

UCA FC
Biotecnología
B736
C.1



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO**

**“PARTICIPACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL EFECTO
INMUNOESTIMULANTE DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS
EN MAMÍFEROS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Raimundo Andrés Born De Toro

Director de Seminario de Título:
María Inés Becker C., Ph.D.

Mayo del 2013
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. Raimundo Andrés Born De Toro

“PARTICIPACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS EN MAMÍFEROS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Dra. María Inés Becker
Director Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de María Inés Becker, sobre una línea horizontal.

Comisión de Evaluación

Dra. María Rosa Bono
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de María Rosa Bono, sobre una línea horizontal.

Dra. Daniela Sauma
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul de Daniela Sauma, sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Mayo 2013



Nací y crecí en Antofagasta, ciudad en la que terminé mis estudios escolares el 2006 en “The Antofagasta British School”. Desde pequeño fui curioso y me encantaba saber como funcionaban las cosas y desarmarlas, por lo que siempre pensé que sería ingeniero mecánico. Sin embargo, a mediados de cuarto medio me empezó a interesar el funcionamiento de lo vivo. Así, el 2007 entré a estudiar ingeniería en biotecnología molecular. En general, me gustó todo el conocimiento que adquirí cursando los ramos científicos, pero creo que la carrera dejó un vacío en cuanto a todo el camino que se necesita recorrer entre los experimentos del laboratorio y un producto de aplicación biotecnológica. Por esta razón, el 2012 comencé a estudiar ingeniería. Espero, algún día no muy lejano, poder mezclar ambos conocimientos.

Sobre lo personal, se me viene a la mente buenos recuerdos del campo, la esgrima y de escuchar metal. Finalmente, me gustaría mencionar a mi hija, Ale, quien nació el verano entre el colegio y la universidad e influye día a día en mis prioridades, decisiones y metas.

“... Y Si La Vida Te Pisa, Desenvaina Una Sonrisa y Vuélvete a Levantar ...”

Txus - Mago de Oz

DEDICATORIA

A las personas que de alguna u otra forma, con o sin saberlo, han forjado mi manera de ver las cosas.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a la profe María Inés Becker por ser una excelente tutora en el ámbito científico, realizando todo su trabajo pasión y dedicación. Gracias por motivarme siempre a seguir adelante en el desarrollo de este trabajo. Además, agradezco especialmente todo el apoyo y los consejos en temas personales.

Quiero agradecerle a la Niki por haber sido un apoyo importantísimo durante toda la carrera.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Sergio, Fabián, Ricardo, Ta-Ying, Cristóbal y Miguel, por su buena disposición y la buena onda dentro y fuera del laboratorio. Además, a don José por su realizar su trabajo con un ánimo excepcional. También, agradezco al equipo de Biosonda S.A.

A mi hija, que sin saberlo, me motiva a seguir mis metas.

Finalmente, agradezco a mis padres por apoyar mis decisiones.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
Estructura de las hemocianinas de moluscos	5
Efecto de las hemocianinas sobre el sistema inmune de los mamíferos	8
Células presentadoras de antígenos	10
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
MATERIALES Y METODOS	17
1. MATERIALES	17
1.1. Animales de experimentación	17
1.2. Reactivos	17
1.2.1. Cultivo celular	17
1.2.2. Proteínas	17
1.2.3. Proteínas marcadas	18
1.2.4. Anticuerpos	18

1.3.	Soluciones	19
1.3.1.	Medios de cultivo	19
1.3.2.	Soluciones estériles	19
1.3.3.	Cuantificación de proteínas	20
1.3.4.	Soluciones para electroforesis	20
1.3.5.	Soluciones para <i>Western blot</i>	20
1.3.6.	Soluciones para citometría de flujo	21
1.4.	Soluciones para microscopía	21
1.5.	Materiales varios	21
1.6.	Equipos	22
2.	MÉTODOS	23
2.1.	Obtención de células de la cavidad peritoneal	23
2.2.	Cultivo de macrófagos	23
2.3.	Cultivo de DCs	24
2.4.	Electroforesis y <i>Western blot</i> a partir de extractos celulares	24
2.5.	Análisis por citometría de flujo	26
2.6.	Análisis por microscopía electrónica	27
	RESULTADOS	28
1.	Establecimiento de un cultivo de macrófagos murinos <i>in vitro</i>	28
2.	Incorporación de CCH por macrófagos cultivados <i>in vitro</i>	31
3.	Incorporación de CCH por macrófagos <i>in vivo</i>	36
4.	Procesamiento de CCH por macrófagos <i>in vitro</i>	38
	DISCUSIÓN	40
	CONCLUSIONES	50
	BIBLIOGRAFÍA	51

FINANCIAMIENTO

Esta Memoria de Investigación fue financiada por el Proyecto FONDECYT 1110651. Además, se recibió el apoyo de BIOSONDA S.A. y de la Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (FUCITED).

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Internacionales

Becker MI, Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, Del Campo M, **Born R**, Ferreira J, Manubens A, De Ioannes A (2012) Novel hemocyanin from the *Fissurella latimarginata* exhibits an outstanding immunogenicity and non-specific immunomodulatory effects in a melanoma model. 99th American Association of Immunologist. Boston, USA. *J Immunol* **188**: 53.6.

Nacionales

Zhong T, Arancibia S, **Born R**, Manubens A, Becker MI (2012) Perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas en células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estimulación in vitro con hemocianinas de moluscos. *Biol Res* **45**: R-63.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización de las hemocianinas de molusco.	7
Figura 2. Caracterización del cultivo de macrófagos murinos a partir de células peritoneales.	29
Figura 3. Determinación de la homogeneidad del cultivo de macrófagos.	30
Figura 4. Porcentaje de macrófagos que incorporan CCH u OVO marcada a diferentes tiempos <i>in vitro</i> .	32
Figura 5. Incorporación <i>in vitro</i> de CCH con y sin residuos oligosacáridos por macrófagos.	34
Figura 6. Incorporación <i>in vitro</i> de CCH por DCs.	35
Figura 7. Cantidad de macrófagos en la cavidad peritoneal a diferentes tiempos post-inyección de CCH, CCH-488, OVO y OVO-488.	37
Figura 8. Cinética de incorporación <i>in vivo</i> de CCH-488 u OVO-488.	37
Figura 9. <i>Western blot</i> a partir de extractos celulares de macrófagos incubados con CCH a distintos tiempos.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	:	<i>Antigen-presenting cell</i> , célula presentadora de antígenos
BCG	:	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BCR	:	<i>B cell receptors</i> , receptor de célula B
BSA	:	<i>Bovine serum albumin</i> , albúmina sérica de bovino
CCH	:	<i>Concholepas concholepas hemocyanin</i> , hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>
CSV	:	Carcinoma superficial de vejiga
DCs	:	<i>Dendritic cells</i> , células dendríticas
D-MEM	:	<i>Dulbecco's modified Eagle's médium</i> , medio Eagle modificado por Dulbecco
ELISA	:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> , ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FAL	:	Fosfatasa alcalina
FITC	:	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , Isotiocianato de Fluoresceína
FLH	:	<i>Fissurella latimarginata hemocyanin</i> , hemocianina de <i>Fissurella latimarginata</i>
FSC	:	<i>Forward Scatter</i> , dispersión frontal (del rayo de luz)
FUs	:	<i>Functional Units</i> , unidades funcionales
HRP	:	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Peroxidasa de rábano
KLH	:	<i>Keyhole limpet hemocyanin</i> , hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>
LPS	:	<i>Lipopolysaccharide</i> , Lipopolisacárido
MHCII	:	<i>Major histocompatibility complex class II</i> , complejo principal de histocompatibilidad de clase II

OVO	:	Ovoalbúmina
PE	:	<i>Phycoeritrin</i> , Ficoeritrina
PBS	:	<i>Phosphate buffer saline</i> , tampón fosfato salino
rGM-CSF	:	<i>Recombinant Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> , factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante
RPMI	:	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> , medio Roswell Park Memorial Institute
SDS	:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> , dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	:	<i>SDS polyacrylamide gel electrophoresis</i> , electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SFB	:	Suero fetal de bovino
SSC	:	<i>Side Scatter</i> , dispersión lateral (del rayo de luz)
TAA	:	<i>Tumor-Associated Antigens</i> , antígenos asociados a tumores
TBST	:	<i>Tris-Buffered Saline with Tween-20</i> , tampón Tris salino con Tween-20

RESUMEN

Las hemocianinas son glicoproteínas transportadoras de oxígeno que se encuentran en la hemolinfa de algunos moluscos y artrópodos. Algunas hemocianinas de molusco inducen una poderosa respuesta inmunológica al ser inyectadas en mamíferos y no se conoce con exactitud la razón de este fenómeno. Sin embargo, este efecto ha sido atribuido a diversos factores como su xenogenicidad, gran tamaño (4 a 8 MDa), la presencia de residuos oligosacáridos y su estructura cuaternaria con múltiples epítomos repetidos.

Debido a las propiedades inmunoestimulantes no específicas y adyuvancia intrínseca de algunas hemocianinas de moluscos, estas son de gran importancia por su aplicación en los campos de la biomedicina y la biotecnología, por ejemplo como proteínas transportadoras para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos, en vacunas experimentales terapéuticas contra diversos tipos de cáncer y como inmunoestimulantes no específicos. Durante décadas se ha utilizado la hemocianina de *Megathura crenulata* (KLH) para estos propósitos. Sin embargo, más recientemente se descubrió que la hemocianina del gastrópodo chileno *Concholepas concholepas* (CCH) presenta propiedades inmunológicas comparables a KLH, por lo que es una excelente alternativa para las aplicaciones en biomedicina y biotecnología.

Hipotetizamos que el efecto inmunoestimulante de las hemocianinas, se explica en parte porque al ser incorporadas por células presentadoras de antígeno (APCs), conducen a la creación de un ambiente pro-inflamatorio que lleva a potenciar la respuesta adaptativa del tipo Th1 contra ellas, la cual indirectamente, estimula respuestas inmunes antitumorales latentes en los ganglios regionales. Es así, que

trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que CCH es endocitada por células dendríticas (DCs) y lentamente procesada, fenómeno que consecuentemente, produce su lenta maduración, reflejada en la secreción de IL-12. Sin embargo, otras APCs como son los macrófagos, también podrían participar en las etapas tempranas de la respuesta inmune contra hemocianinas, por su gran capacidad proteolítica y que producen numerosas citoquinas. Además, el gran tamaño y compleja estructura de las hemocianinas podrían influir en su procesamiento por macrófagos.

De esta forma, en este trabajo se estudió la incorporación y el procesamiento de CCH *in vitro* e *in vivo* en macrófagos peritoneales de ratones C57BL6. Como control, se usó otra proteína modelo: ovoalbúmina (OVO). Para concretar este estudio, se utilizaron diversas técnicas que incluyeron citometría de flujo, microscopía electrónica de transmisión y *Western blot*.

Los resultados demuestran que los macrófagos incorporan CCH nativa y desglicosilada *in vitro*, ya sea por macropinocitosis o endocitosis. Sorpresivamente, los estudios *in vivo*, indicaron que OVO ingresa más rápido a los macrófagos que CCH, con máximos de incorporación en torno a las 14 y 24 horas, respectivamente. Además, se observó que CCH *in vitro* es procesada mucho más lentamente que OVO, encontrándose un fragmento en torno a 46 kDa que podría corresponder a una unidad funcional en tiempos superiores a las 24 horas.

Estos resultados apoyan la idea que uno de los mecanismos envueltos en la inmunoestimulación por las hemocianinas, radica en su compleja estructura y tamaño, que produce su lento procesamiento, aún por células tan poderosas proteolíticamente como los macrófagos.

ABSTRACT

Hemocyanins are oxygen-carrier proteins found in the hemolymph of several mollusks and arthropods. Some of these hemocyanins of mollusks provoke powerful immune responses when injected in mammals, reaction whose cause has not yet been clarified. Nonetheless, this effect has been attributed to diverse factors such as their xenogenic character, their huge size (4 to 8 MDa), the presence of oligosaccharide residues and its quaternary structure with multiple repeated epitopes.

Due to the non-specific immunostimulant properties and the intrinsic adjuvanticity that exhibit some mollusks hemocyanins, these proteins stand out due to their potential applications in the fields of biomedicine and biotechnology, e.g. as carrier proteins as a way to produce antibodies against haptens and peptides, in experimental therapeutic vaccines against various types of cancer and like non-specific immunostimulants. For decades, *Megathura crenulata* hemocyanin (KLH) has been used for these purposes. However, more recently it has been discovered that the Chilean gastropod *Concholepas concholepas* hemocyanin (CCH) presents outstanding immune properties, which makes it an excellent alternative in the mentioned fields.

We hypothesize that the immunostimulant effect of hemocyanins is partially explained by the fact that, once incorporated by antigen presenting cells (APCs), they lead to the creation of a proinflammatory environment which results in a Th1 type adaptive response against the hemocyanin, reaction that may indirectly stimulates latent anti-tumoral responses within local ganglia.

Previous research in our laboratory has demonstrated that CCH is endocytosed by dendritic cells (DCs) and slowly processed by them. This phenomenon, consequently,

results in their gradual maturing, reflected by the IL-12 synthesis. However, other APCs such as macrophages could also participate in early stages of the immune response against hemocyanins, due to their considerable proteolytic capacity and their ability to produce various cytokines. Moreover, the huge size and complex structure of hemocyanin might actually be influential factors on their processing by macrophages.

This way, in this research we studied CCH incorporation and processing (both *in vitro* and *in vivo*) by peritoneal macrophages obtained from C57BL6 mice. As a reference, ovalbumin (OVA) a well-defined protein antigen was used. In order to carry out this investigation, several techniques such as flow cytometry, transmission electron microscopy and Western blot were used.

In vitro experiments have shown that both native and deglycosylated CCH are incorporated to macrophages, whether through macropinocytosis or endocytosis. Surprisingly, *in vivo* studies indicate that OVA absorption occurs faster than CCH, with incorporation maximums found at about 14 and 24 hours, respectively. In addition, it was observed that *in vitro* CCH is processed by macrophages much more slowly than OVA. More interestingly, a fragment of 46 kDa was found in a time superior to 24 hours, which could correspond to a functional unit.

This results support the idea that one of the mechanisms involved in immunostimulation by hemocyanins, lays on its complex structure and size, which reflects on its slow processing, even by proteolytic cells as powerful as macrophages.

INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son glicoproteínas transportadoras de oxígeno que se encuentran en la hemolinfa de numerosas especies de moluscos y artrópodos. Se ha observado que entre estos dos grupos de organismos, las hemocianinas presentan diferencias considerables en su secuencia primaria, su tamaño y la organización de sus subunidades, lo que sugiere una divergencia evolutiva que mantiene similitudes en su función, reflejada en la conservación del sitio activo de ambos tipos de proteínas, constituido por átomos de cobre que son coordinados por triadas de histidina. Sin embargo, presentan importantes diferencias en su estructura cuaternaria (Van Holde y Miller, 1995). En este seminario de título, nuestra atención está puesta en las hemocianinas de moluscos, específicamente en la de algunos gastrópodos, que como se describirá más adelante, tienen variadas aplicaciones biomédicas y biotecnológicas.

Estructura de las hemocianinas de moluscos

El enorme tamaño de las hemocianinas de moluscos ha permitido observar su estructura por microscopía electrónica mediante tinción negativa, donde ha quedado en evidencia su peculiar forma de cilindro hueco de aproximadamente 35 nm de diámetro por 40 nm de largo. Usando numerosos procedimientos experimentales que permiten disociar y re asociar moléculas, se demostró que las hemocianinas se ensamblan en moléculas cilíndricas compuestas por 10 subunidades no-covalentemente unidas, denominadas decámeros, las cuales tienen una masa molecular entre los 350 a 450 kDa y están formadas por siete u ocho dominios globulares, denominados unidades funcionales (FUs). Las FUs tienen una masa molecular que varía entre 45 a 55 kDa y están unidas covalentemente entre sí mediante regiones flexibles constituidas por 10 a

15 aminoácidos, formando una organización tipo "collar de perlas" (ver Figura 1). Además, cada FUs es capaz de unir reversiblemente una molécula de oxígeno a través de un par de átomos de cobre, lo cual le confiere el color azul profundo característico de estas proteínas. De esta manera, los decámeros de las hemocianinas de moluscos alcanzan masas moleculares de 3,5 a 4,5 MDa y, en el caso de bivalvos y gastrópodos, los decámeros pueden asociarse entre sí, formando enormes estructuras que alcanzan los 8 MDa (van Holde y Miler, 1995; Decker y col, 2007) denominadas didecámeros.

Se suman a la compleja estructura proteica de las hemocianinas su residuos oligosacáridos, que pueden alcanzar hasta un 9% de su peso (%p/p), siendo manosa el componente más abundante (Harris y Markl, 1999; Hall y Wood, 1976). Su conocimiento ha llevado a numerosos autores que ellos serían determinantes en el efecto inmunoestimulante que estas proteínas tienen sobre el sistema inmune de los mamíferos, sin embargo, no hay evidencia experimental inequívoca al respecto.

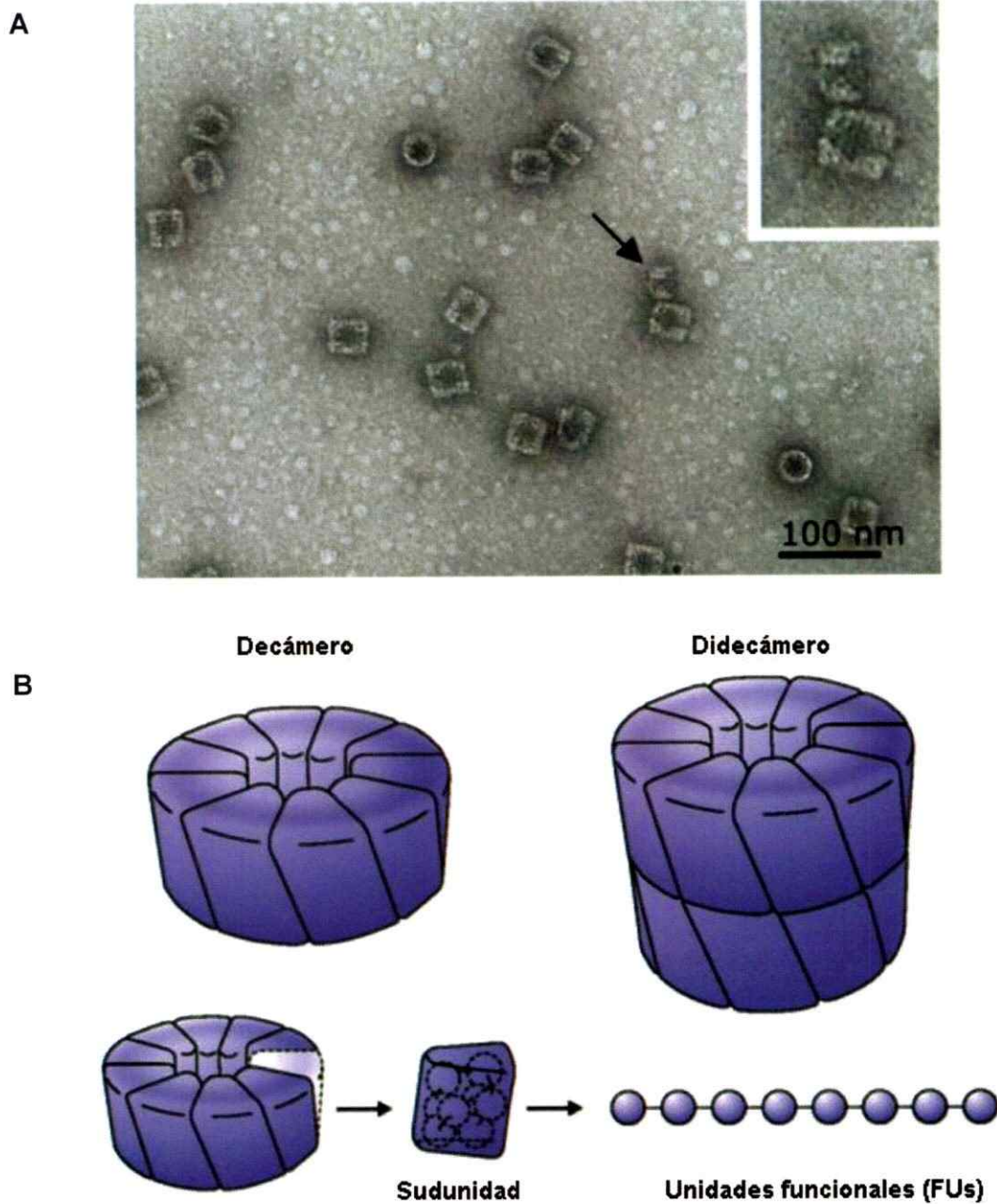


Figura 1. Organización de las hemocianinas de moluscos.

A. Microscopía electrónica de transmisión de moléculas de hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH) teñidas negativamente, en la cual se puede apreciar vistas laterales de los didecámeros (rectángulos) y vistas desde arriba (círculos) que denotan su estructura con forma de cilindro hueco. La flecha muestra un decámero al lado de un didecámero. **B.** Esquema de las hemocianinas de moluscos, la organización de sus subunidades y sus unidades funcionales (FUs), unidas por péptidos flexibles de 10 a 15 aminoácidos (Arancibia y col, 2012a).

Efecto de las hemocianinas sobre el sistema inmune de los mamíferos

Se ha descrito que al inocular mamíferos, incluyendo seres humanos, con hemocianinas de gastrópodos, se induce una poderosa respuesta inmunológica benéfica, de ahí su consideración como inmunoestimulante no específico, efecto que ha sido atribuido a diversos factores de la proteína tales como su xenogenicidad, gran tamaño, la presencia de residuos oligosacáridos y su estructura cuaternaria de tipo D5 con múltiples epítomos repetidos (Haris y Markl, 1999; Del Campo y col, 2011).

Debido a sus propiedades inmunoestimulantes no específicas y adyuvancia intrínseca, sumado a su nula toxicidad y ausencia de efectos secundarios no deseados, algunas hemocianinas de moluscos tienen gran importancia por su aplicación en los campos de la biomedicina y la biotecnología (Musselli y col, 2001; Del Campo y col, 2011; Kantele y col, 2012). En biomedicina, son utilizadas como proteínas transportadoras (*carrier*) para producir anticuerpos contra haptenos y péptidos. Además, se emplean como inmunoestimulantes no específicos para prevenir la recurrencia del carcinoma superficial de vejiga (CSV) luego de su extirpación quirúrgica, como una alternativa a la terapia clásica con *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) instilado uretralmente (Lamm y col, 2000; Perabo y Muller, 2004; Arancibia y col, 2012b). Además, se usan en vacunas experimentales terapéuticas contra diversos tipos de cáncer, porque dirigen la respuesta inmune celular y humoral hacia respuestas del tipo Th1 (Moltedo y col, 2006; Arancibia y col, 2011 y 2012a). Para estos propósitos, se ha utilizado desde los años 60 la hemocianina de una lapa nativa de las costas de California y México conocida como *keyhole limpet* que corresponde a la especie *Megathura crenulata*. Esta hemocianina, conocida como KLH, se ha utilizado durante más de 40 años como antígeno modelo para estudiar las respuestas timo-

dependientes mediadas por linfocitos T CD4⁺ (Harris y Markl, 1999; Markl y col, 2001; Del Campo y col, 2011). Actualmente se utiliza KLH como *carrier* de epítopos de antígenos asociados a tumores (TAA), tales como glicolípidos y mucopolisacáridos, en vacunas experimentales para diferentes tipos de cáncer (Muselli y col, 2001; Zhu y col, 2009; Del Campo y col, 2011). Además, se utilizan como potenciadores de la respuesta de células T en la inmunoterapia de tumores con células dendríticas cargadas con extractos tumorales (Timmerman y Levy, 2000; Shimizu y col, 2001; Millard y col, 2003; López y col, 2009; Jacobs y col, 2010; Lesterhuis y col, 2011). Sin embargo, a pesar del amplio uso de estas proteínas, se conoce poco acerca de los mecanismos por los cuales las hemocianinas estimulan el sistema inmune de los mamíferos y las células involucradas. En consecuencia, dada la utilidad de estas proteínas en las diversas aplicaciones antes señaladas, consideramos importante caracterizar sus mecanismos inmunológicos de acción, ya que su conocimiento podría permitir potenciar más aun sus efectos benéficos para la salud humana y también, de especies de interés productivo.

Se debe señalar que la obtención de KLH depende absolutamente de su fuente natural, ya que, aunque los genes que codifican para sus subunidades han sido clonados, a la fecha no se han logrado expresar en forma heteróloga (Markl y col, 2001). Es así que su demanda creciente ha llevado a buscar fuentes alternativas de hemocianina, con propiedades inmunológicas similares o superiores a KLH. Entre las fuentes más recientes de hemocianina se encuentra la proveniente de *Rapana thomasi* (Dolashka y col, 2010) y la de *Concholepas concholepas*, pero solo esta última ha demostrado tener propiedades inmunológicas comparables a KLH, siendo una alternativa confiable y segura a KLH en el tratamiento del CSV (Atala, 2006).

Como se señaló, científicos chilenos descubrieron que el gastrópodo comúnmente denominado Loco (*Concholepas concholepas*) posee una hemocianina, conocida como CCH, que presenta propiedades inmunológicas comparables a KLH, aun cuando difieren en su origen y en su estructura cuaternaria (De loannes y col, 2004). Aunque ambas proteínas poseen dos tipos de subunidades, en KLH se organizan constituyendo homodécámeros que se asocian de a pares formando homodidecámeros que coexisten en la hemolinfa de los animales. En contraste, en CCH, las subunidades se asocian entremezcladamente constituyendo heterodécámeros que a su vez conforman heterodidecámeros (De loannes y col, 2004; Becker y col, 2009). Sorprendentemente, a pesar de estas diferencias KLH y CCH son igualmente inmunogénicas y poseen un efecto antitumoral similar (Molledo y col, 2006). Sus propiedades inmunológicas similares a KLH y su gran estabilidad (Idakieva y col, 2008) han convertido a CCH en una excelente alternativa o sustituto para aplicaciones en biomedicina y biotecnología, como proteína *carrier* para producir anticuerpos en animales de experimentación (Gravotta y col, 2007; Matus y col, 2007; Grenegard y col, 2008) y también en el desarrollo de vacunas experimentales (Miller y col, 2006; Pilon y col, 2007; Del Campo y col, 2011).

Células presentadoras de antígenos

Una de las características más importantes que comparten CCH y KLH es que no necesitan de adyuvantes para provocar su acción inmunoestimulante en la inmunoterapia del CSV, lo cual lleva a preguntarse ¿cómo estas proteínas inician la respuesta inmune?. Por otra parte, para iniciar la respuesta adaptativa contra proteínas de tipo timo-dependiente y, en consecuencia mediada por linfocitos T CD4⁺, es fundamental que estas células reconozcan los antígenos a través del complejo

principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII). Las moléculas MHCII presentan péptidos provenientes de la vía exógena o endocítica y se expresan constitutivamente en la membrana plasmática de las células presentadoras de antígeno (APC), aunque en otros tipos celulares puede inducirse su expresión por acción de citoquinas, como IFN- γ (Neeffes y col, 2011).

Bajo este contexto, las APC, que incluyen células dendríticas (DCs), macrófagos y linfocitos B, juegan un papel fundamental, procesando y presentando el antígeno a los linfocitos T CD4⁺ (Banchereau y Steinman, 1998; Inaba y col, 2000; Trombetta y Mellman, 2005). Todas las células efectoras del sistema inmune, incluyendo las APC, tienen su origen en células troncales hematopoyéticas, de las cuales se generan los progenitores mieloides y linfoides. Tanto DCs como macrófagos son parte del linaje procedente de la diferenciación de progenitores mieloides, mientras que los linfocitos B son parte del linaje linfoide (Metcalfe, 2007). Para actuar como APC, estos tipos celulares deben tener la capacidad de capturar e internalizar el antígeno, procesarlo en pequeños péptidos de 12 a 25 aminoácidos, cargarlo en las moléculas MHCII y exponer este complejo péptido-MHCII en su membrana plasmática (Trombetta y Mellman, 2005).

Las DCs se consideran las células presentadoras de antígenos profesionales, puesto que presentan antígenos a los linfocitos T CD4⁺ con mayor eficiencia que los otros dos grupos celulares mencionados anteriormente (Steinman, 2007). Son células de forma estrellada que se localizan estratégicamente en sitios de concentración antigénica. Se diferencian a partir de precursores CD34⁺ y pueden reconocerse por la expresión de marcadores como CD11c, CD40, CD80 y CD86 (Lutz y col, 1999).

Los macrófagos son células involucradas en la remoción de partículas antigénicas y en la década de los 80's, eran considerados las principales células presentadoras de antígenos debido a su gran capacidad fagocítica, proteolítica y de inducción de la proliferación de linfocitos T (Unanue, 1984). Se originan a partir de monocitos sanguíneos, los cuales migran a los distintos tejidos y sufren cambios morfológicos, diferenciándose en macrófagos, siendo estos inducibles cuando son activados por citoquinas pro-inflamatorias o productos bacterianos, aunque no en los niveles de DCs, lo cual explicaría parcialmente porque son menos eficientes en la presentación antigénica y estimulación de células T en comparación a las DCs (Trombetta y Mellman, 2005). Estas células tienen un sistema vesicular bastante desarrollado y pueden reconocerse con marcadores como CD11b, CD40, CD80, CD86, TLR4 y F4/80 (Ghosna E y col, 2009). Además, expresan MHC I y MHC II, siendo inducibles cuando son activados por citoquinas pro-inflamatorias o por productos bacterianos. De acuerdo al tipo de activación, los macrófagos se puede clasificar en dos clases opuestas fenotípicamente, a saber, los clásicamente activados denominados M1 y los "alternativamente" activados, denominados M2 (Verschoor y col, 2012). Los macrófagos M1 son activados por IFN- γ y TNF- α , o por agonistas de receptores tipo *Toll*, desencadenando diversos procesos efectores de la respuesta inmune como son la muerte de parásitos intracelulares, la lisis de células tumorales y la producción de citoquinas como IL-1 β , y TNF- α , además de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otros. Los macrófagos M2, comparten propiedades funcionales involucradas en respuestas de linfocitos Th2, tales como procesos de inmunorregulación y remodelamiento de tejidos (Mantovani y col, 2004).

Los linfocitos B se diferencian en la médula ósea y son las células principales de la respuesta inmune humoral, puesto que luego de detectar un antígeno, pueden diferenciarse a células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos. Se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas en la superficie de su membrana, que actúan como receptores de antígeno (BCR), siendo capaces también de procesarlos y presentarlos a linfocitos TCD4⁺ (Harwood y Batista, 2010).

Estudios realizados sobre el procesamiento de KLH en DCs humanas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos sanguíneos, mostraron que KLH promovía la activación y maduración de DCs porque se producía un aumento de la expresión de los marcadores de superficie CD40, CD80, CD86, CD83 y HLA-DR, además de un aumento en la producción de IL-10 y IL-12 (Presicce y col, 2008). Por otra parte, estudios realizados con DCs murinas diferenciadas *in vitro* a partir de médula ósea, mostraron que tanto su viabilidad como su funcionalidad (respecto a la adquisición de antígenos y su capacidad de estimular esplenocitos) no se ven disminuidas al ser pulsadas con KLH, por lo cual pueden utilizarse como marcador molecular para facilitar el monitoreo de la inducción de la respuesta inmune, ya sea en estudios clínicos de vacunas contra el cáncer basadas en DCs, como para mejorar la eficacia terapéutica de dichas vacunas (Teitz-Tennenbaum y col, 2008). Otros estudios en modelos murinos han determinado que se puede utilizar CCH marcada fluorescentemente (con Alexa Fluor 488) para trazar la migración de DCs hacia ganglios linfáticos, puesto que el inicio de la respuesta inflamatoria al virus de la influenza (denotado por un aumento de la concentración de INF- β , IL-6 y TNF- α) coincide con la aparición de DCs portadoras de material endocitado en los ganglios linfáticos (Molledo y col, 2009).

Por otra parte, experimentos sobre procesamiento de antígenos realizados en DCs cargadas con Rnasa A y su forma inestable, Rnasa S, mostraron que la forma más estable de la proteína inducía una mayor proliferación de linfocitos T porque las DCs permanecerían más tiempo presentando el antígeno en los ganglios regionales (Delamarre y col, 2005). Concordantemente, resultados previos de nuestro laboratorio también sugieren que CCH, en comparación con otro antígeno modelo como lo es Ovoalbúmina (OVO), se procesa lentamente en DCs (Del Campo, 2007; Arancibia y col, 2011). De estos resultados se desprende la posibilidad de que el lento procesamiento de CCH sea una de las causas de su gran capacidad inmunogénica y antitumoral no específica. También, recientemente, se ha demostrado que al pre-incubar DCs con CCH y luego co-incubarlas con células *Natural Killer*, se favorece la interacción entre ambos tipos celulares, reflejado como una polarización de mitocondrias hacia los contactos celulares concomitante con un aumento de IL-12 e IFN- γ (Del Campo y col, 2013).

Además de los estudios realizados en DCs, también se ha propuesto que los macrófagos podrían estar involucrados en el inicio de la respuesta anti-tumoral estimulada por KLH, puesto que en la orina de pacientes con CSV se ha observado un aumento en la concentración de la citoquina pro-inflamatoria IL-1 α , producida por macrófagos activados (Jurincic-Winkler y col, 1995). En la década de los 80's se realizaron experimentos que demostraron que los macrófagos eran capaces de internalizar KLH y presentar a linfocitos T de manera específica en un periodo de entre 45 y 60 minutos (Birmingham y col, 1982; Unanue, 1984; Rhodes y col, 1989).

Entonces, basados en los resultados previos obtenidos en DCs, la aparición de IL-1 α en la orina de pacientes con CSV y en la evidencia de que las DCs presentan una

menor capacidad proteolítica respecto a los macrófagos (Delamarre y col, 2005), tiene interés estudiar el procesamiento de CCH por parte de los macrófagos por que poseen una elevada capacidad proteolítica y producen numerosas citoquinas pro-inflamatorias. Además, el gran tamaño y compleja estructura de las hemocianinas podrían influir en su procesamiento por macrófagos.

Hipótesis

Macrófagos peritoneales murinos de la cepa C57BL/6 incorporan y procesan lentamente CCH, favoreciendo de esta forma su inmunogenicidad y efecto antitumoral, en comparación con otra proteína que no tiene estas propiedades inmunológicas por sí sola, como es ovoalbúmina.

Objetivo general

Estudiar la incorporación, procesamiento y presentación de hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH) en macrófagos peritoneales de ratones C57BL/6 tanto *in vivo* como *in vitro*.

Objetivos específicos

1. Estudiar la incorporación de CCH en macrófagos cultivados *in vitro* mediante microscopía electrónica de transmisión.
2. Determinar la cinética de incorporación de CCH en macrófagos peritoneales, tanto *in vivo* como *in vitro*, en comparación con OVO, mediante citometría de flujo.
3. Estudiar el procesamiento de CCH en macrófagos peritoneales *in vitro*, mediante *Western blot*.

MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

1.1. Animales de experimentación

Como modelo de estudio se utilizaron ratones hembras y machos de la cepa C57BL/6 (haplotipo H-2b) de entre 2 y 4 meses de edad adquiridos en el bioterio de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los ratones se sometieron a ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y se mantuvieron a temperaturas entre 21 y 24 °C, con abundante agua y alimento, siguiendo las normas institucionales para el manejo y bienestar de los animales.

1.2. Reactivos

1.2.1. Cultivo celular

Los siguientes reactivos son de Gibco (obtenidos de Invitrogen, EEUU): medio de cultivo RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute); medio de cultivo D-MEM (Dulbecco's modified Eagle's medium); Penicilina/Estreptomina 1×10^4 U/ml (100x); L-Glutamina 200 mM (100x); Piruvato de sodio 100 mM (100x); Aminoácidos no esenciales (100x, MEM NEAA). El suero fetal de bovino (SFB) fue obtenido de Hyclone (EEUU).

1.2.2. Proteínas

La hemocianina de *Concholepas concholepas* (CCH, Immunocyanine® - libre de lipopolisacparidos, LPS) fue proporcionada por Biosonda S.A. (Santiago, Chile).

CCH desglicosilada químicamente (Ox-CCH), se obtuvo según el procedimiento descrito por Arancibia y col, 2012a.

Ovoalbúmina (Imject® ovalbumin) fue adquirida de Thermo (EEUU).

El factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos recombinante (recombinant *Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, rGM-CSF) adquirido BD Pharmingen (EEUU).

1.2.3. Proteínas marcadas

Las proteínas marcadas, CCH-Alexa488 (CCH-488), OVO-Alexa488 (OVO-488) y OVO-Alexa647 (OVO-647), fueron preparadas según Moltedo y col, 2009.

1.2.4. Anticuerpos

El anticuerpo asociado a fluoróforo anti-F4/80-Alexa Fluor 647 fue obtenido de BioLegend (EEUU).

El anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina (FAL) fue obtenido de Thermo (EEUU).

El anticuerpo de cabra anti-IgG (H+L) de rata, conjugado peroxidasa (HRP) fue obtenido de Thermo (EEUU).

El anticuerpo de rata anti- β -actina de ratón fue obtenido de Sigma (EEUU).

Los anticuerpos policlonales de conejo anti-CCH fueron producidos por Biosonda S.A., según procedimientos propios.

1.3. Soluciones

1.3.1. Medios de cultivo

El medio de cultivo utilizado se compuso de medio D-MEM o RPMI, complementado con 10% SFB, 1% penicilina/estreptomicina, 1 % L-glutamina, 1% piruvato de sodio y 1% de aminoácidos no esenciales.

1.3.2. Soluciones estériles

Para la preparación de todas las soluciones estériles se utilizó agua libre de LPS (Baxter, EEUU).

Tampón fosfato salino (PBS): 100 mM fosfato de sodio, 150 mM cloruro de sodio, pH 7,2 (Thermo, EEUU).

Solución de tioglicolato: (para 1 litro) compuesta de caseína 15 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 2,5 g, L-cisteína 0,5 g, tioglicolato de sodio 0,5 g, agar, 0,75 g, dextrosa 5,5 g, glucosa 5,5 g; autoclavada una vez y envejecida 1 mes.

Solución de lisis de los glóbulos rojos: 150 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 y 0,1 mM EDTA.

Solución de lisis: tampón con baja concentración de detergente (*low detergent buffer*, LDB) compuesto por 20 mM Tris/HCL, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% Triton X-100, ajustado a pH 7.5 y con la adicción de un coctel de inhibidores de proteasas (Roche, EEUU).

Tripsina: Tripsina/EDTA de invitrogen (EEUU).

1.3.3. Cuantificación de proteínas

Para realizar los ensayos de cuantificación de proteínas se utilizó como estándar albúmina de suero bovino 2.0 mg/ml (*bovine serum albumin*, BSA) y reactivo de Coomassie (Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent), ambas soluciones adquiridas de Thermo (EEUU).

1.3.4. Soluciones para electroforesis

Tampón de corrida: para correr los geles SDS-PAGE se utilizó un tampón Tris-glicina SDS adquirido de Thermo (EEUU) y compuesto por 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS y pH 8,3.

Tampón de carga: para denaturar y cargar las muestras se utilizó un tampón de carga 4x (*Laemmli buffer 4x*) compuesto por 24% 1 M Tris/HCl pH 6,8, 28% agua destilada, 8% SDS, 40% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol y 0,01% Azul de bromofenol.

1.3.5. Soluciones para *Western blot*

Tampón de transferencia: para realizar la transferencia se utilizó una solución compuesta por 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,3.

TBST: para realizar los lavados e incubaciones de la membrana se utilizó un tampón Tris salino con Tween-20 (TBST) compuesto por 2,42 g Tris base, 8 g NaCl, ajustando su pH a 7,6 con HCl y 0,02% Tween-20.

TBST-Caseína: para realizar el bloqueo de la membrana se utilizó una solución de TBST con 1% de caseína.

Sustrato para FAL: 1-Step™ NBT/BCIP (*nitro-blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate*) adquirido de Thermo (EEUU).

Sustrato para HRP: SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate adquirido de Pierce (EEUU).

Tampón de lavado membrana nitrocelulosa (Tampón de *Stripping*): Restore™ Western blot Stripping Buffer, Thermo (EEUU).

Solución de revelado: revelador película grano fino D-76, Jamarca ®.

Solución de fijación: Fijador de papel y película U-3, Jamarca ®.

1.3.6. Soluciones para citometría de flujo

Para realizar los lavados e incubaciones se utilizó una solución de PBS-SFB 2%. Para realizar la fijación de las muestras se utilizó PBS-paraformaldehído 2%.

1.4. Soluciones para microscopía

Fijador: las células se fijaron con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

1.5. Materiales varios

Placas de 6 pocillos obtenidas de Nunc, EEUU; Stericup & Steritop™ de 500 y 1000 ml de 0,22 µm obtenidas de Millipore, EEUU; pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml, tubos cónicos de 15 y 50 ml, tubos Eppendorf obtenidos de Axygen, EEUU; Jeringas de 2,5 ml y de insulina (1 ml) obtenidas de Terumo, EEUU; cámara de Neubauer; porta y cubre objetos; membrana de nitrocelulosa 0,45 µm obtenida de Thermo, EEUU.

1.6. Equipos

Campana de flujo laminar (Clean Room Procusts); Microscopio de contraste de fase DIAPHOT-TMD (Nikon); Cámara de electroforesis (Bio Rad); Sistema de transferencia de membrana de nitrocelulosa (Bio Rad); Fuente de poder (Bio Rad); Centrifuga refrigerada IEC-CENTRA-7R (International equipment company); Estufa de cultivo de células con regulación de temperatura y CO₂ (Nuair); Microcentrifuga 5417C (Eppendorf); Lector de ELISA 7520 (Cambridge Technology, Inc); Balanza granataria electrónica (Sartorius); pHmetro Orion 3 Star (Thermo); Citómetro de flujo laminar (FACSort de Beckton Dickinson, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile); Microscopio electrónico de transmisión (Phillips Tecnai 12, Servicio de microscopía electrónica Pontificia Universidad Católica).

2. MÉTODOS

2.1. Obtención de células de la cavidad peritoneal

Se aplicó un procedimiento previamente publicado (Zhang et al, 2008) con modificaciones. Brevemente, ratones C57BL6 fueron inyectados con 1,6 ml de una solución de tioglicolato en la cavidad peritoneal y luego de 4 días fueron sacrificados por dislocación cervical. A partir de este momento se trabajó bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar. Primero, se realizaron dos lavados de la cavidad peritoneal con 5 ml de PBS estéril cada uno y luego, la solución obtenida se centrifugó durante 20 minutos a 1500 rpm (240 rcf) a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2,5 ml de solución de lisis de glóbulos rojos. La suspensión se incubó durante 5 minutos a 37 °C y se detuvo la lisis agregando 2,5 ml de medio de cultivo D-MEM, centrifugándose luego durante 20 minutos a 1500 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y finalmente, el pellet se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo D-MEM.

2.2. Cultivo de macrófagos

Se contaron las células presentes en la solución obtenida en el método 2.1 utilizando una cámara de Neubauer. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a 2,5 millones de células por pozo y se incubaron durante 1 hora en la estufa a 37 °C. Finalmente, se realizaron 2 lavados con PBS estéril para eliminar todas las células no adheridas a la placa y se agregaron 5 ml de medio de cultivo D-MEM. Los macrófagos fueron considerados como las células adheridas a la placa (Zhang y col, 2008).

2.3. Cultivo de DCs

Las DCs se obtuvieron a partir de precursores de médula ósea, según lo descrito por Lutz y col, 1999. Brevemente, se obtuvo la médula ósea a partir del fémur y la tibia de ratones C57BL6, perfundiendo con PBS estéril. Luego, se centrifugó durante 15 minutos a 1500 rpm (240 rcf), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en solución de lisis de glóbulos rojos. Tres minutos después se agregó un volumen de medio RPMI para detener la lisis, se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 5 ml de medio fresco con rGM-CSF a 20 ng/ml. Posteriormente se cultivó en placas de 6 pocillos a 2,5 millones de células por pozo. Al día 3 se agregó 1 volumen de medio fresco con rGM-CSF a 20 ng/ml. En los días 6 y 8 se sacó la mitad del sobrenadante del cultivo de DCs, se centrifugó 15 minutos a 1500 rpm y se eliminó el sobrenadante. Luego, el pellet se resuspendió en 1 volumen de medio fresco con rGM-CSF a 20 ng/ml y se devolvió a los pocillos correspondiente. Las células se utilizaron en el décimo día de cultivo.

2.4. Electroforesis y *Western blot* a partir de extractos celulares

Se realizó un cultivo celular según lo descrito en el método 2.2 y luego se trataron las células, incubándolas con hemocianina de *Concholepas concholepas* a diferentes tiempos: 4, 24, 72, 120 y 144 horas. Además, como control negativo de la presencia de CCH se realizó un cultivo omitiendo la hemocianina y como control positivo de CCH, se incubó CCH durante 4 horas en medio de cultivo sin macrófagos.

Transcurrido el tiempo de incubación con los diferentes tratamientos, los macrófagos fueron cosechados desde la placa de Petri, para lo cual se eliminó el medio de cultivo, se realizaron 2 lavados con PBS estéril y se soltaron las células

incubando con 300 μ l de tripsina durante 30 minutos a 37 °C. La suspensión de células se centrifugó a 2.000 rpm (420 rcf) durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 150 μ l de solución de lisis y se sometió a un tratamiento de ruptura celular utilizando un sonicador. Luego, se centrifugó durante 12 minutos a 12.000 rpm (15300 rcf), se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf, se agregaron 50 μ l de tampón de carga y se denaturó la muestra calentándola a 100 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, se realizó una electroforesis en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) según el procedimiento general descrito por Laemli (1970). Se utilizó un gel en gradiente de 5 a 15 % de acrilamida, cargando la misma concentración de proteína para cada muestra de extracto celular, en torno a 45 μ g/carril. El gel se corrió en 3 etapas, con las siguientes condiciones: Paso 1: 60 V, 30 minutos; Paso 2: 85 V, 30 minutos; Paso 3: 100 V, 80 minutos.

Al finalizar la electroforesis se transfirieron las proteínas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa, en condiciones húmedas utilizando el tampón de transferencia, a 100 V durante 90 minutos, según el procedimiento general descrito por Towbin y col, 1979.

La membrana con las proteínas se dejó bloqueando en TBST-Caseína durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación y luego, se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti- β -actina a una dilución 1:40.000, como control de carga. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a HRP a una dilución de 1:10.000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces

por 10 minutos con TBST y se procedió a revelar. Dado que el antisuero estaba acoplado a HRP se cubrió la membrana con sustrato para HRP, se mantuvo durante 5 minutos en el cassette de revelado junto con un *film* fotográfico. Luego, el *film* se sumergió en la solución de revelado durante 3 a 5 minutos, se lavó con agua y se sumergió la solución de fijación durante 5 minutos.

Posteriormente, se removieron los anticuerpos de la membrana para poder revelar utilizando antisuero anti-CCH. Para esto, la membrana se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con el tampón de *stripping*. Luego, se dejó bloqueando en TBST-Caseína durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se agregó el antisuero primario conejo anti-CCH a una dilución de 1:10.000 y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBST y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a FAL a una dilución de 1:10.000 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Dado que el antisuero estaba acoplado a FAL, la membrana se incubó durante 5 a 15 minutos con sustrato para FAL.

2.5. Análisis por citometría de flujo

Los ratones fueron inyectados en la cavidad peritoneal con 1 mg de CCH, CCH-488, OVO u OVO-488 o 300 μ l de PBS como control. Luego de 1, 4, 14, 24, 72 horas, se obtuvieron las células de la cavidad peritoneal según lo descrito en el método 2.1, hasta antes de resuspender en medio de cultivo D-MEM. Las células obtenidas se lavaron con PBS-SFB y se centrifugaron 10 minutos a 2.000 rpm (420 rcf). El pellet se resuspendió en 100 μ l de PBS-SFB, se agregó 1 μ l de anti-F4/80-Alexa Fluor 647 y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Luego se centrifugó 10 minutos a 2.000

rpm (420 rcf), se lavó con 200 μ l de PBS-SFB, se volvió a centrifugar y se fijaron las células con 200 μ l de PBS-paraformaldehído. Finalmente, las muestras se leyeron en un citómetro de flujo laminar en el Laboratorio de Inmunología (Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Los datos obtenidos por citometría fueron analizados con el programa computacional WINMDI.

2.6. Análisis por microscopía electrónica

Se realizó un cultivo celular según lo descrito en el método 2.2 y luego se trataron las células, incubándolas con CCH nativa o desglicosilada químicamente durante 10 y 60 minutos. Además, se realizó el control correspondiente sin la adición hemocianina y cultivos de DCs, bajo las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminó el medio de cultivo, se lavó 2 veces con PBS, se agregó el fijador directamente a las células adheridas en la placa y luego de 2 a 3 minutos se removieron cuidadosamente las células con una espátula de teflón. La solución se centrifugó hasta formar el pellet (aproximadamente 5 minutos a 5.000 rpm (2.700 rcf)) los cuales fueron procesados en la Unidad de Microscopía, Pontificia Universidad Católica de Chile. Allí, las muestras fueron post-fijadas con OsO_4 , deshidratadas con concentraciones crecientes de acetona y embebidas en una resina de Epon (Polyscience), de acuerdo a lo descrito por Luft (1961). Luego, la resina se polimerizó a 60°C durante 48 h y se realizaron cortes finos de 400-500 Å de grosor. Los cortes se recogieron en grillas de cobre y se tiñeron con acetato de uranilo al 4% en 50% metanol durante 1-5 minutos, se lavarán con 50% etanol frío, y luego se tiñeron con citrato de plomo de acuerdo al método descrito por Reynolds (1963). Finalmente, se lavaron con agua destilada y se observaron al microscopio electrónico a 80 KV.

RESULTADOS

1. Establecimiento de un cultivo de macrófagos murinos *in vitro*

Para llevar adelante el desarrollo de este seminario de título, en primer lugar fue necesario establecer un procedimiento de obtención de macrófagos peritoneales para realizar los cultivos *in vitro* en presencia de hemocianina. De esta manera, se logró obtener cultivos como los que se muestran en las fotografías tomadas directamente desde las placas de cultivo en la Figura 2 (bajo aumento en A y un acercamiento en B), donde se distinguen dos poblaciones celulares: alargadas y adheridas al sustrato y otras de forma redondeada prácticamente no adheridas. Dichos cultivos fueron cosechados y analizados mediante citometría de flujo, con lo cual se observó que la población celular era bastante uniforme visto en un gráfico de puntos o *dot plot* de granulosidad (SSC) vs tamaño (FSC) (Figura 2 C), puesto que la gran mayoría de las células se agrupan en una zona determinada (Figura 2 D). El procedimiento se realizó numerosas veces, obteniéndose resultados similares, por lo cual se consideró, que el protocolo establecido para obtener cultivos de macrófagos era reproducible y confiable.

Análisis posteriores de la población en cultivo usando un anticuerpo monoclonal para macrófagos (anti-F4/80) mostraron que alrededor del 93% de la población de células lo expresa, al comparar las células incubadas con el anticuerpo (Figura 3 B) respecto de las células sin el anticuerpo (Figura 3 A). Por lo tanto, se consideró que las células estaban suficientemente homogéneas y en condiciones morfológicas apropiadas para ser incubadas con CCH. Además, estudios paralelos del laboratorio en que estos cultivos fueron incubados con LPS y AIOH₃ demostraron su funcionalidad, reflejada en la secreción de la citoquina 1- β (Zhong, 2013).

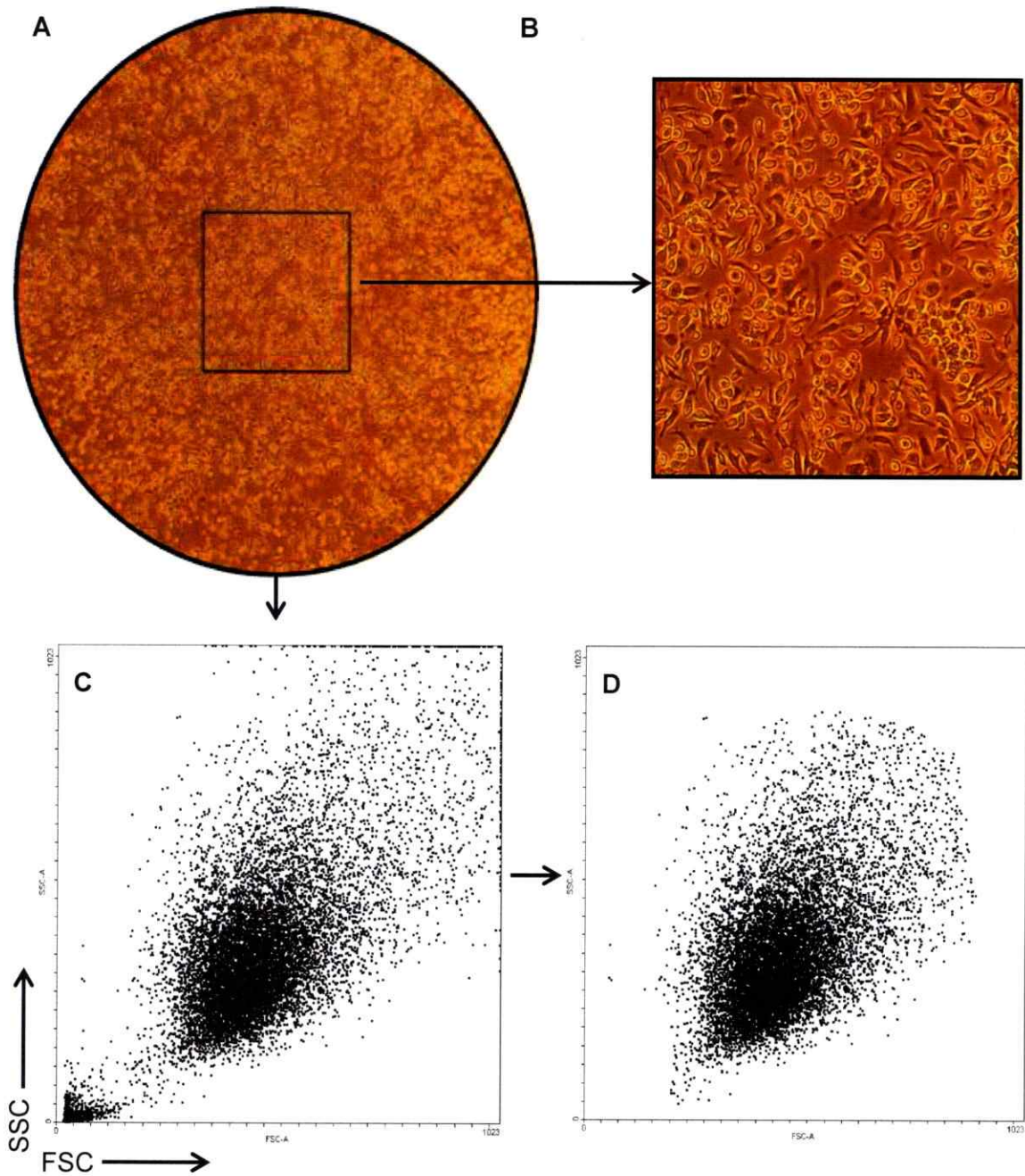


Figura 2. Caracterización del cultivo de macrófagos murinos a partir de células peritoneales.

A. Cultivo de células extraídas a partir de un lavado peritoneal, luego de seleccionar las células que se mantenían adheridas a la placa de cultivo. **B.** Aumento de A, en que se muestran células fusiformes adheridas al sustrato y también células esféricas. **C.** Gráfico de puntos o *dot plot* (SSC vs FSC) a partir del cultivo A. **D.** Zona que contiene el 85% de los eventos que se muestran en C.

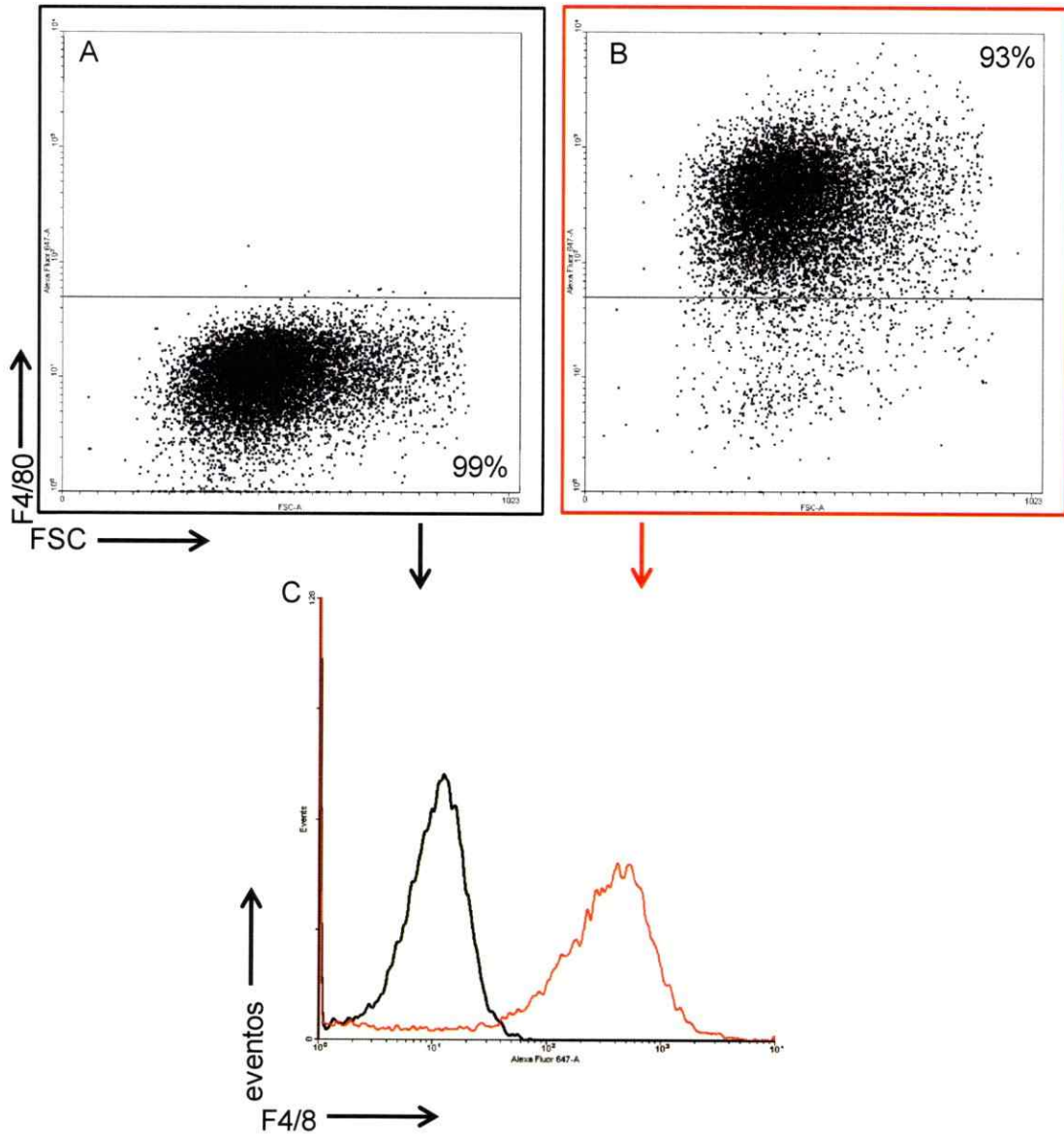


Figura 3. Determinación de la homogeneidad del cultivo de macrófagos.

A y **B**. *Dot plots* análogos al que se muestra en la Figura 2 D, pero usando el marcador F4/80 vs FSC; **A**. Control negativo, células sin teñir con el anticuerpo monoclonal específico. **B**. Células marcadas con el anticuerpo anti-F4/80. **C**. Histograma que representa la cantidad de fluorescencia de los eventos de **A** (línea negra) y **B** (línea roja).

2. Incorporación de CCH por macrófagos cultivados *in vitro*

Para determinar el proceso de incorporación de CCH por macrófagos se desarrollaron diferentes procedimientos. En primer lugar, se evaluaron dos concentraciones diferentes de hemocianina de *Concholepas concholepas* y OVO para determinar la mejor concentración a utilizar en los experimentos de incorporación *in vitro*. Para esto, se comparó el porcentaje de macrófagos que incorporaron las proteínas marcadas, luego de 1 o 4 horas después de haber agregado 100 o 200 μg de las proteínas por ml de medio de cultivo. Estos resultados se presentan en la Figura 4. No se observó mayor diferencia en la incorporación al incubar con las diferentes concentraciones de CCH, en contraste con una mayor incorporación de OVO cuando se agregan 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Por otra parte, experimentos previos de nuestro laboratorio demuestran que las DCs incorporan tanto CCH nativa como CCH desglicosilada químicamente (denominada Ox-CCH) la cual se obtiene mediante oxidación de sus azúcares con peryodato de sodio. Ambas proteínas son incorporadas principalmente por macropinocitosis y, en menor extensión, por endocitosis mediada por clatrina (Arancibia y col, 2012a). Por lo tanto, quisimos analizar si en macrófagos se observaba un fenómeno similar. Así, cultivos de macrófagos fueron incubados por diferentes tiempos (10 y 60 minutos) con CCH nativa o con Ox-CCH y luego fueron analizados mediante microscopía electrónica de transmisión, aprovechando que el enorme tamaño de las hemocianinas y su forma de cilindro hueco característica, permiten identificarlas fácilmente, sin la necesidad de utilizar métodos ultraimunocitoquímicos. Como control se analizaron cultivos de macrófagos sin CCH y también, cultivos de DCs.

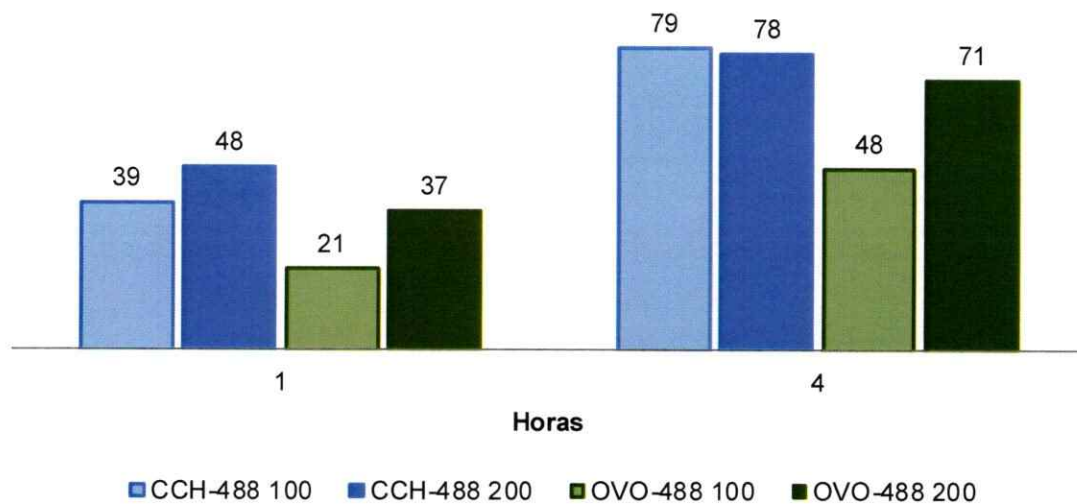


Figura 4. Porcentaje de macrófagos que incorporan CCH u OVO marcada a diferentes tiempos *in vitro*.

Se muestra el porcentaje de células que presentan doble marcaje (F4/80⁺ y proteína marcada con Alexa 488) en dos tiempos distintos, es decir, el porcentaje de macrófagos que incorporan CCH u OVO marcadas fluorescentemente, cuando las proteínas se agregan a 100 o 200 µg/ml de medio de cultivo. Los datos graficados corresponden a un experimento, en que cada condición no tuvo réplica.

Los resultados se muestran en la Figura 5, donde se observa la morfología propia de un macrófago en un cultivo control (Figura 5 A), caracterizada por la presencia de numerosas prolongaciones citoplasmáticas en su superficie. El núcleo se presenta polarizado y con un nucléolo prominente. En el citoplasma se observa la presencia de pequeñas vacuolas pinocíticas de contenido claro y también grandes vacuolas heterofágicas con un contenido particulado muy fino, característico de este tipo celular (Bloom y Fawcett, 1975). En las fotografías a continuación, se muestra que tanto CCH nativa como Ox-CCH son incorporadas por macropinocitosis y luego se reconocen en vesículas claras que podrían corresponder a lisosomas, porque tienen doble membrana y en su interior se observan restos membranosos y moléculas de hemocianina, dando cuenta que efectivamente, esta proteína es incorporada, ya sea por macropinocitosis o por endocitosis en los macrófagos y, que la presencia o ausencia de azúcares en la proteína, no afecta este fenómeno.

A modo de comparación, en la Figura 6 se muestran los resultados de incorporación de CCH en DCs. Morfológicamente, estas células muestran numerosas prolongaciones en su superficie, y a diferencia de los macrófagos, tienen una organización polarizada de sus organelos, caracterizada por la presencia de un núcleo excéntrico al cual le sigue una columna de numerosos organelos. Además, las DCs no presentan en su citoplasma las enormes vesículas heterofágicas con contenido particulado fino que se observó en macrófagos (Figura 6 A en contraste con Figura 5 A). A pesar de haber agregado la misma cantidad de CCH tanto en DCs como en macrófagos, cualitativamente, nos llamó la atención la presencia de una cantidad mayor de moléculas de CCH en vesículas de DCs respecto a la cantidad de moléculas presente en las vesículas de macrófagos.

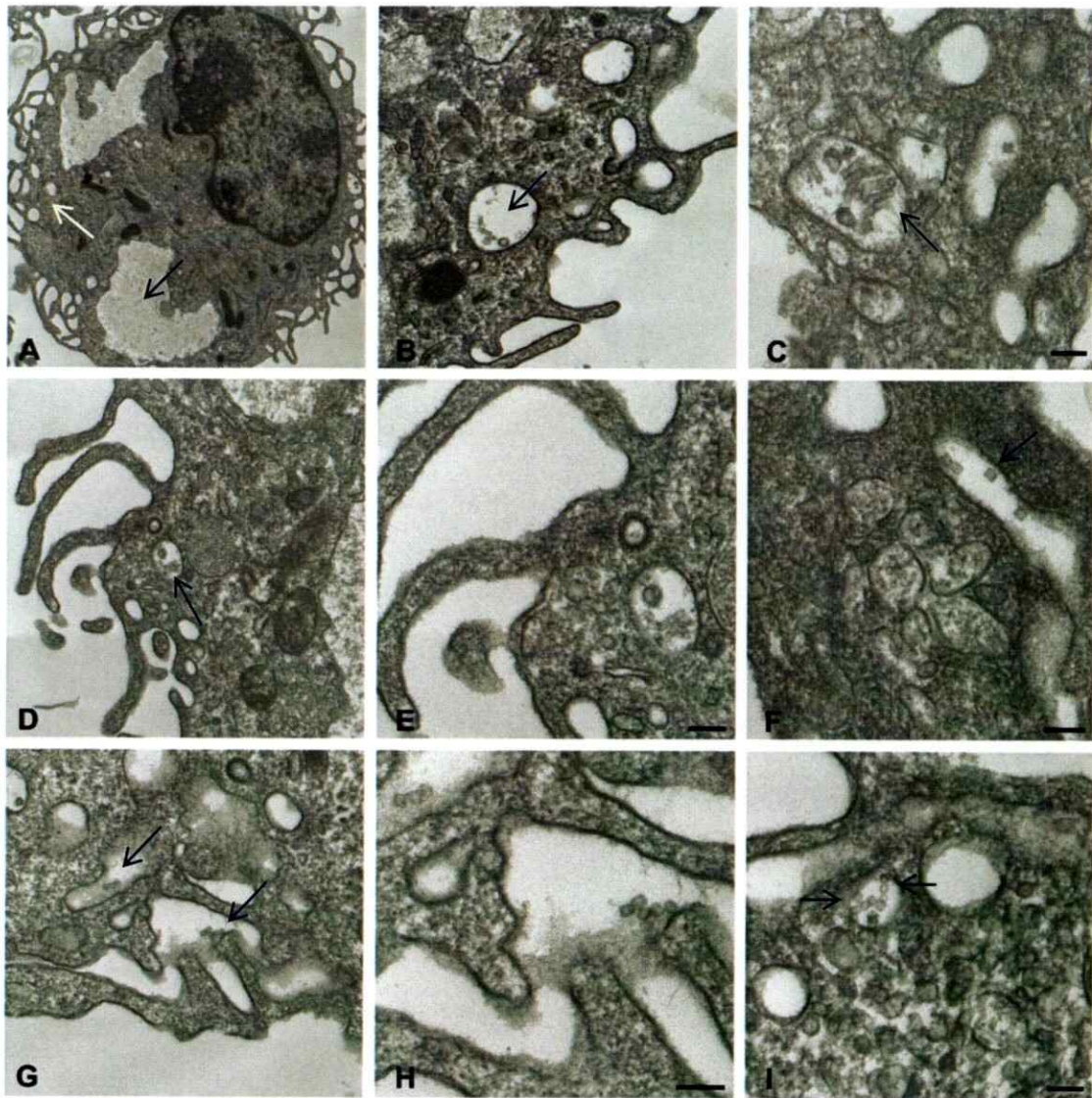


Figura 5. Incorporación *in vitro* de CCH con y sin residuos oligosacáridos por macrófagos.

A. Macrófago control, sin CCH. Se muestran vacuolas pinocíticas (flecha blanca) y vacuolas heterofágicas (flecha negra). **B, C y D.** Macrófagos mostrando una vacuola pinocítica superficial con CCH en su interior (flechas). **E.** aumento de la vacuola destacada con una flecha en D; **F.** Otra vacuola superficial con CCH en su interior (flecha). **G.** Detalle de un proceso celular que tiene adheridas moléculas de CCH desglucosiladas (flechas). **H.** Aumento de los procesos celulares destacados con flechas en G. **I.** Vacuola superficial con Ox-CCH observándose moléculas en ambos ejes de simetría (flechas). Las barras indican 100 nm.

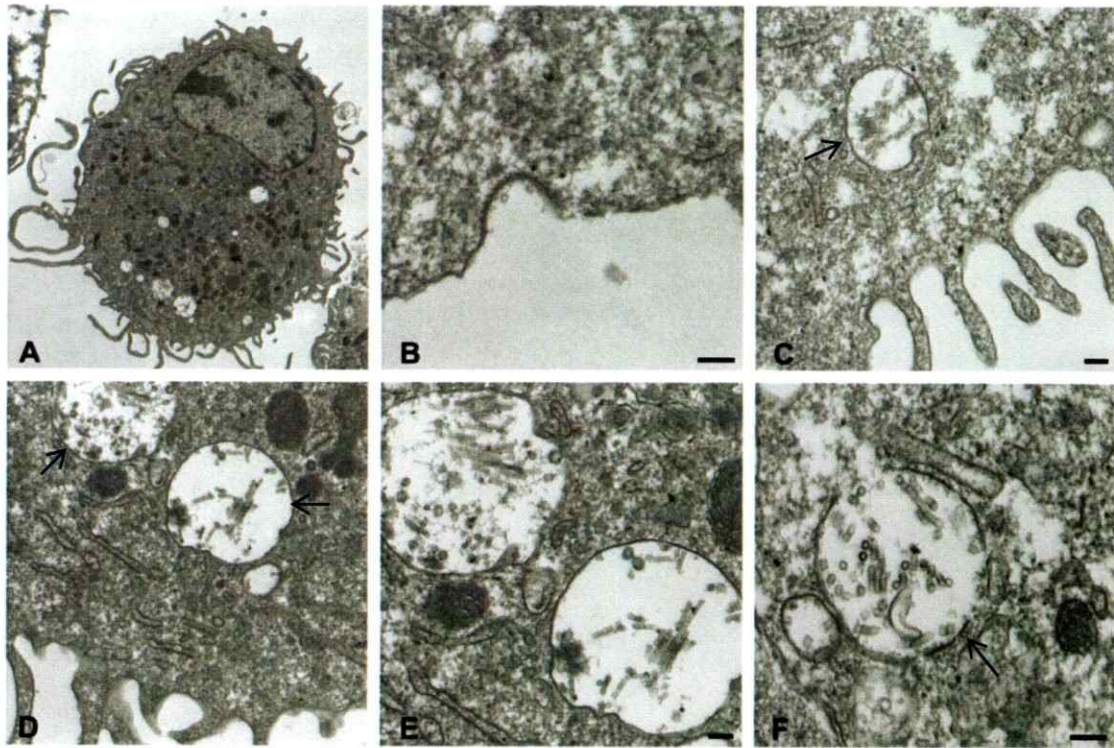


Figura 6. Incorporación *in vitro* de CCH por DCs.

A. DC control, sin CCH, mostrando su morfología polarizada. **B.** Un par de moléculas de CCH adheridas a la superficie de una región con clatrina (Schmid, 1997). **C y D.** DCs mostrando una vacuola superficial con CCH en su interior (flechas). **E.** Aumento de las vacuolas destacadas con flechas en D. **F.** DC mostrando una vacuola con CCH en su interior (flecha), observándose numerosas moléculas. Las barras indican 100 nm.

3. Incorporación de CCH por macrófagos *in vivo*

Para llevar adelante los experimentos de incorporación de CCH *in vivo*, ratones de la cepa C57BL6 fueron inyectados en la cavidad peritoneal con 1 mg de proteína (CCH u OVO, marcadas con el fluoróforo Alexa Fluor 488, o sin marcar como control), a diferentes tiempos (entre 1 hora y 72 horas). Para recuperar las células del peritoneo, se realizó un lavado de la cavidad peritoneal y posteriormente se sometieron a un análisis mediante citometría de flujo, utilizando como marcador de macrófagos un anticuerpo monoclonal anti-F4/80 acoplado al fluoróforo (Alexa Fluor 647).

Los resultados presentados en la Figura 7 muestran que no existe diferencia significativa entre la incorporación de las proteínas sin marcar respecto de las proteínas acopladas a fluoróforo, por parte de la población de macrófagos presentes en el peritoneo. En tanto, se observaron leves diferencias, en cuanto al porcentaje de células marcadas en la cavidad peritoneal luego de inyectar CCH con respecto a inyectar OVO. Cabe notar la persistencia de la fluorescencia a las 72 horas.

Posteriormente, se analizó el porcentaje macrófagos presentes en la cavidad peritoneal que incorporaron proteína marcada. Los resultados, presentes en la Figura 8, indican que OVO ingresaría más rápido a los macrófagos que CCH, con máximos de incorporación en torno a las 14 horas (~14% de células marcadas) y 24 horas (~19% de células marcadas), respectivamente. Cabe mencionar un hecho curioso en los experimentos es que para OVO se observaron dos máximos locales de incorporación, el primero en torno a 1 hora y el segundo en torno a las 14 horas.

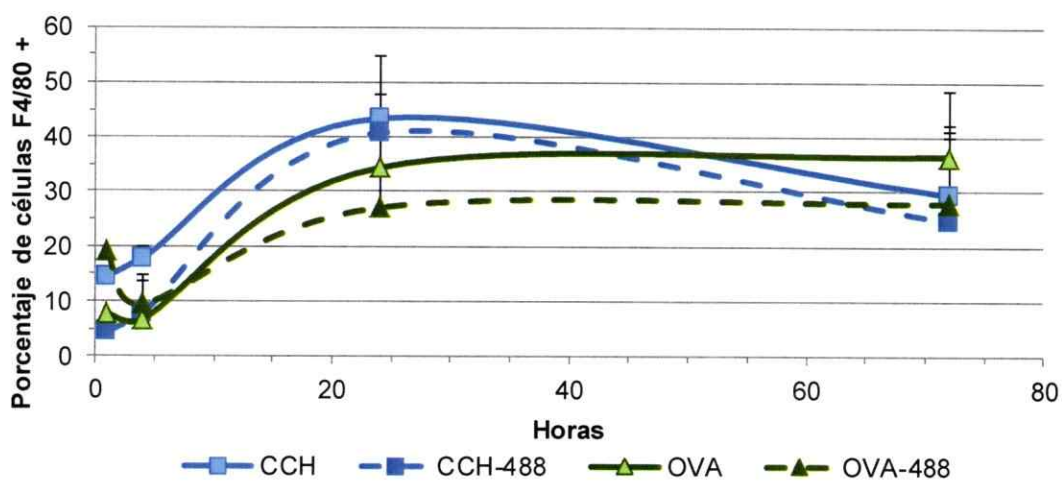


Figura 7. Cantidad de macrófagos en la cavidad peritoneal a diferentes tiempos post-inyección de CCH, CCH-488, OVO y OVO-488.

Porcentaje de macrófagos peritoneales recuperados a diferentes tiempos post inyección intraperitoneal de las diferentes proteínas en estudio, analizados por citometría de flujo usando el marcador específico anti-F4/80. Los gráficos representan el promedio de 2 experimentos independientes.

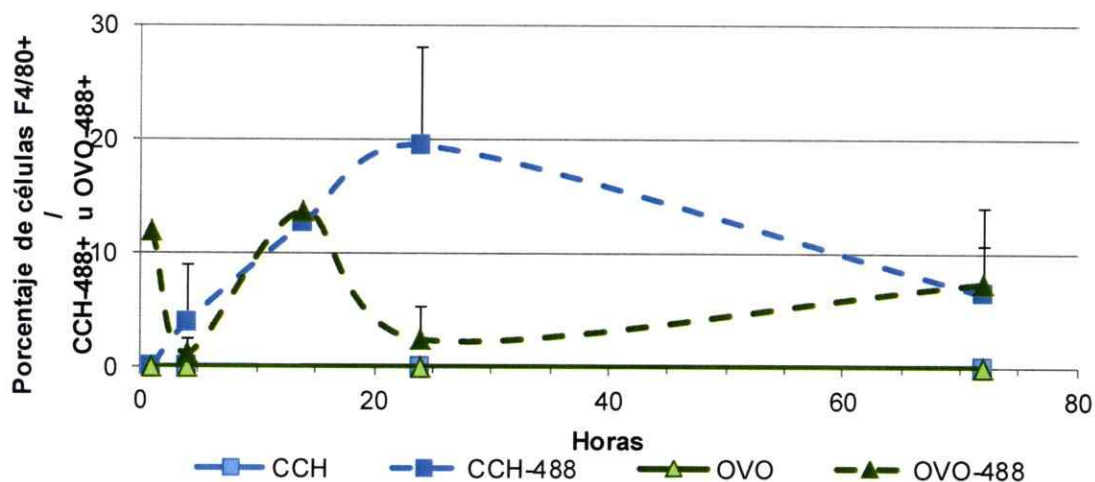


Figura 8. Cinética de incorporación *in vivo* de CCH-488 u OVO-488.

Porcentaje de células F4/80⁺ que incorporan CCH-488 u OVO-488 a diferentes tiempos post-inyección intraperitoneal de las proteínas. Como control se utilizó las proteínas sin marcar. Se realizaron 2 experimentos independientes con resultados similares.

4. Procesamiento de CCH por macrófagos *in vitro*

Para evaluar el procesamiento de CCH *in vitro* por macrófagos se siguió su fragmentación mediante *Western blot*, analizando extractos de macrófagos previamente cultivados con CCH durante diferentes tiempos y revelando la hemocianina con un suero de conejo anti-CCH. (Figura 9 A). Como control de carga se utilizó la proteína β -actina, usando un anticuerpo comercial específico para ella (Figura 9 B). Se debe recordar que ambas imágenes corresponden a la misma membrana, puesto que primero se reveló mediante quimioluminiscencia para determinar si se había cargado la misma cantidad de proteína en cada carril. Luego, se removieron los anticuerpos anti- β -actina y su conjugado para, posteriormente, incubar con los anticuerpos anti-hemocianina y revelar con un conjugado marcado con FAL (ver Método 2.4). Los resultados del *Western blot* para CCH mostraron la presencia de fragmentos de hemocianina (121, 72, 53 y 46 kDa) teñidos tenuemente a las 4 horas de incubación, los cuales se intensifican a las 24 horas y aun más a las 72 horas, para luego disminuir a las 120 horas. En tiempos superiores, se observa la persistencia de una banda tenue en torno a 46 kDa que podría corresponder a una FU. En la Figura 9 B se muestra que la cantidad de proteína cargada por carril fue relativamente similar, con una banda de señal intensa en torno a los 42 kDa. Se destaca que los dos carriles que muestran menor carga, corresponden a los tiempos de mayor intensidad de los fragmentos de CCH. Estos resultados en su conjunto, demuestran que CCH es lentamente degradada por macrófagos, lo cual apoya las observaciones previas de nuestro laboratorio pero en células dendríticas (Arancibia y col, 2012a).

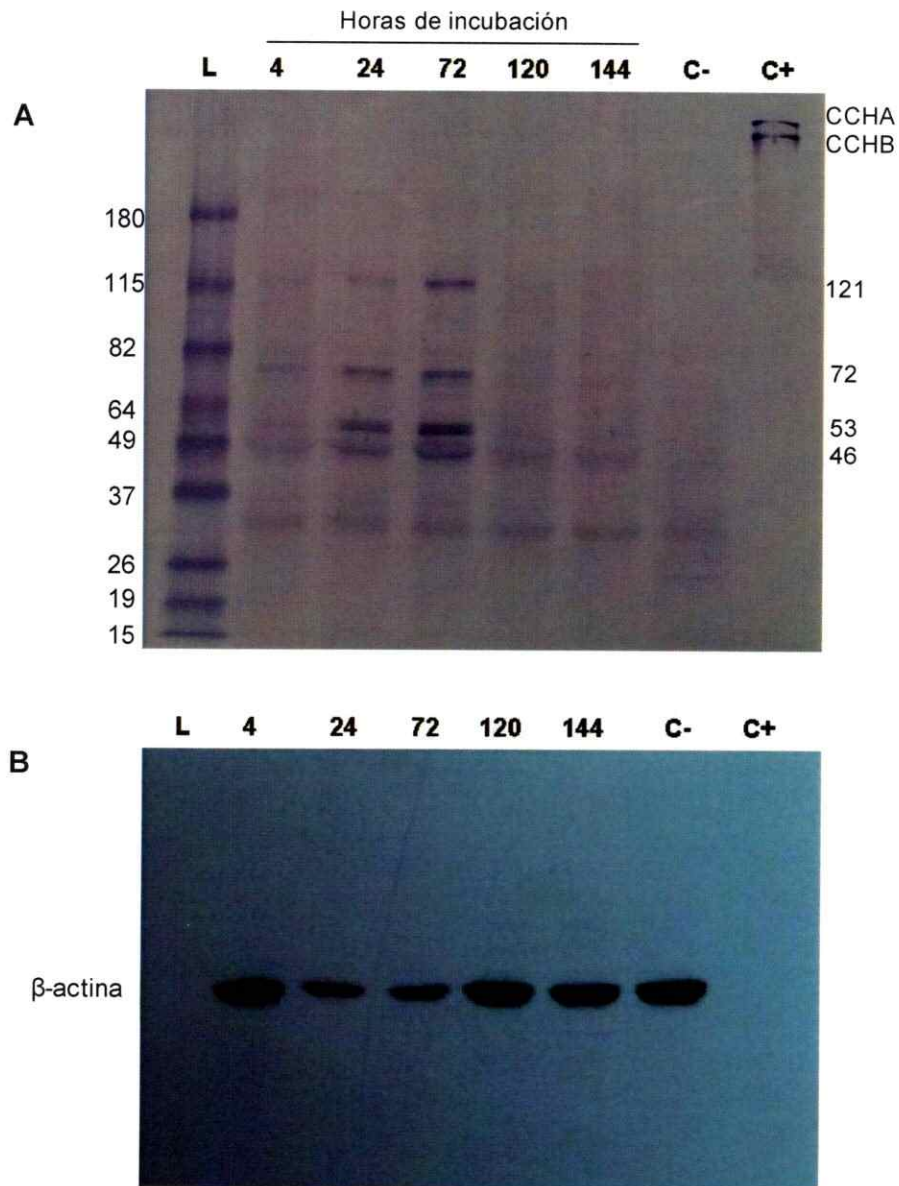


Figura 9. Western blot de extractos celulares de macrófagos incubados con CCH durante distintos tiempos.

Arriba, la membrana se incubó con antisuero de conejo anti-CCH y se reveló con FAL. Abajo, la membrana se incubó con anticuerpo anti- β -actina, como control de carga, y se reveló mediante quimioluminiscencia. L se refiere al marcador de peso molecular, los números horizontales indican las horas de incubación con CCH, C- corresponde a un extracto celular sin adicionar CCH y C+ corresponde a CCH sola, mostrando sus dos subunidades características, CCHA (405 kDa) y CCHB (350 kDa). El experimento se repitió 10 veces, hasta tener una visualización óptima y reproducible de las bandas.

DISCUSIÓN

Desde que la hemocianina de *Keyhole limpet* comenzara a utilizarse en diferentes ámbitos biomédicos y biotecnológicos en la década de los 60's, se ha acumulado evidencia que demuestra inequívocamente que, las hemocianinas de moluscos generan una potente respuesta inmunológica al ser inoculadas en mamíferos. Esta propiedad es intrínseca de estas proteínas, puesto que ocurre sin la necesidad de administrarlas en conjunto con un adyuvante y se caracteriza porque genera un ambiente de citoquinas del tipo Th1 (Molledo y col, 2006). Dado que esta propiedad también se presenta en humanos, dichas proteínas tienen aplicaciones en el campo de la biomedicina y son de valor biotecnológico, como por ejemplo, en la terapia para prevenir la recurrencia del carcinoma superficial de vejiga. Sin embargo, no se conoce con certeza los mecanismos que pueden estar involucrados en este efecto, ni tampoco las células que participan. Por este motivo, durante el desarrollo de este trabajo se ha intentado contribuir al conocimiento acerca de las células que participan en el reconocimiento y procesamiento de la hemocianina del molusco chileno *Concholepas concholepas*.

La respuesta inmunológica que se genera a partir de la inoculación de las hemocianinas de moluscos ha sido caracterizada por estar mediada por linfocitos T CD4⁺, lo que significa que se utiliza la vía exógena de presentación de antígenos para iniciar la respuesta inmune adaptativa contra ellas. Esta vía requiere que los fragmentos proteicos de la hemocianina, se carguen en MHCII y bajo este contexto, las APC son indispensables para gatillar el proceso de respuesta inmune frente a CCH. Sin embargo, surge la pregunta de cual o cuales APCs incorporan hemocianina y como ella/s generan una respuesta innata que posteriormente conduzca a la poderosa

respuesta adaptativa de tipo timo-dependiente que las caracteriza y que tiene efectos inmunoestimulantes no específicos. Más aun, considerando que uno de los dogmas actuales de la inmunología señala que un antígeno para generar respuesta inmune debe generar un ambiente pro-inflamatorio. En este marco, nuestro laboratorio ha propuesto que el efecto inmunoestimulante de las hemocianinas, se explica en parte porque al ser incorporadas por APCs, conducen a la creación de un ambiente pro-inflamatorio que lleva a potenciar la respuesta adaptativa del tipo Th1 contra ellas, la cual indirectamente, estimula respuestas inmunes antitumorales latentes en los ganglios regionales (Molledo y col, 2006; Arancibia y col, 2012a). Anteriormente, se demostró tanto por microscopía electrónica de transmisión como por citometría de flujo, que las DCs incorporan CCH en tiempos tempranos de incubación *in vitro*. Además, se determinó que CCH ingresa vía vesículas de clatrina y, por *Western blot*, se observó que la degradación de CCH era paulatina, encontrándose fragmentos entre 40 y 120 kDa, con una banda intensa en torno a 45 kDa aproximadamente sobre las 50 horas de incubación (Del Campo, 2007; Arancibia y col, 2012a).

Es así entonces, que este trabajo se centró en estudiar la participación por parte de los macrófagos en la respuesta inmune contra hemocianina. Aunque se conoce que las DCs son las células presentadoras de antígeno por excelencia, se quiso determinar si este segundo grupo celular participaba de la respuesta inmune asociada a la inoculación de CCH, puesto que existen antecedentes que en la orina de pacientes con CSV aparece IL-1 α , una citoquina pro-inflamatoria secretada por macrófagos activados (Jurincic-Winkler y col, 1995).

Para comenzar este estudio y llevar a cabo los experimentos *in vitro*, fue necesario establecer un cultivo de macrófagos. Para ello se utilizó la cepa de ratones C57BL/6

puesto a que es un buen modelo en inmunología experimental, disponiéndose de bastante información acerca de esta cepa y también, porque existe una gran variedad de marcadores específicos para distinguir entre tipos celulares. Además, considerando nuestro interés de proyectar el uso de hemocianinas en inmunoterapia de algunos cánceres, se considera a este modelo un predictor razonable de la efectividad de la inmunoterapia contra tumores humanos y por lo tanto, es importante toda la información que podamos recabar utilizándolo (Kochenderfer y Gress, 2007).

Los macrófagos se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos del animal, sin embargo, generalmente son difíciles de aislar. Principalmente, los métodos utilizados para su obtención son la maduración a partir de monocitos sanguíneos y la obtención de los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal. De estos dos métodos, la cavidad peritoneal permite la obtención sencilla de un número moderado de macrófagos, una cantidad que puede ser insuficiente para realizar experimentos que necesitan de una gran cantidad de células. Sin embargo, siguiendo el procedimiento publicado por Zhang y col, se utilizó una solución de tioglicolato para aumentar el rendimiento de obtención (alrededor de $1 - 2 \times 10^7$ células, 75% macrófagos). Esta solución provoca una respuesta inflamatoria que incrementa la migración de monocitos hacia la cavidad peritoneal, aumentando así la cantidad de macrófagos presentes en ella.

Para determinar la uniformidad del cultivo de macrófagos, este se analizó mediante citometría de flujo. En la Figura 2 C se observa claramente una región que posee cierta regularidad respecto a los parámetros de FSC y SSC. Esto estaría indicando una población celular que posee tamaño y forma similares, dado que el parámetro FSC es indicativo del largo de las células y SSC de las irregularidades presentes en la

membrana celular. Además, cabe mencionar que los elementos con parámetros FSC y SSC extremos, es decir, las esquinas inferior izquierda y superior derecha de la Figura 2 C no se consideraron para los análisis siguientes, porque sus parámetros indicarían que no corresponden a células. De esta forma, la región considerada para evaluar la uniformidad del cultivo corresponde al 85% de los eventos analizados por el citómetro, lo cual se observa gráficamente en la Figura 2 D. Para discriminar los macrófagos del resto de las poblaciones celulares se utilizó el anticuerpo anti-F4/80. La proteína F4/80 corresponde a una proteína de membrana de la familia de las EGF-TM7, compuesta por seis dominios EGF (*Epidermal Growth Factor*) y siete dominios transmembrana, que en ratones se presenta principalmente en macrófagos (Gordon y col, 2011). De esta manera en la Figura 3 se observa que el alrededor del 90% de las células analizadas del cultivo presentan F4/80 en su membrana, lo cual se condice con los rendimientos mencionados en el procedimiento. Así, se consideró que el cultivo de macrófagos era lo suficientemente homogéneo. Sin embargo, era fundamental determinar su funcionalidad. Es así que se realizaron experimentos en paralelo en los cultivos de macrófagos para determinar la expresión génica de algunas citoquinas pro-inflamatorias características (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-12p40) mediante qPCR y posteriormente, se evaluó su secreción al medio de cultivo, usando ensayos de ELISA comerciales (Zhong y col, 2012). Se encontró que todas las citoquinas señaladas aumentaron su nivel de transcripción y de secreción en presencia de LPS, con respecto al control. En el caso de la IL-1 β fue necesario además agregar AlOH₃ o ATP, ya que para que se secrete IL-1 β se necesita de una segunda señal para activar el inflamosoma y de esta manera a la caspasa-1, que es la encargada de producir la maduración de la proteína desde la forma de 31 kDa a la de 17 kDa (van de Veerdonk, 2011).

Luego de haber establecido el cultivo base del presente trabajo, se procedió a estudiar la incorporación de CCH *in vitro*. Primero se evaluó la concentración de proteína a utilizar durante los experimentos, para lo cual se comparó la incorporación de dos concentraciones distintas de proteína marcada con fluoróforo, tanto de CCH como OVO. En la Figura 4 se observa que CCH es incorporada por gran parte de la población celular al cabo de 4 horas para ambas concentraciones de proteína. Por otra parte, se observa una menor proporción de la población celular que incorpora 100 $\mu\text{g/ml}$ de OVO, frente a la que incorpora 200 $\mu\text{g/ml}$. Así, se decidió utilizar 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína para los experimentos de *Western blot*, puesto que no se presentaron mayores diferencias de incorporación al utilizar CCH. Además, esta concentración está en el rango de estudios similares con otro tipo de proteína: por ejemplo, en estudios de activación lisosomal en DCs, se utilizó diferentes formas de RNAsa a razón de 500 $\mu\text{g/ml}$ (Delamarre y col, 2005).

Por otra parte, utilizando microscopía electrónica de transmisión se observó que la población de macrófagos en cultivo incorpora CCH en tiempos tempranos de incubación. Para la realización de estos experimentos cabe destacar el excelente estado de preservación del material, lo cual es fundamental al momento de visualizar moléculas de CCH. Para ello fue necesario optimizar las condiciones de fijación, ya que en los primeros experimentos, las células se cosechaban y luego se fijaban y, aunque el procedimiento no tomaba más de 20 minutos, era suficiente para que el material se notara mal preservado. Por esta razón, la mejor condición de preservación se logró fijando brevemente las células, previo a su desprendimiento del plástico de la placa de cultivo. Además, como se señaló anteriormente, gracias al enorme tamaño de estas proteínas y su peculiar forma de cilindro hueco, fue posible identificar estas

moléculas sin mayores dificultades, como se muestra en las microfotografías de las Figura 5 y Figura 6. Para realizar la microscopía se utilizó la proteína en su forma nativa y desglicosilada químicamente con peryodato de sodio, un tratamiento que oxida la molécula al actuar sobre los grupos hidroxilos de carbonos adyacentes rompiendo el enlace C-C, en un medio tamponado con acetato a pH ácido (Sussich y Cesaro, 2000), procedimiento que también le confiere mayor estabilidad ya que provoca entrecruzamientos inter- e intra- moleculares debido a la formación de bases de Schiff (Arancibia y col, 2012b). Este fenómeno se aprecia en las ambas Figuras, ya que la forma de las moléculas de Ox-CCH se visualizó con mayor nitidez que las de CCH nativa. En la Figura 5 I se observan claramente moléculas que se corresponden con la forma cilíndrica, donde se aprecian vistas laterales (flecha izquierda, forma rectangular) y vistas superiores (flecha derecha, forma circular) de moléculas. Por otra parte, al comparar las muestras de macrófagos (Figura 5) con las muestras de DCs (Figura 6) se observa que, en general, las vesículas de DCs contienen una mayor cantidad de moléculas de CCH, tanto en las muestras incubadas con proteína en su forma nativa como desglicosilada. Además al momento de observar las muestras al microscopio electrónico, se encontraron con mayor facilidad las vesículas que contienen CCH en DCs que en las de macrófagos.

Las moléculas de hemocianina se incorporaron principalmente por macropinocitosis, pero también, al igual que en DCs, se incorporan vía vesículas recubiertas de clatrina (Schmid, 1997). Esto se explicaría en parte, porque los macrófagos al igual que las células dendríticas, son células altamente especializadas en el reconocimiento de los más variados tipos de antígenos, para lo cual utilizan diferentes formas de endocitosis (Mellman, 1996). Sin embargo, a la fecha hay escaso

conocimiento sobre si este reconocimiento es mediado por receptores de la inmunidad innata presentes en APCs como podrían ser, por ejemplo, los de tipo lectina, DC-SIGN, Dectina y particularmente los receptores de manosa (East y Isacke, 2002). Como se señaló anteriormente, manosa es el oligosacárido mayoritariamente presente en hemocianinas. Sin embargo, estudios en DCs humanas cultivadas *in vitro* demuestran que dicho receptor está parcialmente envuelto en la incorporación de KLH (Presicce y col, 2008). Por otra parte, los resultados con Ox-CCH en DCs (Arancibia y col, 2012a) y los obtenidos con macrófagos en este trabajo, muestran que los azúcares no serían determinantes en el proceso de incorporación de KLH y CCH por APCs. Más aún, se ha demostrado que Ox-CCH es más inmunogénica que su forma nativa y que mantiene sus efectos antitumorales en un modelo murino de melanoma (Arancibia y col, 2012a).

Por otra parte, mediante citometría de flujo se evaluó la incorporación de CCH y OVO *in vivo*, por parte de la población de macrófagos del peritoneo. Sin embargo, esto no distingue entre los macrófagos residentes y los que llegan producto la respuesta hacia la proteína. Según la literatura los macrófagos residentes representan el 50% del total de células de la cavidad peritoneal en un ratón sin manipular, mientras que podrían corresponder a un 70% cuando son inyectados con sustancias extrañas (Zhang y col, 2008). Esto nos lleva a proponer, que en experimentos futuros, habría que buscar en los ganglios linfáticos correspondientes la presencia de trazas de hemocianina, lo cual no se realizó.

Un hecho que llama la atención en los resultados de la cinética de incorporación de OVO, es la presencia de dos máximos de incorporación (ver Figura 8), uno que ocurre inmediatamente post inoculación y el otro, ocurre alrededor de las 14 horas. Una

interpretación posible radica en el tamaño de ambas proteínas. Al ser OVO más pequeña (45 kDa) que CCH (8 MDa), difundiría más rápidamente y se uniría a la superficie de los macrófagos sin ser endocitada (primer máximo), sugiriendo que para ello se requiere la inducción de un ligando o un cambio en la superficie de los macrófagos (segundo máximo). Sin embargo, estudios de incorporación de KLH-FITC y OVO-FITC en células intestinales epiteliales humanas cultivadas *in vitro*, por ejemplo, demuestran que este proceso no es afectado por el tamaño de dichas proteínas pero si por su solubilidad (So y col, 2000). En este caso, descartamos un efecto de la solubilidad, ya que CCH y OVO son proteínas muy solubles y, aunque no lo fueran, es sabido que en los macrófagos se favorece la endocitosis de complejos proteicos insolubles mediante la opsonización. Finalmente, no podemos descartar que se deba a un efecto debido a la carga neta diferente de ambas proteínas, ya que se sabe que ella afecta las propiedades de interacción con receptores de la superficie celular, su internalización y su destino intracelular (Davies y col, 1981; Goldstein y col, 1985; Mellman y col, 1996). Por último no se puede descartar un efecto causado por los fluoróforos sobre OVO. Averiguarlo requeriría de nuevos experimentos que apuntaran a alguna de estas explicaciones.

Posteriormente, para evaluar el procesamiento de CCH por parte de macrófagos peritoneales, se decidió analizar extractos de macrófagos previamente incubados con 100 µg/ml de CCH a diferentes tiempos. En el *Western blot* presente en la Figura 9 A se observan bandas de 121, 72, 53 y 46 kDa aproximadamente, las cuales se mantienen hasta las 72 horas post-incubación con CCH. Los pesos de estas bandas se corresponden con los trabajos previos del laboratorio realizados en DCs en que cuales

se observan que las bandas en un *Western blot* oscilaban entre los 40 y 120 kDa (Del Campo, 2007).

A modo de comparación, se debe señalar que los resultados con OVO usando procedimientos similares demuestran que el procesamiento de esta proteína por parte de extractos de macrófagos ocurre rápidamente, ya que se aprecia una rápida degradación de esta proteína en un *Western blot*, donde se deja de ver la banda correspondiente a OVO en un tiempo de una hora aproximadamente (Delamarre y col, 2005). Resultados similares se obtuvieron en DCs (Arancibia y col, 2012a).

Resultados previos del laboratorio (Becker MI y col, 2009) indican que las moléculas de CCH se conforman por las subunidades CCHA y CCHB, cuyos pesos moleculares son de 405 y 350 kDa, respectivamente. Sin embargo, en el *Western blot* de la Figura 9 A no se observan bandas que puedan corresponderse con fragmentos de dichos tamaños, por lo que una interpretación posible es que no se acumula suficiente cantidad de las subunidades de CCH dentro del sistema vesicular del macrófago como para ser detectadas mediante esta metodología. Considerando los tamaños de las bandas persistentes, las de menor peso (46 y 53 kDa) podrían corresponder a FUs, dado que su peso molecular se encuentra en torno a los 50 kDa para ambas subunidades (De Ioannes y col, 2004; Becker MI y col, 2009). Posiblemente, las regiones flexibles (o más inestables) que unen covalentemente las FUs (véase en Figura 1) son digeridas con mayor facilidad por las enzimas presentes en el sistema proteolítico de los macrófagos debido a que se encuentran más expuestas al medio y por ende, son más asequibles a las distintas enzimas (Landry, 1997). Resultados similares a CCH hemos encontrado con una nueva hemocianina descubierta en nuestro laboratorio, proveniente de *Fissurella latimarginata* (FLH), que

al compararla con CCH y KLH, es más inmunogénica y mejor agente antitumoral en un modelo de melanoma murino. Es así que en macrófagos incubados con FLH, se observa mediante *Western blot* la persistencia de una banda en torno a 31 kDA luego de 72 horas de incubación, que podría corresponder a una FU (Becker y col, 2012).

Finalmente, un aspecto fundamental de la presentación antigénica es la presentación de los péptidos en los MHC, en este caso, como ya se ha señalado en MHCII por tratarse de una proteína exógena. Sin embargo, los estudios realizados a la fecha en nuestro laboratorio, en macrófagos y en DCs murinas cultivadas *in vitro*, no muestran el fenómeno de aumento de MHCII ni de moléculas co-estimuladoras que acompaña este proceso, sugiriendo que mecanismos no canónicos de presentación operan con las hemocianinas. Más aún, ha sido reportado que sólo cuando CCH es contaminada con LPS es posible observar un aumento de la expresión de MHCII de DCs en tiempos tempranos (Molledo y col, 2009). Por lo tanto, concluimos que el lento procesamiento de CCH nativa, que se traduce en una mantención de la presentación antigénica por un tiempo mayor que el habitual, sea uno de los factores que explican la inmunogenicidad de las hemocianinas. Esta idea se apoya en trabajos publicados que demuestran que el retardo en la proteólisis de un antígeno mejora su inmunogenicidad, la presentación antigénica y su capacidad de permanecer por más tiempo en APCs localizadas en los nódulos linfáticos, para así diseminar sistémicamente el antígeno y estimular por un mayor período de tiempo a linfocitos T (Delamarre y col, 2005 y 2006)

CONCLUSIONES

1. Los macrófagos peritoneales murinos incorporan CCH tanto *in vitro* como *in vivo*, por macropinocitosis principalmente como queda demostrado por la detección de moléculas de CCH por microscopía electrónica de transmisión. Su ingreso además fue corroborado por citometría de flujo con hemocianina marcada con un fluoróforo, y también revelando sus fragmentos mediante *Western blot* con anticuerpos específicos.
2. Los azúcares de CCH no son determinantes en la incorporación de hemocianinas por macrófagos, ya que tanto CCH nativa como Ox-CCH se reconocen en el interior de vacuolas pinocíticas.
3. Los estudios *in vivo*, indicaron que OVO ingresa más rápido a los macrófagos que CCH, con máximos de incorporación en torno a las 14 y 24 horas, respectivamente.
4. Se demostró que CCH *in vitro* es procesada mucho más lentamente que OVO, en los macrófagos, encontrándose fragmentos en torno a 50 kDa que podrían corresponder a una unidad funcional en tiempos superiores a las 24 horas.
5. Los resultados obtenidos demuestran que los macrófagos también participan en los mecanismos inmunológicos tempranos que acompañan el reconocimiento de las hemocianinas como antígenos y, su poderosa maquinaria proteolítica no es capaz de degradarlas rápidamente como a otros antígenos de naturaleza proteica, propiedad que la denota como una de las causas de sus notables efectos sobre el sistema inmune de los mamíferos.

BIBLIOGRAFÍA

- Arancibia S, Del Campo, Nova E, Salazar F, Becker MI (2012a) Enhanced structural stability of *Concholepas* hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur J Immunol* **42**: 688-699.
- Arancibia S, Salazar F, Backer MI (2012b) Hemocyanins in the immunotherapy of superficial bladder cancer. En AE Canda (Ed), *Bladder Cancer*. pp 221-242. InTech.
- Atala A (2006) Immunotherapeutic effect of concholepas hemocyanin in bladder cancer. *J Urol* **176**: 2335-2336.
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252.
- Becker MI, Fuentes A, Del Campo M, Manubens A, Nova E, Oliva H, Faunes F, Valenzuela MA, Campos-Valette M, Aliaga A, Ferreira J, De Ioannes A, De Ioannes P, Moltedo B (2009) Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *International Immunopharmacology* **9**: 330-339.
- Becker MI, Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, Del Campo M, Born R, Ferreira J, Manubens A, De Ioannes A (2012) Novel hemocyanin from the *Fissurella latimarginata* exhibits an outstanding immunogenicity and non-specific immunomodulatory effects in a melanoma model. 99th American Association of Immunologist. Boston, USA. *J Immunol* **188**: 53.6.
- Birmingham J, Chesnut R, Kappler J, Marrack P, Kubo R, Grey H (1982) Antigen presentation to T cell hybridomas by a macrophage cell line: an inducible function. *J Immunol* **128**(3): 1491-1492.
- Bloom W, Fawcett DW (1975) *A Textbook of Histology*. pp 175-179. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Davies PF, Rennke HG, Cotran RS (1981) Influence of molecular charge upon the endocytosis and intracellular fate of peroxidase activity in cultured arterial endothelium. *J Cell Sci* **49**: 69-86.
- De Ioannes P, Moltedo B, Oliva H, Pacheco R, Faunes F, De Ioannes AE, Becker MI (2004) Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual hetero decameric array of subunits. *J Biol Chem* **279**: 26134-26142.
- Decker H, Hellmann N, Jaenicke E, Lieb B, Meissner U, Markl J (2007) Minireview: Recent progress in hemocyanin research. *Integr Comp Biol* **47**(4): 631-44.
- Del Campo M (2007) Efecto de hemocianinas de moluscos en la maduración de células dendríticas murinas. Memoria para optar al título de Bioquímico. Santiago, Chile. Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Del Campo M, Arancibia S, Nova E, Salazar F, González A, Moltedo B, De Ioannes P, Ferreira J, Manubens A, Becker MI (2011) Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Rev médica Chile* **139**: 236-46
- Del Campo M, Lagos L, Puente J, Manubens M, De Ioannes A, Arancibia S, Becker MI. Hemocyanins promote an immunological synapse between natural killer cells and dendritic cells. Enviado a publicación a *Clinical & Developmental Immunology*, Febrero 2013.

- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES (2005) Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* **307**:1630-1634.
- Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES (2006) Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med* **203**:2049-2055.
- Dolashka P, Velkova L, Shishkov S, Kostova K, Dolashki A, Dimitrov I, Atanasov B, Devreese B, Voelter W, Van Beeumen J (2010) Glycan structures and antiviral effect of the structural subunit RvH2 of *Rapana* hemocyanin. *Carbohydr* **345**: 2361-2367.
- East L, Isacke CM (2002) The mannose receptor family. *Biochim Biophys Acta* **1572**: 364-386.
- Ghosna E, Cassadoc A, Govonid G, Fukuharaa T, Yanga Y, Monackd D, Bortolucic K, Almeida S, Herzenberga L, Herzenberga L (2009) Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc Natl Acad Sci* **107**:2568-2573.
- Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ (1985) Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu Rev Cell Biol* **1**:1-39.
- Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M (2011) F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur J Immunol* **41**: 2470-2525.
- Gravotta D, Deora A, Perret E, Oyanadel C, Soza A, Schreiner R, Gonzalez A, Rodriguez-Boulan E (2007) AP1B sorts basolateral proteins in recycling and biosynthetic routes of MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 1564-1569.
- Grenegard M, Vretenbrant-Öberg K, Nylander M, Désilets S, Lindström EG, Larsson A, Ramström I, Ramström S, Lindahl TL (2008) The ATP-gated P2X1 receptor plays a pivotal role in activation of aspirin-treated platelets by thrombin and epinephrine. *J Biol Chem* **283**: 18493-18504.
- Hall RL, Wood EJ (1976) The carbohydrate content of gastropod haemocyanins. *Biochem Soc Trans* **4**(2): 307-309.
- Harris JR, Markl J (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron* **30**: 597-623.
- Harwood NE, Batista FD (2010) Early Events in B Cell Activation. *Annual Review of Immunology* **28**: 185-210.
- Idakieva K, Nikolov P, Chakarska I, Genov N, Shnyrov VL (2008) Spectroscopic properties and conformational stability of *Concholepas concholepas* hemocyanin. *J Fluoresc* **18**: 715-725.
- Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM (2000) The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* **191**: 927-936.
- Jacobs JF, Punt CJ, Lesterhuis WJ, Sutmulder RP, Brouwer HM, Scharenborg NM, Klasen IS, Hilbrands LB, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ (2010) Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase III study in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res* **16**: 5067-5078.

- Jurincic-Winkler CD, Gallati H, Alvarez-Mon M, Sippel J, Carballido J, Klippel K (1995) Urinary interleukin-1 alpha levels are increased by intravesical instillation with keyhole limpet hemocyanin in patients with superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Eur Urol* **28**(4): 334-339.
- Kantele A, Hakkinen MP, Zivny J, Elson CO, Mestecky J, Kantele JM (2011) Humoral immune response to keyhole limpet hemocyanin, the protein carrier in cancer vaccines. *Clin Dev Immunol* **2011**:614383.
- Kochenderfer JN, Gress RE (2007) A comparison and critical analysis of preclinical anticancer vaccination strategies. *Exp Biol Med* **232**: 1130-1141.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamm DL, Dehaven JI, Riggs DR (2000) Keyhole limpet hemocyanin immunotherapy of bladder cancer: laboratory and clinical studies. *Eur Urol* **37**: 41-44.
- Landry SJ (1997) Local protein instability predictive of helper T-cell epitopes. *Immunol Today* **18**:527-532.
- Lesterhuis WJ, Schreibelt G, Scharenborg NM, Brouwer HM, Gerritsen MJ, Croockewit S, Coulie PG, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG, de Vries IJ, Punt CJ (2011) Wild-type and modified gp100 peptide-pulsed dendritic cell vaccination of advanced melanoma patients can lead to long-term clinical responses independent of the peptide used. *Cancer Immunol Immunother* **60**:249-260.
- Lopez MN, Pereda C, Segal G, Munoz L, Aguilera R, Gonzalez FE, Escobar A, Ginesta A, Reyes D, Gonzalez R, Mendoza-Naranjo A, Larrondo M, Compan A, Ferrada C, Salazar-Onfray F (2009) Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. *J Clin Oncol* **27**: 945-952.
- Luft JH (1961) Improvements in epoxy resin methods. *J Biophys Biochem Cytol* **9**: 409-414.
- Lutz M, Kukutsch N, Ogilvie A, Rbner S, Koch F, Romani N, Schuler G (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* **223**: 77-92.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunol* **25**:677-686.
- Markl J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR (2001) Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J Cancer Res Clin Oncol* **2**:3-9.
- Matus S, Burgos PV, Bravo-Zehnder M, Kraft R, Porras OH, Farias P, Barros F, Torrealba F, Massardo L, Jacobelli S, González A (2007) Antiribosomal-P autoantibodies from psychiatric lupus target a novel neuronal surface protein causing calcium influx and apoptosis. *J Exper Med* **204**: 3221-3234.
- Mellman I (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Biol* **12**: 575-625.
- Metcalf D (2007) Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells* **25**:2390-2395.

Millard AL, Ittelet D, Schooneman F, Bernard J (2003) Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4+ T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. *Vaccine* **21**: 869-876.

Miller LA, Talwar GP, Killian GJ (2006) Contraceptive effect of a recombinant GnRH vaccine in adult female pigs. *Vertebr Pest Conf* **22**: 106-109.

Molledo B, Faunes F, Haussmann D, De Ioannes P, De Ioannes AE, Puente J, Becker MI (2006) Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol* **176**: 2690-2695.

Molledo B, Lopez CB, Pazos M, Becker MI, Hermesh T, Moran TM (2009) Cutting edge: stealth influenza virus replication precedes the initiation of adaptive immunity. *J Immunol* **183**: 3569-3573.

Musselli C, Livingston PO, Ragupathi G (2001) Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: R20-26.

Neeffes J, Jongsma M, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **11**: 823-836.

Oliva H, Molledo B, De Ioannes P, Faunes F, De Ioannes AE, Becker MI (2002) Monoclonal antibodies to molluscan hemocyanin from *Concholepas concholepas* demonstrate common and specific epitopes among subunits. *Hybrid Hybridomics* **21**: 365-374.

Perabo FG, Muller SC (2004) Current and new strategies in immunotherapy for superficial bladder cancer. *Urology* **64**: 409-421.

Pilon J, Loiacono C, Okeson D, Lund S, Vercauteren K, Rhyanc J, Miller L (2007) Anti-prion activity generated by a novel vaccine formulation. *Neuroscience Letters* **429**: 161-164.

Presicce P, Taddeo A, Conti A, Villa M, Della Bella S (2008) Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol* **45**: 1136-1145.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**: 208-212.

Rhodes J, Balfour B, Blom J, Agger R (1989) Comparison of antigen uptake by peritoneal macrophages and veiled cells from the thoracic duct using isotope-, FITC-, or gold-labelled antigen. *Immunology* **68**(3): 403-409.

Schmid SL (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem* **66**: 511-548.

Shimizu K, Thomas EK, Giedlin M, Mule JJ (2001) Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res* **61**: 2618-2624.

So AL, Small G, Sperber K, Becker K, Oei E, Tyorkin M, Mayer L (2000) Factors affecting antigen uptake by human intestinal epithelial cell lines. *Dig Dis Sci* **45**: 1130-1137.

Steinman RM (2007) Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat Med* **13**: 1155-1159.

Sussich F, Cesaro A (2000) The kinetics of periodate oxidation of carbohydrates: a calorimetric approach. *Carbohydr Res* 329(1): 87-95.

Teitz-Tennenbaum S, Li Q, Davis M, Chang A (2008) Dendritic cells pulsed with keyhole limpet hemocyanin and cryopreserved maintain anti-tumor activity in a murine melanoma model. *Clin Immunol* 129: 482-491.

Timmerman JM, Levy R (2000) Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine. *J Immunol* 164: 4797-4803.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci*. 76: 4350-4354.

Trombetta ES, Mellman I (2005) Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu Rev Immunol* 23: 975-1028.

Unanue E (1984) Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol* 2: 395-428.

Van Holde, KE, Miller KI (1995) Hemocyanins. *Adv Protein Chem* 47: 1-81.

Van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA (2011) Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32: 110-116.

Verschoor CP, Puchta A, Bowdish DME (2012) The Macrophage. *Methods. Mol Biol* 844:139-156.

Zhu J, Wan Q, Lee D, Yang G, Spassova MK, Ouerfelli O, Ragupathi G, Damani P, Livingston PO, Danishefsky SJ (2009) From synthesis to biologics: preclinical data on a chemistry derived anticancer vaccine. *J Am Chem Soc* 131: 9298-9303.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM (2008) The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol* 83:14.1.1-14.1.14

Zhong T, Arancibia S, Born R, Manubens A, Becker MI (2012a) Perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas en células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estimulación *in vitro* con hemocianinas de moluscos. *Biol Res* 45: R-63 Abstract.

Zhong T (2013) Patrón de expresión de citoquinas y quimioquinas de células presentadoras de antígeno murinas en respuesta a estimulación *in vitro* con hemocianinas de moluscos. Tesis de Grado Magister en Bioquímica. Fundación Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Director. María Inés Becker. En desarrollo.