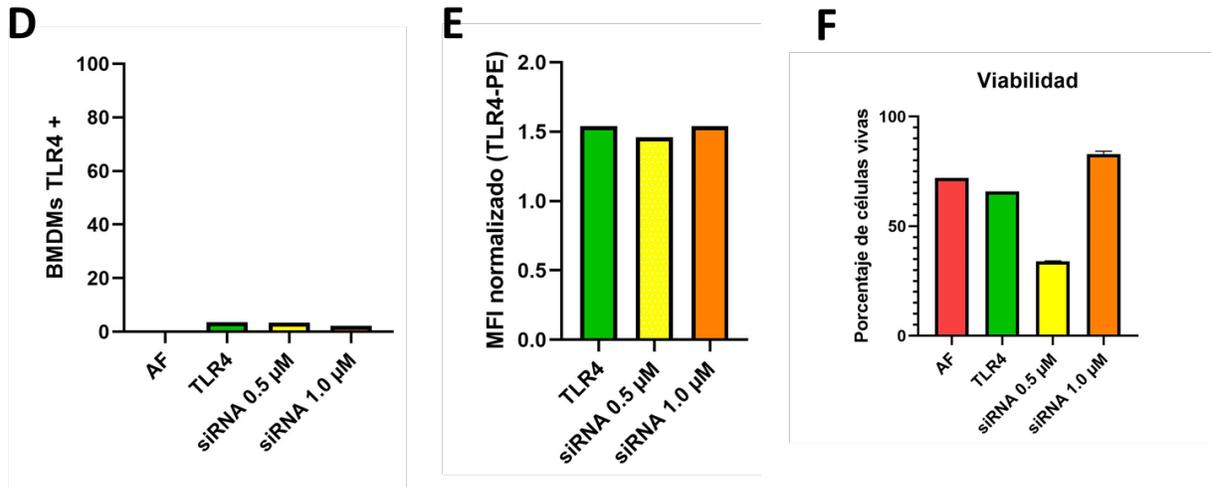
Habiendo encontrado una concentración de hemocianina y la presencia del receptor TLR4, se prosiguió a transfectar cultivos de BMDMs de manera similar que en **6.4**. Brevemente, 1,6 a 2,0 por  $10^6$  células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y transfectadas con una mezcla de 500 o 1.000 pmol de TLR4 siRNA y 9  $\mu$ l de RNAiMAX Lipofectamina alcanzando una concentración por pocillo de 0,5 y 1,0  $\mu$ M durante 6 horas y luego, se completó con 1ml de medio completo durante 18 horas y se analizó los niveles de TLR4 mediante citometría de flujo a las 24 y 48 horas.

La **Figura 21** muestran los resultados obtenidos a las 24 y 48 horas de la transfección realizada en las BMDMs. En el gráfico **21A** se observa que las células sin transfectar poseen bajos niveles de TLR4 (alrededor de un 10%) y que no hay diferencias de este control respecto a las células transfectadas a 0,5 y 1,0  $\mu$ M. De la misma manera, en **21B** no se observa diferencias en la MFI de las células transfectadas con ambas concentraciones y el control. Respecto a la viabilidad celular, en **21C** se muestra que las células sin tratar poseen una viabilidad de alrededor del 80%. Por el contrario, las células transfectadas a 0,5  $\mu$ M poseen una viabilidad menor que el control, lo que no se aprecia a 1,0  $\mu$ M, lo que indicaría que no es efecto de la concentración del siRNA (**21C**). De manera similar al punto de 24 horas, en el punto de 48 horas no se observan diferencias en el porcentaje de células TLR4+ y MFI de las células transfectadas y no transfectadas (**21D** y **21E**). Respecto a la viabilidad, se observa el mismo comportamiento que en **21C**, e inclusive con una pequeña mejora en la viabilidad de las células transfectadas a 1,0  $\mu$ M (**21E**). Interesantemente, con el transcurso de los días comienza a disminuir la expresión basal de TLR4, desde el día 7 de diferenciación, hasta el día 9, según lo mostrado en las **Figuras 19D** y **21D**. Inicialmente, al día 7 se obtuvo en promedio alrededor de 30% y al día 9 valores cercanos al 3% de TLR4.

## 24 horas



## 48 horas



**Figura 21. Evaluación mediante citometría de flujo de los niveles de TLR4 en BMDMs transfectados con un siRNA.** Cultivos de BMDMs fueron transfectados a una concentración de 0,5 y 1,0 µM durante 24 y 48 horas, y analizados por citometría de flujo. En ambos experimentos se utilizó un control negativo (AF) y un control positivo con las células sin tratar (TLR4). **A, B y C.** Gráficos del porcentaje de células TLR4+, MFI y viabilidad a las 24 horas. **D, E, y F.** Gráficos del porcentaje células TLR4+, MFI y viabilidad a las 48 horas. El error está dado por el promedio de SEM. Los gráficos muestran los resultados de 1 experimento, por esta razón no se realizó un análisis estadístico.

## 8. DISCUSIÓN

Las hemocianinas son un conjunto de glicoproteínas obtenidas de diferentes moluscos, ampliamente utilizadas en el campo de la biotecnología y biomedicina por sus características inmunogénicas. Su función fisiológica más conocida es el transporte de oxígeno, sin embargo, más recientemente se han descrito otras funciones que incluyen funciones inmunológicas en dichos organismos (76) Dado su efecto inmunomodulador no específico, estas moléculas han sido empleadas como adyuvantes de vacunas experimentales contra modelos murinos de cáncer oral, superficial de vejiga y próstata, entre otros (77). Estudios previos de nuestro laboratorio han permitido comprender mayormente la estructura y efectos de algunas hemocianinas como CCH, FLH y KLH. A partir de sus características moleculares, se ha investigado como es el mecanismo de acción de estas glicoproteínas sobre APCs, encontrándose que una de las características más relevantes para la comprensión de su agonismo sobre los PRRs, es la presencia de azúcares, alcanzando hasta un 5,5% en FLH y, siendo manosa el azúcar predominante (16). En efecto, se ha demostrado que las hemocianinas se unen a PRRs de forma azúcar-dependiente, entre ellos: MR, DC-SING, MGL y TLR4 (25).

Se ha descrito que el uso de inhibidores farmacológicos de la vía de señalización de TLR4 y anticuerpos bloqueadores de TLR4 en APCs incubadas con hemocianinas, generan una disminución en la secreción de citoquinas proinflamatorias, corroborando fuertemente así, el agonismo de TLR4 y dichas glicoproteínas. Además, estos datos se han corroborados en un modelo murino *KO* para TLR4, donde se observa que estos ratones secretan menos IL-6 respecto a los *Wild Type* cuando son estimulados con FLH. También se ha demostrado la unión de las hemocianinas al MR, receptor que no posee un dominio de señalización celular río abajo, por lo cual requiere asociarse a otros receptores, como TLR4, para gatillar la activación de las APC (27,28). En este contexto, una hipótesis de nuestro laboratorio plantea que la unión de las hemocianinas con el MR favorecería la formación de agrupaciones (*clusters*) de PRRs, donde aumentarían las interacciones de MR con TLR4 para activar finalmente a la APC y gatillar la diferenciación hacia linfocitos T *helper* 1, por tratarse de un antígeno timo-dependiente. Dentro de esto último, el agonismo de las hemocianinas sobre estos receptores de inmunidad innata permitiría activar la APC, aumentando la endocitosis de las hemocianinas, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la activación de la inmunidad innata y adaptativa hacia a un fenotipo Th1 (25).

No obstante, a pesar de los antecedentes señalados anteriormente, que conducen fuertemente a comprender la interacción de TLR4 y estas glicoproteínas para ejercer su efecto proinflamatorio e inmunoestimulante, se consideró realizar nuevas investigaciones para profundizar en el conocimiento de la participación de TLR4 en este efecto de las hemocianinas. En respuesta a ello, durante esta

Tesis se planteó utilizar una línea celular de macrófagos murinos J774.2 y un cultivo primario de macrófagos derivados de médula ósea de ratón, para estudiar los efectos de la interacción entre las hemocianinas y TLR4. Los resultados de este trabajo confirmaron el efecto proinflamatorio que poseen CCH y FLH mediante la secreción de citoquinas con perfil Th1. También se determinó la presencia del receptor TLR4 en estas células, por lo cual se consideraron modelos preliminares adecuados para realizar el estudio de las hemocianinas y su efecto proinflamatorio mediado por TLR4. Cumpliéndose estas características, se diseñó un protocolo de silenciamiento transiente de la línea de macrófagos J774.2 y macrófagos derivados de médula ósea, mediante la utilización de vehículos liposomales y siRNA para silenciar la expresión de este receptor.

### **8.1 La expresión de TLR4 en la línea celular J774.2 es alta y constitutiva.**

Anteriormente, datos de nuestro laboratorio han corroborado la interacción entre las hemocianinas y receptores de inmunidad innata en APCs. Sin embargo, se consideró que obtener más información sobre TLR4 era fundamental para comprender la función de este receptor y su asociación con MR en la activación de la APCs por hemocianinas. Dicho esto, la selección de un modelo que tuviese alta expresión de TLR4 fue clave para el estudio de este fenómeno. Considerando la literatura actual y los recursos que poseía nuestro laboratorio, en una primera instancia para esta Tesis se realizó una caracterización mediante citometría de flujo de la línea celular de macrófagos J774.2 proveniente de ratones BALB/c, la cual fue reclonada a partir de la línea J774.1. Los datos obtenidos de la citometría mostraron una alta expresión de TLR4, alcanzando valores sobre el 70 % al tiempo 0 del análisis. Algunos datos bibliográficos muestran aproximaciones similares con este receptor en la línea J774.2. En efecto, se ha visto la relación de la vía de transducción asociada a TLR4 en estos macrófagos, previa determinación de este receptor por citometría de flujo, sin embargo, esos datos fueron mencionados, pero no mostrados (78). En consecuencia, dada la alta presencia constitutiva de TLR4 en esta línea celular, y para efectos de esta Tesis, se consideró que este modelo de APC cumplía con el requisito de expresar el receptor de interés, siendo apto para futuros estudios mediante transfecciones con un siRNA anti-TLR4 para silenciar este receptor y determinar el efecto en la secreción de citoquinas proinflamatorias inducidas por hemocianinas.

### **8.2 Las hemocianinas CCH y FLH inducen un aumento de IL-6 pero no de IL-12p40 y TNF en la línea J774.2.**

Dado que las hemocianinas son proteínas de origen natural, las mutaciones que se generan en el tiempo en las distintas especies son desconocidas. En respuesta a esto, para cada lote de

extracción y purificación de estas glicoproteínas es importante determinar su potencia farmacológica, con el fin de establecer una concentración óptima de estimulación. Por esta razón, se realizó un análisis de dosis-respuesta en la línea celular J774.2 frente a diferentes concentraciones de CCH y FLH. Datos previos de nuestro laboratorio han determinado la viabilidad en estas células cuando son estimuladas hasta una concentración 2,0 mg/ml, donde no se ha visto un efecto citotóxico significativo. Los resultados obtenidos en la **Figura 8** muestran que CCH y FLH inducen un aumento significativo de IL-6 a partir de concentraciones de 0,1 mg/ml a 0,5 mg/ml. Sin embargo, ni CCH ni FLH generaron un aumento de IL-12p40 y TNF en estas células. Dado que existe una alta secreción basal de IL-6, la línea J774.2 puede no ser un buen modelo para determinar la potencia farmacológica de las hemocianinas, principalmente porque el eje de IL-1 $\beta$  (no determinada en esta Tesis, pero documenta) e IL-6 está constitutivamente activo, por lo que genera un sesgo en la eficacia que poseen las hemocianinas como ligandos farmacológicos (79). Además de lo anterior, estas proteínas no se comportan de manera dosis-respuesta frente a esta línea celular, disminuyendo notablemente los niveles de IL-6 a medida que aumenta la concentración de hemocianinas, lo cual podría explicarse a partir de la regulación de los PRRs, generada por la sobresaturación y sobreestimulación del medio con estas mega proteínas, aumentando así la presión oncótica en el medio y generando una regulación negativa de estos receptores, una hipótesis que debe ser corroborada experimentalmente. Algunos datos bibliográficos muestran que los niveles de TLR4 pueden disminuir frente a una larga exposición de agonistas, disminuyendo a su vez la secreción de citoquinas proinflamatorias cuando son estimulados por LPS. En efecto, se ha descrito que un mecanismo por el cual existe esta regulación negativa de TLR4 es través de un miRNA que silencia en la sección 3'-UTR de TLR4 (80).

### **8.3 La utilización de Lipofectamina en las células J774.2 permite incorporar un siRNA fluorescente**

Durante el desarrollo de esta Tesis, se trabajó optimizando un protocolo de transfección para la línea J774.2. En la citometría de flujo se observó un aumento de las células positivas para FITC y MFI, indicando fuertemente junto con las imágenes al microscopio que el reactivo de transfección (SCB) permite la incorporación del siRNA-FITC. No obstante, un control más exacto para corroborar dicha entrada del siRNA-FITC a las células sería una microscopía confocal, para verificar que, efectivamente el siRNA fluorescente se encuentra al interior de las células analizadas. Un problema en el empleo de estos vehículos liposomales es que los proveedores los entregan sin especificar la concentración en que se encuentran, por lo que se emplean experimentalmente como volumen y no como concentraciones, dificultando así, la comparación con otros protocolos publicados de manera precisa. Llamativamente, en algunos trabajos se señala que la utilización de transfecciones con Lipofectamina es altamente variable para los controles. Aun teniendo un valor mayor a un 99% de incorporación del

siRNA-FITC mediante citometría de flujo, la transfección de un plásmido GFP utilizando las mismas condiciones puede alcanzar de un 30 a un 50 % (71, 81).

#### **8.4 El silenciamiento génico de TLR4 en la línea J774.2 mediante el uso de un siRNA/Lipofectamina no es eficiente**

Para estudiar el efecto proinflamatorio inducido por las hemocianinas y su relación con TLR4 en APCs, se procedió a utilizar un siRNA anti-TLR4. Inicialmente se trabajó siguiendo las recomendaciones del fabricante, y posteriormente se realizaron modificaciones en el protocolo para determinar el tiempo y la cantidad de reactivos a utilizar, buscando obtener una transfección reproducible y eficiente (sobre el 70% de la proteína o gen silenciado (81)). En la tercera transfección se aumentó la concentración de siRNA usada, observándose que a las 24 horas si existe una inhibición mayor y cercana al 70% de ambos parámetros (porcentaje y MFI) lo cual se revertía a las 48 horas. Con este promisorio resultado, se prosiguió solo con los análisis a las 24 horas y concentraciones de siRNA mayores a 1,0  $\mu$ M. En las transfecciones siguientes, de la cuarta a la octava, se realizaron tres transfecciones independientes de distintos pasajes de células con altas concentraciones de siRNA, sin embargo, en ninguna repetición se lograron los valores esperados de inhibición. Dado estos resultados, se utilizó otro Kit de transfección proveniente de Thermo Fischer, las cuales corresponden a las últimas dos transfecciones del objetivo 2, donde observa que los niveles de TLR4 tampoco disminuyen según lo esperado. Además, para corroborar estos datos a nivel de expresión génica se realizó un RT-qPCR, obteniéndose resultados que concuerdan con los obtenidos en la citometría, donde no se observa una inhibición de la expresión del gen ni los niveles de TLR4 a las concentraciones utilizadas.

Datos bibliográficos consideran las transfecciones en macrófagos como un gran desafío, principalmente por sus características genotípicas, fenotípicas y funcionales. Además, autores como De Arras *et al.* (2014) mencionan que dependiendo de la forma en qué se transfectan estas células, se pueden obtener diferentes eficiencias en el *knockdown* del gen mediado por un siRNA. Durante el mismo trabajo, diseñaron un protocolo para transfectar células RAW264.7 y J774A.1 mediante electroporación, puesto que obtuvieron mejores resultados en el porcentaje de inhibición con este método en comparación a Lipofectamina. En este mismo trabajo, se menciona que es difícil obtener transfecciones eficientes usando reactivos lipídicos en macrófagos sin una toxicidad asociada. Sumado a esto, los autores señalan que aun cuando la entrega del siRNA es eficientemente ingresada a los macrófagos, la potencia sobre el *knockdown* que induce el siRNA puede ser bastante moderada y su vez, dependiente de cada gen. Contrastando estos antecedentes con los resultados obtenidos en esta Tesis, los valores obtenidos de la incorporación muestran que un 80% en promedio las células

J774.2 son FITC+, pero al transfectar estas mismas células con el siRNA anti-TLR4 no se alcanza una inhibición eficiente, **por lo que se infiere que la ineficiencia de transfección no está ligada a la entrega del siRNA anti-TLR4, sino que más bien, estaría asociado a la regulación del gen *tlr4* en los macrófagos.**

En los resultados sobre la expresión de TLR4 para J774.2, se observa que, una gran parte de la población es TLR4+, cuyo valor aumentó en varias transfecciones cuando se medían a las 24 horas. La línea J774.2 secreta basalmente altos niveles de IL-6, lo que se puede observar en los ELISA realizados a las 24 horas (**Figura 8**). Dado el carácter de esta citoquina, creemos que su efecto pudiese volver a los macrófagos aún más proinflamatorios, aumentando la expresión de genes, entre ellos el de TLR4. En efecto, esto se correlacionaría con los resultados obtenidos sobre el RT-qPCR realizado, donde se observa una leve tendencia al alza en la expresión génica relativa de las células transfectadas a 1,5 y 2,0  $\mu$ M, respecto a las no transfectadas. Por otra parte, otra causa importante a considerar y que podría estar afectando la eficiencia de las transfecciones, es la mitosis de estas células. La línea J774.2 posee un tiempo de división aproximado de 17 horas, razón por la cual esta división podría estar afectando las mediciones a horas más tardías de 24 y 48 horas. Además, distintos proveedores han mencionado que el uso de células con un alto número de pasajes (> 20 o > 30) genera transfecciones ineficientes. Dado que nuestro laboratorio lleva muchos años trabajando con esta línea celular, es probable que el alto número de pasajes que tienen las células J774.2 utilizadas para este trabajo, esté afectando también la poca eficiencia obtenida con el siRNA.

Por otra parte, se ha documentado que la secuencia génica del siRNA diseñado también afecta los niveles de inhibición del mRNA estudiado. El grupo de Xu *et al.* (2007) realizó un trabajo sobre macrófagos RAW.273, en donde utilizó 9 secuencias distintas de un siRNA anti-TLR4, y encontró una alta variabilidad en la inhibición, desde un 0% a un 88% medido por *Western blot* (82). Dado que los siRNA utilizados son comerciales, prediseñados y probados en otras líneas celulares, es posible que este diseño genere una variabilidad importante en los macrófagos y sobre todo en la línea J774.2 utilizada en esta tesis como modelo de estudio.

De acuerdo a nuestros resultados, no podemos responder la hipótesis planteada. Sin embargo, considerando la información publicada por nuestro laboratorio sobre la respuesta proinflamatoria inducida por las hemocianinas en APCs y su relación con TLR4, podríamos especular que el silenciamiento completo de TLR4 y posterior incubación con las hemocianinas, generaría una inhibición parcial de la respuesta proinflamatoria generada por los macrófagos en estudio. Se conoce que las hemocianinas se unen a diferentes receptores de inmunidad innata, por ende, es posible que en un caso de silenciamiento completo de TLR4, estas glicoproteínas generen la activación de la respuesta inmune vía otros receptores, generando un aumento de las citoquinas en estudio. No

obstante, la inhibición completa de TLR4 se obtendría solo en un caso teórico en los modelos utilizados, ya que en la mayoría de las transfecciones realizadas se obtuvo una inhibición parcial y bajo un 70 %. La máxima inhibición lograda en el porcentaje de células TLR4+ fue de un 72,4 %, por lo que existió un remanente de células que aún expresaban este receptor. En respuesta a este último punto, la incubación con las hemocianinas generaría un alza en los niveles de IL-6 dado el remanente de células TLR4+, la cual se esperaría que fuese significativamente menor comparado con las células estimuladas, pero no silenciadas. Otro dato importante por considerar es que las hemocianinas endocitadas por APCs. al ser procesadas antigénicamente más lentamente que los antígenos proteicos conocidos, podrían exponer péptidos provenientes de las FUs con restos de residuos de oligosacáridos a TLRs intracelulares u otros receptores que reconozcan motivos de carbohidratos, pudiendo gatillar finalmente la respuesta de las APCs (83). Respecto a este último punto, los receptores tipo NOD son una familia de receptores que reconoce glicoproteínas intracelularmente. Dentro de ellos, NOD1 y NOD2 reconocen secciones específicas del peptidoglicano (PGN), cuya presencia es fundamental para la sobrevivencia y protección de bacterias. El PGN se construye por cadenas de glucanos formadas por residuos alternos unidos por enlaces  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), donde el GlcNAc también está presente como motivo de carbohidratos en las hemocianinas (16). Si bien la presencia de azúcares no es esencial para la activación de NOD1, la cadena de glucanos sí lo es para la activación de NOD2, receptor que está presente en macrófagos. Además, otros receptores asociados a esta misma familia son los NLRP, que responden a DAMPs y PAMPs participando en la formación del inflamosoma. Respecto a las moléculas que reconocen, entre ellas se encuentra el LPS, estructura que comparte motivos de carbohidratos con las hemocianinas. Teniendo estas similitudes estructurales, algunos receptores tipo NOD podrían ser potenciales participantes de la activación de la respuesta a nivel intracelular mediada por hemocianinas en APCs (84, 85, 86).

Dentro de las proyecciones para continuar con los estudios de las hemocianinas y su relación con TLR4, se plantea el uso de un anticuerpo bloqueador e inhibidor de este receptor, cuyo uso no ha sido empleado en los modelos de macrófagos utilizados en esta Tesis. Por lo demás, a la fecha se han desarrollado nuevas tecnologías para generar el *knockdown* de receptores. En efecto, existen Kits comerciales del sistema CRISPR-Cas9 para el silenciamiento de TLR4 que podría ser útil para el estudio de su participación en el efecto proinflamatorio e inmunomodulador de las hemocianinas. Recientemente han sido publicados datos sobre la eficacia de este sistema en células epiteliales, demostrado que en las células TLR4 KO se atenúa la respuesta inflamatoria inducida por LPS (87). Por otra parte, también se podría considerar usar líneas células KO para TLR4, como los macrófagos humanos THP-1 Dual, los cuales contribuirían a entender mayormente la interacción de las hemocianinas con TLR4 (trabajo en marcha de Diego Díaz, Tesis doctoral de Bioquímica, Universidad de Chile). En particular, las THP-1 poseen las vías de señalización de TLR4 ligadas a NF- $\kappa$ B y IRF-1,

las cuales generan fosfatasa alcalina y actividad de luciferasa para ser medidas en respuesta al agonismo de TLR4, respectivamente (88).

## 9. CONCLUSIONES

1. Se comprobaron altos y significativos niveles de expresión (>70%) de TLR4 en la línea J774.2, y la estimulación de estas células con CCH y FLH indujeron niveles significativos de IL-6, pero no de IL-12p40 y TNF, resultados que hicieron promisorio esta línea para realizar el silenciamiento de TLR4.
2. Si bien la línea celular J774.2 incorpora significativamente un siRNA fluorescente utilizando un vehículo liposomal como Lipofectamina, los resultados del silenciamiento de TLR4 usando el mismo método con un siRNA anti-TLR4 no fueron reproducibles, imposibilitando el estudio de TLR4 y las hemocianinas en ausencia de este receptor.
3. Las BMDMs presentan niveles significativos pero bajos en porcentaje (~30%) de TLR4 en comparación la línea J774.2, y al estimular con FLH se indujo una tendencia al alza, pero no significativa de las citoquinas IL-6, IL-12p40 y TNF.
4. Dado los bajos niveles de TLR4 y la ineficacia del siRNA y vehículos liposomales para inhibir su expresión, se concluye que el cultivo primario de macrófagos derivados de médula ósea no es un buen modelo de estudio para un ensayo con estas características.

## 10. REFERENCIAS

1. Del Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., Gonzalez, A., Moltedo, B., Becker, M. I. (2011). Hemocyanins as immunostimulants. *Revista médica de Chile*, 139(2), 236-246.
2. Becker, M. I., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M., & De Ioannes, A. (2014). Mollusk hemocyanins as natural immunostimulants in biomedical applications. En: *Immune Response Activation*. InTech, 45-72.
3. Markl, J., Lieb, B., Gebauer, W., Altenhein, B., Meissner, U., & Harris, J. R. (2001). Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127(2), R3-R9.
4. Musselli, C., Livingston, P. O., & Ragupathi, G. (2001). Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: The Memorial Sloan Kettering experience. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 127(2), R20-R26.
5. Hughes, E. E., Gilleland, H. E Jr. (1995). Ability of synthetic peptides representing epitopes of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* to afford protection against *P.aeruginosa* infection in a murine acute pneumonia model. *Vaccine*, 13(18),1750-3.
6. May, R. J., Beenhouwer, D. O., Scharff, M. D. (2003). Antibodies to keyhole limpet hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4905-4912.
7. Fan, J., Liang, X., Horton, M. S., Perry, H. C., Citron, M. P., Heidecker, G. J., Fu T. M., Joyce J, Przysiecki, C. T., Keller, P. M., Garsky, V. M., Ionescu, R., Rippeon, Y., Shi, L., Chastain, M.A., Condra, J. H, Davies, M. E., Liao, J., Emini, E. A., Shiver, J. W. (2004) Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 22(23-24), 2993-3003.
8. Palacios, M., Tampe, R., Del Campo, M., Zhong, T. Y., López, M. N., Salazar-Onfray, F., Becker, M. I. (2018). Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 74-86.
9. Van Holde KE, Miller KI. Hemocyanins. (1995). *Advances in Protein Chemistry*, 47, 1–81.
10. Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., & Tanaka, Y. (2018). Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophysical Reviews*, 10(2), 191-202.
11. Gatsogiannis, C., Markl, J. (2009). *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. *Journal of Molecular Biology*, 385(3), 963-983.
12. Swerdlow, R. D., Ebert, R. F., Lee, P., Bonaventura, C., & Miller, K. I. (1996). *Keyhole limpet* hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and

- multimers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 113(3), 537-548.
13. Kurokawa, T., Wuhrer, M., Lochnit, G., Geyer, H., Markl, J., Geyer, R. (2002). Hemocyanin from the *keyhole limpet Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal ( $\beta$ 1–6) Man-motifs. *European Journal of Biochemistry*, 269(22), 5459-5473.
  14. HALL, R. L., WOOD, E. J. (1976). The carbohydrate content of gastropod haemocyanins. *Biochemical Society Transactions*, 4(2), 307-309.
  15. De Ioannes, P., Moltedo, B., Oliva, H., Pacheco, R., Faunes, F., De Ioannes, A. E., Becker, M. I. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26134-26142.
  16. Arancibia, S., Espinoza, C., Salazar, F., Del Campo, M., Tampe, R., Zhong, T. Y., ... Manubens, A. (2014). A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PloS One*, 9(1).
  17. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L., Glimcher, L. H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annual Review of Immunology*, 21(1), 713-758.
  18. Geyer, H., Wuhrer, M., Kurokawa, T., & Geyer, R. (2004). Characterization of *keyhole limpet* hemocyanin (KLH) glycans sharing a carbohydrate epitope with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. *Micron*, 35(1-2), 105-106.
  19. May, R. J., Beenhouwer, D. O., Scharff, M. D. (2003). Antibodies to *keyhole limpet* hemocyanin cross-react with an epitope on the polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* and other carbohydrates: implications for vaccine development. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4905-4912.
  20. Wirguin, I., Suturkova-Milosević, L., Briani, C., Latov, N. (1995). *Keyhole limpet* hemocyanin contains Gal ( $\beta$ 1–3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 40(5), 307-310.
  21. Salazar, M. L., Jiménez, J. M., Villar, J., Rivera, M., Báez, M., Manubens, A., Becker, M. I. (2019). N-Glycosylation of mollusk hemocyanins contributes to their structural stability and immunomodulatory properties in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19546-19564.
  22. Harris, J. R., Markl, J. (1999). *Keyhole limpet* hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*, 30(6), 597-623.
  23. Siddiqui, N. I., Idakieva, K., Demarsin, B., Doumanova, L., Compennolle, F., & Gielens, C. (2007). Involvement of glycan chains in the antigenicity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(3), 705-711.
  24. Svensson, M., Pfeifer, J., Stockinger, B., Wick, M. J. (1997). Bacterial antigen delivery systems: phagocytic processing of bacterial antigens for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *Behring Institute Mitteilungen*, 98, 197.

25. Jiménez, J. M., Salazar, M. L., Arancibia, S., Villar, J., Salazar, F., Brown, G. D., ... Manubens, A. (2019). TLR4, but neither Dectin-1 nor Dectin-2, participates in the mollusk hemocyanin-induced proinflammatory effects in antigen-presenting cells from mammals. *Frontiers in Immunology*, 10, 1136.
26. McGreal, E. P., Miller, J. L., Gordon, S. (2005). Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Current Opinion in Immunology*, 17(1), 18-24.
27. Van Vliet, S. J., García-Vallejo, J. J., Van Kooyk, Y. (2008). Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunology & Cell Biology*, 86(7), 580-587.
28. Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y., Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100(5), 575-585.
29. Zhong, T. Y., Arancibia, S., Born, R., Tampe, R., Villar, J., Del Campo, M., Becker, M. I. (2016). Hemocyanins stimulate innate immunity by inducing different temporal patterns of proinflammatory cytokine expression in macrophages. *The Journal of Immunology*, 196(11), 4650-4662.
30. Patin, E. C., Thompson, A., Orr, S. J. (2019). Pattern recognition receptors in fungal immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 89, 24-33.
31. Steinman, R. M., Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161), 419-426.
32. Dambuzá, I. M., Brown, G. D. (2015). C-type lectins in immunity: recent developments. *Current Opinion in Immunology*, 32, 21-27.
33. Sancho, D., & Reis e Sousa, C. (2012). Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annual Review of Immunology*, 30, 491-529.
34. Wang, X. W., Vasta, G. R., Wang, J. X. (2020). The functional relevance of shrimp C-type lectins in host-pathogen interactions. *Developmental & Comparative Immunology*, 103708.
35. Borriello, F., Zanoni, I., Granucci, F. (2020). Cellular and molecular mechanisms of antifungal innate immunity at epithelial barriers: The role of C-type lectin receptors. *European Journal of Immunology*, 50(3), 317-325.
36. Geijtenbeek, T. B., Gringhuis, S. I. (2016). C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 16(7), 433-448.
37. Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4(7), 499-511.
38. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
39. Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, 11(5), 373.

40. De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74(2), 181-189.
41. Manicassamy, S., Pulendran, B. (2009). Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors. *Seminars in Immunology*, 21(4), 185-193.
42. National Center for Biotechnology Information. (2020). *Homo sapiens toll like receptor 4 (TLR4), RefSeqGene on chromosome 9*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_011475.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_011475.1)
43. Ensembl (2020) *Transcript: TLR4-201*. Recuperado de : [https://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Summary?db=core:g=ENSG00000136869;r=9:117704175-117724735;t=ENST00000355622](https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core:g=ENSG00000136869;r=9:117704175-117724735;t=ENST00000355622)
44. Giordano, N. P., Cian, M. B., Dalebroux, Z. D. (2020). Outermembrane lipid secretion and the innate immune response to Gram-negative bacteria. *Infection and Immunity*, 88(7)
45. Flo, T. H., Ryan, L., Latz, E., Takeuchi, O., Monks, B. G., Lien, E., Espevik, T. (2002). Involvement of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in cell activation by mannuronic acid polymers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35489-35495.
46. Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., ... Miyake, K. (2002). *Saccharomyces cerevisiae*-and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14-and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiology and Immunology*, 46(7), 503-512.
47. Beck, L., Van-Lüme, D. S., Souza, J. R., Domingues, A. L., Favre, T., Abath, F. G., Montenegro, S. M. (2008). Discriminating acute from chronic human *schistosomiasis mansoni*. *Acta tropica*, 108(2-3), 229-233.
48. Viriyakosol, S., Tobias, P. S., Kitchens, R. L., Kirkland, T. N. (2001). MD-2 binds to bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 38044-38051.
49. Ohto, U., Fukase, K., Miyake, K., Shimizu, T. (2012). Structural basis of species-specific endotoxin sensing by innate immune receptor TLR4/MD-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19), 7421-7426.
50. Molteni, M., Gemma, S., Rossetti, C. (2016). The role of toll-like receptor 4 in infectious and noninfectious inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2016 (1), 1-9.
51. National Center for Biotechnology Information. (2020). *Toll-like receptor 4, partial [Mus musculus musculus]*. Recuperado de: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGY29756.1?report=genbank&log\\$=protalign&blast\\_rank=1&RID=G21ZV5RU014&from=1&to=748](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AGY29756.1?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RID=G21ZV5RU014&from=1&to=748)
52. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G., et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med*. 2003;29:530–538. doi: 10.1007/s00134-003-1662-x

53. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3) JAMA. 2016;315:801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
54. Keynan Y., Fowke K.R., Ball T.B., Meyers A.F.A. Toll-like receptors dysregulation after influenza virus infection: Insights into pathogenesis of subsequent bacterial pneumonia. ISRN Pulmonol. 2011;2011 doi: 10.5402/2011/142518.
55. Bachtell R., Hutchinson M.R., Wang X., Rice K.C., Maier S.F., Watkins L.R. Targeting the toll of drug abuse: The translational potential of Toll-like receptor 4. CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2015;14:692–699. doi: 10.2174/1871527314666150529132503.
56. Liu J., Buisman-Pijlman F., Hutchinson M.R. Toll-like receptor 4: Innate immune regulator of neuroimmune and neuroendocrine interactions in stress and major depressive disorder. Front. Neurosci. 2014;8:309. doi: 10.3389/fnins.2014.00309.
57. Wu M.K., Huang T.L., Huang K.W., Huang Y.L., Hung Y.Y. Association between toll-like receptor 4 expression and symptoms of major depressive disorder. Neuropsychiatr. Dis. Treat. 2015;11:1853–1857.
58. De Paola M., Sestito S.E., Mariani A., Memo C., Fanelli R., Freschi M., Bendotti C., Calabrese V., Peri F. Synthetic and natural small molecule TLR4 antagonists inhibit motoneuron death in cultures from ALS mouse model. Pharmacol. Res. 2016;103:180–187. doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.020.
59. Thakur K.K., Saini J., Mahajan K., Singh D., Jayswal D.P., Mishra S., Bishayee A., Sethi G., Kunnumakkara A.B. Therapeutic implications of toll-like receptors in peripheral neuropathic pain. Pharmacol. Res. 2017;115:224–232. doi: 10.1016/j.phrs.2016.11.019.
60. Bettoni I., Comelli F., Rossini C., Granucci F., Giagnoni G., Peri F., Costa B. Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: Efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice. Glia. 2008;56:1312–1319. doi: 10.1002/glia.20699.
61. Lu, H., Wu, L., Liu, L., Ruan, Q., Zhang, X., Hong, W., ... & Bai, Y. (2018). Quercetin ameliorates kidney injury and fibrosis by modulating M1/M2 macrophage polarization. *Biochemical pharmacology*, 154, 203-212.
62. Gong, J., Li, J., Dong, H., Chen, G., Qin, X., Hu, M., ... & Lu, F. (2019). Inhibitory effects of berberine on proinflammatory M1 macrophage polarization through interfering with the interaction between TLR4 and MyD88. *BMC complementary and alternative medicine*, 19(1), 1-12.
63. Krishnan, J., Anwar, M. A., Choi, S. (2018). TLR4 (Toll-Like Receptor 4). *Journal Encyclopedia of Signaling Molecules*, 5472-5483.
64. Trombetta, E. S., Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annual Review of Immunology.*, 23, 975-1028.
65. Hu, B., Zhong, L., Weng, Y., Peng, L., Huang, Y., Zhao, Y., Liang, X. J. (2020). Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1-25.

66. Kim, Y. K. (2020). RNA Therapy: Current Status and Future Potential. *Chonnam Medical Journal*, 56(2), 87.
67. Lin, Y. X., Wang, Y., Blake, S., Yu, M., Mei, L., Wang, H., Shi, J. (2020). RNA Nanotechnology-Mediated Cancer Immunotherapy. *Theranostics*, 10(1), 281.
68. Fujita, Y., Kuwano, K., Ochiya, T. (2015). Development of small RNA delivery systems for lung cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5254–5270.
69. Carthew, R. W., Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655.
70. Babu, A., Muralidharan, R., Amreddy, N., Mehta, M., Munshi, A., Ramesh, R. (2016). Nanoparticles for siRNA-based gene silencing in tumor therapy. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 15(8), 849-863.
71. De Arras, L., Guthrie, B. S., Alper, S. (2014). Using RNA-interference to investigate the innate immune response in mouse macrophages. *Journal of Visualized Experiment*. (93), e51306.
72. Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P., Nakoinz, I. (1978). Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15(1), 261-267.
73. Zhang, X., Goncalves, R., & Mosser, D. M. (2008). The isolation and characterization of murine macrophages. *Current protocols in immunology*, 83(1), 14-1.
74. Somasundar, P., Riggs, D. R., Jackson, B. J., & McFadden, D. W. (2005). Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. *The American journal of surgery*, 190(5), 713-716.
75. Riggs, D. R., Jackson, B. J., Vona-Davis, L., Nigam, A., & McFadden, D. W. (2005). In vitro effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regards to cell growth, cytokine production, and apoptosis. *The American journal of surgery*, 189(6), 680-684.
76. Coates, C. J., & Nairn, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental & Comparative Immunology*, 45(1), 43-55.
77. Mora Román, J. J., Del Campo, M., Villar, J., Paolini, F., Curzio, G., Venuti, A., ... & Becker, M. I. (2019). Immunotherapeutic potential of mollusk hemocyanins in combination with human vaccine adjuvants in murine models of oral cancer. *Journal of immunology research*, 2019.
78. Broad, A., Kirby, J. A., Jones, D. E., & Applied Immunology and Transplantation Research Group. (2007). Toll-like receptor interactions: tolerance of MyD88-dependent cytokines but enhancement of MyD88-independent interferon- $\beta$  production. *Immunology*, 120(1), 103-111.
79. Merck. (1 de noviembre de 2021). [https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/cb\\_85011428?context=product](https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/product/sigma/cb_85011428?context=product)
80. Krueger, U., Bergauer, T., Kaufmann, B., Wolter, I., Pilk, S., Heider-Fabian, M., ... & Konrad, J. (2007). Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening. *Oligonucleotides*, 17(2), 237-250.

81. Carralot, J. P., Kim, T. K., Lenseigne, B., Boese, A. S., Sommer, P., Genovesio, A., & Brodin, P. (2009). Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. *Journal of biomolecular screening*, 14(2), 151-160.
82. Xu, Z., Huang, C. X., Li, Y., Wang, P. Z., Ren, G. L., Chen, C. S., ... & Bai, X. F. (2007). Toll-like receptor 4 siRNA attenuates LPS-induced secretion of inflammatory cytokines and chemokines by macrophages. *Journal of Infection*, 55(1), e1-e9.
83. Arancibia, S., Campo, M. D., Nova, E., Salazar, F., & Becker, M. I. (2012). Enhanced structural stability of Concholepas hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *European journal of immunology*, 42(3), 688-699.
84. D'Ambrosio, E. A., Drake, W. R., Mashayekh, S., Ukaegbu, O. I., Brown, A. R., & Grimes, C. L. (2019). Modulation of the NOD-like receptors NOD1 and NOD2: A chemist's perspective. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 29(10), 1153-1161.
85. Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 149-167.
86. Hernández López, J. C., & Urcuqui Inchima, S. (2012). Activation and regulation of inflammasome NLRP3 in infectious diseases. *Iatreia*, 25(4), 380-390.
87. Shandilya, U. K., Sharma, A., Mallikarjunappa, S., Guo, J., Mao, Y., Meade, K. G., & Karrow, N. A. (2021). CRISPR-Cas9-mediated knockout of TLR4 modulates Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis cell lysate-induced inflammation in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 104(10), 11135-11146.
88. Li, L. Q., Song, A. X., Wong, W. T., & Wu, J. Y. (2021). Modification and enhanced anti-inflammatory activity by Bifidobacterial fermentation of an exopolysaccharide from a medicinal fungus Cs-HK1. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 586-594.