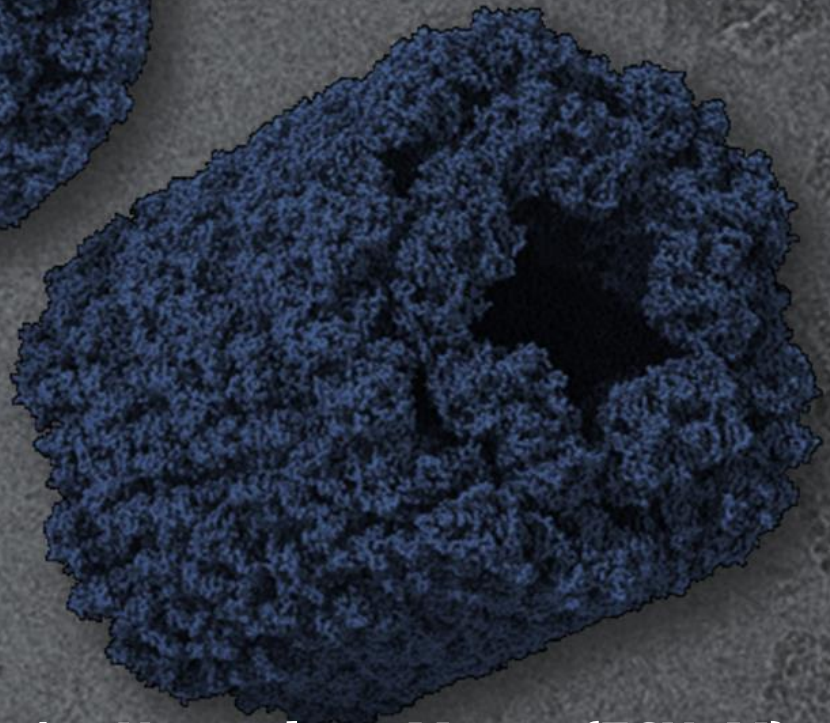
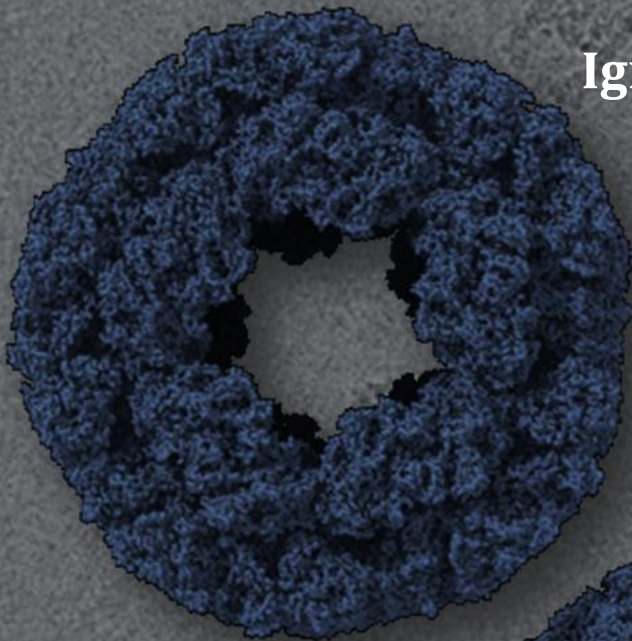


**Caracterización estructural y funcional de
la hemocianina de *Pomacea canaliculata*
y su participación en el sistema
inmune de moluscos gasterópodos**

Tesis Doctoral

**Doctorando:
Ignacio Rafael Chiumiento**

**Directores:
Horacio Heras
Marcos Sebastián Dreon**



**Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM)
Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
Año 2024**

Caracterización estructural y funcional de la hemocianina de *Pomacea canaliculata* y su participación en el sistema inmune de moluscos gasterópodos

Tesis Doctoral

Doctorando:

Lic. Ignacio Rafael Chiumiento

Directores:

Dr. Horacio Heras

Dr. Marcos Sebastián Dreon

Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM)

Universidad Nacional de La Plata (UNLP)

Año 2024



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Naturales fue realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP, UNLP-CONICET), bajo la dirección del Dr. Horacio Heras y el Dr. Marcos Sebastián Dreon.



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

*Un científico debe tener la actitud de quien no sabe nada
pero está dispuesto a aprenderlo todo*

DEDICATORIA

A mi familia, especialmente a mis papás Miriam y Rafael, mi hermano Edu, mi sobrino Lucio, mi cuñada Vale, mis tíos Leo y Lau, y mi abuela Nelly.

Por el amor, la fe y los valores que alientan a dar siempre lo mejor de uno, por la paciencia para acompañarme cada vez que me sentía desbordado y porque detrás de todo gran esfuerzo hay una gran familia.

AGRADECIMIENTOS

- A Horacio por recibirme en el laboratorio y apoyarme con calidez humana a lo largo de estos años.
- A Marcos, por los acuerdos, discusiones, esfuerzos y aprendizajes del día a día; porque investigadores hay muchos, pero padre científico hay uno solo.
- A mis amigos, especialmente los de la facultad, gente de buen corazón con la que se hizo más ameno recorrer este camino.
- A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Kevin, Nacho y Yani, que se convirtieron en amigos. A Tabi, Mati y Santi con quienes pude compartir y aprender en distintas etapas de esta tesis.
- A todo el personal del INIBIOLP, que directa o indirectamente colaboró para la elaboración de este trabajo.
- A mis compañeros de Química Biológica, una gran cátedra donde me brindaron un espacio cálido para crecer como docente.
- A Felix Mark y Bernhard Lieb, así como a todo el personal del Instituto Alfred Wegener Helmholtz Centre for Polar and Marine Research.

RECONOCIMIENTO

A las instituciones que han financiado el trabajo de investigación aquí plasmado:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i)
- Laboratorio Nacional de Nanotecnología (CNPEM, Campinas, Brazil)
- Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD)

RESUMEN

Pomacea canaliculata, Lamarck 1822 (Gastropoda, Ampulariidae) es una especie dulceacuícola nativa de Sudamérica, que se ha convertido en invasora en diversas regiones del mundo, generando perjuicios a nivel económico y medioambiental, y actuando como vector del nematodo *Angiostrongylus cantonensis*, agente causal de la meningoencefalitis eosinofílica humana. En este contexto, cobra interés el estudio de su biología, y en particular, de las adaptaciones a nivel bioquímico que podrían explicar su éxito reproductivo. Entre ellas destacan las asociadas con su carácter anfíbio, donde la hemocianina, pigmento respiratorio que constituye la proteína mayoritaria de la hemolinfa, jugaría un papel central.

Las hemocianinas de moluscos cuentan con una estructura oligomérica compleja, lo que les permite alcanzar tamaños considerables, siendo una de las proteínas más grandes de la naturaleza. Su rol en la fisiología de invertebrados no se limita al intercambio gaseoso, sino que también participa de procesos como la hemostasia, el transporte de lípidos y el mantenimiento de la presión oncótica. Destaca su rol en la inmunidad innata, donde hemocianinas de diversas especies han sido estudiadas por su capacidad de actuar como fenoloxidasas durante la melanización y liberar péptidos antimicrobianos. Adicionalmente, las hemocianinas de moluscos han adquirido interés por su potencial biomédico como compuestos inmunoestimulantes, propiedad que se ha asociado con su gran tamaño y patrón de glicosilación. Hasta el momento, las hemocianinas evaluadas para este uso provienen de especies con biodisponibilidad reducida, principalmente la hemocianina del gasterópodo marino *Megathura crenulata* (KLH), que se emplea como adyuvante en diferentes protocolos de inmunización y en terapias antitumorales contra el cáncer de vejiga con recidivas.

El presente trabajo de tesis se propone contribuir al conocimiento sobre la estructura y función de las hemocianinas de moluscos, así como su potencial aplicación. Para ello se estudió la hemocianina de *Pomacea canaliculata* (PcH), iniciando una caracterización de su estructura y propiedades biofísicoquímicas, su rol como molécula efectora del sistema inmune y su capacidad inmunogénica sobre vertebrados.

Se optimizó un protocolo para la obtención de PcH en grandes cantidades y con un alto grado de pureza. Seguidamente, se determinaron las secuencias aminoacídicas internas de la proteína, lo que permitió obtener las secuencias completas empleando el transcriptoma de la especie. A partir de ellas, se realizó un análisis *in silico* donde se pudo determinar peso molecular, péptido señal, punto isoeléctrico, coeficiente de extinción molar, dominios conservados y sitios de glicosilación para PcH. Adicionalmente, se investigó su estructura cuaternaria, resolviéndose un modelo 3D por criomicroscopía electrónica de 4,4 Å y confirmando que PcH presenta la estructura típica de las hemocianinas del tipo KLH. La resolución lograda permitió determinar interacciones estabilizantes de la estructura cuaternaria no descriptas previamente para este tipo de hemocianinas, así como la ubicación de glicanos N-ligados. La cercanía de estos elementos con los sitios activos sugiere una participación en los cambios conformacionales ocurridos durante el efecto cooperativo. Se evaluó la estabilidad frente a cambios de temperatura y pH, encontrándose que PcH es estable hasta los 60 °C y a valores de pH entre 4 y 10. Asimismo, se observó que su afinidad

por el O₂ disminuía por encima de los 24 °C, y que presenta asociación con lípidos, principalmente fosfolípidos.

En cuanto a su participación en la inmunidad innata, se encontró que Pch podría estar involucrada en una serie de mecanismos defensivos frente a patógenos. Así, se detectó actividad fenoloxidasa intrínseca baja, pero inducible por tratamientos proteolíticos limitados, que llevarían a un remodelado capaz de aumentar la accesibilidad de los sustratos al sitio activo. Un estudio *in silico* de Pch reveló la presencia de varios sitios de clivaje proteolítico accesibles, lo cual fue verificado experimentalmente. En paralelo, se evaluó la capacidad de Pch para generar péptidos antimicrobianos, mediante análisis de su secuencia y posterior síntesis de los mejores candidatos. Éstos fueron evaluados *in vitro*, confirmando su actividad antimicrobiana. Se generaron modelos *ab initio* de estos péptidos, y se mapearon en el modelo de Pch, revelando que la mayoría de ellos eran accesibles para ser liberados por ataque proteolítico. Sumado a ello, se encontró que Pch es capaz de aglutinar bacterias y que en su secuencia alberga dominios tipo-inmunoglobulina bien expuestos, frecuentemente asociados con el reconocimiento y aglutinación de patógenos, algo nunca antes descrito en hemocianinas de gasterópodos.

Por último, se estudió la capacidad inmunoestimulante de Pch, analizando su efecto *in vitro* sobre una línea de monocitos humanos THP-1 e *in vivo* sobre ratones C57BL/6JLAE. Se encontró que Pch provoca un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias por parte de macrófagos ya diferenciados y que este efecto se pierde tras deglicosilar a la proteína. Al indagar sobre el perfil de glicosilación, se halló que Pch porta oligosacáridos N-ligados del tipo alta manosa, estructuras de tipo híbrido y glicanos compatibles con antígeno T, similar a lo observado para KLH. A su vez, ensayos con suero policlonal anti-Pch demostraron la ausencia de reactividad cruzada con otras hemocianinas de moluscos, dando cuenta de características antigénicas particulares. En adición, cuando Pch fue incubada con monocitos produjo un aumento en la adhesión celular y cambios morfológico-metabólicos compatibles con un efecto diferenciador. Esto sumado al estudio de la expresión de marcadores de macrófagos, confirmó que Pch induce la diferenciación monocito-macrófago, en un proceso que parece derivar hacia la formación de macrófagos M1, aquéllos asociados a respuestas de tipo proinflamatoria. Finalmente, al comparar la respuesta humoral desencadenada por Pch con aquella generada por KLH, se observaron niveles equivalentes. De este modo, Pch se plantea como nuevo agente inmunoestimulante, con un método de purificación sencillo a partir de una especie dulceacuícola con buena biodisponibilidad, todo lo cual refuerza la importancia de su estudio y alienta a continuar investigando en aras de una potencial aplicación biomédica.

ABSTRACT

Pomacea canaliculata, Lamarck 1822 (Gastropoda, Ampulariidae) is a freshwater species native from South America that has become invasive in diverse regions around the world, generating economic and environmental damages while acting as a vector for nematode *Angiostrongylus cantonensis*, the causal agent of human eosinophilic meningoencephalitis. In this context, there is a growing interest around the study of its biology, in particular, about the biochemical adaptations that could explain its reproductive success. Among them, there stand out the ones related with its amphibious lifestyle, from which hemocyanin, the respiratory pigment being the main protein in hemolymph, would play a key role.

Mollusk hemocyanins have a complex oligomeric structure that enables them to reach huge sizes, making them one of the biggest proteins in nature. Its role in invertebrate physiology is not limited to gas exchange, but it also participates in other processes like hemostasis, lipid transport and the maintenance of oncotic pressure. It is notable their role in innate immunity, where hemocyanins from diverse species have been studied for its capacity to act as phenoloxidases during melanization and to release antimicrobial peptides. Additionally, mollusk hemocyanins have attracted attention for its biomedical potential as immunostimulant compounds, a property associated to its big size and glycosylation pattern. Until now, hemocyanins evaluated for this purpose had come from species with reduced bioavailability, mainly the hemocyanin from marine gastropod *Megathura crenulata* (KLH), which is employed as an adjuvant in different immunization protocols and in antitumoral therapies against recurrent bladder cancer.

The current thesis work aims to contribute to the knowledge of structure and function of mollusk hemocyanins, as well as of its potential application. Therefore, the hemocyanin of *Pomacea canaliculata* (PcH) was studied, starting a characterization of its structure and biophysicochemical properties, role as an effector molecule in the immune system and immunogenic capacity on vertebrates.

A purification protocol was optimized for the obtention of PcH in great quantities and with high purity grade. Next, internal aminoacidic sequences were determined, which allowed to obtain the complete sequences using the species transcriptome. From them, an *in silico* analysis was conducted that enabled to determine molecular weight, signal peptide, isoelectric point, molar extinction coefficient, conserved domains and glycosylation sites for PcH. In addition, quaternary structure was investigated, reaching to a 3D cryoelectron microscopy model at 4,4 Å resolution, and confirming that PcH displays the typical structure of KLH-type hemocyanins. The accomplished resolution allowed the determination of stabilizing interactions on the quaternary structure level not previously described for this type of hemocyanins, along with the location of N-linked glycans. The proximity of these elements with the active site suggests a role in the conformational changes that take place during cooperative effect. PcH thermal and pH stability was evaluated, finding that it is stable up to 60 °C and in pH values between 4 and 10. Also, it was observed that PcH presents a decrease in O₂ affinity above 24 °C, and that it can associate with lipids, mainly phospholipids.

As regards with its role in innate immunity, it was found that PcH could be involved in a series of defensive mechanisms against pathogens. Indeed, a low intrinsic phenoloxidase activity was detected, though able to be induced by limited proteolytic treatments, that would lead to a remodelling that increase substrate accesibility to the active site. An *in silico* analysis of PcH revealed the presence of various accessible proteolytic cleavage sites, then experimentally verified. In parallel, PcH capacity to generate antimicrobial peptides was evaluated, by sequence analysis and posterior synthesis of the best candidates. These peptides were evaluated *in vitro*, confirming its antimicrobial activity. Also, *ab initio* models were generated and mapped in PcH model, showing that most of the peptides were accessible to be released upon proteolytic attack. Moreover, it was found that PcH was able to agglutinate bacteria and that its sequence contains well exposed Ig-like domains, which are frequently associated to pathogen recognition and agglutination, a feature never described before for gastropod hemocyanins.

Lastly, PcH immunostimulant capacity was investigated, analysing its *in vitro* effect over a human monocyte THP-1 cell line and *in vivo* over C57BL/6JLAE mice. It was found that PcH elicit the secretion of proinflammatory cytokines in already differentiated macrophages, an effect that was lost after protein deglycosylation. When inquiring about the glycosylation profile, it was shown that PcH displays N-linked oligosaccharides from high-mannose and hybrid-type structures to glycans compatible with T-antigen, in agreement with the structures observed for KLH. Also, assays with anti-PcH polyclonal serum revealed the absence of cross reactivity with other mollusk hemocyanins, showing particular antigenic characteristics. In addition, upon PcH incubation, monocytes showed an increase in cellular adhesion and morphological-metabolic changes that agree with a differentiating effect. All these findings considered, together with the expression assays on macrophage markers, confirmed that PcH is able to induce monocyte-macrophage differentiation, in a process that drives to the formation of M1 macrophages, those associated with proinflammatory responses. Finally, when comparing the humoral response triggered by PcH and KLH, similar levels were observed. Thus, PcH is proposed as a new immunostimulant agent, with a straightforward purification method from a freshwater species with good bioavailability, all of which reinforces the importance of studying PcH and encourage to continue investigating in the search of a potential biomedical application.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS	14
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS	16
I.A. EL MODELO BIOLÓGICO	
I.A.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.....	17
I.A.2. IMPORTANCIA SANITARIA, ECONÓMICA Y AMBIENTAL.....	18
I.B. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EVOLUCIÓN DE LAS HEMOCIANINAS	
I.B.1. DIVERSIDAD DE PIGMENTOS RESPIRATORIOS EN LA NATURALEZA.....	20
I.B.2. ESTRUCTURA DE LAS HEMOCIANINAS DE INVERTEBRADOS.....	20
I.B.3. TIPOS ESTRUCTURALES DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS.....	22
I.B.4. ENSAMBLADO DE LAS HEMOCIANINAS.....	24
I.B.5. PAPEL DE LA GLICOSILACIÓN EN LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL.....	25
I.B.6. HIPÓTESIS EVOLUTIVA SOBRE EL ORIGEN DE LAS HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS.....	26
I.B.7. LA HEMOCIANINA COMO PROTEÍNA MULTIFUNCIÓN.....	27
I.C. PARTICIPACIÓN DE LAS HEMOCIANINAS EN EL SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS	
I.C.1. BIOLOGÍA COMPARADA DEL SISTEMA INMUNE.....	27
I.C.2. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA DE HEMOCIANINAS.....	29
I.C.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INMUNIDAD INNATA.....	30
I.C.4. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE HEMOCIANINAS.....	31
I.C.5. DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA EN HEMOCIANINAS.....	32
I.D. EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE LAS HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS	
I.D.1. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE VERTEBRADOS.....	33
I.D.2. MODOS DE ACCIÓN.....	34
I.D.3. MECANISMOS DE INMUNOGENICIDAD.....	35
I.E. OBJETIVOS	37
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	38
II.A. PURIFICACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE <i>Pomacea canaliculata</i> (PcH)	
II.A.1. CONDICIONES DE CRÍA DE LOS ANIMALES.....	39
II.A.2. OBTENCIÓN DE HEMOLINFA.....	40
II.A.3. AISLAMIENTO DE PcH POR ULTRACENTRIFUGACIÓN Y CROMATOGRAFIA LIQUIDA.....	41
II.A.4. COMPROBACIÓN DE LA PUREZA DE LA MUESTRA POR ELECTROFORESIS.....	41

II.A.5. CUANTIFICACIÓN DE PcH.....	42
II.A.6. SEPARACIÓN DE ISOFORMAS DE PcH.....	42
II.A.7. COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL DE PcH POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA.....	43
II.B. CARACTERIZACIÓN DE PcH	
II.B.1. ESTRUCTURA PRIMARIA	
II.B.1.I ESPECTROMETRÍA DE MASAS, ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y GENÓMICO..	44
II.B.1.II ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS.....	45
II.B.2. ESTRUCTURA NATIVA	
II.B.2.I. ANÁLISIS DE FORMA GLOBAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.....	45
II.B.2.II. RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURA POR CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	46
II.B.2.II.i. ADQUISICIÓN Y PRIMER PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	46
II.B.2.II.ii. SELECCIÓN DE PARTÍCULAS Y RECONSTRUCCIÓN 3D.....	47
II.B.2.II.iii. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO, REFINAMIENTO EN ESPACIO REAL Y VALIDACIÓN.....	47
II.B.3. ESTABILIDAD ESTRUCTURAL	
II.B.3.I. CONDICIONES A EVALUAR.....	48
II.B.3.II. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN.....	48
II.B.3.III. ANÁLISIS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA.....	49
II. B.4. AFINIDAD POR EL OXÍGENO.....	50
II.B.5. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS ASOCIADOS A PcH	
II.B.5.I. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS.....	51
II.B.5.II. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y DETECCIÓN POR IONIZACIÓN CON LLAMA.....	52
II.C. PARTICIPACIÓN DE PcH EN LA INMUNIDAD INNATA	
II.C.1. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA	
II.C.1.I. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA INTRÍNSECA.....	54
II.C.1.II. INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD FENOLOXIDASA POR TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO.....	55
II.C.1.III.ZIMOGRAMA Y ANÁLISIS POR <i>SDS-PAGE</i>	56
II.C.1.IV. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DEL CLIVAJE PROTEOLÍTICO DE PcH.....	56
II.C.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS	
II.C.2.I PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> Y SÍNTESIS.....	56
II.C.2.II. MODELADO <i>AB INITIO</i> Y MAPEO EN LA ESTRUCTURA DE PcH.....	57
II.C.2.III. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR.....	57
II.C.2.IV. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	58
II.C.2.V. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA.....	58
II.C.3. ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE PcH	
II.C.3.I. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN DE BACTERIAS.....	59
II.C.3.II. BÚSQUEDA DE DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA EN PcH.....	59
II.D. POTENCIAL INMUNOESTIMULANTE DE PCH	
II.D.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	60
II.D.2. CULTIVO DE MONOCITOS.....	61
II.D.3. CONTROL DE CITOTOXICIDAD.....	61
II.D.4. ANÁLISIS DE CITOQUINAS SECRETADAS.....	62
II.D.5. CARACTERÍSTICAS DE PcH ASOCIADAS A SU INMUNOGENICIDAD	

II.D.5.I. ESTUDIO DE LOS OLIGOSACARIDOS ASOCIADOS.....	62
II.D.5.II. INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA CON OTRAS HEMOCIANINAS.....	63
II.D.6. EFECTO DE P _{cH} SOBRE LA DIFERENCIACION DE MONOCITOS	
II.D.6.I. ADHESIÓN CELULAR.....	63
II.D.6.II. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO.....	64
II.D.6.III. ESTUDIO DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	
II.D.6.III.i. EXPRESIÓN DE CD68 POR WESTERN BLOT.....	65
II.D.6.III.ii. EXPRESIÓN DE MARCADORES PARA SUBTIPOS DE MACRÓFAGOS POR qPCR	
II.D.6.III.ii.a. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc.....	65
II.D.6.III.ii.b. EXPRESIÓN GENICA DIFERENCIAL.....	66
II.D.7. EFECTO DE P _{cH} SOBRE LA IMUNIDAD HUMORAL	
II.D.7.I. ANIMALES DE LABORATORIO.....	68
II.D.7.II. BIOENSAYO Y DETERMINACIÓN DE IgG EN SUERO.....	68
II.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	68

CAPÍTULO III: CARACTERIZACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata*.....

III.A. INTRODUCCIÓN.....	70
III.B. RESULTADOS	
III.B.1. PURIFICACIÓN DE P _{cH}	71
III.B.2. ISOFORMAS DE P _{cH}	72
III.B.3. DESENSAMBLADO ESTRUCTURAL DE P _{cH}	73
III.B.4. ESTRUCTURA DE P _{cH}	
III.B.4.I. ESTRUCTURA PRIMARIA.....	74
III.B.4.II ASPECTO GLOBAL DE P _{cH}	75
III.B.4.III. MODELO ESTRUCTURAL DE P _{cH} POR CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA	
III.B.4.III.i. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE P _{cH}	76
III.B.4.III.ii. UNIDADES FUNCIONALES Y SUS SEGMENTOS CONECTORES.....	78
III.B.4.III.iii. SITIOS DE GLICOSILACIÓN.....	79
III.B.4.III.iv. DÍMERO ANTIPARALELO.....	79
III.B.4.III.v. ENSAMBLADOS DECAMÉRICO Y DIDECAMÉRICO.....	80
III.B.5. ESTABILIDAD ESTRUCTURAL	
III.B.5.I. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA TEMPERATURA.....	81
III.B.5.II. COMPORTAMIENTO FRENTE AL pH.....	82
III.B.6. AFINIDAD POR EL OXÍGENO.....	83
III.B.7. LÍPIDOS ASOCIADOS.....	84
III.C. DISCUSIÓN.....	85

CAPÍTULO IV: PARTICIPACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata* EN LA INMUNIDAD INNATA.....

IV.A. INTRODUCCIÓN.....	89
--------------------------------	-----------

IV.B. RESULTADOS

IV.B.1. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA	
IV.B.1.I. ACTIVIDAD INTRÍNSECA.....	91
IV.B.1.II. INDUCCIÓN POR PROTEÓLISIS.....	92
IV.B.1.III. PREDICCIÓN Y MAPEO DE SITIOS DE ATAQUE PROTEOLÍTICO EN PcH.....	94
IV.B.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) DERIVADOS DE PcH	
IV.B.2.I. IDENTIDAD DE LOS PAMs.....	96
IV.B.2.II. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PAMs.....	97
IV.B.2.III. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS PAMs.....	98
IV.B.2.IV. MODELADO MOLECULAR DE LOS PAMs Y SU UBICACION EN LA ESTRUCTURA DE PcH.....	99
IV.B.3. ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE PcH	
IV.B.3.I. AGLUTINACIÓN DE BACTERIAS.....	101
IV.B.3.II. DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA DE PcH.....	101
IV.C. DISCUSIÓN.....	103

CAPÍTULO V: LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata* COMO INMUNOESTIMULANTE.....106**V.A. INTRODUCCIÓN.....107****V.B. RESULTADOS**

V.B.1. EFECTO DE PcH SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR.....	108
V.B.2. EFECTO DE PcH SOBRE EL PERFIL DE CITOQUINAS SECRETADAS	
V.B.2.I EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PcH.....	109
V.B.2.II. INFLUENCIA DE LA GLICOSILACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE.....	109
V.B.3. PATRÓN DE GLICOSILACIÓN ASOCIADO A LA INMUNOGENICIDAD.....	110
V.B.4. INMUNOREACTIVIDAD.....	112
V.B.5. EFECTO DE PcH SOBRE LA DIFERENCIACIÓN MONOCITO-MACRÓFAGO	
V.B.5.I. ADHESIÓN CELULAR.....	113
V.B.5.II. MORFOLOGÍA CELULAR.....	114
V.B.5.III. METABOLISMO CELULAR.....	114
V.B.5.IV. EXPRESIÓN DEL MARCADOR PAN-MACRÓFAGO CD68.....	116
V.B.5.V. EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN M1-M2.....	116
V.B.6. RESPUESTA HUMORAL A PcH.....	117
V.C. DISCUSIÓN.....	118

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....120**APÉNDICE.....123****BIBLIOGRAFÍA.....132**

ABREVIATURAS

AE	Actividad específica	His	Histidina	PvHCT	Fragmento C-terminal de la hemocianina de <i>Penaeus vannamei</i>
Asn	Asparagina	HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	PVL	Lectina de <i>Psathyrella velutina</i>
BCG	Bacilo de Calmette-Guerrin	IFM	Intensidad de fluorescencia media	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BSL-1	Lectina de <i>Bandeiraea simplicifolia-1</i>	IFN-γ	Interferón- γ	RCA-I	Aglutinina de Ricinus Communis-I
CCH	Hemocianina de <i>Concholepas concholepas</i>	Ig	Inmunoglobulina	RMSD	Distancia media cuadrática mínima
CDs	Células dendríticas	IL	Interleuquina	ROS	Especies reactivas del oxígeno
CIM	Concentración inhibitoria mínima	Imd	Inmunodeficiencia	RtH	Hemocianina de <i>Rapana venosa</i>
CM	Centro de masas	IP	Índice de Polidispersión	SBA	Aglutinina de poroto se soja
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad	JAC	Jacalina	PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
ConA	Concanavalina A	kcat	Número de recambio	SDS	Dodecil sulfato de sodio
CPAs	Células presentadoras de antígenos	KLH	Hemocianina de <i>Megathura crenulata</i>	SEC	Exclusión molecular
CR3	Receptor de complemento 3	Km	Constante de Michaelis-Menten	Ser	Serina
CryoEM	Criomicroscopía electrónica	LB	Luria-Bertani	SFB	Suero fetal bovino
CTF	Función de transferencia de contraste	LCA	Aglutinina de <i>Lens culinaris</i>	SNPs	Polimorfismos de nucleótido único
Cys	Cisteína	Leu	Leucina	SSC	Dispersión hacia los laterales
DBA	Aglutinina de <i>Dolichos biflorus</i>	LPS	Lipopolisacárido	TEM	Microscopía electrónica de transmisión
DLS	Dispersión de luz dinámica	Man	Manosa	TF	Transformada de Fourier
DMSO	Dimetilsulfóxido	MAP	Proteína cinasas activadas por mitógenos	Thr	Treonina
DO	Densidad óptica	MPM	Marcador de peso molecular	TLR	Receptor de tipo-Toll
DPEC	Dietilpirocarbonato	MR	Receptor de manosa	Tm	Temperatura de fusión
Dscam	Molécula de adherencia celular del síndrome de <i>Down</i>	MS	Espectrometría de masas	TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina

DTT	Ditiotreitol	MTT	Bromuro de 3-(3,4 - dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio	TNE	Buffer Tris, NaCl y EDTA
ECL	Lectina de <i>Erythrina cristagalli</i>	NFκB	Factor nuclear κB	TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	OPD	O-fenilenediamina dihidrocloruro	UEA-1	Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i> -1
ERK	Quinasa regulada por señal extracelular	PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos	UF	Unidad Funcional
FcyR	Receptor del fragmento cristalizable γ	PAMs	Péptidos antimicrobianos	Vi	Velocidad inicial
FLH	Hemocianina de <i>Fisurella latimarginata</i>	PBS	Buffer fosfato salino	Vm	Velocidad máxima
FPV	Fluido perivitelino	PcH	Hemocianina de <i>Pomacea canaliculata</i>	WGA	Aglutinina del germen de trigo
FREP	Proteínas relacionadas con fibrinógeno	pI	Punto isoelectrico		
FSC	Dispersión hacia adelante	pCO₂	Presión parcial de CO ₂		
Gal	Galactosa	pO₂	Presión parcial de O ₂		
GalNAc	N-acetil-galactosamina	pN₂	Presión parcial de N ₂		
GAPDH	Gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa	PM	Peso molecular		
GlcNAc	N-acetil-glucosamina	PMA	Forbol-12-miristato-13- acetato		
GRAVY	Gran promedio de hidropaticidad	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo		
GSFSC	<i>Gold-Standard Fourier Shell Correlation</i>	PNA	Aglutinina de maní		
HaH	Hemocianina de <i>Helix aspersa</i>	Pro	Prolina		
HdH	Hemocianina de <i>Haliotis diversicolor</i>	PRR	Receptor de reconocimiento de patrones		
HEPES	Ácido 4-(2- hidroxietil)piperazin-1- iletanosulfónico	PSA	Lectina de <i>Pisum sativum</i>		

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

I.A. EL MODELO BIOLÓGICO

I.A.1. DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

En este trabajo se emplea *Pomacea canaliculata*, Lamarck 1822 (Gastropoda, Ampulariidae), un caracol dulceacuícola nativo de América del Sur (**Fig. I-1A**).

La familia Ampulariidae comprende nueve géneros de origen gondwánico, de los cuales *Pomacea* es el más diverso y contiene las especies de más amplia distribución geográfica (Hayes et al. 2015). Puntualmente, *P. canaliculata* ocupa las cuencas de los ríos de La Plata, Uruguay y Paraná, desde el sur de la provincia de Buenos Aires hasta el sur de Brasil; habiendo sido introducido en otras regiones del mundo (Hayes et al. 2012; Cowie et al. 2017).

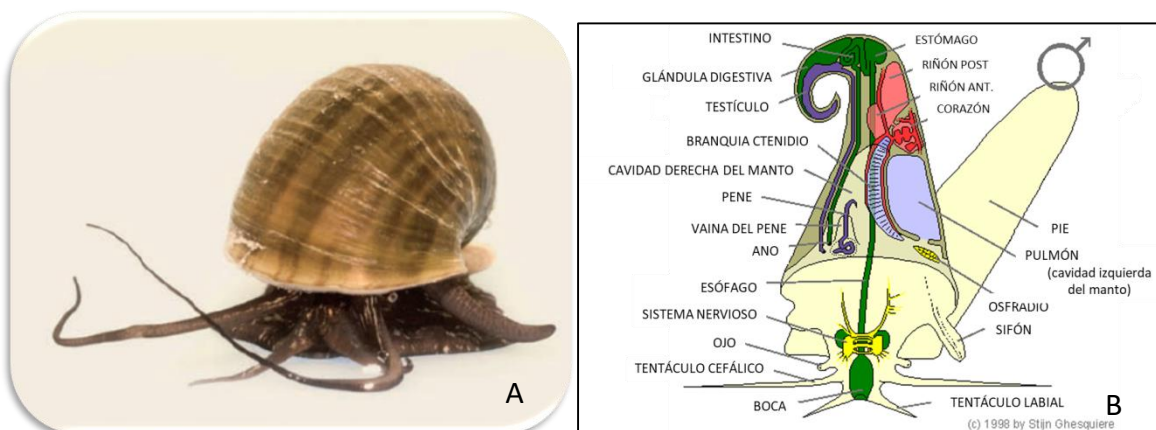


Figura I-1: Descripción de *Pomacea canaliculata*. (A) Ejemplar adulto de *Pomacea canaliculata* (Imagen tomada de Heras et al. 2014) (B) Esquema anatómico de un macho (Imagen tomada de <http://www.applesnail.net/>).

El éxito reproductivo alcanzado en las zonas de introducción puede explicarse en base a sus numerosas adaptaciones, propias de una especie versátil, capaz de enfrentarse a condiciones ambientales cambiantes. Nuestro grupo de trabajo ha hecho foco en algunas de estas adaptaciones, integrando el conocimiento generado en el área de la bioquímica y biofísica de proteínas con la fisiología-evolución de la especie. Así, cabe destacar la estrategia reproductiva de *P. canaliculata*, cuyas hembras pueden depositar numerosas ovipuestas tras una sola cópula, conteniendo en promedio 300 huevos cada una (Estebenet y Cazzaniga, 1993). Éstas son colocadas sobre la vegetación ribereña emergente de los ambientes lénticos, de manera que los huevos quedan resguardados de los depredadores acuáticos y los neonatos caen al agua inmediatamente tras eclosionar (Hayes et al. 2015). Acompañando esta estrategia, el fluido perivitelino (FPV) que nutre al embrión en desarrollo, cuenta con una serie de proteínas denominadas perivitelininas (Cheesman, 1958; Garín et al. 1996). Entre sus numerosas funciones, se encuentran el soporte nutricional, fotoprotección y defensa antioxidante contra la radiación solar a la que se ven expuestos los huevos, el efecto higroscópico para hacer frente a la desecación, y el otorgamiento de propiedades antidigestivas y neurotóxicas y de una coloración rosada aposemática; estas últimas como parte de un sistema de defensa contra potenciales depredadores terrestres

(Heras et al. 1998; Dreon et al. 2004; Heras et al. 2008; Dreon et al. 2013; Ituarte et al. 2019).

En cuanto a su modo de vida, *P. canaliculata* presenta hábitos anfibios. Tal condición permite que un individuo transcurra la mayoría del tiempo bajo la superficie del agua, realizando el intercambio gaseoso mediante una branquia (ctenidio) ubicada en la región derecha del cuerpo, pero contando con la capacidad de respirar oxígeno del aire a través de una cavidad paleal muy vascularizada que configura un pulmón apto para la supervivencia fuera del agua (**Fig. I-1B**) si las condiciones ambientales así lo requirieren, como puede ocurrir en períodos de sequía durante los que estos caracoles permanecen enterrados en el barro o durante la oviposición fuera del agua. A la vez, el pulmón permite retener burbujas de aire tomadas a través de un sifón conformado como una prolongación de la cavidad paleal, que se pliega sobre sí misma, y puede extenderse hacia la superficie, útil sobre todo en aguas con baja presión parcial de oxígeno (Rodríguez et al. 2019; Seuffert y Martín, 2010; Martín et al. 2017).

En relación con este aspecto, el transporte de oxígeno en hemolinfa se realiza mediante el pigmento respiratorio hemocianina, componente mayoritario del fluido, (Barros et al. 1993; Hill et al. 2012). Dada su estructura oligomérica compleja, cuenta con una gran cantidad de sitios de unión al oxígeno por molécula, permitiendo un transporte más eficiente en hemolinfa (Cuff et al. 1998; Lieb et al. 2010). Además, de su función tradicional como pigmento respiratorio, las hemocianinas participan en otros aspectos de la fisiología de invertebrados (Heras et al. 1990; Coates y Nairn, 2014; Coates et al. 2020), que se detallan más adelante en este capítulo.

I.A.2. IMPORTANCIA SANITARIA, ECONÓMICA Y AMBIENTAL

En la década de 1980, los ampuláridos fueron introducidos por el hombre en Asia con fines ornamentales y alimenticios, escapando y proliferando luego en los ambientes naturales (Mochida, 1991). La expansión actual de *P. canaliculata* incluye numerosos países del sudeste asiático, Chile, Ecuador, España y el sur de América del Norte; impactando sobre las regiones alcanzadas, hasta el punto de ser catalogada como una de las 100 peores especies invasoras por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (**Fig. I-2**) (Lowe et al. 2000; Cowie et al. 2017; Jiang et al. 2022).

Desde el punto de vista sanitario, *P. canaliculata* es vector de la meningoencefalitis eosinofílica humana, una afección del sistema nervioso central causada por el nematodo parásito *Angiostrongylus cantonensis*, que se transmite por el consumo del caracol sin la adecuada cocción o simplemente a través de la mucosidad que éste secreta a su paso por la vegetación comestible (Lv et al. 2009; 2011; Barrat et al. 2016; Damborenea et al. 2017).

Económicamente, su gran voracidad sobre la vegetación la ha transformado en una plaga para los cultivos de arroz y taro, generando pérdidas millonarias para la producción agrícola (Cowie, 2002; Correoso Rodriguez et al. 2017; Jiang et al. 2022).

En cuanto al aspecto ambiental, la depredación sobre las macrófitas locales en humedales invadidos, lleva a la acumulación de nutrientes y posterior eutrofización de los cuerpos de agua; de igual modo, la mayor fecundidad y rápido desarrollo de la

especie en comparación con la fauna autóctona, han afectado fuertemente a la biodiversidad de los ambientes invadidos (Carlsson et al. 2004; Horgan et al. 2014).

El impacto de nuestra especie modelo sobre las áreas de distribución está estrechamente relacionado con las adaptaciones que le han conferido una gran flexibilidad trófica, convirtiendo a estos organismos en una plaga difícil de erradicar. Los intentos de control mediante métodos químicos y biológicos han dado resultados dispares, algunos de ellos produciendo efectos indeseados sobre otras especies o el ambiente que habitan (Teo, 2001; Wong et al. 2009; Bernatis y Warren, 2014). En este sentido, el estudio de las biomoléculas de *Pomacea canaliculata* podría arrojar luz sobre posibles dianas moleculares para ayudar a su control. La hemocianina tendría un rol central en la supervivencia, pues participaría simultáneamente en diversas funciones fisiológicas, consituyendo así un potencial blanco de interés para el desarrollo de estrategias de control.

Otro aspecto importante de destacar es que numerosos compuestos bioactivos han sido descritos a partir de sus fuentes naturales empleando invertebrados. Entre éstos encontramos péptidos antimicrobianos (PAMs), lectinas (grupo de proteínas que unen glúcidos de manera específica) y hemocianinas con potencial inmunoestimulante aisladas de moluscos (Harris y Markl, 1999; Becker et al. 2014; Suleria et al. 2017; Rivera Pérez y Hernández Saavedra, 2021; Staudacher, 2021), que abren la puerta a futuras explotaciones de las biomoléculas de invertebrados en el área de la medicina y de la industria.

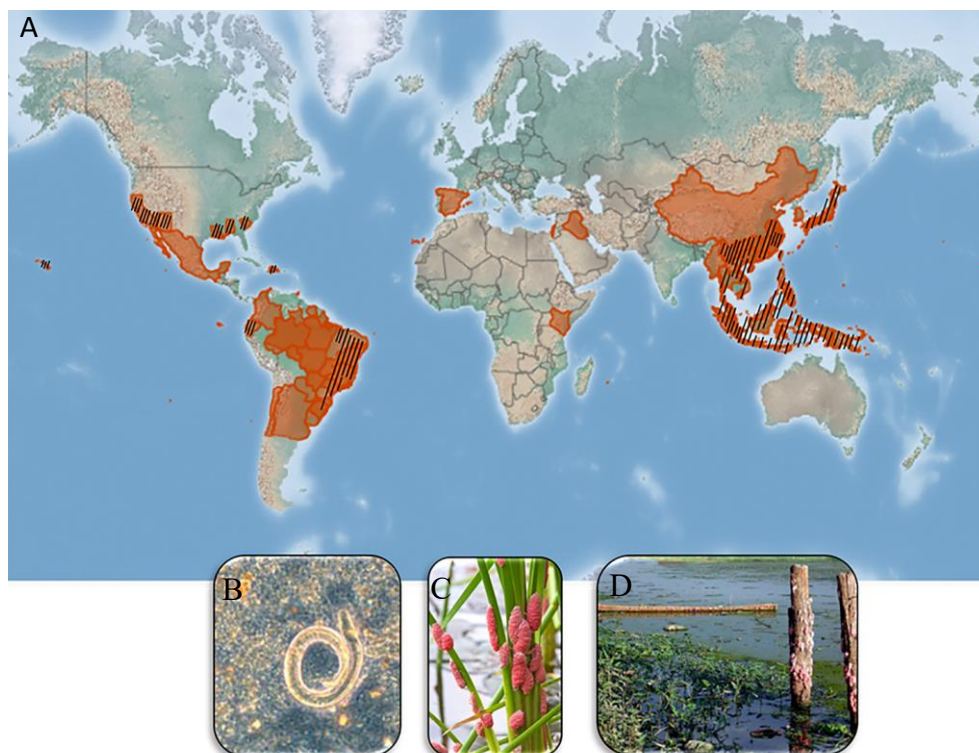


Figura 1-2: Impacto sanitario-económico-ecológico de *P. canaliculata*. (A) En color naranja, extensión actual de la especie; rayado en negro, regiones con reporte de casos de meningoencefalitis eosinofílica (Barratt et al. 2016). Insertos, (B) microfotografía del nematodo parásito *Angiostrongylus cantonensis* (Imagen tomada de Barratt et al. 2016) (C) puestas de *P. canaliculata* sobre plantaciones de arroz. (D) ambiente invadido por *P. canaliculata*, (Imagen tomada de Carlsson et al. 2020) (Mapa online, modificado de <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.68490>).

I.B. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y EVOLUCIÓN DE LAS HEMOCIANINAS

I.B.1. DIVERSIDAD DE PIGMENTOS RESPIRATORIOS EN LA NATURALEZA

Los pigmentos respiratorios son proteínas multiméricas que unen oxígeno de manera reversible y facilitan su transporte, a través de fluidos circulatorios, hacia los tejidos periféricos del organismo. Se componen de proteínas asociadas a grupos prostéticos, ya sea porfirinas (como el grupo hemo) o metales divalentes (como hierro o cobre); siendo ellos los encargados de unir los átomos de oxígeno. La coloración que aportan a los fluidos en que están disueltos, les valió la denominación histórica con que se los conoce hoy en día (Torres, 1983; Hill et al. 2012).

Entre los pigmentos respiratorios que pueden encontrarse en la naturaleza, existen algunos que se localizan dentro de células especializadas y otros que se hallan libres en circulación. Esta diversidad puede ilustrarse con algunos ejemplos representativos. Las hemeritinas, presentes en Sipunculida, Brachiopoda y Priapulida, son ferroproteínas intracelulares que aportan una coloración purpúrea al fluido circulatorio. Las hemoglobinas intracelulares de Chordata y Echinodermata, y aquéllas de tipo extracelular (en ocasiones llamadas eritrocruorinas) que se observan en Pogonophora y algunos Polychaeta y Arthropoda, son hemoproteínas que aportan una coloración rojiza. Las clorocruorinas de ciertos géneros de Polychaeta son ferroproteínas extracelulares que otorgan un color verde a la hemolinfa de éstos. Por último, encontramos a las hemocianinas, cupropoteínas extracelulares que aportan un color azul a la hemolinfa de Mollusca y Arthropoda (principalmente crustáceos malacostracos y arácnidos), que describiremos con mayor detalle (Terwilliger, 1998; Royer et al. 2006; Zeis, 2020).

I.B.2. ESTRUCTURA DE LAS HEMOCIANINAS DE INVERTEBRADOS

Las hemocianinas son proteínas oligoméricas de gran tamaño pertenecientes a la familia de proteínas de cobre tipo 3, que incluye también a las tirosinasas. Esto es, cuentan con un sitio activo con dos átomos de cobre (Cu-A y Cu-B), cada uno de ellos coordinado por 3 residuos de histidina bien conservados, facilitando la unión del oxígeno del modo $\text{Cu}^{+2}\text{-O}_2\text{-Cu}^{+2}$ (Grossmann et al. 2000; Fujieda et al. 2013; Coates y Nairn, 2014).

El espectro de absorción de estos pigmentos revela un pico de máxima intensidad alrededor de los 350 nm, debido a la presencia de oxígeno en el sitio activo, confiriéndole una coloración azulada a la hemolinfa (Fig. I-3). Ésta se vuelve más intensa a medida que aumenta el grado de oxigenación del fluido, lo que permite monitorear espectrofotométricamente las condiciones fisiológicas de los organismos y las características ambientales del medio en que se encuentran (Zielinski et al. 2001; Oellerman et al. 2014).

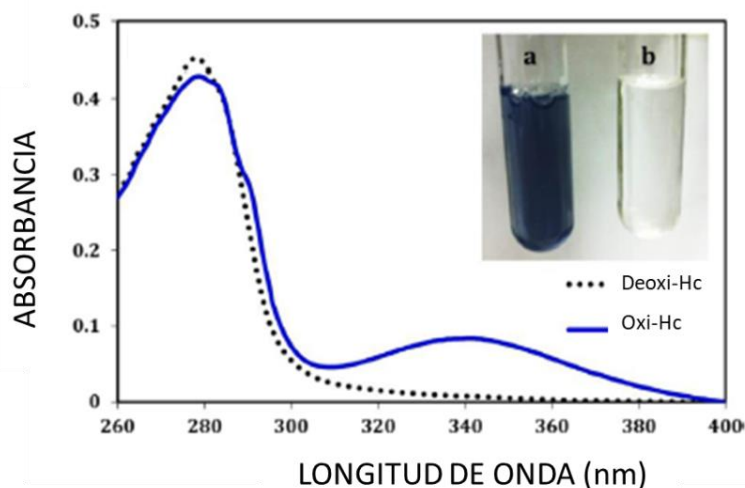


Figura I-3: Espectros de absorción de las hemocianinas. Perfil observado para el caso la hemocianina de *Limulus polyphemus*; resaltando el pico alrededor de 350 nm, correspondiente a la absorción del cobre cuando la proteína se encuentra oxigenada. Inserto, muestras de hemolinfa (a) oxigenada y (b) desoxigenada. (Imagen tomada de Coates y Nairn, 2014).

Dentro del phylum Arthropoda, presentan hemocianina crustáceos y quelicerados, mientras que puede encontrarse en la hemolinfa de diversas clases del phylum Mollusca. Su adquisición en ambos grupos se debería a un proceso de evolución convergente, ya que estas proteínas tienen un porcentaje de similitud de secuencia menor al 10% (Salvato y Beltramini, 1990).

La hemocianina de artrópodos está constituida por subunidades de 75 kDa, organizadas en una estructura hexamérica, la que a su vez puede asociarse formando tetrámeros (Fig. I-4). En las subunidades se distinguen tres dominios, uno de los cuales porta el centro dicúprico, de modo que hay un sitio de unión al oxígeno por subunidad y 24 en total por tetrámero (Rehm et al. 2012).

En el caso de los moluscos, sus hemocianinas presentan estructura cuaternaria decamérica, con subunidades que varían entre 350-550 kDa. Ellas están compuestas por repeticiones en tándem de regiones parálogas de 50 kDa que se conocen como unidades funcionales (UFs), en número variable según el grupo taxonómico. La mayoría de los Gastropoda, presenta 8 UFs (nombradas de A-H) por subunidad. A su vez, cada una de las UFs posee dos dominios, uno N-terminal de tipo alfa hélice que contiene el centro dicúprico, y otro C-terminal de tipo hoja beta plegada. La UF-H tiene la particularidad de presentar, en su extremo C-terminal, un tercer dominio homólogo a cupredoxina; elevando así su masa molecular a 60 kDa. Cabe destacar que una hemocianina típica de gasterópodo posee entonces 8 sitios de unión al oxígeno por subunidad y 80 en total por molécula (Fig. I-4). Añadiendo complejidad estructural, la interacción de moléculas de hemocianina solubles en la hemolinfa permite el ensamblado entre ellas que, en moluscos, puede generar di-, tri-, tetradecámeros o incluso complejos más grandes que se conocen como multímeros (Markl, 2013; Gatsogiannis et al. 2015), alcanzando así decenas de MDa en su peso molecular y constituyéndose en una de las proteínas de mayor tamaño conocidas.

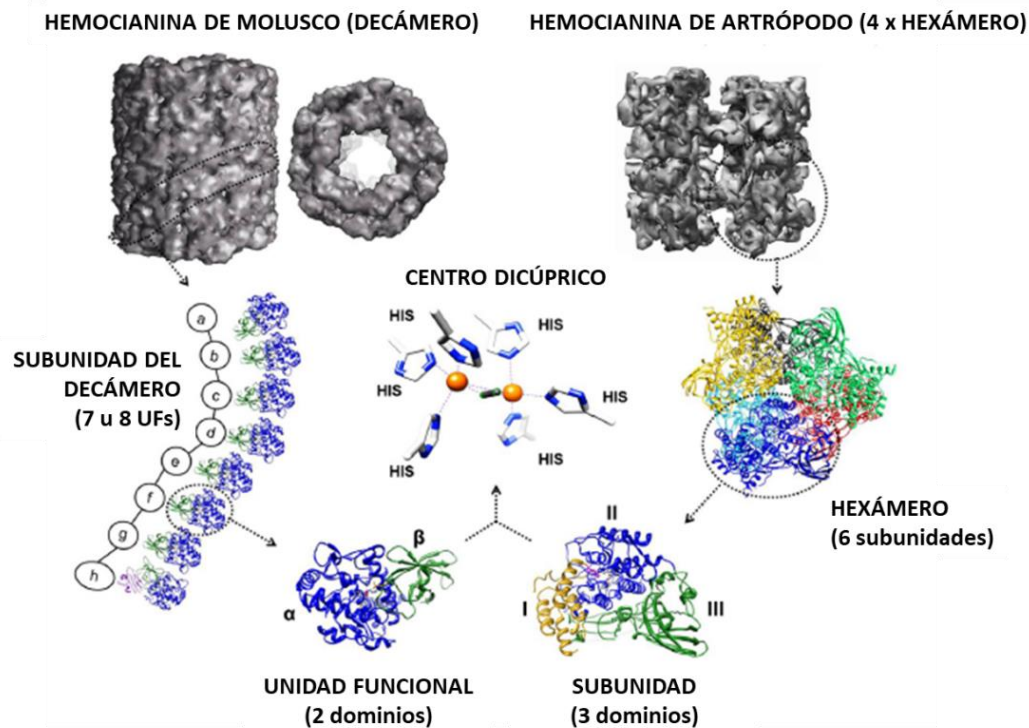


Figura I-4: Esquema de la organización estructural de las hemocianinas de moluscos y artrópodos. Se compara en orden jerárquico descendente desde el nivel de estructura cuaternaria hasta el centro dicúprico. (Imagen modificada de [Coates y Nairn, 2014](#)).

I.B.3. TIPOS ESTRUCTURALES DE HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS

Las hemocianinas del phylum Mollusca, pueden clasificarse según el número y tipo de UFs presentes por subunidad y la disposición que éstas adoptan en la topología final de la molécula ([Kato et al. 2020](#)).

A nivel cuaternario se organizan en decámeros de estructura cilíndrica, con las UFs A-F de una subunidad ubicándose en las paredes del cilindro y un número variable de UFs disponiéndose hacia el centro de éste, configurando la región que se conoce como “collar interno” ([Gatsogiannis y Markl, 2009](#); [Jaenicke et al. 2010](#); [Gai et al. 2015](#)).

Profundizando en estas características, la clasificación estructural permite reconocer cuatro grandes grupos:

- El Tipo I (o Tipo KLH), es el más frecuente en gasterópodos, cuyo representante más estudiado es la hemocianina de *Megathura crenulata* o *Keyhole Lympet Hemocyanin* (KLH). También se encuentra representada en Bivalvia, Caudophoveata y Monoplacophora. Poseen 8 UFs, de las cuales las 6 primeras en la secuencia (A-H) forman la pared del cilindro y las dos últimas (G y H) constituyen el collar interno (**Fig. I-5A**) ([Harris et al. 2004](#); [Zhang et al. 2013](#)).
- El Tipo II (o Megahemocianina) se encuentra en gasterópodos cerithioideos y cuenta con dos tipos de subunidades diferentes, una de ellas de 8 UFs y otra de 12 UFs. Mientras que la primera tiene la misma composición y disposición

espacial que las hemocianinas de Tipo I, la segunda incluye 6 UFs (A-F), en la pared del cilindro y 6 UFs (F1-F6) formando la región del collar interno. Esta subunidad se organiza en una estructura decamérica que ensambla con dos cilindros decaméricos que tienen 8 UFs por subunidad. Este tipo de hemocianinas gigantes habría surgido como una adaptación a ambientes hipóxicos (**Fig. I-5B**) (Lieb et al. 2010; Gatsogiannis et al. 2015).

- El Tipo III (o Tipo *Nautilus*) es propia de *Nautilus* y octopodiformes, y se caracteriza por poseer subunidades de 7 UFs, las clásicas A-F en la pared del cilindro, y una única UF-G integrando el collar interno (**Fig. I-5C**) (Gatsogiannis et al. 2007).
- El Tipo IV se encuentra en los cefalópodos decapodiformes (grupo que incluye sepias y calamares) y presenta subunidades de 8 UFs: A, B, C, D, D', E, F y G. El collar interno estaría formado por las UFs D' (surgida como una duplicación de la UF D original) y G (**Fig. I-5D**) (Thonig et al. 2014; Gai et al. 2015; Tanaka et al. 2019).

Se considera que la UF-H se habría perdido secundariamente en los dos últimos tipos de hemocianinas (Markl, 2013).

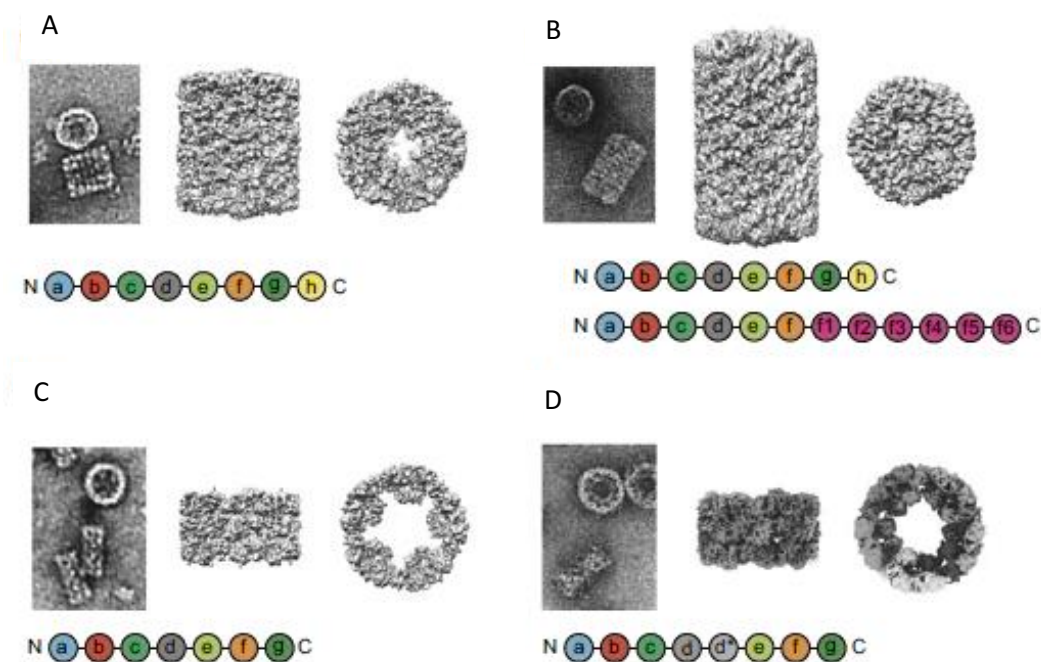


Figura I-5: Clasificación estructural de las hemocianinas de moluscos. (A-D) Imágenes por microscopía electrónica de transmisión, modelos 3D en vistas transversal y longitudinal y composición de unidades funcionales por subunidad, para cada tipo de hemocianina. (A) Tipo I (B) Tipo II (C) Tipo III (D) Tipo IV. (Imagen tomada de Kato et al. 2020).

I.B.4. ENSAMBLADO DE LAS HEMOCIANINAS

El ensamblado, que va desde el plegamiento de las UFs hasta el oligómero completo, y la interacción entre varios de éstos, sigue un patrón complejo (Kato et al. 2020).

Las UFs de un protómero se pliegan e interactúan con aquellas propias de otro protómero, generando un dímero de subunidades o protómeros, dispuesto a la manera de un paralelogramo. Ambas subunidades se disponen antiparalelas entre sí, de modo que la UF A de un protómero se ubica próxima a la UF F del otro. Este dímero de subunidades ha sido identificado como el principal producto de disociación para algunas hemocianinas de moluscos, lo que se explicaría por el particular entrecruzamiento entre UFs de protómeros distintos que da cohesión a toda la estructura (Harris et al. 2004; Zhang et al. 2013).

Cinco dímeros de protómeros interactúan formando las paredes de un cilindro decámero, con las UFs del collar interno hacia adentro del cilindro obstruyendo parcialmente una de sus caras (Fig. I-6) (Zhang et al. 2013; Gai et al. 2015). En un modelo de la hemocianina del calamar *Todarodes pacificus* de 3.0 Å de resolución obtenido por cristalografía de rayos X, se observó que en el mantenimiento del decámero cohesionado participaban interacciones de las UFs del collar interno y residuos glicosídicos (Gai et al. 2015). Estudios adicionales de hemocianinas de distintas especies, revelaron que las interacciones por puentes salinos y uniones por cationes divalentes (principalmente Ca^{+2} y Mg^{+2}) serían importantes a nivel de las interfaces entre UFs de un mismo decámero y entre decámeros (De Ioannes et al. 2004; Harris et al. 2004; Gai et al. 2015). Eventualmente, para el caso de hemocianinas de gasterópodos (que presentan una simetría D5), dos de estos decámeros pueden asociarse por sus extremos abiertos, en lo que se describe como una disposición “cola con cola” (Kato et al. 2017).

Cabe aclarar que la alta complejidad estructural de las hemocianinas ha dificultado su estudio por las técnicas de biología estructural más tradicionales, debiéndose acudir, en ciertos casos, a una combinación de ellas para obtener modelos de buena resolución; como por ejemplo, resolviendo la estructura de UFs individuales por cristalografía de rayos X y superponiéndolas a un mapa de densidad de la estructura global obtenido por criomicroscopía electrónica (Cuff et al. 1998; Jaenicke et al. 2010; Kato et al. 2020). Esta estructura compleja junto con su alto grado de glicosilación ha imposibilitado además la obtención de hemocianinas recombinantes, por lo que todas las hemocianinas purificadas hasta la fecha han sido obtenidas desde su fuente natural (Becker et al. 2014).

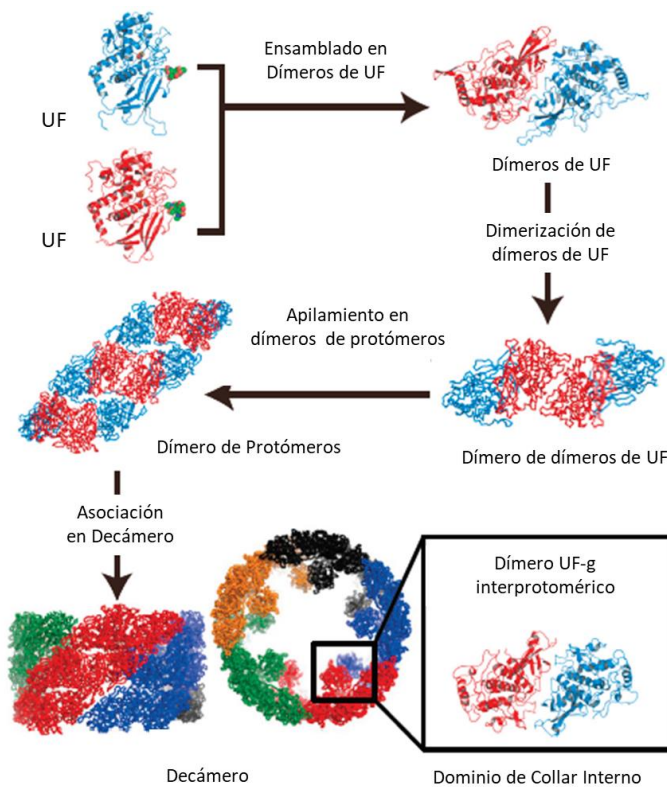


Figura I-6: Ensamblado complejo de las hemocianinas de moluscos. La representación abarca desde el nivel de UF hasta el de decámero ilustrada para el caso de una hemocianina de cefalópodo. (Imagen modificada de [Gai et al. 2015](#)).

I.B.5. PAPEL DE LA GLICOSILACIÓN EN LA ESTABILIDAD ESTRUCTURAL

Las UFs de moluscos poseen secuencias consenso (Asn-X-Ser/Thr, siendo X distinto de Pro) para sitios de N-glicosilación ([Stoeva et al. 1999](#); [Gai et al. 2015](#); [Kato et al. 2020](#)). Más aún, de acuerdo con lo observado en un modelo de 9 Å de KLH resuelto por criomicroscopía electrónica, los oligosacáridos N-ligados se localizarían sobre la cara externa de la pared y el borde del cilindro ([Gatsogiannis y Markl, 2009](#)). El aporte de estos oligosacáridos a la estabilidad estructural de hemocianinas de moluscos puede inferirse de estudios donde se los observa localizados especialmente en zonas de contacto entre UFs de distintos protómeros y, frente a una deglicosilación enzimática, estas proteínas se disocian en subunidades que no pueden reensamblarse. Además, la presencia de monosacáridos promueve la rápida disociación de su estructura sugiriendo la participación de los oligosacáridos en interacciones entre protómeros y en el efecto alostérico, que contribuiría a la función de la hemocianina en el transporte de oxígeno ([Zhang et al. 2013](#); [Gai et al. 2015](#)).

I.B.6. HIPÓTESIS EVOLUTIVA SOBRE EL ORIGEN DE LAS HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS

En base a estudios que emplearon relojes moleculares calibrados a partir de la separación de los linajes Gastropoda-Cephalopoda en el registro fósil, se calculó el origen de la subunidad de hemocianina de moluscos, de 8 UFs (A-H), en aproximadamente 753 millones de años. Esto se condice bien con el hallazgo de fósiles como *Kimberella*, que extenderían el origen del phylum hacia el Precámbrico tardío (Lieb et al. 2000). Por lo tanto, subunidades de 400 kDa organizadas en decámeros deberían considerarse como el arquetipo estructural de estas proteínas.

Una hipótesis evolutiva describe los pasos que habrían tenido lugar en el proceso que va desde una proteína tirosinasa ancestral, correspondiente a una unidad funcional actual, hasta el decámero de hemocianina (Fig. I-7). Así, dos de aquellas UFs ancestrales (Y) actuarían inicialmente como dímeros (YY) para cumplir con su función tirosinasa. En cierto punto, por duplicación génica y diferenciación, se habrían originado dos UFs (X, Z), asimilables a las actuales UF-D y UF-E y asociado en heterodímeros (XZ). Subsecuentemente, por un mecanismo de fusión génica, estas UFs habrían pasado a formar parte del mismo polipéptido (X-Z), para luego asociarse 5 dímeros en la formación de lo que correspondería a un nivel del decámero actual. La unión de 3 de estos niveles habría originado el decámero completo de 3 “pisos”. Posteriormente, nuevas unidades funcionales se habrían diferenciado dentro de la misma cadena polipeptídica a partir de duplicación génica de las secuencias de las dos primeras (Markl, 2013).

De este modo, el ensamblado que en primer término se habría obtenido por la interacción de polipéptidos idénticos de cadenas separadas, pasó a conformarse a partir de la asociación de unidades funcionales diferentes incluidas dentro de la misma cadena polipeptídica (Fig. I-7). Reminiscencia de ello sería la arquitectura de los genes de hemocianina, donde se observan intrones de fase 1 conservados entre los exones que codifican cada unidad funcional (Markl, 2013; Lieb, 2000; 2004).

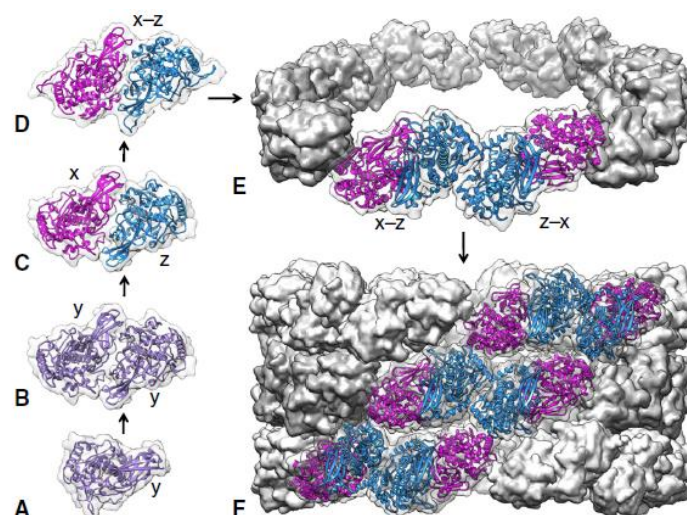


Figura I-7: Hipótesis evolutiva sobre el origen de las hemocianinas. Se parte de una tirosinasa Y ancestral hasta el decámero actual. Los colores corresponden a cadenas polipeptídicas diferentes. A-F: orden propuesto de los sucesos (Imagen tomada de Markl, 2013).

I.B.7. LA HEMOCIANINA COMO PROTEÍNA MULTIFUNCIÓN

Si bien ha sido típicamente descripta como pigmento respiratorio, los papeles que juega la hemocianina en la fisiología de invertebrados no se limitan a ello. Así, además de estar involucrada en el mantenimiento de la presión oncótica de la hemolinfa y la hemostasia, se ha reportado un rol en el transporte de lípidos, función que se vería favorecida por su alta concentración en hemolinfa (Zatta, 1981; Heras y Pollero, 1990; Hall et al. 1995; Jaenicke, 1999; Cunningham et al. 2020).

Los estudios realizados sobre cefalópodos, confirman la participación de subunidades de hemocianina en el transporte de lípidos, asociadas principalmente con ácidos grasos libres, hidrocarburos y ésteres de esteroles (Heras y Pollero 1990; 1992). De tal modo, estas subunidades han sido consideradas como verdaderas apolipoproteínas, conformando lipoproteínas de muy alta densidad (VHDL) o, en conjunto con otras apolipoproteínas, configurando lipoproteínas de menor densidad, esquema que ha sido observado en algunas especies de arácnidos (Cunningham et al. 2007; Laino et al. 2011). Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha descripto asociación con lípidos para ninguna hemocianina de moluscos gasterópodos (Garín y Pollero, 1995).

Otro aspecto relevante acerca del papel multifuncional de las hemocianinas es su participación en el sistema inmune de invertebrados, un tema de creciente interés que se tratará en la siguiente sección.

I.C. PARTICIPACIÓN DE LAS HEMOCIANINAS EN EL SISTEMA INMUNE DE MOLUSCOS

I.C.1. BIOLOGÍA COMPARADA DEL SISTEMA INMUNE

La exposición a agentes foráneos capaces de infectar y causar patologías, ha impulsado el desarrollo de herramientas defensivas en todas las formas de vida, dando lugar a una diversidad de mecanismos inmunológicos. En sentido amplio, esto incluye desde las enzimas de restricción bacterianas que protegen contra virus bacteriófagos, hasta la síntesis de anticuerpos (inmunoglobulinas) y receptores de linfocitos T en Gnathostomata. En definitiva, es la enorme y dinámica diversidad de antígenos a los que puede enfrentarse un individuo a lo largo de su existencia, la que ejerce una presión de selección hacia una mayor diversificación de los receptores antigénicos, con el fin de lograr una respuesta más eficiente (Murphy y Weaver, 2017).

Tradicionalmente, se ha clasificado al sistema inmune en dos grandes compartimientos funcionales: innato y adquirido. Si bien en vertebrados existe una interrelación entre ambos a la hora de montar respuestas adecuadas, se considera que la inmunidad innata se basa en mecanismos iniciados por el reconocimiento de receptores de antígenos dentro de un repertorio estable desde el inicio del desarrollo del organismo, generando una respuesta rápida pero acotada, que no varía con las sucesivas exposiciones; mientras que la inmunidad adquirida se caracteriza por la generación de una gran diversidad de receptores antigénicos (actuando como un “repertorio anticipatorio”) por un proceso de recombinación somática, y posterior selección clonal de las células portadoras de tales receptores en función de las

reiteradas exposiciones a sus antígenos específicos. Los vertebrados poseen tanto inmunidad innata como adquirida, mientras que los invertebrados sólo cuentan con las defensas del sistema innato. Esto no debe llevar a una concepción sobreesimplificadora acerca de la inmunidad de invertebrados, ya que, desde un contexto evolutivo, se observa en éstos una multiplicidad de estrategias defensivas, algunas de ellas que implican recombinación génica o vías de transducción de señales muy similares a las existentes en los mecanismos generales de la respuesta inmune de vertebrados (Murphy y Weaver, 2017).

Uno de los mecanismos de defensa más primitivos probablemente sea la secreción de péptidos antimicrobianos (PAMs). En insectos como *Drosophila*, existen receptores Toll de membrana, que activan vías de señalización que culminan en la liberación de PAMs; aquéllos son homólogos de los receptores tipo-Toll (TLR) de vertebrados, que reconocen Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Ambos tipos de receptores inician cascadas de señalización que culminan en la activación de factores de transcripción, pertenecientes a las familias homólogas REL, en insectos, y NFκB, en vertebrados. Si bien los TLR se diversificaron para participar de otras respuestas efectoras, se hipotetiza que compartirían con los receptores Toll un modo de activación indirecto, donde podrían reconocer proteínas propias hidrolizadas por serín-proteasas endógenas, que se activan por unión a proteínas que reconocen componentes de patógenos. En el erizo de mar *Strongylocentrotus purpuratus*, se han hallado más de 200 genes que codifican homólogos de receptores Toll, ejemplificando cómo una extrema diversificación puede actuar como un mecanismo de ampliación del repertorio de receptores antigénicos en invertebrados (Litman et al. 2010; Murphy y Weaver, 2017).

Un grupo de proteínas miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas son secretadas a los fluidos circulatorios de invertebrados, para unirse a patógenos invasores y facilitar su aglutinación y/o fagocitosis por células de la circulación, como los hemocitos de invertebrados (Smith 2010). Entre ellas se encuentra la proteína *Dscam* (molécula de adherencia celular del síndrome de Down), que en *Drosophila* es codificada por un gen que comprende tal número de exones que permitiría la expresión de al menos 38000 isoformas distintas de *Dscam* con blancos diferentes, por un proceso de corte y empalme (Watson et al. 2005; Dong et al. 2006). En *Biomphalaria glabrata*, un caracol dulceacuícola, los hemocitos pueden secretar proteínas relacionadas con fibrinógeno (FREP), que contienen dominios inmunoglobulina; éstas son codificadas por una familia de genes que se diferenciaría desde una línea germinal, permitiendo la formación de numerosas variantes en cada individuo (Zhang et al. 2004; Adema, 2015).

De este modo, a pesar de que la diversidad de receptores en invertebrados se genere por mecanismos diferentes a los de vertebrados, no posibilitando una selección clonal (y por tanto no pueda incluirse en la inmunidad adquirida), está lejos de limitarse a un grupo acotado e invariable de respuestas. Por el contrario, la inmunidad innata de invertebrados se vale de un conjunto de mecanismos de defensa dinámicos, que han contribuido a la gran diversificación de phyla como los artrópodos y moluscos. A continuación, se ilustra esa complejidad con mecanismos de la inmunidad innata en los que participan las hemocianinas de invertebrados.

I.C.2. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA DE HEMOCIANINAS

El sitio activo dicúprico permitiría a las hemocianinas cumplir funciones no sólo en el transporte de oxígeno, sino también en la participación de cascadas enzimáticas que llevarían a la oxidación de compuestos fenólicos. Dicha actividad fenoloxidasa, es compartida por otras proteínas de cobre tipo 3, como es el caso de las ubicuas tirosinasas y catecoloxidasas, que también son producidas por los hemocitos de invertebrados (Solomon et al. 1996; Decker et al. 2007; Coates y Nairn, 2014).

Las tirosinasas y catecoloxidasas, referidas conjuntamente como fenoloxidasas, catalizan la hidroxilación de compuestos monofenólicos (como la tirosina o el catecol) en difenólicos (como la dopamina), y la oxidación de estos últimos en quinonas y semiquinonas. Reacciones posteriores, no catalizadas por fenoloxidasas, permiten la formación del pigmento melanina, que polimeriza, encapsulando a los patógenos. A lo largo de esta cascada de reacciones se generan numerosas Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), que incluyen anión superóxido, peróxido de hidrógeno y oxhidrilos (**Fig. I-8**) (Vavricka et al. 2014; Sugumaran, 2002).

De este modo, la actividad fenoloxidasa presente en la hemolinfa de invertebrados, además de participar en procesos como la coagulación y cicatrización de heridas, tendría un papel importante en la defensa contra invasiones microbianas, encapsulando e impartiendo de manera localizada daño oxidativo a los microorganismos infecciosos. En ese marco, tanto las fenoloxidasas de hemocitos, como de la hemocianina circulante, serían fundamentales en la inmunidad innata de moluscos y artrópodos (Coates y Nairn, 2014; Cunningham et al. 2020). Más aún, muchas especies de invertebrados, como los artrópodos quelicerados, presentan una casi completa ausencia de actividad fenoloxidasa por hemocitos circulantes (Terwilliger y Ryan 2006; Jaenicke et al. 2009; Coates et al. 2020), sugiriendo una participación protagónica de sus hemocianinas en este proceso.

Se postula que el reconocimiento de PAMPs por receptores asociados a las membranas de hemocitos llevaría a la expresión de factores inmunes (incluyendo PAMs) y la liberación de profenoloxidasas por degranulación celular (Smith, 2010). La acción de serín-proteasas relajaría las estructuras proteicas de estas proenzimas, volviendo más accesible al sitio activo para la entrada de compuestos fenólicos. Asimismo, se ha sugerido la participación de proteasas bacterianas, liberadas durante la invasión de los tejidos afectados (Cerenius et al. 2010; Yao et al. 2019).

En el caso de las hemocianinas, numerosos compuestos han sido descritos como inductores de actividad fenoloxidasa en invertebrados tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto incluye, además de tratamientos proteolíticos con tripsina, quimotripsina o subtilisina, el uso de agentes caótopos como la urea, detergentes como el SDS, preparados de fosfolípidos, LPS bacteriano, sobrenadantes de lisado de hemocitos y lipoproteínas, entre otros (Cerenius L. y Söderhäll, 2004; Coates y Nairn, 2004; Siddiqui et al. 2006; Idakieva et al. 2009; Raynova et al. 2013).

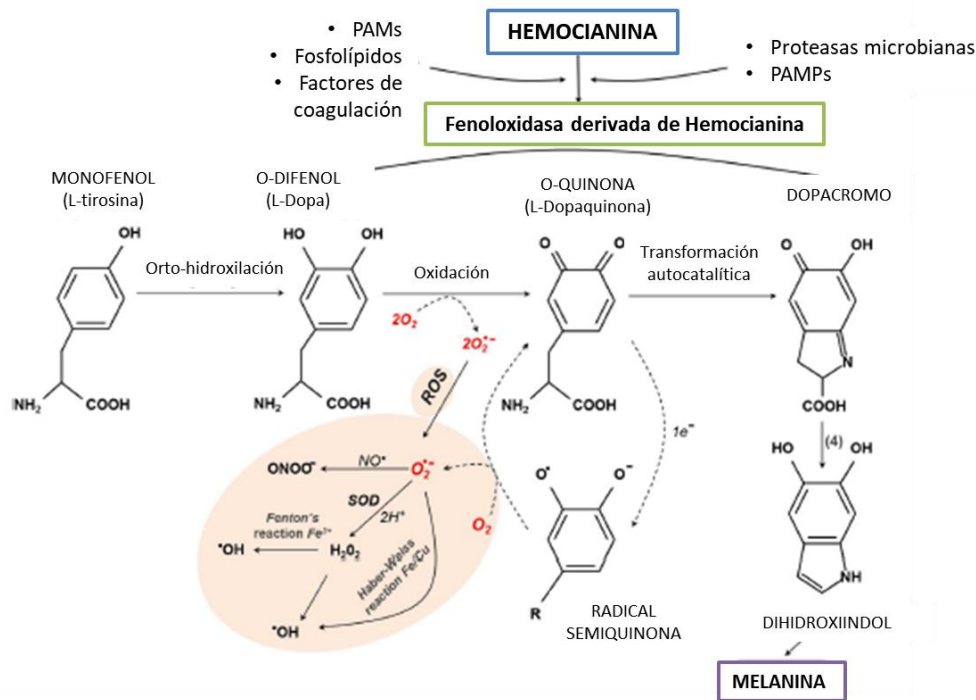


Figura I-8: Actividad fenoloxidasas de hemocianinas. Mecanismo propuesto para la inducción de actividad fenoloxidasas y cascada enzimática que culmina en la síntesis de melanina y producción de ROS. (Imagen tomada de Coates y Nairn, 2014).

I.C.3. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN LA INMUNIDAD INNATA

Como parte de un mecanismo de defensa innato ampliamente extendido, los organismos tienen la capacidad de generar pequeños péptidos, de entre 7 y 100 residuos de aminoácidos, con actividad antimicrobiana (Wu et al. 2018). Los estudios desarrollados sobre un gran número de estos PAMs destacan ciertas características fisicoquímicas comunes en ellos directamente relacionadas con su mecanismo de acción. Entre éstas podemos mencionar su naturaleza anfifílica y carga neta positiva, necesarias para la interacción selectiva con los componentes de las membranas de agentes patógenos, mayoritariamente de carga negativa, como es el caso del ácido lipoteicoico de bacterias Gram Positivas o el LPS, cardiolipina y fosfatidilglicerol de bacterias Gram Negativas. De este modo, la asociación de PAMs sobre la superficie de los microorganismos genera un impacto sobre la estructura, densidad y polarización de membranas celulares, todo lo cual conduce a la disrupción de la bicapa (Matsuzaki, 2009; Nguyen et al. 2011; Guilhelmelli et al. 2013; Boman, 2003; González García et al. 2020).

El estudio de la estructura de PAMs ha permitido clasificarlos en grandes grupos: aquéllos con estructura lineal de tipo α -hélice (como las cecropinas de polillas y nematodos), los que cuentan con puentes disulfuro y se componen de hojas β -plegadas y/o α -hélices (como las defensinas de mamíferos y las drosomicinas de *Drosophila*), y otros que poseen una repetición del mismo aminoácido, generalmente prolina (como sucede con las indolicinas bovinas) (Fig. I-9). La ubicuidad de PAMs en la naturaleza, que son producidos incluso por organismos unicelulares, puede

contenerse dentro de esas clases estructurales que se repiten como formas análogas en los diversos grupos (Wojda et al. 2020).

Los PAMs pueden ser dirigidos contra bacterias, hongos y virus o incluso tener un amplio espectro de acción que les permita combatir diversos agentes infecciosos. Entre sus principales ventajas se encuentran el poseer un efecto rápido (mayor al tiempo de duplicación bacteriano) y no propiciar el desarrollo de resistencia en las poblaciones blanco (Matsuzaki, 1999).

Sus mecanismos de generación también son variables, pudiendo estar codificados en el genoma y expresarse como producto final de vías de transducción de señales como la de los receptores *Toll* o *Imd*, o bien formarse por escisión desde proteínas más grandes que se clivan bajo la acción de proteasas, ambos procesos gatillados por estímulos relacionados con una infección microbiana (Boman, 2003; Coates et al. 2020).

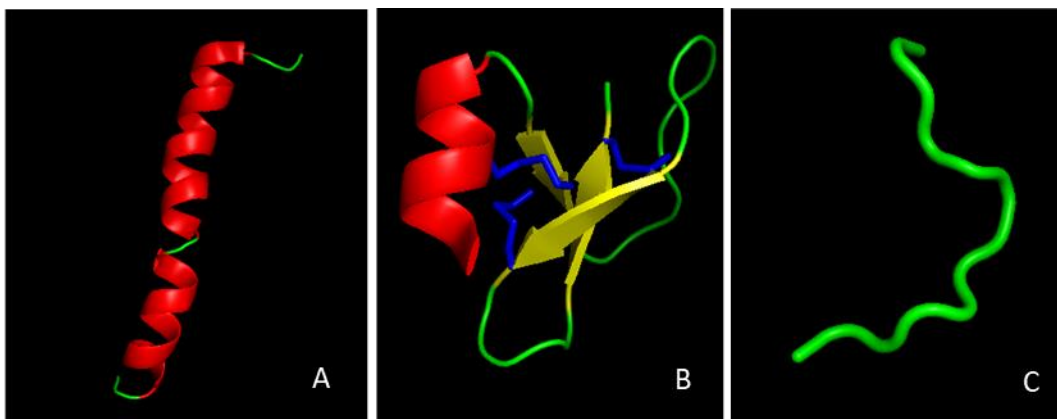


Figura I-9: Tipos estructurales de PAMs más frecuentes. Modelos visualizados en PYMOL 2.3.0. Los colores indican composición de estructuras secundarias: (A) Cecropina α -helicoidal de *Ascaris suum* (PDB ID: 7DEH). (B) β -Defensina-1 de *Homo sapiens*, resaltando los puentes disulfuro en azul (PDB ID: 1IJV). (C) Indolicidina, rica en prolina y triptófano, de *Bos taurus* (PDB ID: 1G89).

I.C.4. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DERIVADOS DE HEMOCIANINAS

El gran tamaño de las hemocianinas de invertebrados les ha permitido jugar un rol en la generación de compuestos bioactivos, que estarían contenidos en las enormes secuencias de estas proteínas y se liberarían por acción de proteasas en un contexto de infección. Este tipo de compuestos, genéricamente conocidos como criptidinas, incluiría PAMs (Coates y Decker, 2017; Coates et al. 2020; Cunningham et al. 2020).

El primero de los PAMs derivados de una hemocianina descubierto fue PvHCt, un péptido lineal α -helicoidal con actividad antifúngica obtenido de la hemolinfa del camarón *Penaeus vannamei* (Destoumieux-Garzon et al. 2001). Sucesivos ejemplos fueron hallados en artrópodos y moluscos, destacándose la identificación de PAMs derivados de la hemocianina del caracol marino *Haliothis tuberculata* (Lee et al. 2003; 2012; Zhuang et al. 2015). Éstos estarían contenidos en una región conservada de la UF E de hemocianina de este gasterópodo, denominada Haliothisina. La accesibilidad para

el ataque proteolítico sería un factor importante para la liberación de estos PAMs, en tanto la región Haliotisina se ubicaría en un bucle entre las cuatro α -hélices y el dominio hoja β -plegada de la UF-E (**Fig. I-10**). Sin embargo, el proceso de escisión proteolítica de PAMs a partir de hemocianinas no se ha corroborado *in vitro*.

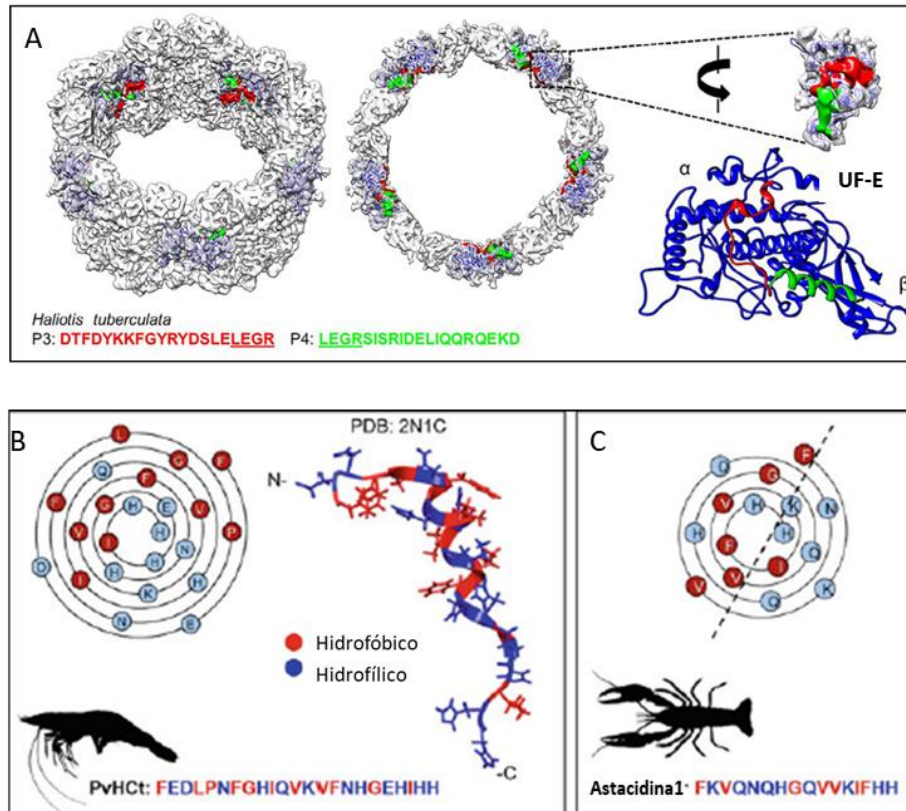


Figura I-10: Péptidos antimicrobianos derivados de hemocianinas. (A) Vistas de la estructura del decámero de la hemocianina del gasterópodo *Haliotis tuberculata* y de su UF-E que contiene la región conservada de haliotisina donde se encuentran dos PAMs denominados P3 y P4 (coloreados en rojo y verde, respectivamente). Se observa el contenido en estructura secundaria y la accesibilidad dentro del decámero (Imagen tomada de [Zhuang et al. 2015](#)). (B) Diagrama de Wenxiang y estructura cristalina del PAM del camarón *Penaeus vannamei* (PvHct). (C) Diagrama de Wenxiang del PAM Astacidina 1 del cangrejo de río *Pacifastacus leniusculus*. En los dos últimos casos, se destaca la anfipaticidad característica de estos compuestos con actividad antimicrobiana. (Imagen tomada de [Coates et al. 2020](#)).

I.C.5. DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA EN HEMOCIANINAS

Uno de los mecanismos efectores involucrados en la inmunidad innata es la aglutinación de bacterias. Esto se debe al reconocimiento de componentes de la superficie de células bacterianas por parte de regiones de reconocimiento que forman parte de moléculas más grandes, como es el caso de los dominios pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas ([Murhpy y Weaver, 2017](#)).

Tales dominios se encontrarían repetidos en los multímeros de hemocianinas de artrópodos, ofreciendo múltiples puntos de interacción con los blancos bacterianos, de modo de inmovilizar varios de ellos al unísono, y producir su aglutinación. Los oligosacáridos propios de esos dominios tipo-inmunoglobulina serían necesarios para dicho efecto. Las secuencias génicas correspondientes contarían con sitios de polimorfismo de nucleótidos únicos (*SNPs*), que permitirían generar una variabilidad más adecuada para reconocer una mayor diversidad de antígenos (Zhang et al. 2004; 2006; 2017a; 2017b; Zhao et al. 2012).

La información sobre hemocianinas de moluscos asociadas a este mecanismo de defensa es, hasta ahora, muy escasa (Alpuche et al. 2010).

I.D. EFECTO INMUNOESTIMULANTE DE LAS HEMOCIANINAS DE MOLUSCOS

I.D.1. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE VERTEBRADOS

Paralelamente a, y abrevando en, la caracterización de las hemocianinas de moluscos, ha surgido un interés por explorar sus potenciales aplicaciones en la estimulación del sistema inmune de vertebrados (Harris y Markl 1999; Becker et al. 2014). En ese sentido, pueden reconocerse tres grandes usos de estas cuproproteínas en la biomedicina (Fig. I-11):

- **Adyuvantes/carriers:** consiste en la conjugación con compuestos que por sí solos no generan una respuesta inmune significativa pero que, ligados a moléculas de hemocianina, se convierten en epitopes reconocibles contra los que el sistema inmune puede montar una respuesta (incluyendo glicolípidos o glicoproteínas tumorales y componentes bacterianos o víricos). En otras palabras, este tipo de uso de las hemocianinas permite convertir haptenos y péptidos pequeños en blancos antigénicos (Musselli et al. 2001; Shen et al. 2009; Del Campo et al. 2011).
- **Componentes de vacunas de células dendríticas (CDs):** la incubación *in vitro* de CDs de un paciente, con un determinado antígeno en presencia de hemocianina, se emplea como una herramienta para combatir el efecto inmunosupresor asociado a ciertas patologías. Las CDs se “cargan” con (es decir, incorporan) los compuestos expuestos, por ejemplo, lisados de células tumorales, y activan para ser así readministradas al paciente (Reichardt et al. 1999; Steinman y Banchereau, 2007).
- **Inmunoestimulantes no específicos:** Este efecto se encuentra íntimamente relacionado con las características estructurales de las hemocianinas de moluscos. Consiste en desencadenar una respuesta proinflamatoria generalizada, mediante una inoculación directa de hemocianina, lo que capacitaría a las células del sistema

inmune para reconocer y combatir tumores (Olsson et al. 1974; Nseyo y Lamm, 1997; Moltedo et al. 2006).

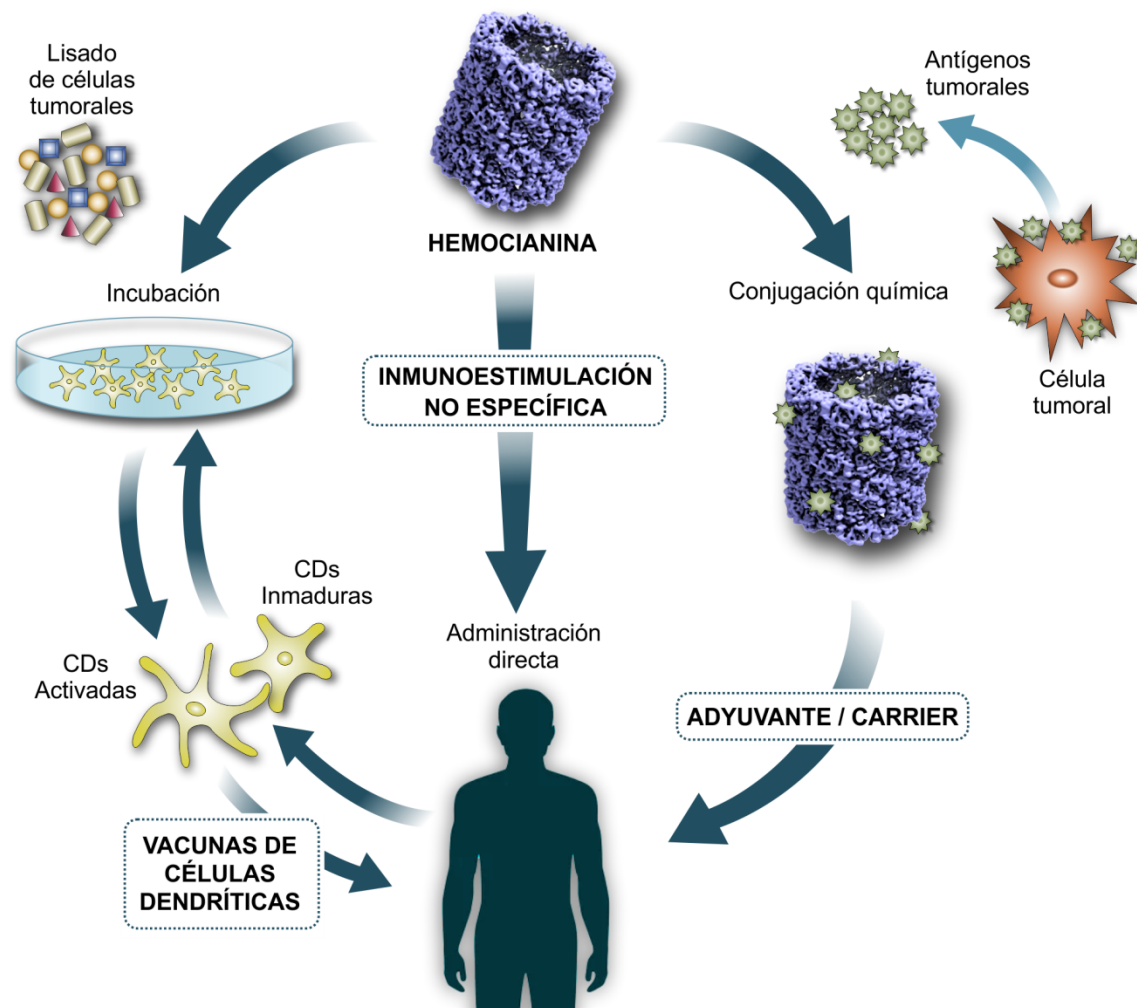


Figura I-11: Aplicaciones biomédicas de las hemocianinas de moluscos. Se esquematiza su empleo como adyuvante/carrier, componente de vacunas de CDs e inmunoestimulante no específico.

I.D.2. MODOS DE ACCIÓN

Las hemocianinas de moluscos marinos inducen una potente respuesta de linfocitos T CD4+ y de linfocitos B asociados a éstos, junto a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-2, IL-12, IFN- γ y TNF- α , relacionadas con una respuesta de tipo Th1 y citotoxicidad mediada por células, según se ha observado en modelos experimentales murinos y aplicaciones inmunoterapéuticas en humanos (Moltedo et al. 2006; Del Campo et al. 2011; Arancibia et al. 2014; Zhong et al. 2016). Para esto es necesaria la internalización de estas proteínas por parte de las células presentadoras de antígenos (CPAs), que captan antígenos en áreas afectadas del organismo,

procesarlos y presentarlos a los linfocitos efectores en órganos linfoides secundarios (Unanue y Cerottini, 1970).

Se observó que las hemocianinas serían internalizadas por endocitosis mediada por clatrina y macropinocitosis (Villar et al. 2021). En el reconocimiento inicial en membranas de CPAs participarían el receptor de manosa y el receptor tipo-*Toll*-4 de forma conjunta (Fig. I-12) (Presicce et al. 2008; Jiménez et al. 2019; Villar et al. 2021). Otros receptores involucrados serían el receptor de complemento 3 (CR3) y el receptor del fragmento cristizable y (FcγR), para KLH. En cuanto a las vías de transducción de señales, implicarían la participación de MAP quinasas como ERK (Quinasa regulada por señal extracelular) y del factor de transcripción NFκB (Yasuda y Ushio, 2016).

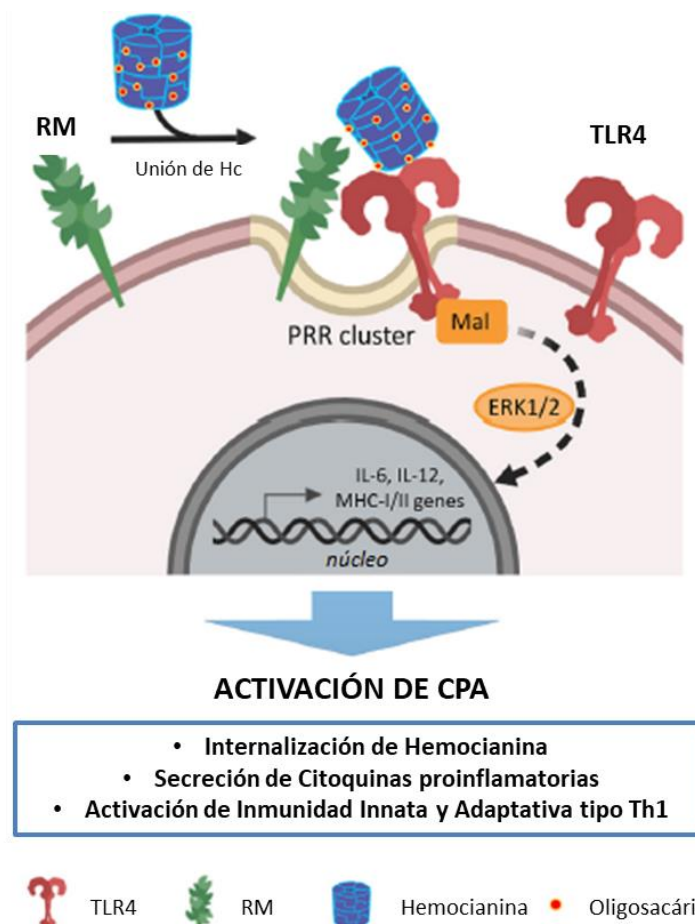


Figura I-12: Modos de acción de las hemocianinas de moluscos. Modelo propuesto para el reconocimiento y vía de transducción de señales de las hemocianinas. Se observa cooperación entre receptores de manosa (RM) y tipo-*Toll*-4 (TLR-4) para el reconocimiento por células presentadoras de antígeno (CPAs); *PRR*: Receptor de reconocimiento de patrones. (Imagen tomada de Jiménez et al. 2019).

I.D.3. MECANISMOS DE INMUNOGENICIDAD

Cabe preguntarnos qué características de las hemocianinas de moluscos podrían explicar los efectos antes mencionados sobre la respuesta inmune de vertebrados. Si

bien esto no se encuentra del todo dilucidado, existen evidencias que permiten hipotetizar algunos posibles mecanismos.

Por un lado, se ha apuntado al tamaño colosal de estas hemocianinas, argumentando que la internalización de estas proteínas por CPAs, principalmente CDs y macrófagos, daría paso a un lento procesamiento por la vía de presentación de antígenos. Es decir, que la degradación proteolítica en los endosomas de estas células, sería más lenta cuanto más grande sea la proteína a presentar y, por ende, conllevaría una presentación más prolongada de sus diversos epitopes por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) sobre la superficie de estas células, para ser reconocidos por los linfocitos interactuantes (Swerdlow et al. 1994; Arancibia et al. 2012; Zhong et al. 2016). También en relación con la complejidad estructural de las hemocianinas, se ha postulado que la reiteración de múltiples epitopes en la misma molécula (o ensamblados de ella), contribuiría a su inmunogenicidad. En desmedro de estas hipótesis está el hecho de que algunas subunidades aisladas de hemocianinas pueden resultar inmunogénicas por sí solas (Weigle, 1964; Tchorbanov et al. 2008; Becker et al. 2009). Otras explicaciones se fundan en el patrón de glicosilación de las hemocianinas. Efectivamente, ciertos oligosacáridos asociados a ellas semejan el patrón de glicosilación aberrante de la superficie de células tumorales (Presicce et al. 2008; Hall y Wood, 1976; Wirguin et al. 1995; Geyer et al. 2005; Dolashka y col 2010). Ensayos realizados *in vivo* con ratones, demostraron una menor respuesta inmune cuando los animales eran inoculados con hemocianinas previamente deglicosiladas (Jiménez et al. 2019). La xenogenicidad asociada a estas proteínas que provienen de organismos filogenéticamente distantes a los vertebrados también sería un factor importante para su efecto inmunogénico (Del Campo et al. 2011). Por último, se ha hipotetizado la existencia de xenoantígenos, aquéllos que estimulan la formación de o se combinan con anticuerpos heterófilos (de otra especie), permitiendo la aparición de reacciones cruzadas en organismos distantes; esto se debería a una similitud de los epitopes de las hemocianinas con epitopes de antígenos previamente reconocidos por las células inmunitarias a lo largo de la historia de vida de un individuo (se ha especulado con que los cilindros decaméricos podrían recordar a la estructura de ciertas cápsides virales) (Orlova et al. 1997; Gesheva et al. 2011; Becker et al. 2014).

Si bien la complejidad estructural y gran tamaño de las hemocianinas podría justificar parcialmente sus propiedades como adyuvante, no parecen ser explicación suficiente. Al menos en experimentos donde CDs de pacientes fueron expuestas *in vitro* a KLH, no se observó un efecto de activación concluyente, mientras que esto sí se apreció cuando en el medio de cultivo se adicionaba suero del paciente; además el bloqueo de los receptores FcγRII en estas CPAs (lo que impide que reconozcan la porción constante de las inmunoglobulinas) inhibió la internalización y presentación. Esto implicaría que los anticuerpos producidos por linfocitos B presentes en el suero del paciente como parte de una estimulación anterior con xenoantígenos similares, sería fundamental para la participación de CDs en la inmunogenicidad de estas hemocianinas (Benitez-Ribas et al. 2006).

Es importante notar que, considerando la complejidad del sistema inmune de vertebrados, los mecanismos hipotetizados no serían mutuamente excluyentes, pudiendo actuar en combinación sobre éste para generar los efectos observados.

I.E. OBJETIVOS

El presente trabajo de Tesis tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de la estructura, función y potencial aplicación de las hemocianinas de moluscos.

En particular:

- A) Aislar la hemocianina de *P. canaliculata* y caracterizar (i) su estructura y (ii) su estabilidad estructural.
- B) Estudiar su rol en la defensa contra invasiones microbianas, evaluando (i) su actividad fenoloxidasa intrínseca e inducible, (ii) su capacidad para generar péptidos antimicrobianos (PAMs) y (iii) su actividad aglutinante.
- C) Evaluar sus propiedades inmunomoduladoras, analizando (i) su efecto inmunoestimulante sobre un modelo celular monocito-macrófago humano, (ii) la participación de los glicanos asociados en dicho efecto y (iii) la respuesta humoral generada en un modelo murino.

Consideramos que el conocimiento sobre estos aspectos de Pch ayudaría a una mejor comprensión de las estrategias adaptativas de un caracol invasor con amplio impacto sanitario-económico-ecológico, lo cual podría ser relevante en el diseño de estrategias para el control de la especie. Por otro lado, sería de utilidad para evaluar la potencial aplicación de esta hemocianina en biomedicina y/o biotecnología.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

II.A. PURIFICACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata* (PcH)

El método optimizado para la purificación de PcH y el análisis de sus isoformas se realizó según el flujo de trabajo esquematizado en la Fig. II-1.

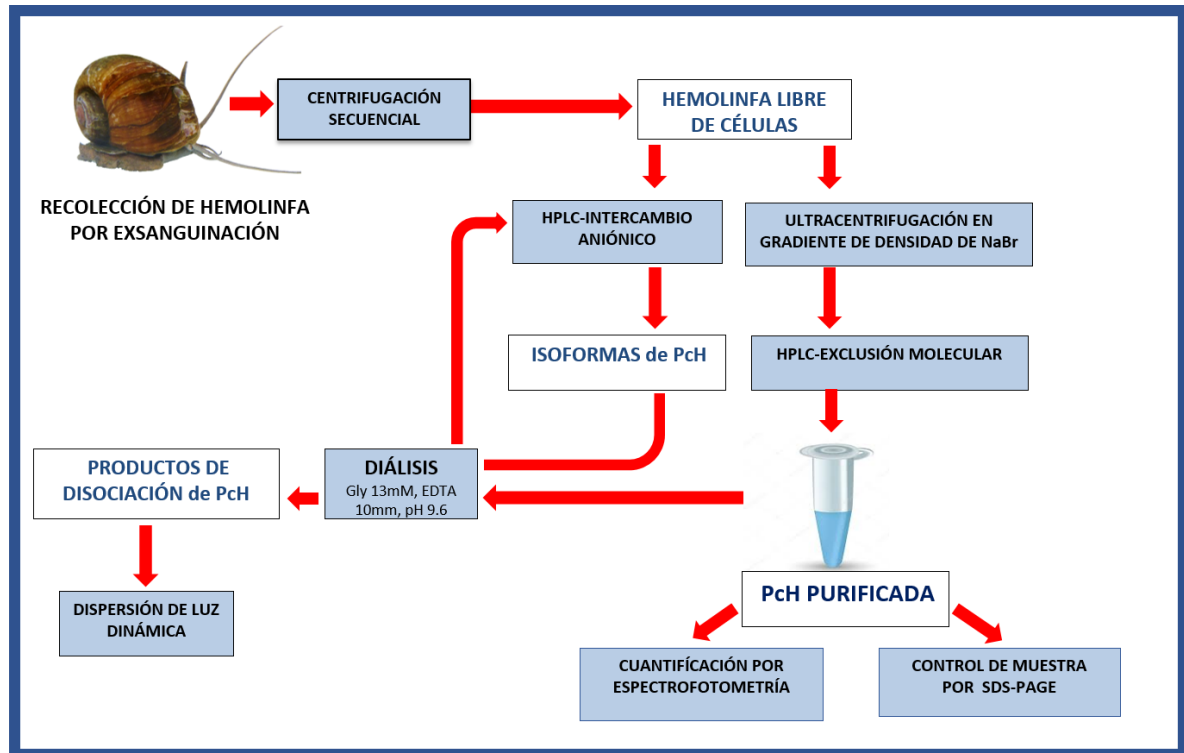


Figura II-1: Diagrama de flujo del algoritmo de trabajo seguido en la sección II.A.

II.A.1. CONDICIONES DE CRÍA DE LOS ANIMALES

Los ejemplares adultos de *P. canaliculata* fueron colectados de cuerpos de agua poco profundos en la localidad de Villa Castells, La Plata, Buenos Aires, Argentina (34°52'31"S, 58°01'12"O) (Fig. II-2), durante los meses de octubre a abril, y mantenidos en acuarios dentro de las instalaciones del INIBIOLP.

Se alimentó a los animales *ad libitum* cada 72 h con hojas de lechuga (*Lactuca sativa* L. 1753). Como suplemento se les proveyó de alimento para peces en escamas. La temperatura del agua se mantuvo entre los 25-27 °C. Semanalmente, se suministró carbonato de calcio, a fin de favorecer la formación de conchilla.

Los estudios con animales fueron realizados de acuerdo a la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (Consejo Nacional de Investigaciones, 2011).

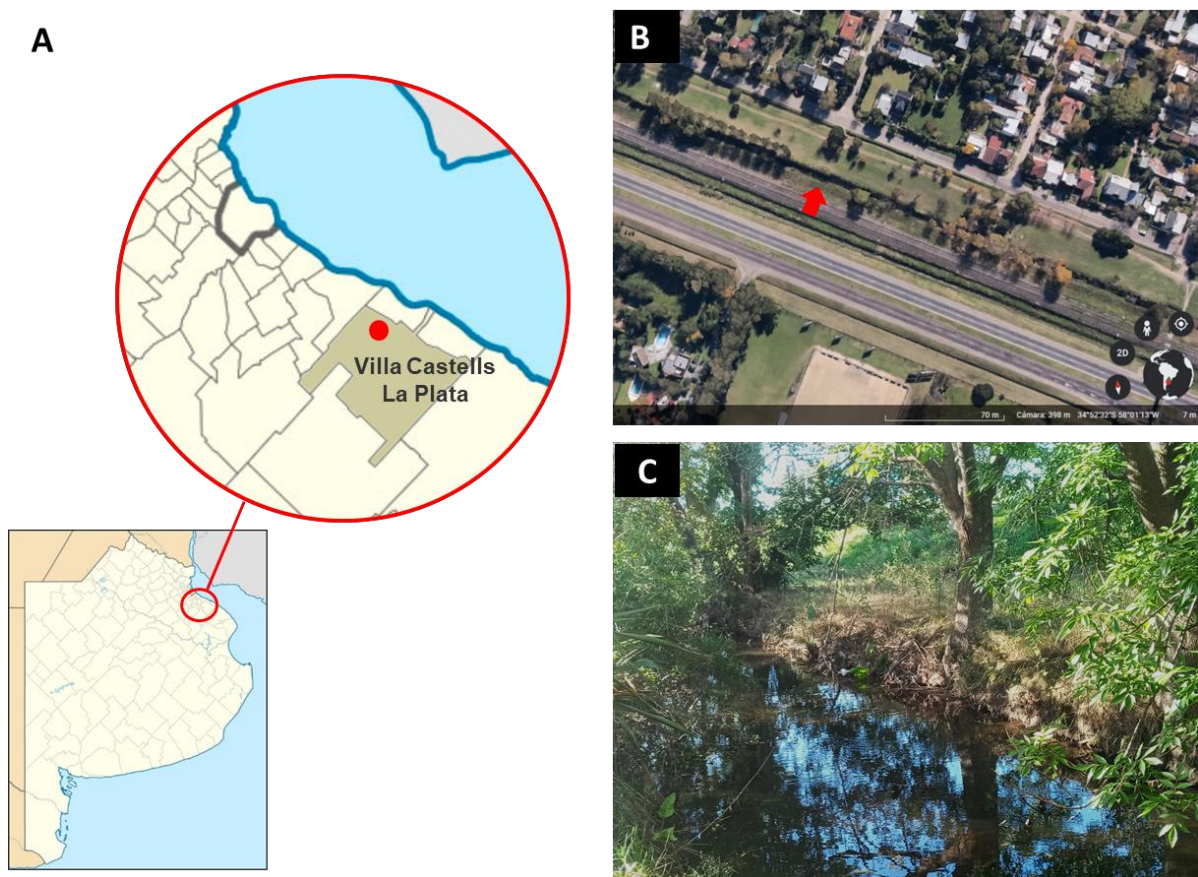


Figura II-2: Sitio de muestreo de *P. canaliculata*. (A) Mapa de la Provincia de Buenos Aires, Argentina y del partido de La Plata (tomados del Instituto Geográfico Nacional, IGN). (B) Vista satelital del sitio de muestreo, en la localidad de Villa Castells, Gonnet (La Plata) obtenida mediante Google Earth (<https://www.google.com/intl/es-419/earth/>). Se señala el cuerpo de agua donde se colectaron los individuos (flecha roja). (C) Aspecto del sitio de muestreo.

II.A.2. OBTENCIÓN DE HEMOLINFA

La hemolinfa se extrajo mediante exsanguinación de ejemplares adultos de tamaño superior a 30 mm de diámetro.

Para ello, cada individuo se lavó superficialmente con agua destilada, utilizando un cepillo de cerda suave y se limpió la zona del opérculo con papel rociado en etanol 70%. A continuación, se presionó suavemente sobre el opérculo, en dirección a uno de los bordes laterales de la abertura. La hemolinfa liberada se recibió sobre placa de Petri con 100 μ L de Inhibidor de Proteasas 1:100 (Sigma, EEUU) y 50 μ L de Citrato de Sodio 3,2%, a fin de evitar la degradación de la hemocianina por proteasas endógenas y la coagulación del fluido, respectivamente.

Este método permitió la supervivencia de los caracoles empleados y la obtención de entre 2-4 mL de hemolinfa por individuo, en función de su tamaño.

La hemolinfa así obtenida fue centrifugada a 500 xg durante 10 min para separar los hemocitos y el sobrenadante obtenido fue nuevamente centrifugado a 100.000 xg , 10

min para remover las proteínas desnaturalizadas. Ambos pasos fueron realizados a 4 °C en una microcentrifuga refrigerada Eppendorf 5424R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

II.A.3. AISLAMIENTO DE P_{CH} POR ULTRACENTRIFUGACIÓN Y CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La muestra resultante se sometió a ultracentrifugación isopícnica o por equilibrio de sedimentación, seguida de cromatografía líquida de alta resolución en columna de exclusión molecular (*HPLC-SEC*), a fin de separar a la P_{CH} de los demás componentes del fluido.

Para el primer paso se dispensaron 1,5 mL de muestra sobre 3 mL de solución de NaBr $\delta=1,28$ g/L. La centrifugación se realizó a 200.000 *xg* por 22 h a 4 °C empleando un rotor SW 60.Ti en una ultracentrífuga Beckman L8-70 (Beckman, Palo Alto, CA, EEUU).

Uno de los tubos, cargado con NaCl $\delta=1,07$ g/mL, se empleó como blanco para calcular las densidades a lo largo del gradiente formado. A partir de alícuotas de 200 μ L tomadas desde el extremo superior, cuyo índice de refracción a 26 °C se obtuvo en un refractómetro (Bausch & Lomb, Inc., Rochester, NY, EEUU), se obtuvieron datos de densidad usando valores tabulados (Orr et al. 1990). Para cada muestra, se midió la absorbancia de las alícuotas a 280 nm y 350 nm en un espectrofotómetro con arreglo de diodos Agilent 8453 UV/Visible (Agilent Technologies, Inc., Waldbronn, Alemania), de manera de obtener el perfil de proteínas de la muestra y así, identificar las fracciones enriquecidas en P_{CH}. Estas últimas fueron agrupadas e inyectadas en una columna de Superosa-6 (Amersham-Pharmacia, Uppsala, Suecia) acoplada a un sistema *HPLC* con detector UV-Vis Agilent 1260 (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Alemania). Como fase móvil se empleó buffer Tris 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM, pH 7,4; buffer fosfato 100 mM, pH 7,5; ó buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4, según el ensayo a realizar posteriormente.

Las muestras de P_{CH} eluidas, detectadas por su absorbancia a 280nm, fueron concentradas por ultrafiltración en dispositivos Amicon Ultra-4 ó Ultra-15 (Millipore, Billerica, MA, EEUU), provistos de membranas con un tamaño de corte de 10 kDa.

II.A.4. COMPROBACIÓN DE LA PUREZA DE LA MUESTRA POR ELECTROFORESIS

La pureza de la P_{CH} fue evaluada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes, en presencia de dodecilsulfato de sodio (*SDS-PAGE*) y β -mercaptoetanol. De este modo, la migración a lo largo de un campo eléctrico se basó exclusivamente en el peso molecular de la proteína, a lo largo de un entramado de gel con gradiente de poliacrilamida-bisacrilamida, hasta alcanzar el tamaño de poro que detuviera la movilidad (Laemmli, 1970; Margolis y Wrigley, 1975). El gradiente de acrilamida empleado fue 4-15% y las condiciones de corrida fueron 70 V por 1 h y luego 90 V durante las siguientes 2 h en una cuba electroforética Mini-Protean III (BioRad, Hercules, CA, EEUU). Concluida la corrida, los geles fueron fijados con una solución de isopropanol 25% y luego teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma

Chemicals) 0,006% (p/v) en ácido acético 10%. Finalmente fueron decolorados en ácido acético 10% (Echan y Speicher, 2002).

II.A.5. CUANTIFICACIÓN DE PcH

El contenido de proteína total fue determinado en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Alemania). El método empleado se basa en la propiedad de los aminoácidos aromáticos de absorber luz UV alrededor de los 280 nm, y para esto se empleó un coeficiente de extinción molar para PcH adquirido *in silico* ($\epsilon_{280} = 5.37 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), cuya obtención se explica en la subsección II.B.1.II. El cálculo de la concentración de proteína en la muestra se realizó según la Ley de Lambert-Beer (Cooper, 2007).

II.A.6. SEPARACIÓN DE ISOFORMAS DE PcH

A fin de investigar la presencia de isoformas, se inyectó hemolinfa en una columna de intercambio aniónico Mono-Q 10/100 GL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia), acoplada a un sistema HPLC con detector UV Agilent 1260. A lo largo de la corrida se fue incrementando la concentración de NaCl según se indica en la **Tabla II-1**.

TIEMPO (min)	% Buffer B	% Buffer C
0	100	0
2	100	0
40	50	50
40,1	0	100
45	0	100
45,1	100	0
60	100	0

Tabla II-1: Gradiente de concentración de NaCl empleado con hemolinfa. Buffer B: Tris 20 mM pH=8,5 y Buffer C: Tris 20 mM, NaCl 1 M, pH=8,5.

Los analitos eluidos (isoformas de PcH) fueron analizados por PAGE nativa 6%. En simultáneo, cada uno de ellos junto con una muestra de PcH nativa, fueron dializados durante 24 h contra un buffer Glicina 130 mM, EDTA 10 mM pH=9,6 a fin de favorecer su disociación (De Ioannes et al. 2004) y se inyectaron en la misma columna, siguiendo el gradiente de concentración de NaCl indicado en la **Tabla II-2**.

TIEMPO (min)	% Buffer B	% Buffer C
0	100	0
4,9	100	0
5,0	85	15
36,5	50	50
36,6	0	100
40,0	0	100
40,1	100	0
45,0	100	0

Tabla II-2: Gradiente de concentración de NaCl empleado con PcH disociada. Buffer B: Glicina 130 mM, EDTA 10 mM pH=9,6 y Buffer C: Glicina 130 mM, EDTA 10 mM, NaCl 1 M, pH=9,6.

II.A.7. COMPLEJIDAD ESTRUCTURAL DE PcH POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA

A fin de conocer la complejidad estructural de PcH tras su disociación, se analizó su diámetro hidrodinámico y peso molecular en condiciones nativas y luego de disociarla en buffer Glicina 130 mM, EDTA 10 mM, pH=9,6 por 24 h. Para esto se determinó la dispersión de luz dinámica (*DLS*) en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), empleando un láser incidente de 633 nm y midiendo la intensidad de luz dispersada por la muestra a 173°.

El método se basa en que el movimiento de las moléculas de proteína en solución, debido a la colisión con las moléculas de solvente que las rodean (movimiento browniano) será más lento cuanto mayor sea el tamaño de la partícula. Las fluctuaciones generadas en el patrón de dispersión de luz tendrán una velocidad inversamente proporcional al tamaño de las partículas. La comparación en intensidad de la señal entre los distintos tiempos ensayados permite obtener coeficientes de correlación, cuya expresión en función del tiempo es una función de correlación, a partir de la cual se deducen parámetros sobre la estructura proteica (Arzenšek, 2010).

Así, se obtuvieron valores de Diámetro Z-promedio e Índice de polidispersión (PDI) mediante análisis cumulante de las funciones de correlación generadas, y se estimaron los pesos moleculares, siguiendo el análisis por defecto del software Zetasizer v.7.13.

II.B. CARACTERIZACIÓN DE PcH

Los análisis correspondientes a la caracterización estructural y funcional de PcH siguieron el flujo de trabajo esquematizado en la **Fig. II-3**.

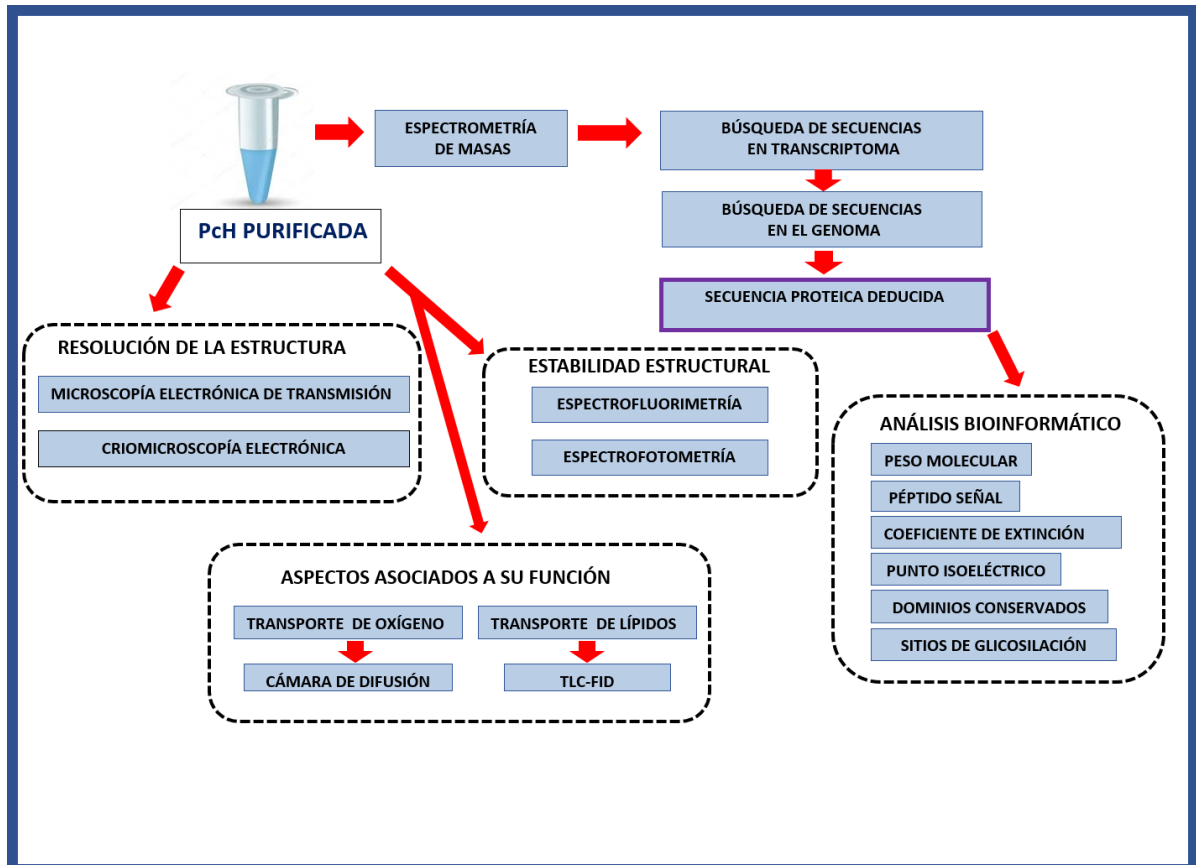


Figura II-3: Diagrama de flujo del algoritmo de trabajo seguido en la sección II.B.

II.B.1. ESTRUCTURA PRIMARIA

II.B.1.I ESPECTROMETRÍA DE MASAS, ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO Y GENÓMICO

El análisis de PcH por espectrometría de masas (*MS*) se llevó a cabo en el CEQUIBIEM (UBA-CONICET). Los puentes disulfuro de la proteína fueron reducidos con DTT 10 mM y las cisteínas libres bloqueadas con iodoacetamida 55 mM. A continuación, se proteolizó con tripsina, siendo los péptidos trípticos resultantes desalados en una columna Zip-Tip C18 (Millipore) y separados en un sistema nano-*HPLC* (EASY nLC 1000, Thermo Scientific, MA, EEUU). Seguidamente, se los ionizó por electrospray (EASY-SPRAY, Thermo Scientific) y secuenció en un espectrómetro de masas con analizadores en tándem Cuadrupolo-Orbitrap (Q-Exactive, High Collision Dissociation Cell, Orbitrap, Thermo Scientific, MA, EEUU). La interpretación de los espectros *MS/MS* adquiridos se realizó empleando *Proteome Discoverer v1.4*.

Las secuencias peptídicas internas de PcH obtenidas se usaron para buscar la secuencia de ADNc completo de la/s subunidad/es posibles de PcH en la base de datos

AmpuBase, (<https://www.comp.hkbu.edu.hk/~db/AmpuBase/index.php>). Ésta contiene transcriptomas secuenciados de 8 especies de ampuláridos, elaborados a partir de varios tejidos (Ip et al. 2018).

Las secuencias de ADNc obtenidas se emplearon con el fin de buscar las secuencias génicas que corresponderían a PcH en el genoma de la especie (Sun et al. 2019), y deducir su secuencia proteica completa.

II.B.1.II ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS

Para cada subunidad de PcH se realizaron estimaciones teóricas de peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de extinción molar a 280 nm empleando la herramienta ProtParam, disponible en el servidor ExPASy. El servidor SignalP 4.1 se utilizó para determinar la presencia de péptido señal en la secuencia proteica y los potenciales sitios de N-glicosilación se predijeron mediante NetNGlyc-1.0.

Adicionalmente se realizó una búsqueda de dominios conservados en las diferentes secuencias de PcH, empleando la herramienta *Conserved Domain Database* (CDD), recurso disponible en el sitio del *National Institute of Health* (NIH).

II.B.2. ESTRUCTURA NATIVA

II.B.2.I. ANÁLISIS DE FORMA GLOBAL POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los estudios de PcH por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizaron utilizando dos servicios diferentes.

Para los ensayos preliminares, muestras de PcH 0,12 g/L (en buffer Tris 20 mM, CaCl₂ 20 mM y MgCl₂ 20 mM, pH 7,4) fueron depositadas sobre un film de carbono soportado en grilla de cobre. A continuación, se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo 2 % (p/v), a temperatura ambiente, durante 10 min y dejó secar sobre mesada. Las imágenes se registraron, en un microscopio JEM-1200 EX II (Tokio, Japón) en el Servicio de Microscopía Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Para el ensayo definitivo muestras de PcH 0,5 g/L en el mismo buffer, fueron sometidas a tinción negativa con acetato de uranilo 2 % (p/v) durante 30 s, repitiéndose este paso dos veces. Las imágenes se registraron en un microscopio Talos F200C (Thermo Fisher, MA, EEUU), operado a 200 kV en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (CNPEM, Campinas, Brazil). El análisis de las imágenes se realizó empleando el software Adobe Photoshop CS6.

II.B.2.II. RESOLUCIÓN DE ESTRUCTURA POR CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

La adquisición de imágenes fue realizada mayormente por la Dra. Tabata Brola, integrante de nuestro grupo de trabajo, y el análisis de la estructura 3D mediante criomicroscopía electrónica (*CryoEM*) fue realizado por la Dra. Brola junto con un importante aporte del tesista en todo el proceso de análisis y discusión de los resultados. En la **Fig. II-4** se presenta un esquema del flujo de trabajo seguido desde la adquisición de imágenes por *CryoEM* hasta el análisis de partícula única para la reconstrucción 3D del mapa de densidad electrónica y modelado de Pch. Asimismo, la **Fig. Apéndice 1** recopila puntos destacados del análisis.

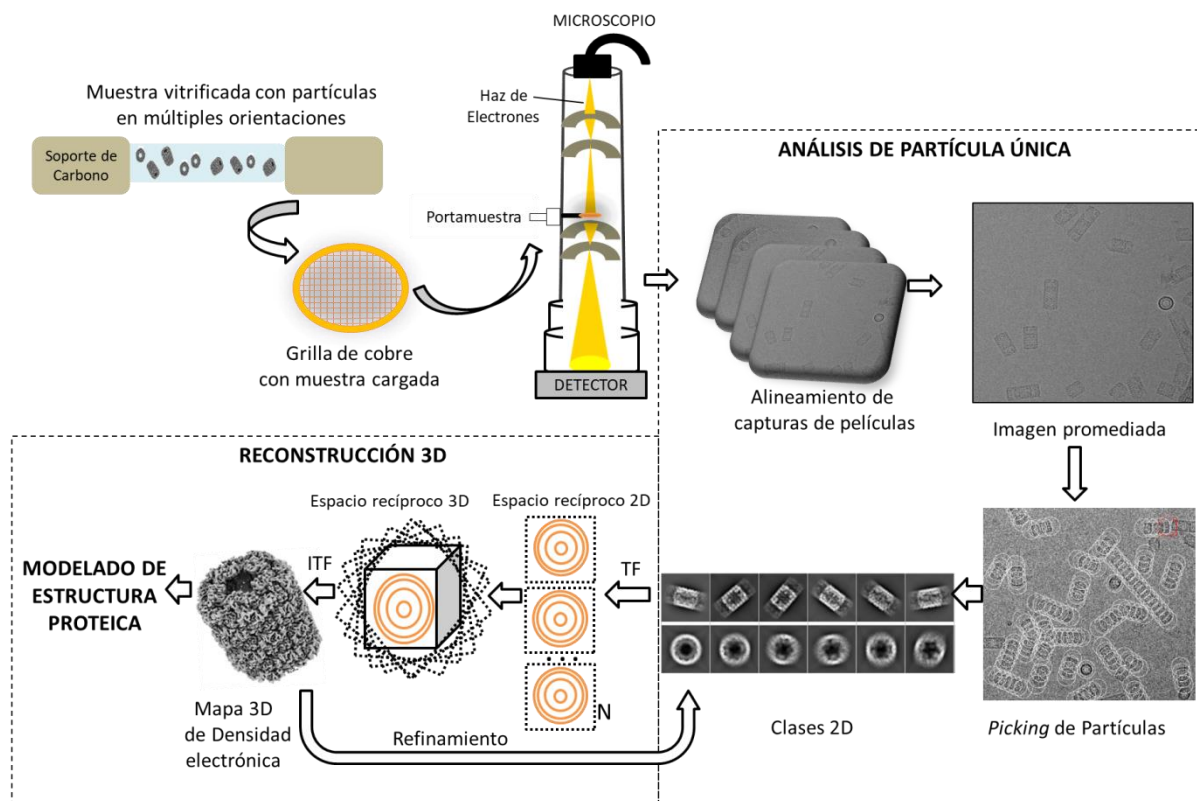


Figura II-4: Flujo de trabajo empleado para análisis por *CryoEM*. Se representa esquemáticamente el proceso desde la adquisición de imágenes hasta la reconstrucción 3D del mapa de densidad electrónica y modelado tridimensional de Pch. TF: Transformada de Fourier; ITF: Inversa de la transformada de Fourier.

II.B.2.II.i. ADQUISICIÓN Y PRIMER PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Para los ensayos de criomicroscopía electrónica, se aplicaron 3 μL de Pch 3,0 mg/mL en buffer Tris 20 mM, CaCl_2 20 mM y MgCl_2 20 mM, pH 7,4 sobre grillas R2/2 con film de carbono sobre soporte de cobre (Quantifoil Micro Tools GmbH, Jena, Alemania), previamente cargadas negativamente por medio de descarga luminiscente (*glow discharge*) que permite la distribución uniforme de las partículas en la superficie de la grilla. La muestra fue aplicada, secada con papel de filtro durante 4,5 s y vitrificada en etano líquido utilizando un Vitrobot (FEI, Hillsboro, OR, EEUU). La vitrificación rápida

permite conservar la conformación nativa de la proteína en un entorno plenamente hidratado, impide el colapso de la muestra cuando se produce vacío dentro del microscopio, no conlleva la generación de presión de vapor que pueda dispersar electrones del haz irradiado, y reduce el riesgo de daño por radiación al espécimen estudiado, permitiendo así emplear dosis más altas de electrones para mejorar el contraste de las imágenes (Frank, 2006).

La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio Titan Krios (Thermo Fisher, MA, EEUU) operado a 300 kV con un detector FEI Falcon III en el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LNNano, CNPEM, Campinas, Brasil) usando una magnificación nominal de 59.000, correspondiente a un tamaño de pixel calibrado de 1,99 Å y un rango de defoco entre -1,1 y -1,9 μm.

El procesamiento posterior de las imágenes así obtenidas se detalla en la **Fig. Apéndice 2**. Así se obtuvieron un total de 4584 películas a gran velocidad, de modo de adquirir las partículas más allá del movimiento que naturalmente sufren cuando la capa de hielo es irradiada por los electrones. Para el análisis de partícula única, microfotografías capturadas de estas películas se alinearon (es decir, compararon para registrar motivos en común) y promediaron utilizando el programa Imagic 4D.

La función de transferencia de contraste (CTF), función que describe cuantitativamente las aberraciones que modifican una imagen, se estimó empleando el programa Gctf. Seguidamente, se realizó un proceso de exclusión manual hasta alcanzar un subconjunto de 3461 microfotografías para continuar su análisis.

II.B.2.II.ii. SELECCIÓN DE PARTÍCULAS Y RECONSTRUCCIÓN 3D

Las microfotografías finales se procesaron empleando el paquete de software Scipion, en colaboración con el Centro Nacional de Biotecnología de Madrid (CNB) a través de la plataforma Instruct Eric.

A fin de reconstruir una imagen 3D de la proteína, se realizó una selección de partículas (*picking*) en sus diferentes vistas 2D, esto es, las apariencias distintivas de la muestra según las orientaciones azarosas al momento de la vitrificación.

Para su empleo en la reconstrucción de un modelo 3D, un total de 29.935 partículas se escogieron en el proceso de selección de clases 2D, conservando aquellas donde los didecámeros se apreciaban claramente e imponiéndose al modelo una simetría D5, como es esperable para una hemocianina de molusco gasterópodo (Zhang et al. 2013).

La resolución global final de la reconstrucción 3D fue 4.4 Å calculada empleando el método *Gold-Standard Fourier Shell Correlation (GSFSC)*. La resolución final se obtuvo como el valor de resolución para el cual el coeficiente de correlación alcanzaba un umbral inferior convencional de 0,143 (Frank, 2006).

II.B.2.II.iii. CONSTRUCCIÓN DEL MODELO, REFINAMIENTO EN ESPACIO REAL Y VALIDACIÓN

En base a la secuencia de Pch Pca_110_9.64, número de acceso: BK014379 (Schäfer et al. 2021), se construyeron unos primeros modelos *ab initio* para cada UF mediante AlphaFold2 CoLab, siguiendo parámetros estándar. Cinco modelos fueron creados para cada UF A-H, trasladados manualmente y ajustados al mapa de densidad

correspondiente a la unidad asimétrica (dímero de subunidades), haciendo coincidir los elementos observados en la estructura secundaria empleando UCSF-Chimera. La densidad electrónica asociada a los aminoácidos N-glicosilados ayudó a confirmar el ajuste de la secuencia en el mapa de densidad de la proteína. El ajuste al mapa fue completado empleando el módulo *fit into map* de UCSF-Chimera (Pettersen et al. 2004), seleccionándose aquellos modelos con los mejores coeficientes de correlación.

Los bucles y péptidos conectores entre UFs fueron refinados empleando Coot (Emsley et al. 2010). El refinamiento general se completó usando el módulo *real space refinement* del paquete de software Phenix. El modelo completo de la Pch se consiguió aplicando simetría D5 a la unidad asimétrica y refinando iterativamente. La validación del modelo se llevó a cabo empleando el software MolProbity (Williams et al. 2018).

El análisis de las estructuras y las figuras se realizaron utilizando los softwares PyMOL Molecular Graphics System 1.8 (Schrödinger, EEUU) y UCSF ChimeraX.

II.B.3. ESTABILIDAD ESTRUCTURAL

II.B.3.I. CONDICIONES A EVALUAR

Se evaluó la influencia de factores ambientales (pH y temperatura) sobre la estructura nativa de Pch.

La estabilidad frente al pH se estudió a los siguientes valores: 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Soluciones buffer en este rango de pH fueron preparadas empleando $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 100 mM, excepto para el caso del buffer a pH 4,0 que consistió en una mezcla de citrato de sodio 100 mM y NaH_2PO_4 0,2 M (Deutscher 1990). Se prepararon soluciones de Pch en cada uno de estos buffers a una concentración de 1 mg/mL y se incubaron a 4 °C durante 48 h en oscuridad. Luego, se analizaron a 25 °C por espectroscopías de absorción y de fluorescencia.

En el caso del estudio de la estabilidad térmica, una muestra de Pch 0,6 mg/mL en buffer Tris-HCl 20 mM, CaCl_2 10 mM, MgCl_2 10 mM, pH=7,4 fue sometida a aumentos progresivos de temperatura de 5 °C en el rango 25-80 °C, adquiriendo los espectros de absorción y de fluorescencia a cada temperatura. Para esto, la muestra fue termostataada utilizando un baño de circulación de agua (LAUDA, Alemania).

II.B.3.II. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPÍA DE ABSORCIÓN

Los espectros de absorción fueron adquiridos en el rango de 250 a 310 nm, empleando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible. Para cada muestra, se promediaron tres espectros, sustrayendo la absorbancia de sus buffers correspondientes.

En todos los casos, se calculó la cuarta derivada de los espectros de absorción, realizando dos derivadas de segundo orden sucesivas, según la **Ec. II-1** (Nozaki, 1990).

$$\frac{\Delta^2 A}{\Delta \lambda^2} = \frac{(A_{i+20} - 2A_i + A_{i-20})}{\Delta \lambda^2} \quad \text{Ecuación II-1}$$

Donde A_i es el valor de absorbancia en el espectro de primer orden y λ es la longitud de onda a la que se observa dicho valor de absorbancia.

Este método permite aumentar la resolución de los espectros originales, procesándolos de modo que los picos de absorción se vuelvan más pronunciados mientras que las bandas anchas tiendan a perderse. De este modo, se pueden discriminar más fácilmente los máximos y mínimos y la topografía general del espectro en la región del UV cercano, correspondiente a la absorbancia de los aminoácidos aromáticos de la proteína, lo cual resulta informativo de la conformación proteica (Duñach et al. 1983).

II.B.3.III. ANÁLISIS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA

Los espectros de fluorescencia intrínseca de PcH fueron registrados en modo de escaneo de emisión en un espectrofluorómetro Varian Cary Eclipse (Varian Inc., Australia). Los residuos de triptófano fueron excitados a 290 nm (con *slits* de 5 nm) y su espectro de emisión registrado entre 310 y 410 nm (con *slit* de 5 nm) en cubeta de cuarzo con 1 cm de paso óptico.

Para cada muestra se promediaron tres espectros de emisión, corregidos por la fluorescencia de sus respectivos buffers.

La utilidad del método para estudiar la estabilidad estructural reside en que evalúa las modificaciones que producen los tratamientos sobre el espectro de emisión de los residuos de triptófano. Así, el aumento en la intensidad de fluorescencia se adjudica a la pérdida del efecto de *quenching* o apagado que los residuos de triptófano sufren en entornos hidrofóbicos de la proteína plegada; mientras que el corrimiento del máximo de emisión hacia mayores longitudes de onda se acentúa ante una mayor exposición de estos residuos al solvente.

A partir de estos resultados se obtuvo el Centro de masas (CM) para cada espectro de emisión de fluorescencia, empleado como parámetro informativo sobre la estabilidad estructural de la proteína, siguiendo la Ec. II-2 (Royer et al. 1986).

$$CM = \frac{\sum F_i \times \lambda_i}{\sum F_i} \quad \text{Ecuación II-2}$$

Donde λ_i es la longitud de onda y F_i es la intensidad de emisión de fluorescencia.

II. B.4. AFINIDAD POR EL OXÍGENO

El análisis de afinidad por el oxígeno se llevó a cabo durante una estancia en el Instituto Alfred Wegener Helmholtz Centre for Polar and Marine Research (Bremerhaven, Alemania).

Se empleó una cámara de difusión modificada (Loligo Systems ApS, Viborg, Dinamarca) (**Fig. II-5**) que permite registrar los cambios en la absorbancia asociados al grado de oxigenación de la proteína a lo largo del tiempo, durante el que pueden modificarse las condiciones de temperatura, pH y presión parcial de gases (pO_2 , pCO_2 y pN_2). La combinación de gases deseada se realiza previamente en un sistema de mezclado de gases (Loligo Systems ApS, Viborg, Dinamarca) que se conecta a la cámara de difusión, de manera de asegurar que la atmósfera de exposición de la proteína se encuentre ya homogénea (Oellerman et al. 2014; 2015).

La Pch, con una concentración mínima de 2,56 mg/mL en buffer Tris 20 mM pH=7,6 fue estudiada con programas donde se registró la absorbancia a 345 nm, mientras se incrementaba la pO_2 (desde 0 hasta 101,33 kPa) y se mantenía constante en 0,1 kPa el valor de pCO_2 . Las corridas se repitieron a diferentes temperaturas: 15, 24 y 28 °C, a fin de conocer la capacidad de unión al oxígeno de Pch en un rango de condiciones que recreara aquéllas de los ambientes habitados por *P. canaliculata*.

Para el análisis de los resultados, se corrigieron los valores de absorbancia a 345 nm por la deriva correspondiente a cada experimento a partir de la absorbancia a 500 nm (considerada como punto isobéptico, en el que no se registraba absorbancia específica para Pch). Las diferencias de concentración entre muestras fueron normalizadas transformando los datos de absorbancia en porcentaje de saturación (%Sat) de O_2 . Se elaboraron curvas de %Sat O_2 vs. pO_2 y calcularon por interpolación los valores de P50, entendiendo ésta como la presión parcial a la cual el porcentaje de saturación de Pch es del 50%, y utilizada como una medida de la afinidad del pigmento respiratorio por el oxígeno.

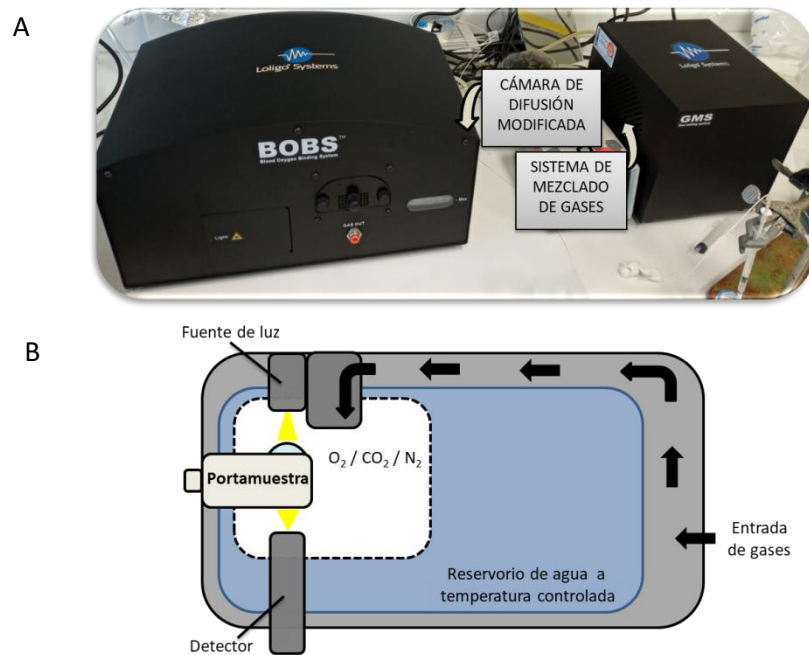


Figura II-5: Equipo empleado para determinar la afinidad de Pch por el O₂. (A) Cámara de difusión modificada y sistema de mezclado de gases asociado. (B) Esquema simplificado en corte sagital de la cámara de difusión modificada, mostrando sus componentes.

II.B.5. DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS ASOCIADOS A Pch

II.B.5.I. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

Se extrajo el contenido total de lípidos de Pch siguiendo el método de Folch (Folch et al. 1957). Para ello 88,5 mg de Pch disueltos en 5 mL de PBS, se mezcló con 20 mL de solución de Folch, Cloroformo:Metanol 2:1 (v/v), en un tubo de vidrio esmerilado. Se agitó por 1 min y se dejó reposar durante 1 h a 4 °C. A continuación, se filtró el contenido a otro tubo esmerilado y añadió un volumen de NaCl 18‰ equivalente al 20% del volumen total. Para lograr una adecuada separación de fases, se lo dejó reposar toda la noche a 4 °C. La fase superior se descartó, y la inferior, que contenía los lípidos, se filtró nuevamente a través de un papel de filtro humedecido en cloroformo. El extracto resultante se secó con N₂ (para impedir la oxidación de los lípidos) y resuspendió en 3 µL de solución de Folch.

II.B.5.II. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y DETECCIÓN POR IONIZACIÓN CON LLAMA

Para la separación y determinación de las distintas clases de lípidos mediante cromatografía en capa fina se emplearon varillas de cuarzo revestido con una capa adsorbente de 75 μm de espesor de partículas de sílica gel como fase estacionaria Chromarod-SIII (Chromatorod-A, Iatron Laboratories, Japón) (Ackman et al. 1990).

Triplicados de 1 μL de extracto lípidico de Pch, se sembraron en varillas cuyo contenido de humedad se estandarizó por incubación previa en una cuba saturada de NaCl durante 5 min. Como estándar externo se empleó una solución de monoacilglicerol (Sigma) 3,33 mg/mL, de la cual se sembraron 0,3 μL en 6 varillas. La identificación se realizó comparando los valores de relación de frente de una mezcla de lípidos estándares (Sigma), corrida en simultáneo.

Como fase móvil se usaron dos sistemas de solventes, empleados sucesivamente:

- Benceno:Cloroformo:Ácido fórmico 70:25:1 (v/v/v) para el desarrollo de los lípidos neutros.
- Cloroformo:Metanol:Agua 70:25:3 (v/v/v) para la separación de lípidos polares.

El desarrollo de ambos sistemas se realizó en una cuba cromatográfica, controlando el avance por capilaridad de la fase móvil sobre las varillas de sílica. Después de cada desarrollo, se detectaron los lípidos quemando las varillas en un equipo IATROSCAN TH-10 con detector de ionización por llama (Iatron Laboratories, Tokio, Japón) (Fig. II-6), acoplado al software Peak-ABC System mediante una placa adquisidora (CT-21, Chromatogram Acquisition) que permitió determinar los componentes lipídicos a modo de picos cromatográficos, cuyas áreas eran proporcionales a la cantidad de lípido presente.

Se realizó una cuantificación de los componentes de la muestra, para esto se obtuvieron las áreas de los picos identificados como ésteres de esterol, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, colesterol o fosfolípidos. Las áreas de monoacilglicerol se promediaron y se obtuvo la relación área de lípido/ área de monoacilglicerol para cada clase de lípido. Estos valores se interpolaron en una curva de calibración previamente construida para cada lípido, cuya recta de regresión seguía la Ec. II-3 (Romero et al. 2018).

$$Y = aX + b$$

Ecuación II- 3

Donde Y= área de Lípido Z / área de monoacilglicerol; y X es la masa del Lípido Z (expresada en μg).

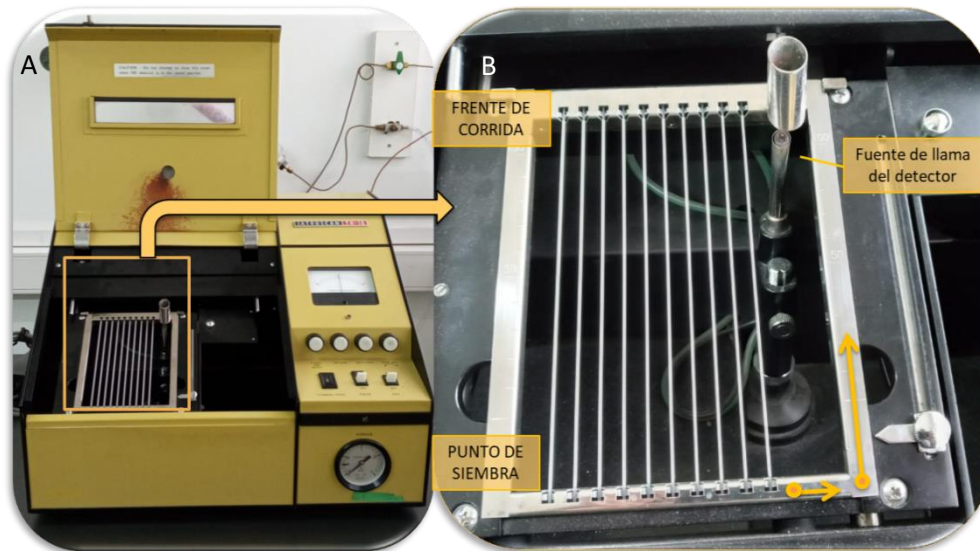


Figura II-6: Equipo empleado para la detección de lípidos asociados a Pch.

(A) Disposición de las varillas, luego del desarrollo cromatográfico, en equipo IATROSCAN TH-10 con detector de ionización por llama. (B) Vista aumentada del recuadro en A, donde se indica la dirección del movimiento de las varillas en su soporte metálico, quemándose desde el frente de corrida hacia el punto de siembra, de manera de adquirir los picos cromatográficos correspondientes a los lípidos separados en orden de polaridad creciente.

II.C. PARTICIPACIÓN DE P_{CH} EN LA INMUNIDAD INNATA

Para evaluar la participación de P_{CH} en el sistema inmune se estudió su actividad fenoloxidasa, su papel como proteína precursora de péptidos antimicrobianos (PAMs) y su capacidad aglutinante. Para esto se siguió el flujo de trabajo esquematizado en la Fig. II-7.

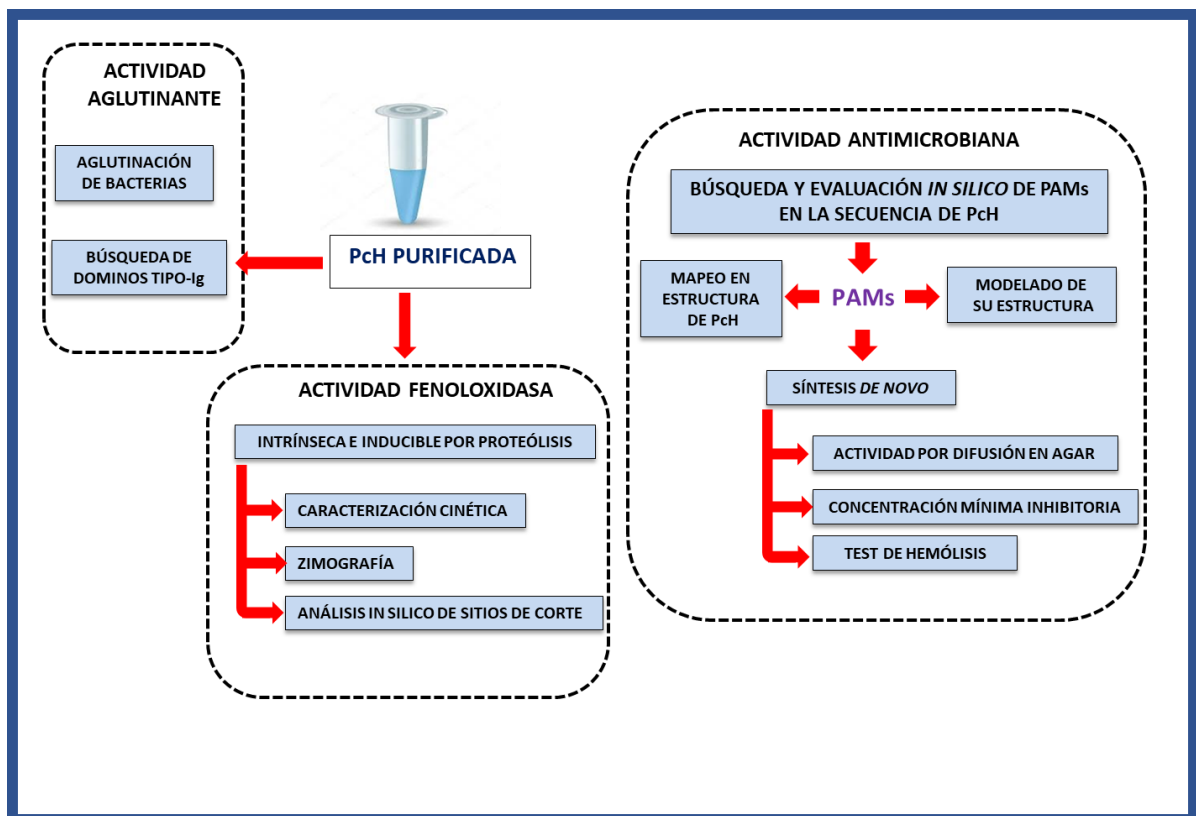


Figura II-7: Diagrama de flujo del algoritmo de trabajo seguido en la sección II.C.

II.C.1. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA

II.C.1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD FENOLOXIDASA INTRÍNSECA

Las medidas de actividad fenoloxidasa se realizaron a una concentración de P_{CH} de 3 mg/mL en buffer fosfato 100 mM, pH=7,5, empleando catecol o dopamina como sustrato. La temperatura se mantuvo en 30 °C empleando un baño de circulación de agua LAUDA. Ambos sustratos se prepararon diariamente y mantuvieron en oscuridad para evitar su autooxidación.

Las reacciones enzimáticas se iniciaron por la adición de catecol o dopamina, y su progreso se monitoreó mediante el aumento de la absorbancia a 420 ó 475 nm, respectivamente, en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible. Las velocidades iniciales se determinaron en la porción cuasi-lineal de las curvas, correspondiente a un

intervalo de tiempo de 0-100 segundos. La autooxidación del sustrato, para cada concentración ensayada, se determinó en ausencia de Pch, sustrayendo luego este valor a las mediciones correspondientes con la proteína. A partir del análisis de los datos se construyeron la curva de Michaelis-Menten (velocidad inicial vs. [S]) y su doble recíproca, ajustada por regresión lineal a una recta de Lineweaver-Burk, según la **Ec. II-4** (Nelson y Cox, 2018).

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad \text{Ecuación II-4}$$

A partir de ella se determinaron los siguientes parámetros cinéticos de la enzima (Nelson y Cox, 2018):

- Velocidad máxima (V_m), entendida como la velocidad inicial a la que se tiende cuando la cinética enzimática alcanza un comportamiento de saturación, de modo que, virtualmente, toda la enzima esté en forma de complejo enzima-sustrato (ES).
- Constante de Michaelis-Menten (K_m), constante de disociación del complejo ES (paso limitante en la cinética de una enzima), empleada como una medida de la afinidad de la enzima por su sustrato. A nivel práctico, se trata de la concentración de sustrato a la cual la velocidad inicial es $\frac{1}{2}$ de la velocidad máxima.
- Número de recambio (k_{cat}), que equivale al número de moles de sustrato convertidos en producto a cargo de 1 mol de enzima cuando ésta se encuentra saturada con su sustrato, permitiendo el análisis independientemente de la concentración de enzima que se emplee.
- Eficiencia catalítica, que considera los dos parámetros precedentes de manera de facilitar la comparación entre enzimas diferentes. Se calcula como k_{cat}/K_m .

Se tuvo en cuenta un coeficiente de absorción molar de $1417 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o-quinona y $3600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para dopacromo (los productos de oxidación del catecol y la dopamina, respectivamente) y un peso molecular de 50 kDa para cada UF de Pch, considerada como la mínima entidad que aloja un sitio activo (Idakieva et al. 2009).

II.C.1.II. INDUCCIÓN DE ACTIVIDAD FENOLOXIDASA POR TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO

Se realizó la proteólisis parcial de Pch con tripsina, quimotripsina y subtilisina, mediante incubación a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por distintos tiempos y relaciones proteasa:Pch. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de PMSF 100 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EEUU) de modo de alcanzar una relación molar proteasa:inhibidor de 1000 a 1.

La actividad enzimática de cada producto de proteólisis fue medida espectrofotométricamente por triplicado, siguiendo la metodología arriba mencionada, y empleando catecol como sustrato. A fin de establecer una comparación

entre los distintos tratamientos, se calculó la actividad específica (AE) para cada caso, entendida según la **Ec. II-6** (Nelson y Cox, 2018).

$$AE = \frac{V_i}{E} \quad \text{Ecuación II-6}$$

Donde V_i es la velocidad inicial expresada en mmoles/s, E es la masa de enzima expresada en mg.

II.C.1.III. ZIMOGRAMA Y ANÁLISIS POR SDS-PAGE

Los productos de digestión del tratamiento proteolítico limitado se analizaron mediante electroforesis en condiciones nativas (PAGE 6%) y disociantes (SDS-PAGE 4-15%). Adicionalmente su actividad fenoloxidasa se analizó mediante zimografía en geles nativos empleando una solución de sustrato como revelador. Para ello, se sembraron 100 μg de PcH (nativa y proteolizada) en un gel 6% nativo, y se lo incubó toda la noche con catecol 125 mM en buffer fosfato 100 mM, pH=7,5. Se inspeccionaron los geles en búsqueda de bandas proteicas de color marrón que daban cuenta de la oxidación del catecol, denotando actividad enzimática.

II.C.1.IV. ANÁLISIS *IN SILICO* DEL CLIVAJE PROTEOLÍTICO DE PcH

El número y ubicación de los sitios de corte para tripsina y quimotripsina en la estructura de PcH fueron determinados *in silico* mediante el software ExPaSy-PeptideCutter, (Gasteiger et al. 2005). Para el caso de la subtilisina este análisis no pudo realizarse dado su amplia especificidad de sustrato y la escasa información estructural disponible (Tang et al. 2019). Se hizo especial énfasis en la búsqueda de estos sitios dentro de los péptidos conectores (o *linkers*) de unidades funcionales. Estos péptidos fueron identificados empleando la herramienta *Conserved Domain Database* (CDD).

II.C.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

II.C.2.I PREDICCIÓN *IN SILICO* Y SÍNTESIS

Para predecir las secuencias de potenciales PAMs, la secuencia aminoacídica completa de PcH se exploró mediante el servidor Antimicrobial-Peptides (AntiBP) (Lata et al., 2007).

Los candidatos con mejor puntaje fueron analizados empleando el servidor Antimicrobial Peptide Database-3 (APD-3) (Wang et al., 2016). Éste permitió evaluar las propiedades esperadas para cada secuencia peptídica, incluyendo su carga neta, estructura anfipática, Índice de hidropatía, Índice de Boman, y posibilidad de formar

estructuras coincidentes con las conocidas para PAMs (α -hélice lineal, hojas β -plegadas y/o α -hélices con puentes disulfuro, o estructura con repeticiones del mismo aminoácido).

En base a estos análisis, se seleccionaron las secuencias con más probabilidad de presentar actividad antimicrobiana y se sintetizaron *de novo* en un sistema de fase sólida (Pepmic Co., Suzhou, China). Los péptidos desalados fueron disueltos en buffer fosfato pH=7,4 a una concentración final de 38-50 mM según la solubilidad del péptido, para su posterior caracterización funcional.

II.C.2.II. MODELADO *AB INITIO* Y MAPEO EN LA ESTRUCTURA DE Pch

El servidor PEP-FOLD se empleó para modelar tridimensionalmente la secuencia de los PAMs predichos (Shen et al., 2014) y la estructura tridimensional obtenida fue analizada empleando UCSF Chimera (Petersen et al., 2004).

Las secuencias de PAMs fueron localizadas en la estructura de Pch resuelta por criomicroscopía electrónica (subsección II.B2.II.), a fin de recabar información sobre su accesibilidad para ser liberados ante un ataque proteolítico.

II.C.2.III. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSIÓN EN AGAR

La actividad antimicrobiana de Pch y de los PAMs potencialmente derivados de ella se evaluó en medio sólido frente a *Escherichia coli* (BL-21) y *Staphylococcus pseudintermedius*, bacterias Gram negativa y Gram positiva, respectivamente.

Se preparó un cultivo de cada microorganismo en un tubo de 50 mL con 10 mL de medio Luria Bertani (LB) y aproximadamente 10 μ L del stock de bacterias correspondiente, dejándolo en agitación a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, los cultivos bacterianos llegaron a fase *lag*. A partir de esa mayor biomasa, se tomaron alícuotas para preparar diluciones 1/5 en medio LB y volver a incubar por 1 h, de modo que el cultivo vuelva a fase exponencial de crecimiento.

A continuación, se esparcieron 50 μ L de cada subcultivo sobre placas con agar LB, dejándose secar invertido durante 20 min a 37 °C. Luego, se aplicaron los tratamientos en forma de gotas de 5 μ L, correspondientes a cada uno de los PAMs ensayados, diferentes preparaciones de Pch (nativa y proteolizada), buffer fosfato 10 mM pH=7,4 (como control negativo), y una dilución de Penicilina-Estreptomicina 1/10 (a modo de control positivo).

Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 h y luego se inspeccionaron en busca de halos de inhibición de crecimiento.

II.C.2.IV. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Los ensayos en medio líquido permitieron determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada PAM sintetizado, definida ésta como la concentración más baja de PAM que produce inhibición del crecimiento bacteriano.

Para ello se expandieron cultivos de las mismas especies bacterianas antes mencionadas, siguiendo el mismo procedimiento de la sección anterior. El inóculo final sobre el que se ensayó la CIM, se preparó realizando diluciones hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,02 a 620 nm.

En el ensayo se evaluó una serie de diluciones seriadas 1/2 en medio LB para cada agente antimicrobiano. Para ello se prepararon 10 tubos de 1,5 mL, de modo que la dilución inicial de PAM fuera 1/4 y el volumen final de incubación en cada tubo fuera de 50 μ L (en cada uno se emplearon 25 μ L de inóculo bacteriano).

A modo de control negativo se preparó un tubo con LB en lugar de PAM, mientras que otro con Penicilina-Estreptomicina se utilizó como control positivo.

Todas las preparaciones se incubaron a 37 °C durante 16 h, al cabo de las cuales se añadieron 50 μ L de LB por tubo para compensar cualquier posible evaporación de líquido ocurrido durante la incubación, y se midió crecimiento bacteriano determinando DO a 620 nm en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible. Alternativamente, para el caso de los PAMs menos solubles que generaban excesiva dispersión de luz, la CIM se infirió comparando el patrón obtenido en gráficos de *FSC* vs *SSC* (véase fundamento en sección II.D.6.II.) por citometría de flujo en un equipo Accuri C6 Plus (BD Biosciences) para las concentraciones de PAMs con los controles positivo y negativo.

II.C.2.V. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Para comenzar a analizar la bioseguridad de los PAMs sintetizados como potenciales agentes terapéuticos, se estudió su capacidad de producir hemólisis sobre eritrocitos humanos.

Sangre de un donante saludable se obtuvo por punción venosa y se recibió en una solución de Elsever estéril (Glucosa 100 mM, Citrato de Sodio 30 mM y NaCl 20 mM, pH=7,2). La muestra se conservó a 4 °C hasta su uso dentro de las 24 h de extracción. Entonces, los eritrocitos se centrifugaron a 500 xg por 10 min en centrifuga Eppendorf 524 R y lavaron con PBS, repitiendo varias veces el procedimiento hasta observar un sobrenadante límpido. El paquete globular resultante del último lavado se resuspendió en PBS y diluyó hasta obtener una suspensión de eritrocitos 1%.

Luego, utilizando tubos de 0,5 mL, se incubaron 98 μ L de la suspensión mencionada con 2 μ L de cada PAM, incubando durante 2 h a 37°C; un control negativo se preparó empleando 2 μ L de buffer fosfato 10 mM pH=7,4. Lo propio también se ensayó para Pch, a fin de corroborar su inocuidad frente a eritrocitos humanos.

Los eritrocitos intactos en cada tubo se precipitaron por centrifugación a 500 xg durante 10 min. El sobrenadante resultante se centrifugó a 10.000 xg por 10 min en el mismo equipo, para evitar que proteína desnaturalizada de la muestra interfiera con las mediciones. La presencia de hemólisis se infirió empleando este último

sobrenadante para determinar absorbancia a 412 y 500 nm (correspondientes al espectro de absorción de la hemoglobina) en un espectrofotómetro Agilent 8453 UV/Visible.

III.C.3. ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE PcH

II.C.3.I. ENSAYOS DE AGLUTINACIÓN DE BACTERIAS

La capacidad aglutinante de PcH nativa se ensayó para las cepas bacterianas antes mencionadas. Para ello, 40 μ L de *E. coli* y *S. pseudintermedius* diluidas en PBS ($DO_{600nm}=1,2$) se incubaron con 10 μ L de diluciones seriadas de PcH en placa de 96 pocillos, con fondo redondeado (Greiner, Bio-one). Como control negativo se empleó buffer Tris 20 mM, $CaCl_2$ 20 mM y $MgCl_2$ 20 mM, pH 7,4. Luego de incubar toda la noche a temperatura ambiente, las placas se examinaron macroscópicamente inclinándolas a 45° respecto al plano horizontal en búsqueda del no corrimiento del botón de microorganismos; siendo este último indicativo de aglutinación. El contenido de cada pocillo también fue observado bajo microscopio óptico (Biotraza XSP-167SP, China) con el fin de confirmar la observación anterior.

II.C.3.II. BÚSQUEDA DE DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA EN PcH

Las secuencias aminoacídicas deducidas de PcH fueron examinadas en busca de dominios tipo-Ig empleando el servidor InterPro. A continuación, los dominios encontrados se mapearon en el modelo de PcH por *CryoEM* empleando Chimera X y se realizó un alineamiento múltiple mediante MUSCLE de las UFs que los contenían para cada isoforma.

II.D. POTENCIAL INMUNOESTIMULANTE DE PCH

Las propiedades inmunogénicas de Pch se estudiaron siguiendo el flujo de trabajo diagramado en la **Fig. II-8**.

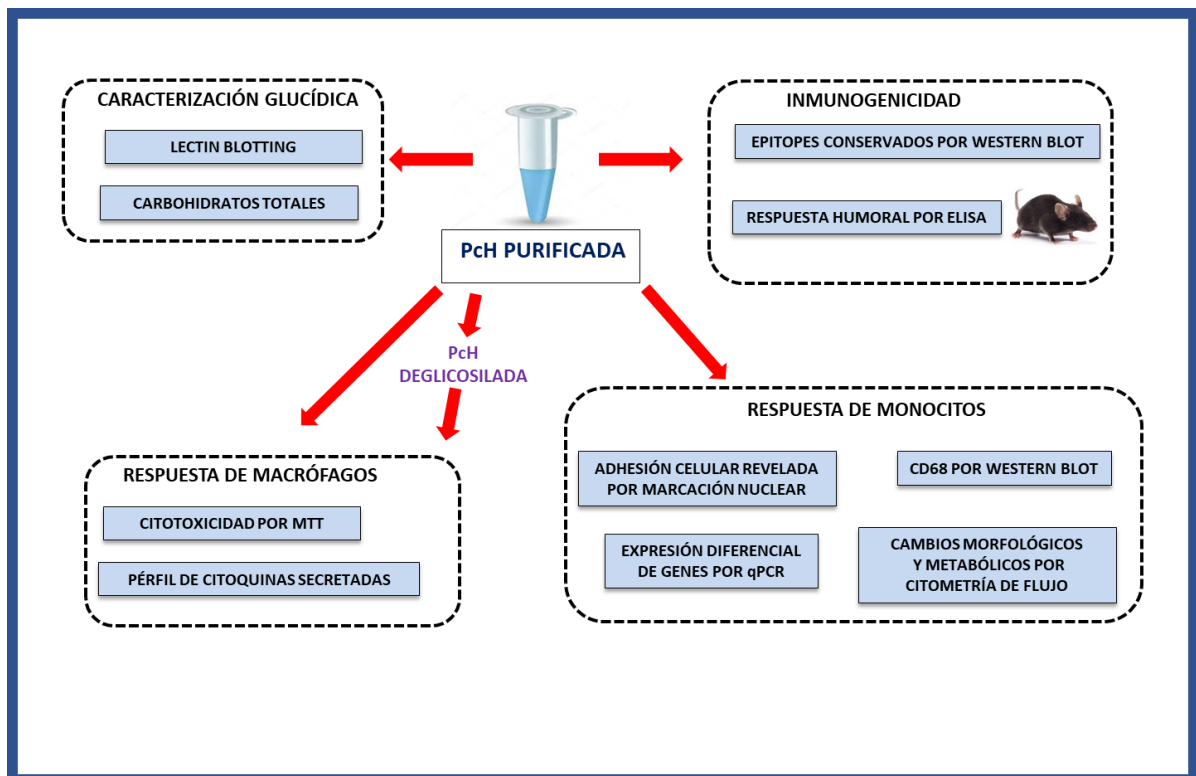


Figura II-8: Diagrama de flujo del algoritmo de trabajo seguido en la sección II.D.

II.D.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Todas las muestras empleadas para ensayos con cultivos celulares o animales de laboratorio fueron disueltas en PBS y esterilizadas por filtración a 0,22 μm . La KLH liofilizada (Sigma Chemical) se reconstituyó según las instrucciones del fabricante. El contenido de LPS de las muestras ensayadas fue determinado espectrofotométricamente según el método de Karkhanis et al. (Karkhanis et al. 1978).

La deglicosilación de Pch se realizó por métodos químicos y enzimáticos. En el primer caso se realizó una incubación con NaIO_4 15 mM en PBS pH=7,2 (Jiménez et al. 2019). La deglicosilación enzimática se realizó empleando PNGasa F 500 U/mL (New England Biolabs, MA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de deglicosilar, la muestra de Pch se lavó con PBS y concentró a 1mg/mL empleando dispositivos Amicon Ultra-15 de peso de corte 50 kDa (Millipore), la remoción de los glicanos se comprobó por PAGE nativa 5-12%.

II.D.2. CULTIVO DE MONOCITOS

Los experimentos se realizaron trabajando con monocitos THP-1 (obtenida de ECACC, Salisbury, Reino Unido) que provienen de una línea celular inmortalizada derivada de leucemia monocítica aguda humana (Baxter et al. 2020).

El medio de cultivo empleado fue RPMI 1640 (Serendipia Lab, Buenos Aires, Argentina) 1,04% (p/v), suplementado con HEPES 0,48% (p/v), NaHCO₃ 0,2% (p/v), Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B 1/10 y suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) (Natocor, Córdoba, Argentina).

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%, se procuró que la densidad celular no supere 1x10⁶ células/mL recambiando el medio de cultivo cada 3 a 4 días.

Los monocitos THP-1 presentan forma esférica y proliferan a modo de racimos en suspensión, debiéndose disgregar mecánicamente por pipeteo antes de realizar el recuento previo a cualquier ensayo. Con el fin de diferenciarlos a macrófagos se utilizó forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). La presencia de PMA en el medio de cultivo da como resultado que las células THP-1 se adhieran al plástico de la placa de cultivo adoptando una morfología estrellada. Allí se mantienen, sin proliferar, en un medio de composición similar al anterior: RPMI suplementado con 0,5% SFB (v/v). Estas células expresan marcadores de diferenciación a macrófagos y pueden liberar citoquinas y fagocitar en mayor medida que las células no tratadas (Baxter et al. 2020).

Para todos los ensayos, los recuentos se realizaron en cámara de Neubauer, contando como células viables aquéllas de aspecto birrefringente que excluían activamente el colorante Azul Tripán. Se promedió el número de células contado para cada cuadrante de la cámara, y se calculó la densidad celular (células/mL) de acuerdo con la **Ec. II-6** (Freshney, 2000).

$$\text{Densidad celular} = \text{Promedio} \times \text{Factor de Dil.} \times 10000 \quad \text{Ecuación II-6}$$

Previo a cada ensayo, el volumen de cultivo conteniendo la cantidad de células deseadas se trasvasó a un tubo cónico y centrifugó a 500 xg durante 10 min para precipitar las células que luego se resuspendieron en el volumen de medio RPMI 0,5% SFB (v/v) necesario para llevar a la densidad de siembra deseada.

II.D.3. CONTROL DE CITOTOXICIDAD

Monocitos THP-1 se sembraron a una densidad celular de 1x10⁶ células/mL (0,5x10⁶ células/pocillo) en placa de 24 pocillos y se diferenciaron a macrófagos por incubación con PMA 5 ng/mL en RPMI 0,5% SFB (v/v), durante 48 h. A continuación, el medio conteniendo PMA se removió, lavó dos veces con PBS e incubó en medio fresco por 24 h.

Para evaluar el efecto de los tratamientos empleados sobre la viabilidad celular, los cultivos se expusieron durante 3 h a PcH (1 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,01 mg/mL), LPS (50 ng/mL) y PBS. Luego se lavaron con PBS y se incubaron con bromuro de 3-(3,4 -

dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolio (MTT) 0,5 mg/mL en PBS. Se controló bajo microscopio óptico la formación de cristales de formazán, producto de la reducción del MTT por las enzimas mitocondriales de las células metabólicamente activas. Seguidamente, se removió el sobrenadante y se disgregaron las células de cada pocillo administrando dimetilsulfóxido (DMSO), lo que permitió solubilizar los cristales generados y cuantificarlos espectrofotométricamente a 560 nm en lector de placa (DTX 880, Beckman Coulter, CA, EEUU).

II.D.4. ANÁLISIS DE CITOQUINAS SECRETADAS

Macrófagos diferenciados en las condiciones arriba mencionadas, se expusieron durante 3 h a una serie de concentraciones de PcH (1 mg/mL, 0,1 mg/mL y 0,01 mg/mL), lipopolisacárido (LPS) 50 ng/mL y PBS como controles positivo y negativo, respectivamente. En otro ensayo similar, se evaluó el efecto del tratamiento con PcH 1mg/mL deglicosilada químicamente con NaIO₄ y enzimáticamente con PNGasa F, siguiendo las condiciones empleadas en bibliografía para otras hemocianinas (Arancibia et al. 2012; Salazar et al. 2019).

Los niveles de las citoquinas TNF- α e IL-1 β fueron medidos en el sobrenadante de los cultivos mediante un ELISA de tipo sandwich, utilizando el kit de Becton Dickinson, Argentina. Se trata de ensayos en fase sólida, donde se emplean placas de 96 pocillos sobre los cuáles se forma, en una serie de pasos, un complejo anticuerpo-citoquina-anticuerpo conjugado a biotina, que permite el revelado por adición de estreptavidina unida a peroxidasa y de un sustrato, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que genera color cuando se oxida en presencia de H₂O₂. La lectura espectrofotométrica a 450 nm se realizó en lector de placas DTX 880.

II.D.5. CARACTERÍSTICAS DE PcH ASOCIADAS A SU INMUNOGENICIDAD

II.D.5.I. ESTUDIO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS ASOCIADOS

El contenido total de carbohidratos de PcH fue determinado espectrofotométricamente por el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois y col 1956). Luego, en ensayos de *Lectin blotting*, se emplearon las siguientes lectinas biotiniladas para estudiar su patrón de glicosilación: PVL, BSL-1, JAC, SBA, ConA, WGA, DBA, UEA-1, PNA, RCA-I, ECL, PSA y LCA (Vector Labs, Burlingame, CA, EEUU).

En el ensayo, gotas conteniendo 5 μ g de PcH fueron dispensadas sobre uno de los extremos de tiras de nitrocelulosa (Hybond, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) e incubados por 1,5 h a 37 °C en atmósfera húmeda. Luego, se lavó con PBS-Tween 0,1% y bloqueó con albúmina sérica bovina 3% (v/v) en PBS, durante toda la noche a 4 °C. Seguidamente, cada tira fue incubada 1,5 h a 37 °C con una lectina diferente a concentraciones limitantes, de manera de evitar interacciones no específicas. La incubación se realizó en buffer fosfato 10 mM, NaCl 0,15 M, azida sódica 0,08% (p/v), pH=7,8 para RCA-I y en HEPES 10 mM, Ca⁺² 0,1 mM, pH=8,4 para las restantes lectinas. Tras cinco lavados con PBS-Tween 0,1%, las tiras se revelaron añadiendo

estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (Vector Labs) y visualizadas por quimioluminiscencia empleando luminol y H_2O_2 como sustratos, según los principios explicados en la subsección siguiente.

II.D.5.II. INMUNOREACTIVIDAD CRUZADA CON OTRAS HEMOCIANINAS

Para analizar la presencia de epitopes compartidos con otras hemocianinas de gasterópodos se realizó un ensayo de *Western blot*. En éste, Pch fue sembrada junto con las hemocianinas de *Concholepas concholepas* (CCH) y de *Fisurella latimarginata* (FLH) en un gel *SDS-PAGE* 4-15%. Luego, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, en una cuba Mini Transblot Cell (Bio Rad Laboratories Inc., CA, EEUU) por 1 h a 100 V, usando buffer Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20% (v/v), pH=8,3.

A continuación, la membrana fue bloqueada durante 1 h con leche descremada 5% (p/v) en PBS-Tween 0,1%, e incubada toda la noche a 4 °C con un suero policlonal de conejo anti-Pch diluido 1/6000 en una solución de leche descremada 1% (p/v) en PBS-Tween 0,1%.

Luego de lavar con PBS-Tween 0,1%, la membrana fue incubada con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo, conjugado a peroxidasa de rábano (BioRad Laboratories, Inc.) diluido 1/6000. La inmunoreactividad fue visualizada por quimioluminiscencia en un sistema de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EEUU), mediante incubación de la membrana con una solución de H_2O_2 4,4% (v/v) en presencia de Luminol 0,044% (p/v) y Cumárico 0,0066% (p/v) en Tris 0,09 M, pH=8,5. El procesamiento y análisis se realizó mediante el software ImageJ (NIH).

II.D.6. EFECTO DE Pch SOBRE LA DIFERENCIACION DE MONOCITOS

II.D.6.I. ADHESIÓN CELULAR

Para evaluar el efecto de Pch sobre la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos, en particular sobre la adhesión celular, se sembraron en placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/mL (1×10^5 células/pocillo) e incubaron durante 24 h con 1 mg/mL de Pch. Como control positivo y negativo del ensayo se utilizó una solución 5 ng/mL de PMA y PBS respectivamente. El sobrenadante, conteniendo las células en suspensión, se tomó en tubos de microcentrifuga, dejando las células adheridas en los pocillos originales.

Los tubos con sobrenadante se centrifugaron a 500 xg, lavaron con PBS y centrifugaron nuevamente, conservando el pellet celular que se incubó a -80 °C durante 30 min. Se resuspendió en 100 µL de agua destilada y congeló nuevamente a -80 °C durante 1 h. A continuación, se dejó llegar los tubos a temperatura ambiente y añadió a cada uno 100 µL de Hoescht-33258 0,02 mg/mL en buffer TNE (NaCl 2M, EDTA 1mM, Tris-HCl 10mM, pH=7,4), incubando a 37 °C en oscuridad durante 15 min y

trasladando el contenido de los tubos a pocillos vacíos de la placa empleada. Un procedimiento similar se siguió con las células adheridas pero sin removerlas de sus pocillos.

El fluoróforo Hoescht-33258 es un agente intercalante, que al interactuar con el ADN aumenta significativamente su rendimiento cuántico de fluorescencia respecto al compuesto no unido, permitiendo obtener una medida representativa de la cantidad de células en cada fracción (Cyboran-Mikołajczyk et al., 2019). Las mediciones se realizaron en lector de placas DTX 880 empleando filtros cercanos a excitación de 358 nm y emisión de 460 nm.

Adicionalmente, imágenes de cada fracción para los distintos tratamientos fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX-71, Tokio, Japón).

La sensibilidad y linealidad de la emisión del Hoescht-33258 respecto al número de células fueron evaluadas a través de una curva de calibración del fluoróforo.

II.D.6.II. MORFOLOGÍA Y METABOLISMO

Monocitos THP-1 fueron sembrados a una densidad de 1×10^6 células/mL en placas de 12 pocillos e incubados con Pch 1 mg/mL, PMA 5 ng/mL como control positivo, y PBS como control negativo.

Al cabo de 72 h se tomó el sobrenadante que contenía las células en suspensión, mientras que aquellas células que lograron adherirse a la superficie de la placa, fueron levantadas mecánicamente empleando *scraper* y resuspendidas en RPMI 0,5% SFB.

Las características morfológicas de ambas poblaciones celulares fueron analizadas para cada tratamiento mediante citometría de flujo en un equipo Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Las subpoblaciones observables fueron delimitadas por regiones en gráficos de *FSC* (*forward scatter* o dispersión hacia adelante) vs. *SSC* (*side scatter* o dispersión hacia los laterales). El parámetro *FSC* da cuenta de la luz LASER dispersada a 180° por las células que cruzan el punto de interrogación del citómetro, informando sobre el tamaño de ellas; el parámetro *SSC* informa sobre la complejidad intracelular de los eventos, en base a la dispersión a 90° de la luz LASER incidente (Cossarizza et al. 2019; Daigneault 2010).

El efecto sobre la diferenciación monocito-macrófago se continuó explorando en un ensayo similar, a una densidad de 0.5×10^6 células/mL (0.5×10^6 células/pocillo) en placas de 12 pocillos y empleando los mismos tratamientos arriba mencionados. Previamente a ser levantadas de la placa, las células fueron incubadas durante 15 min a 37°C con MitoTracker DeepRed 1nM (Invitrogen, Waltham, MA, EEUU), una sonda sensible al potencial transmembrana mitocondrial, disuelta en RPMI sin rojo fenol ni SFB. Para su excitación se empleó un LASER rojo (640 nm) y se detectó su emisión de fluorescencia en el canal APC FL-4 (BP 675/25) del mismo citómetro. El control de autofluorescencia consistió en células sin incubar con la sonda, cuyo valor se sustrajo al valor de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) registrado para cada tratamiento.

En cada ensayo se adquirieron un total de 50.000 eventos por muestra, trabajando con un valor umbral de 2.000.000. Los gráficos de densidad para estos análisis se realizaron empleando el software FlowJow v.10.

II.D.6.III. ESTUDIO DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

II.D.6.III.i. EXPRESIÓN DE CD68 POR WESTERN BLOT

La expresión del marcador CD68, correspondiente a una activación de tipo panmacrófago, fue evaluada en células sometidas a tratamientos con 1 mg/mL de Pch, PMA 0,5 ng/mL y PBS. Las células se sembraron en placas de 12 pocillos, a una densidad de 1×10^6 células/mL (1×10^6 células/pocillo) y luego de 72 h de incubación, las células adheridas se removieron mecánicamente mediante *scrappers*, tomándose todo el contenido del pocillo. Se centrifugaron a 500 *xg* por 10 min, se lavaron con PBS y resuspendieron en 40 μ L de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; detergente NP-40 1 %). Tras una incubación en hielo durante 30 min, se centrifugó a 13.000 *xg* por 10 min, conservándose el sobrenadante enriquecido con las proteínas de la muestra para cada tratamiento, cuya concentración se determinó por el método de Bradford (Bradford 1976).

A continuación se realizó *Western blot*, sembrándose 5 μ g de la proteína total obtenida para cada tratamiento en *SDS-PAGE* 4-12%, y transfiriéndose a una membrana de nitrocelulosa de igual manera a lo descrito en la sección II.D.3.II. La membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada 5% (v/v) en PBS-Tween 0,05% (v/v) durante 1 h e incubada toda la noche a 4 °C, con un anticuerpo monoclonal murino anti-CD68 (Anti-CD68 Antibody [KP1], A250757) diluido 1/10.000 en leche descremada 1% (v/v) en PBS-Tween 0,05% (v/v). Luego, se lavó la membrana con PBS-Tween e incubó con un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón, conjugado a peroxidasa de rábano (BioRad Laboratories Inc.), diluido 1/20.000 en la misma solución que el anticuerpo primario. Las bandas se revelaron por quimioluminiscencia, y analizaron por densitometría empleando ImageJ.

II.D.6.III.ii. EXPRESIÓN DE MARCADORES PARA SUBTIPOS DE MACRÓFAGOS POR qPCR

II.D.6.III.ii.a. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc

Monocitos THP-1 fueron sembrados a una densidad de $2,5 \times 10^6$ células/mL en placas individuales de 60 mm de diámetro ($2,5 \times 10^6$ células/placa) en RPMI 0,5% SFB y tratados con Pch 1 mg/mL, PMA 0,5 ng/mL y PBS. Se prepararon incubaciones de 72 y 36 h para cada tratamiento.

Finalizada la incubación, se extrajo ARN total de cada placa empleando 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Se centrifugó cada muestra en TRIzol durante 10 min a 12000 *xg*, a 4 °C; el sobrenadante se incubó 5 min a temperatura ambiente para permitir la total disociación de los complejos nucleoproteicos. Luego, se añadieron 200 μ L de cloroformo y agitó vigorosamente durante 15 s, seguido de una incubación a temperatura ambiente por 5 min. Se realizó una nueva centrifugación a 12000 *xg* durante 15 min a 4 °C para la separación de fases: una roja inferior (fenol-clorofórmica) enriquecida en ADN, una intermedia delgada con ADN y nucleoproteínas, y una incolora superior mayoritaria (acuosa) que contenía el ARN extraído de las células.

La fase acuosa fue trasvasada y diluida 1/2 con isopropanol e incubada a 4 °C durante toda la noche, a fin de precipitar el ARN. Después se centrifugó la muestra a 12.000 *xg* durante 10 min a 4 °C y descartó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1mL de etanol 75%, centrifugando a 7.500 *xg* por 5 min a 4 °C; este paso se repitió una vez más, y el precipitado se secó a 37 °C por 5-10 min. El ARN obtenido se resuspendió en agua libre de ARNasas. La calidad y concentración de ARN de cada muestra se determinó espectrofotométricamente en un Nanodrop 2000/2000c (Thermo Scientific, MA, EEUU) registrando las razones de absorbancia a 260/230 nm, que informa sobre la presencia de solventes orgánicos y 260/280 nm, que informa sobre la presencia de proteínas. Después, se sintetizó ADNc empleando kit de retrotranscriptasa (iScript, BioRad) a partir de 1 µg de ARN para cada muestra, en termociclador Veriti (Applied Biosystems) según se indica en la **Tabla II-3**.

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Hibridación de oligodT y primers al azar	5	25
Transcripción reversa (síntesis de ADNc)	20	46
Inactivación de Retrotranscriptasa	1	95

Tabla II-3: Programa térmico empleado para la síntesis de ADNc.

II.D.6.III.ii.b. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL

El ADNc de la muestra para cada marcador fue cuantificado mediante qPCR, comparando su expresión relativa a un gen reportero, con respecto a una curva de calibración construida para cada uno de los genes estudiados. Los marcadores y la secuencia de los cebadores empleados para cada uno se indican en la **Tabla II-4**.

Tipo de Macrófago	Marcador	Cebador hacia adelante (5'-3')	Cebador reverso (5'-3')
Panmacrófago	CD68	CGAGCATCATTCTTTCACCAGCT	ATGAGAGGCAGCAAGATGGACC
	CD11b	GGAACGCCATTGTCTGCTTTTCG	ATGCTGAGGTCATCCTGGCAGA
M1	CD86	CCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCC	GCTGTAATCCAAGGAATGTGGTC
	CD80	CTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTT	GCCAGTAGATGCGAGTTTGTGC
	iNOS	GCTCTACACCTCCAATGTGACC	CTGCCGAGATTTGAGCCTCATG
M2	CD163	CCAGAAGGAACCTGTAGCCACAG	CAGGCACCAAGCGTTTTGAGCT
	CD206	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	CAAAACGCTCGCGCATTGTCCA
Gen Reportero	GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

Tabla II-4: Marcadores para expresión génica diferencial. Se detalla su especificidad y secuencias.

Cada tubo de reacción contuvo 2,5 µL de ADNc (concentración final 6,25 ng/µL), 1 µL de solución de pares de cebadores (concentración final 1 µM), 1,5 µL de agua DPEC 0,1% (v/v) y 5 µL de mezcla de reacción (Bio-Rad), que incluye ADN polimerasa Taq y sonda fluorescente SYBRGREEN, que se intercala en la doble hebra de ADN y posee un pico de emisión a 522 nm, así como sonda ROX para normalización de volúmenes.

Se utilizaron placas de 96 pocillos, y empleó un termociclador AriaMix (Agilent, EEUU) siguiendo el programa térmico de la **Tabla II-5**.

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)
Activación de ADN polimerasa	30	9
Amplificación (x40)	5	95
	30	60
Ruptura de doble hélices de ADN molde	5	95
Hibridación de cebadores y síntesis de nuevas cadenas	30	60
Construcción de curvas de fusión para revelar la presencia de dímero de cebadores	30	95
	30	95
	30	65

Tabla II-5: Programa térmico empleado para el ensayo de expresión génica diferencial por qPCR. x40: el ciclo se repite 40 veces para la etapa de Amplificación.

Como gen reportero se empleó GAPDH y, a modo de control negativo de las reacciones, se prepararon y corrieron muestras sin ADN molde. Las curvas de calibración se elaboraron empleando diluciones seriadas 1/3 a partir de un pool de todas las muestras de ADNc.

El análisis de los resultados se hizo siguiendo la **Ec. II-7** (Pfaffl, 2001).

$$\text{Razón} = \frac{(E_{\text{BLANCO}})^{\Delta Cq_{\text{BLANCO (CALIBRADOR-MUESTRA)}}}}{(E_{\text{REFERENCIA}})^{\Delta Cq_{\text{REFERENCIA (CALIBRADOR-MUESTRA)}}}} \quad \text{Ecuación II-7}$$

Donde E es la Eficiencia de la qPCR para cada gen, calculada en sus respectivas curvas de calibración como $10^{(1-\text{PENDIENTE DE LA RECTA DE REGRESIÓN})-1}$; Cq es el número de ciclo a partir del cual la señal de fluorescencia emitida por la sonda supera un valor de emisión umbral (Cq es menor a mayores niveles de expresión); genes blanco son todos aquéllos (marcadores) cuya expresión se busca medir; genes de referencia son los genes reporteros (GAPDH en este caso); y calibrador es la muestra empleada como control negativo del experimento, en este caso los tratamientos de las células con PBS.

II.D.7. EFECTO DE P_{CH} SOBRE LA IMUNIDAD HUMORAL

II.D.7.I. ANIMALES DE LABORATORIO

Ratones C57BL/6JLAE hembra de seis semanas de edad, *Mus musculus* Linnaeus, 1758, se obtuvieron del Laboratorio de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP, Argentina), mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP, Argentina) a 22 °C con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h y alimentaron *ad libitum* con comida y agua estéril.

Los estudios fueron realizados de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio ([Consejo Nacional de Investigaciones, 2011](#)) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP (P02-01-2024).

II.D.7.II. BIOENSAYO Y DETERMINACIÓN DE IgG EN SUERO

Para evaluar la inmunogenicidad de P_{CH} *in vivo*, grupos de 3 ratones fueron inoculados intraperitonealmente con 100 µL de P_{CH}, KLH (ambas a una concentración de 2mg/mL) y PBS como control negativo.

Luego de 15 días, la inmunización se repitió, y al cabo de 10 días, los ratones fueron eutanasiados por dislocación cervical y sangrados por punción cardíaca.

El suero obtenido por el procesamiento de las muestras de sangre fue empleado para determinar el nivel de IgG generado por ELISA indirecto. Brevemente, placas de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp, Thermo Scientific, MA, EEUU) fueron sensibilizadas con P_{CH} o KLH 25 µg/mL en buffer carbonato pH=9.6; bloqueadas con leche descremada 3% (p/v) en PBS e incubadas con diluciones seriadas 1:2 de los sueros en leche descremada 1% (p/v) en PBS. El revelado se realizó empleando anticuerpos anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (dilución 1/10.000) en presencia de o-fenilenediamina dihidrocloruro (OPD) y H₂O₂, generándose un producto coloreado que se detectó a 492 nm en lector de placas (Varioskan LUX, Thermo Fisher, MA, EEUU).

Para el análisis de los datos, los valores de dilución del suero (X) se transformaron aplicando $-\log(X)$, y se consideró como título de IgG de cada suero al inverso de la dilución inmediatamente anterior a aquella en el que la curva de titulación se volvía asintótica.

II.E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos del presente trabajo de tesis fueron analizados usando el programa GraphPad Prism v6. Se realizaron pruebas de homocedasticidad mediante tests de Brown-Forsythe y de Bartlett, así como de normalidad mediante tests de D'Agostino-Pearson (K^2), Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias significativas se analizaron por T de Student o ANOVA de una vía y posterior test de Tukey, excepto en los casos especificados donde se realizaron tests no paramétricos. El número de réplicas para cada ensayo se detalla en las leyendas de los gráficos de sus resultados.

CAPÍTULO III:

CARACTERIZACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata*

III.A. INTRODUCCIÓN

Las hemocianinas son cuproproteínas hemolinfáticas multifuncionales de moluscos y artrópodos (Coates y Nairn, 2014). La estructura de las hemocianinas de moluscos puede dividirse para su estudio en distintos niveles, en el más simple de los cuales puede observarse un dominio α -helicoidal y otro de hoja β -plegada (a los que puede añadirse un tercero de tipo cupredoxina), que componen la llamada unidad funcional (UF). Repeticiones en tándem de 7 o más de éstas conforman las subunidades protoméricas, las cuales se asocian entre sí en decámeros y/o di-decámeros, verdaderos oligómeros funcionales, que a su vez pueden interactuar con otros de su tipo generando estructuras proteicas de colosal tamaño (Markl 2013).

Una serie de clases estructurales han sido descritas para las hemocianinas de moluscos, siendo la mayoría de las presentes en gasterópodos agrupadas en la categoría de tipo KLH, por contener 8 UFs (A-H). En su estructura decamérica, las primeras seis (A-F) constituyen la pared de un cilindro hueco con las UFs G y H protruyendo hacia el interior de éste, a modo de collar interno, hacia uno de sus extremos (Harris et al. 2004; Kato et al. 2017).

Hasta la fecha se cuenta con escasos modelos tridimensionales para hemocianinas de gasterópodos, todos ellos obtenidos por criomicroscopía electrónica (CryoEM). Éstos son: una estructura resuelta de 9 Å para KLH de *Megathura crenulata* (Gatsogiannis y Markl, 2009), un modelo de 4,5 Å para la hemocianina de *Haliotis diversicolor* (Zhang et al. 2013), 2 estructuras de 9-13 Å para las mega-hemocianinas de *Terebralia palustris* y *Melanoides tuberculata* (Gatsogiannis et al. 2015) y otra de 7.0 Å para la hemocianina de *Crepidula fornicata* (Pasqualetto et al. 2023). La mejor resolución alcanzada para una hemocianina de molusco (3,0 Å) se observa en el caso de una estructura cristalográfica de la hemocianina del calamar *Todarodes pacificus* (Gai et al. 2015). En tanto, sólo se han resuelto estructuras por cristalografía para algunas UFs de hemocianinas de gasterópodos (Perbandt et al. 2003; Jaenicke et al. 2010).

A pesar de la importancia económica, sanitaria y ambiental de *P. canaliculata*, poco se conoce sobre su hemocianina, proteína mayoritaria de la hemolinfa, tanto a nivel estructural como funcional. Si bien, tiempo atrás, fue objeto de estudios sobre su forma global y afinidad por el O₂ (Barros y col 1993) y se reportó la ausencia de lípidos asociados (Garín y Pollero, 1995), tales análisis no fueron profundizados posteriormente. Más recientemente, nuestro grupo colaboró en la elaboración de la base de datos *AmpuBase*, y en la secuenciación del genoma completo de *P. canaliculata* (Ip et al. 2018; Sun et al. 2019), sentando así bases sólidas para profundizar los estudios sobre esta hemocianina.

El objetivo de este capítulo es indagar en las características estructurales y funcionales de PcH, haciendo énfasis en la dilucidación de su estructura tridimensional, estabilidad y presencia de isoformas; así como estudiar su afinidad por el oxígeno y potencial asociación con lípidos.

III.B. RESULTADOS

III.B.1. PURIFICACIÓN DE PcH

La hemolinfa de *P. canaliculata* fue sometida a centrifugaciones sucesivas para descartar los hemocitos circulantes y proteínas desnaturalizadas, y el sobrenadante ultracentrifugado para obtener una fracción concentrada en PcH. Ésta se apreció como una banda de coloración azulada, indicativa de una hemocianina oxigenada, y cuya densidad relativa fue de 1,26 g/mL (**Fig. III-1A**).

Dicha fracción fue posteriormente purificada por *HPLC-SEC*, obteniéndose un único pico cromatográfico conspicuo (**Fig. III-1B**). Su espectro de absorción arrojó dos máximos a 280 y 350 nm (**Fig. III-1C**), confirmando su identidad. El peso molecular por *SDS-PAGE* es compatible con el de una cadena polipeptídica de 350-400 kDa, en el mismo orden de las hemocianinas de moluscos que se emplearon como estándares (**Fig. III-1D**).

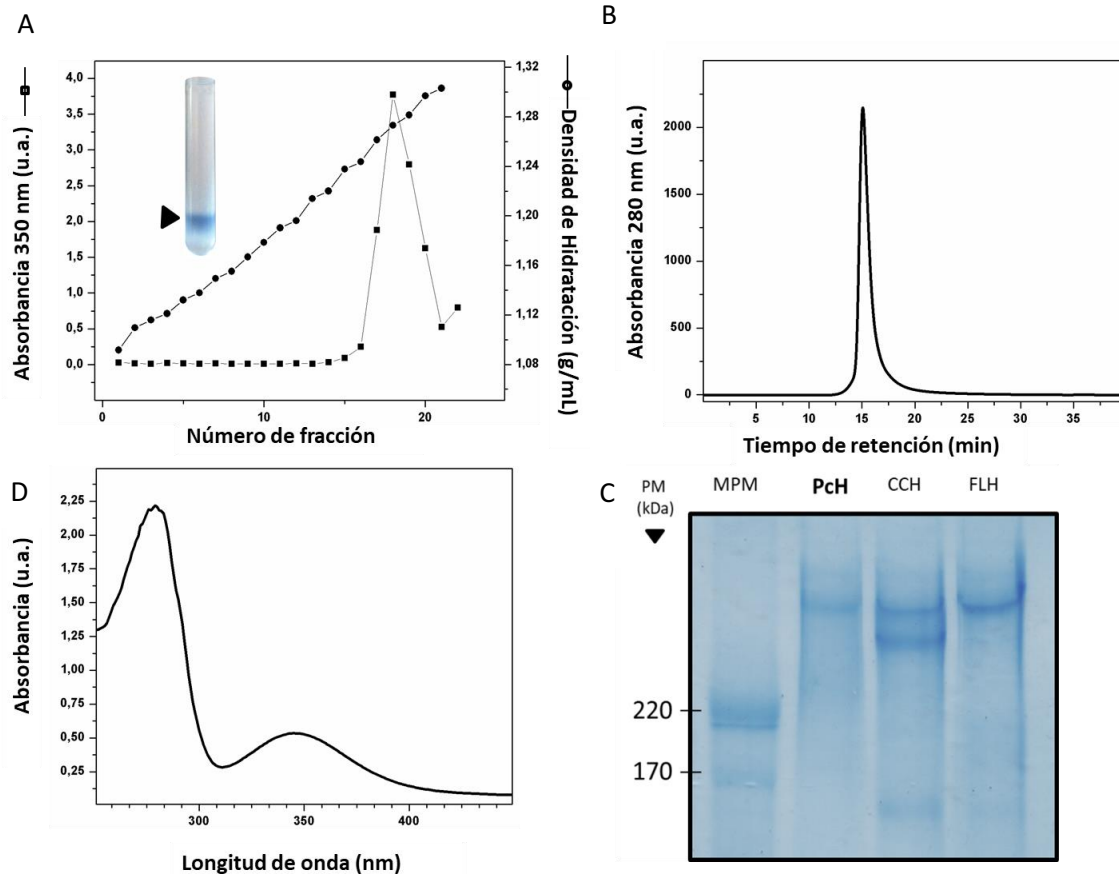


Figura III-1: Optimización de la purificación de Pch. (A) Perfiles de densidad obtenidos para hemolinfa libre de células luego de ultracentrifugación a 200.000 xg. La punta de flecha indica la fracción azulada enriquecida en hemocianina. (B) Perfil de elución por HPLC-SEC para la fracción enriquecida. (C) Espectro de absorción del analito eluido, con máximo de absorción característico a 350nm. (D) Comprobación de la presencia de la muestra purificada según su peso molecular esperado mediante SDS-PAGE 4-15%, empleando como comparación hemocianinas de otras especies de gasterópodos. CCH: hemocianina de *Concholepas concholepas*; FLH: hemocianina de *Fisurella latimarginata* (FLH); PM: Peso molecular; MPM: Marcador de peso molecular.

III.B.2. ISOFORMAS DE PCH

Para indagar sobre la presencia de isoformas de Pch, se analizó la hemolinfa libre de células de *P. canaliculata* mediante HPLC-intercambio aniónico, obteniéndose dos picos principales con tiempos de retención aproximados de 32 y 36 min (**Fig. III-2**). La diferente movilidad electroforética de ambos eluatos confirmó que se trata de diferentes isoformas de Pch. (**Inserto Fig. III-2**).

Finalmente, se realizó un tratamiento disociativo en glicina 130mM, EDTA 10mM pH=9,6 para cada uno de los eluatos obtenidos por intercambio aniónico y se reanalizaron por separado, pudiendo apreciarse su correspondencia, en tiempos de retención, con cada uno de los picos obtenidos en el cromatograma anterior (**Fig. III-2**).

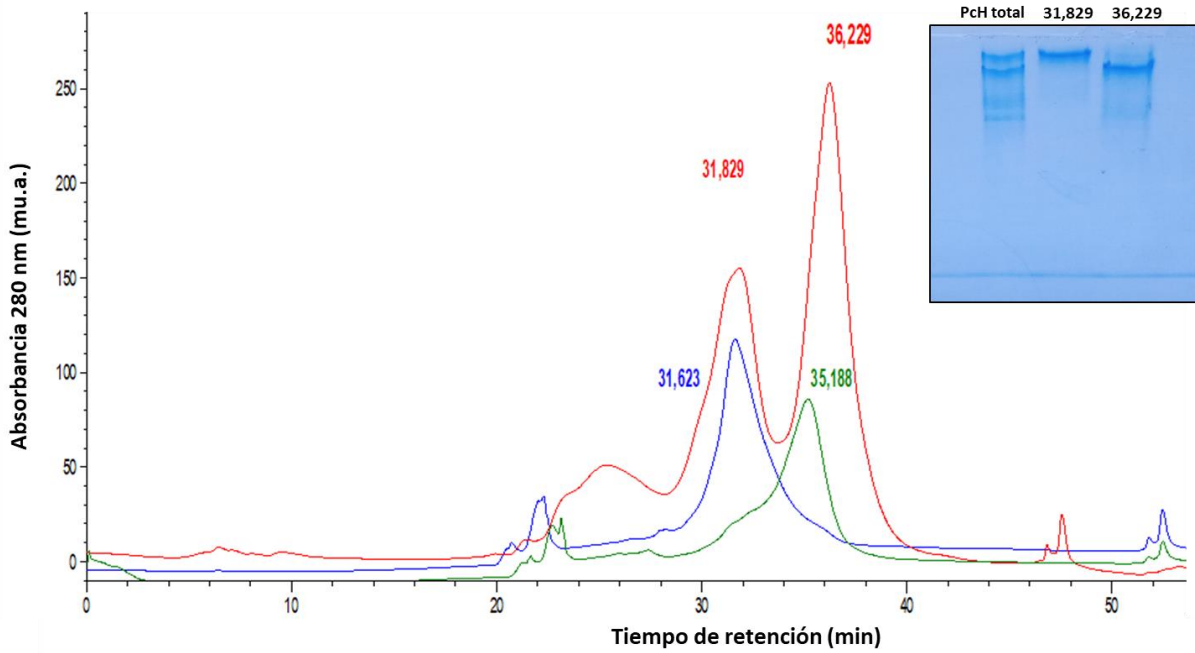


Figura III-2: Isoformas de Pch. Perfil de elución por *HPLC*-Intercambio aniónico, obtenidos al inyectar hemolinfa libre de células (---) y los productos de disociación de cada pico por separado (- - - y - - -). Inserto: Movilidad en *PAGE* Nativa 6% de los analitos eluidos a 31,829 y 36,229 min.

III.B.3. DESENSAMBLADO ESTRUCTURAL DE Pch

Empleando *DLS* pudo analizarse el efecto del tratamiento disociativo con Glicina 130mM, EDTA 10mM pH=9,6 sobre la estructura de Pch. Así, la tendencia a la reducción en los pesos moleculares estimados se condeciría con una pérdida de su estructura oligomérica, desde el nivel de decámero hasta un PM compatible con el de dímeros de subunidades (**Fig. III-3**).

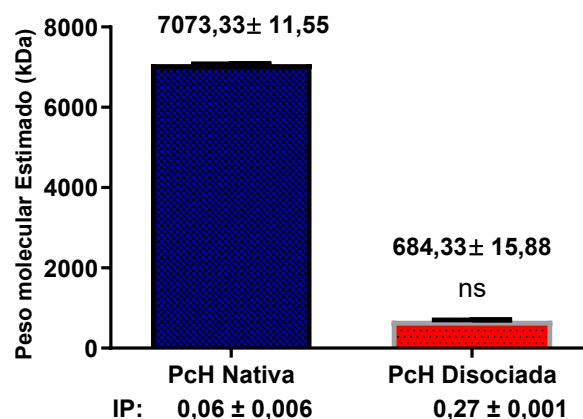


Fig.III-3: Análisis de la disociación de Pch por dispersión de luz dinámica. Perfiles obtenidos en condiciones nativas (PBS) y luego del tratamiento en Glicina 130mM, EDTA 10mM pH=9,6. El peso molecular estimado se indica sobre las barras. Resultados representativos de 3 medidas independientes ± DE. IP: Índice de Polidispersión. Prueba de Mann-Whitney: ns=no significativo.

III.B.4. ESTRUCTURA DE PcH

III.B.4.I. ESTRUCTURA PRIMARIA

A partir de un análisis de PcH por espectrometría de masas se obtuvieron secuencias de péptidos internos que permitieron avanzar hacia una búsqueda transcriptómica en la base de datos *AmpuBase*, y posteriormente deducir las secuencias génicas y proteicas. Inicialmente, se hallaron cuatro isoformas para PcH en el genoma (no mostradas aquí), de las cuáles 3 de ellas fueron reanalizadas y anotadas por investigadores externos a nuestro grupo de trabajo como PcHI, PcHIIb y PcHIII (Schäfer et al. 2021).

Aquí se reporta un análisis *in silico* de las secuencias de PcH, que permitió obtener el peso molecular, punto isoeléctrico y coeficiente de absorción molar, así como reconocer la presencia de péptido señal, su sitio de corte y los potenciales sitios N-glicosilados (en segmentos Asp-X-Serina/Treonina) para cada una de las 3 isoformas (Tabla III-1).

Subunidad PcH [Nro. de acceso GenBank]	PM (kDa)	pl	ϵ_{280} ($M^{-1} cm^{-1}$)	Péptido Señal (sitio de corte)	Potenciales sitios de N-glicosilación
PcH I [BK014379]	390.984	5.72	537045	SÍ (~ 22-23)	15
PcH I Ib [BK014378]	390.494	5.48	533385	SÍ (~ 21-22)	10
PcH III [BK014377]	390.395	5.61	547685	SÍ (~ 21-22)	15

Tabla III-1: Propiedades biofísicoquímicas obtenidas *in silico* para cada subunidad de PcH.

PM: peso molecular; pl: punto isoeléctrico; ϵ_{280} : coeficiente de extinción molar a 280nm.

III.B.4.II ASPECTO GLOBAL DE PcH

La forma global y el tamaño de PcH pudo apreciarse por tinción negativa bajo *TEM*. El análisis de las imágenes reveló estructuras cilíndricas huecas con un diámetro de $32,02 \pm 1,73$ nm y longitudes variables de $35,02 \pm 1,61$; $51,06 \pm 2,49$; y $65,11 \pm 4,22$ nm, lo que se corresponde con ensamblados de di-, tri- y tetradecámeros, respectivamente, siendo el tridecámero la estructura predominante en estos análisis (**Fig. III-4**). También se observó la presencia de escasos multímeros de PcH. Los didecámeros permitieron apreciar una asociación “cola con cola” de los decámeros individuales, construyéndose ensamblados mayores con adición de nuevos decámeros por interacción cabeza-cola.

La vista superior de las estructuras cilíndricas de PcH confirmó la presencia de collares internos, compatibles con la presencia de las UFs G y H.

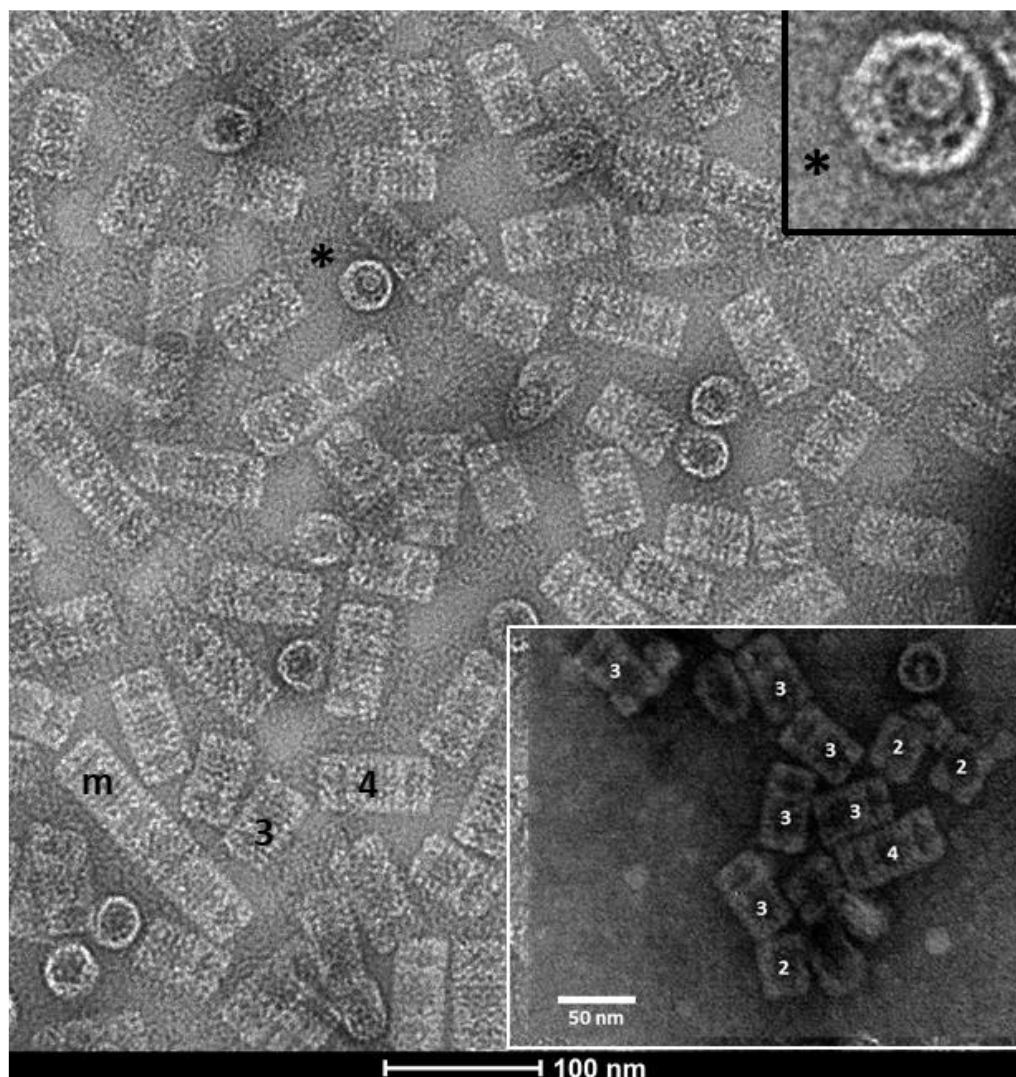


Figura III-4: Aspecto global de PcH por tinción negativa-TEM. En las microfotografías se pueden observar didecámeros (2), tridecámeros (3), tetradecámeros (4), multímeros (m) y una vista superior (*) revelando la presencia de collares internos, con detalle ampliado en inserto superior. Las medidas son el resultado de 10 determinaciones para cada tipo de ensamblado.

III.B.4.III. MODELO ESTRUCTURAL DE PcH POR CRIOMICROSCOPIA ELECTRÓNICA

III.B.4.III.i. ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PcH

Luego de un análisis de partícula única sobre el conjunto de microfotografías obtenidas por *CryoEM*, la estructura obtenida para PcH alcanzó una resolución de 4,4 Å, según el método de *gold-standard Fourier Shell Correlation (GSFSC)* con umbral de 0,143.

El modelo generado se depositó en la base de datos PDB con el código 8TRZ. Para su construcción, se empleó la secuencia de PcH-IIb como la más representativa del conjunto de las isoformas, por ser la que presentó mayor similitud con las restantes dos (**Tabla III-2**).

Isoforma	PcH-I	PcH-IIb	PcH-III
PcH-I	100.00	64.68	62.37
PcH-IIb	64.68	100.00	71.85
PcH-III	62.37	71.85	100.00

Tabla III-2: Comparación de secuencias de PcH. Matriz de porcentaje de identidad para las tres isoformas de PcH, elaborada a partir de un alineamiento múltiple empleando MUSCLE.

El dímero de subunidades, antiparalelo y asimétrico, fue considerado como un cuerpo rígido para la construcción del modelo tridimensional de PcH, compuesto de 16 UFs, es decir 8 UFs por subunidad (con un 39-49% de identidad entre ellas). Cinco de estos dímeros antiparalelos constituyeron un decámero, mientras que 2 decámeros asociados “cola con cola” conformaron el didecámero. Esta organización estructural se corresponde con la de las hemocianinas del tipo KLH. Sólo los didecámeros se emplearon para la reconstrucción 3D (**Fig. III-5A**).

Se observó que el cilindro decamérico es cruzado oblicuamente por un surco menor y un surco mayor, el primero de ellos localizado dentro de cada dímero asimétrico, y el segundo corriendo entre dos de ellos (**Fig. III-5B**).

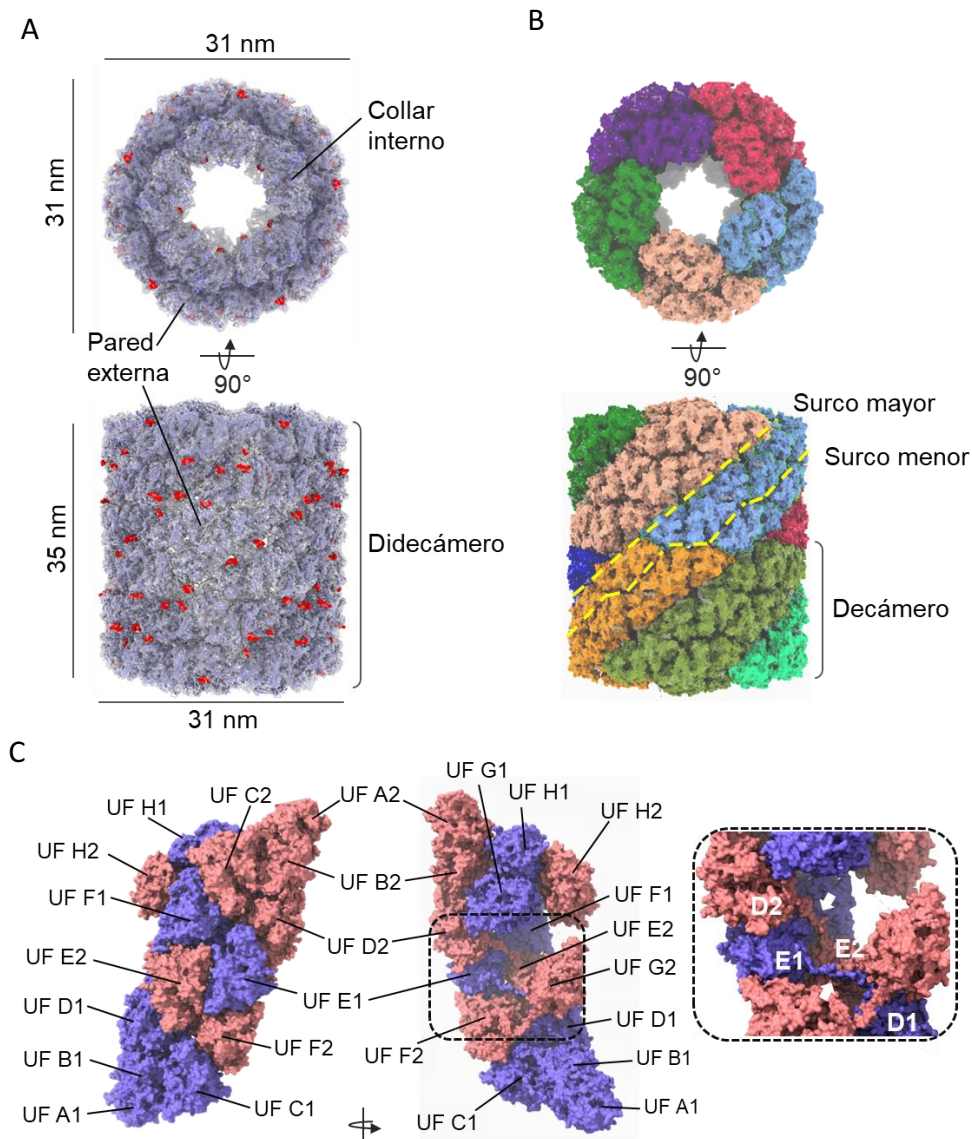


Figura III-5: Organización jerárquica de Pch. (A) Vista superior y lateral del didecámero, con los glicanos resaltados en rojo, tanto en la pared externa como en el collar interno. (B) Mismas vistas del didecámero donde se resaltan en diferentes colores los dímeros antiparalelos. Los surcos mayor y menor se indican con líneas amarillas discontinuas. (C) Dímero antiparalelo ubicado en el mapa de densidad, indicando ambos protómeros azul y rosa, con su forma característica de paralelogramo. Se indican las 16 UFs que lo conforman, los números 1 y 2 hacen referencia a cada protómero. Inserto: detalle del entrecruzamiento de protómeros en el dímero antiparalelo. El segmento conector entre las UF D y E (flechas blancas) de un protómero corre por encima de la UF E del otro, resultando en una conformación entrecruzada.

III.B.4.III.ii. UNIDADES FUNCIONALES Y SUS SEGMENTOS CONECTORES

El modelo tridimensional de PcH mostró la presencia de una pared externa y un collar interno claramente reconocibles. La pared del cilindro está compuesta de las UFs A-F, mientras que el collar interno se compone de las UFs G y H. Se determinó la posición de cada UF a lo largo del cilindro, denominándose las UF A1 a UF H1 para una subunidad (protómero o cadena) y UF A2 a UF H2 para la otra subunidad, ambas conformando un dímero antiparalelo, de acuerdo a la nomenclatura previamente establecida (Zhang et al. 2013; Zhu et al. 2014) (Fig. III-5C; Fig.III-6).

Se determinó la ubicación de cada una de las UFs en una subunidad, valiéndose de la buena visibilidad del mapa de densidad en los segmentos conectores entre UFs, excepto entre UF G y UF H donde se encontraba incompleto o prácticamente ausente. Particularmente, el segmento conector entre UF D y UF E de una subunidad presenta una conformación extendida tal que discurre todo a lo largo y por encima de la UF E de la otra subunidad (Fig.III-5C).

Adicionalmente, cada UF mostró los dos dominios conservados en hemocianinas de moluscos: uno N-terminal rico en α -hélices y otro C-terminal de tipo hoja β -plegada. El dominio C-terminal tipo-cupredoxina, esperable para las hemocianinas del tipo KLH, fue visible en todas las UF H. El dominio α -hélice de cada UF contiene el sitio de unión al O₂, compuesto por dos átomos de cobre centrales, CuA y CuB, cada uno coordinado por tres residuos de histidina altamente conservados. El modelo también reveló un escudo de residuos hidrofóbicos que aportarían a la selectividad del sitio activo sobre sus sustratos (Fig.III-7).

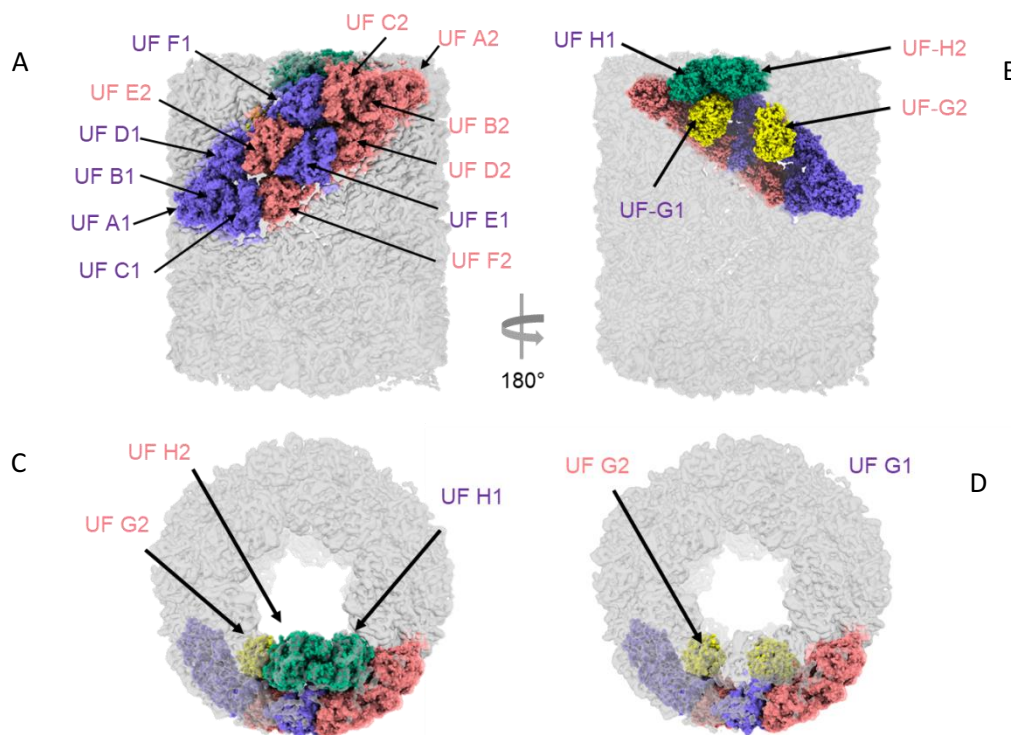


Figura III-6: Distribución espacial de las UFs. (A) Ubicación de las UF A-E de un dímero en la pared, vista exterior. (B) Ubicación de las UF G-H del collar, vista interior. (C y D) Vista superior del collar con y sin UF H, respectivamente.

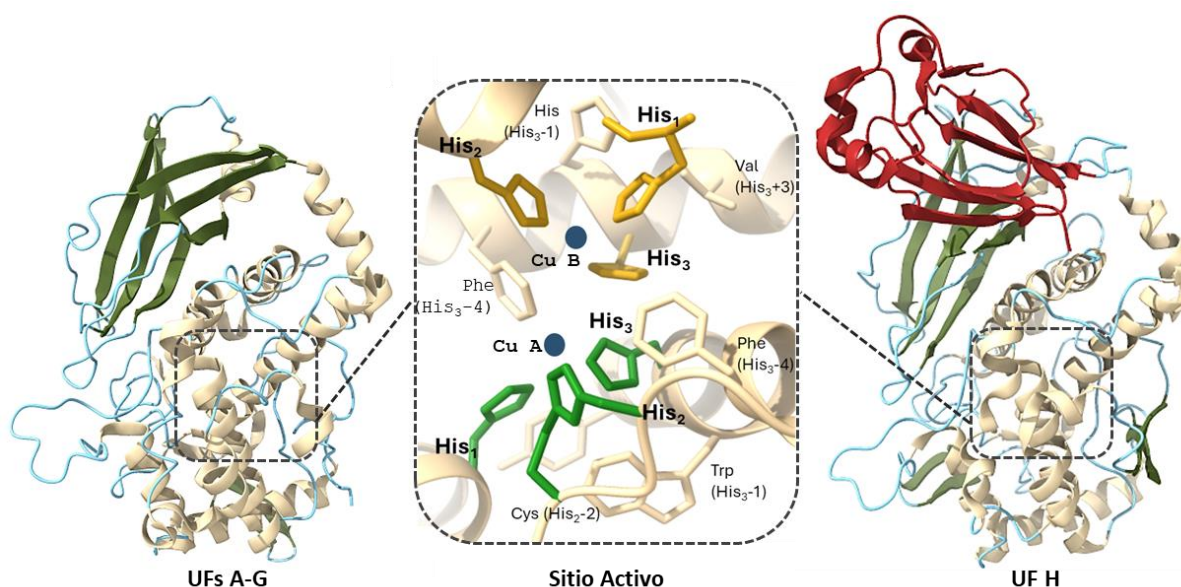


Figura III-7: Estructura de las UFs y del sitio activo dicúprico. Modelo de UF-C (izquierda) representativo de las UFs A-G, donde se observan los dominios conservados α -hélice (blanco) y hoja β -plegada (verde). Modelo de UF-H (derecha) portando un dominio tipo-cupredoxina (rojo) adicional. Detalle de la estructura del sitio activo (centro) donde se observa la posición de los átomos de Cu (azul), las histidinas a ellos coordinadas (en amarillo para el CuA y en verde para el CuB), y otros residuos conservados que forman un escudo hidrofóbico (blanco, consta su posición con respecto a la histidina del sitio activo más cercana). Cys (His₂-2) forma un enlace tioéter con His₂.

III.B.4.III.iii. SITIOS DE GLICOSILACIÓN

En todas las UFs, excepto en UF C y UF H, se observaron largas protrusiones del mapa de densidad, asociadas con residuos de Asn (**Fig. III-5A**). Éstas fueron interpretadas como sitios de N-glicosilación, que coincidieron con la predicción *in silico* (**Tabla Apéndice-1**). Así, un total de 6 sitios de glicosilación para cada subunidad fueron observados. La porción proximal de sus oligosacáridos fue modelada como GlcNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) ó GlcNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) GlcNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) Man, según el mapa de densidad permitiera apreciar. Estos oligosacáridos se distribuyeron principalmente a lo largo del surco mayor, es decir, en la interfaz entre dímeros antiparalelos. Todos ellos se encontraron en la pared externa del cilindro, con excepción de un oligosacárido unido que protruía desde la UF G hacia el lumen del cilindro (**Fig. III-5A**).

III.B.4.III.iv. DÍMERO ANTIPARALELO

El alineamiento estructural de ambas subunidades del dímero mostró que las UFs que conforman la pared del cilindro poseen una estructura terciaria casi idéntica, con un valor de *RMSD* de 1,03. Sin embargo, aunque las UFs del collar interno, UF G y UF H, sean idénticas a aquéllas de la otra subunidad (*RMSD* de 1,03 y 1,3 respectivamente), la disposición espacial de estas UFs es diferente en cada subunidad (**Fig. III-6C**). Esto es debido a un desplazamiento de UF H2 dentro del collar interno hacia uno de los extremos del cilindro, quedando próxima a UF H1, de manera que ambas UFs H se

localizan por encima de ambas UFs G en un dímero, estableciendo la condición asimétrica de éste (**Fig. III-6 B, C**).

El dímero antiparalelo se estabiliza por una serie de interacciones que se dan entre pares de UFs de la pared del decámero, y entre UFs de la pared del cilindro y aquellas de la región del collar interno (**Fig. III-8**). Estas interacciones son principalmente puentes de hidrógeno y, en menor cantidad, puentes salinos (**Tabla Apéndice-2**).

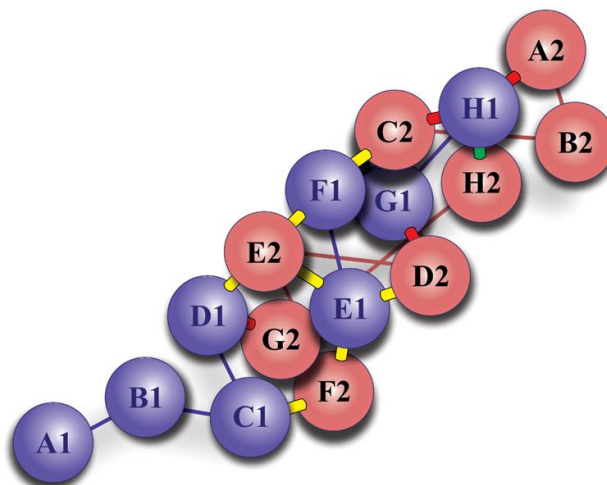


Figura III-8: Estabilización de dímeros antiparalelos. Las UFs se representan como esferas, con la cadena o subunidad 1 en azul, la subunidad 2 en rojo, y las interacciones existentes como líneas gruesas amarillas (para aquellas entre UFs de la pared externa), rojas (entre UFs de la pared y UFs del collar interno) y verde (entre UFs del collar interno). Las líneas de trazo fino indican los segmentos conectores entre UFs de cada subunidad.

III.B.4.III.v. ENSAMBLADOS DECAMÉRICO Y DIDECAMÉRICO

La resolución obtenida para el mapa de densidad permitió identificar las interacciones entre UFs pertenecientes a dímeros asimétricos adyacentes que permitirían la estabilización del decámero: UF E – UF A, UF D – UF B, UF F – UF A, UF A – UF D en la pared externa y UF G – UF G, UF H – UF H en el collar interno, algunas de ellas se ilustran en la **Fig. Apéndice-3A**.

En el caso del didecámero, se observaron tres tipos de interacciones diferentes participando de su estabilización: UF A – UF B; UF C – UF F; UF A – UF C (**Fig. Apéndice-3B; Fig. Apéndice-4**).

Tanto para las interacciones del decámero como del didecámero, se visualizaron residuos de Cys y de Leu inmediatamente continuos a bucles y a cadenas β , respectivamente, que contactaban con His del sitio activo de sus respectivas UFs. Además, se apreciaron oligosacáridos ligados a residuos de Asn en la proximidad de los sitios de contacto (**Fig. Apéndice-3; Fig. Apéndice-4**).

III.B.5. ESTABILIDAD ESTRUCTURAL

III.B.5.I. COMPORTAMIENTO FRENTE A LA TEMPERATURA

La termoestabilidad de Pch se evaluó en un rango de 25 a 80 °C mediante espectroscopía de absorción y de fluorescencia.

El espectro de absorción no mostró cambios significativos frente a los tratamientos térmicos hasta alcanzar los 80 °C (**Fig. III-9A**); hecho que se apreció más claramente mediante el análisis de la cuarta derivada del espectro por un corrimiento hacia longitudes de onda mayores a esta temperatura (**Fig. III-9B**).

Los espectros de fluorescencia intrínseca de Pch (técnica más sensible que la anterior) denotan alteraciones estructurales progresivos de la proteína, más importantes a partir de los 60 °C. A partir de esta temperatura, se observa un corrimiento de los máximos de emisión de los espectros hacia longitudes de onda mayores. Esto se debería a la pérdida de energía no radiativa por una mayor exposición de los residuos de triptófano al entorno, interactuando con las moléculas del solvente (**Fig. III-9C**). Tal comportamiento pudo vislumbrarse más fácilmente mediante el análisis del centro de masas de los espectros (**Fig. III-9D**).

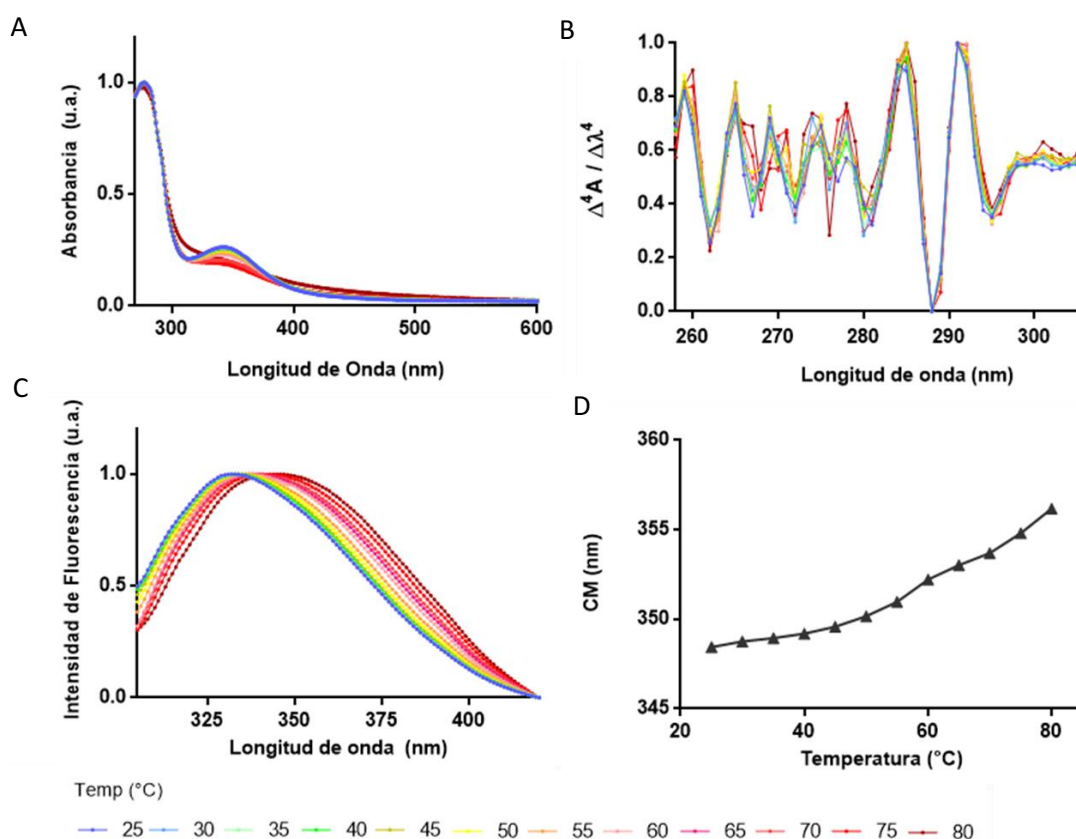


Figura III-9: Termoestabilidad de Pch. (A) Espectros de absorción normalizados y (B) cuarta derivada de los mismos a diferentes temperaturas. (C) Espectros de fluorescencia intrínseca normalizados a diferentes temperaturas y (D) evolución de los centros de masas de los mismos.

III.B.5.II. COMPORTAMIENTO FRENTE AL pH

Al igual que en el caso de la termoestabilidad, los cambios conformacionales de Pch frente a variaciones del pH se analizaron por espectroscopía de absorción y de fluorescencia.

Los espectros de absorción mostraron cambios a valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos (**Fig. III-10A**); el análisis de la cuarta derivada de los mismos denotó un corrimiento hacia longitudes de onda menores para valores de pH de 2, 10 y 12 (**Fig. III-10B**).

Los espectros de fluorescencia normalizados permitieron apreciar un corrimiento hacia longitudes de onda menores a pH=2 y hacia longitudes de onda mayores para el caso de pH=12 (**Fig. III-10C**). Este comportamiento se verificó al observar la variación en el centro de masas de los espectros, de donde se infiere una estabilidad conformacional de Pch en el rango de pH=4-10 (**Fig. III-10D**).

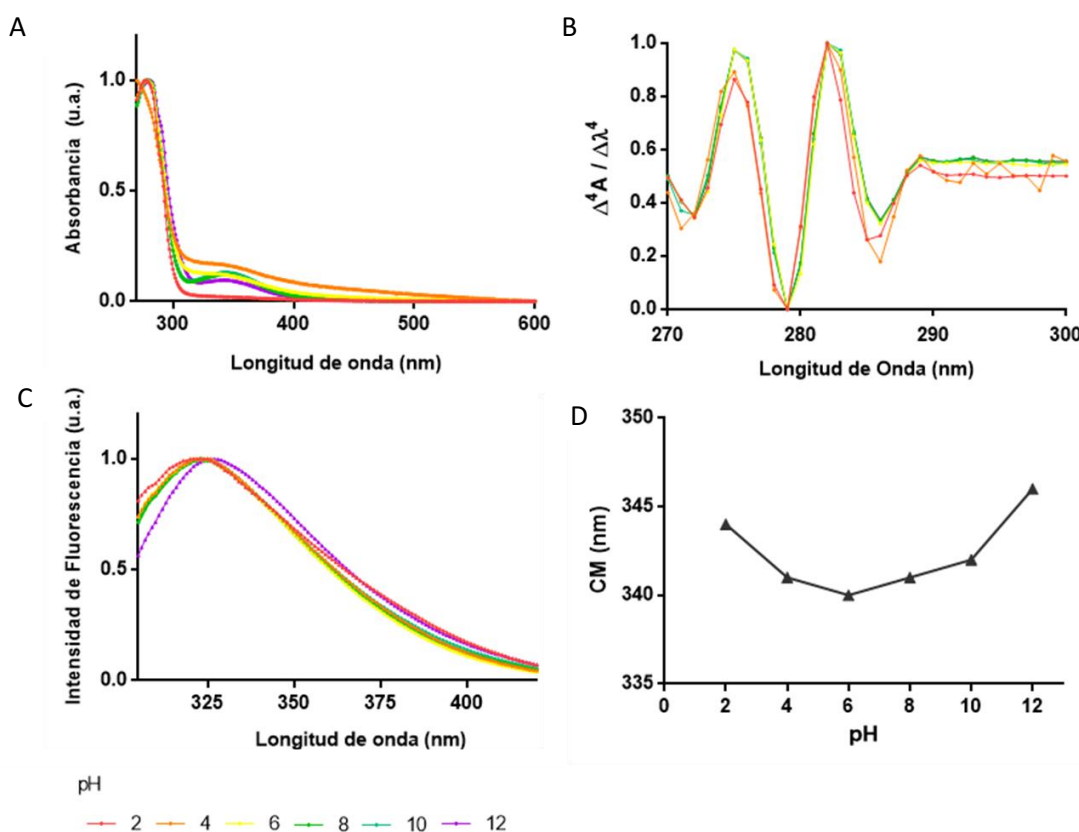


Figura III-10: Estabilidad de Pch frente a las variaciones del pH. (A) Espectros de absorción normalizados y (B) su cuarta derivada a diferentes valores de pH. (C) Espectros de fluorescencia intrínseca normalizados y (D) sus centros de masas para los diferentes valores de pH.

III.B.6. AFINIDAD POR EL OXÍGENO

Se monitoreó el grado de oxigenación de Pch en una cámara de difusión modificada, obteniéndose las curvas de saturación del oxígeno a tres temperaturas (15, 24 y 28 °C) (Fig. III-11A).

Se encontró una tendencia a la reducción de la P50 (valor de presión parcial de O₂ al cual se obtenía un porcentaje de saturación del 50%) al exponer a Pch a la temperatura más baja. Esto sería un primer indicativo de una mayor afinidad de Pch por el O₂ a bajas temperaturas ambientales (Fig. III-11B).

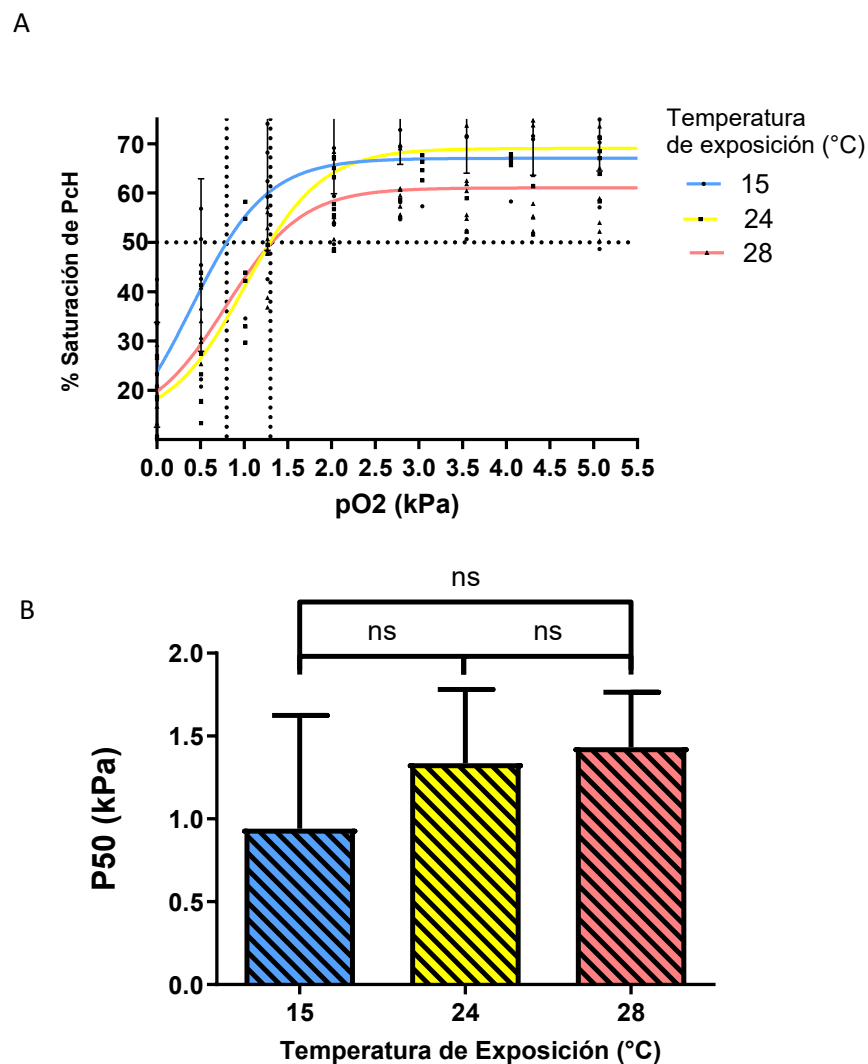


Fig. III-11: Afinidad de Pch por el oxígeno. (A) Comportamiento de saturación de Pch con O₂ a 15 °C, 24 °C y 28 °C, cada curva es promedio de 8 réplicas. Las líneas punteadas indican el valor de P50 para cada curva. (B) Comportamiento de la P50, asociada a la disminución de la temperatura de exposición. Las barras representan el promedio \pm DE de 8 determinaciones independientes. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: ns= no significativo.

III.B.7. LÍPIDOS ASOCIADOS

La determinación por cromatografía en capa fina acoplada a detector por ionización con llama reveló la presencia de lípidos asociados a Pch. Los lípidos identificados fueron, en orden de polaridad creciente: ésteres de esteroles, triacilgliceroles, ácidos grasos libres, colesterol, y fosfolípidos. En cuanto a su composición, se observa un predominio de los lípidos estructurales por sobre los energéticos (**Tabla III-3**).

Lípido Asociado	Concentración ($\mu\text{g} / \text{mg}$ de Pch)
ÉSTERES DE ESTEROL	$0,63 \pm 2,47 \times 10^{-3}$
TRIACILGLICEROLES	$0,40 \pm 1,9 \times 10^{-2}$
ÁCIDOS GRASOS LIBRES	$0,022 \pm 2,9 \times 10^{-3}$
COLESTEROL	$0,01 \pm 1,6 \times 10^{-4}$
FOSFOLÍPIDOS	$2,21 \pm 3,4 \times 10^{-2}$
TOTAL	3,28

Tabla III-3: Composición lipídica de Pch. Los valores reportados son el promedio de tres determinaciones \pm DE.

III.C. DISCUSIÓN

Gastropoda es la clase de moluscos más exitosa, contiene el mayor número de especies y ocupa una gran variedad de hábitats, abarcando formas marinas, límnicas y terrestres (De Jong-Brink et al. 1983). Tal diversificación se explica, en parte, por la adquisición de la capacidad de respirar aire (Schäffer et al. 2019), lo que permitió la transición desde la vida marina hasta la ocupación de ambientes dulceacuícolas y terrestres. Esto implicó la aparición de una serie de adaptaciones fisiológicas y bioquímicas, donde la hemocianina habría ocupado un rol central, adaptando el metabolismo energético a las nuevas condiciones ambientales, como indicaría la ocurrencia de eventos de duplicación y ganancia de intrones (asociada a procesos de regulación de la expresión) para los genes de hemocianinas en diversos clados de Gastropoda (Lieb et al. 2010; Schäffer et al. 2019; 2021).

Para comenzar a interpretar el rol de la PcH en la adaptación a diferentes condiciones ambientales, en este capítulo estudiamos sus características estructurales y funcionales. En este sentido, generamos un modelo tridimensional de la proteína con una resolución de 4,4 Å, siendo ésta una de las mejores resoluciones alcanzadas para estructuras de hemocianinas de gasterópodos.

Por otro lado, el análisis *in silico* de las secuencias de PcH permitió obtener una primera aproximación de sus propiedades físicoquímicas y determinar la existencia de isoformas (confirmadas experimentalmente tras separación por HPLC), lo que parece ser un rasgo típico de las hemocianinas de ampuláridos como revela una búsqueda en los genomas de *P. maculata*, *Marisa cornuarietis* y *Lanistes nyassanus* (Sun et al. 2019). Aunque las tres isoformas de PcH poseen alta similitud de secuencia, las diferencias en sus propiedades permiten inferir la posibilidad de una expresión diferencial probablemente asociada con las cambiantes condiciones ambientales que *P. canaliculata* enfrenta como parte de su modo de vida anfibio. Resulta de interés recordar el caso de las hemocianinas de Cerithioidea (que también poseen hábitos anfibios), donde se sugiere que la expresión de diferentes isoformas permitiría la aclimatación respiratoria a condiciones de disponibilidad de O₂ variables (Lieb y col 2010). Asimismo, se ha reportado la expresión diferencial de isoformas de hemocianina de *Haliotis diversicolor* como respuesta al estrés o a diferentes períodos del desarrollo (Yao y col 2019). Si bien más trabajo es necesario para dilucidar tales aspectos sobre las isoformas de PcH, las diferencias en número de sitios de glicosilación y puntos isoeléctricos, coherente con perfiles cromatográficos y movilidades electroforéticas diferentes para al menos dos de ellas, permiten especular con un rol diferenciado para estas isoformas en la aclimatación a las condiciones fluctuantes de su hábitat. De esta manera, se especula que la expresión diferencial de isoformas de PcH podría tener una relación directa con la alta invasividad de la especie, premisa hasta ahora no explorada sobre otros moluscos de hábitos invasores.

Las microfotografías de PcH revelaron una preponderancia de ensamblados di- y tridecaméricos, en concordancia con otras hemocianinas de gasterópodos (Markl y col 2013; De Ioannes y col 2004). Se ha sugerido que el ensamblado multimérico, es pH-dependiente, y jugaría un rol importante modificando la afinidad de PcH por el O₂ (Barros et al. 1993). Este hecho podría estar íntimamente relacionado con la existencia de isoformas de PcH y sus capacidades diferenciales para organizarse en multímeros, aunque más trabajo es necesario para verificarlo.

Los resultados obtenidos en este capítulo nos permiten confirmar que las características estructurales generales de PcH coinciden con las del tipo KLH (Markl 2013; Kato et al. 2017). La alta resolución alcanzada en el modelo tridimensional de la proteína permitió inferir interacciones estabilizantes de su estructura, tanto a nivel del dímero antiparalelo, como entre dímeros y entre decámeros adyacentes, encontrándose que en la mayoría de los casos se trataba de puentes de hidrógeno y, en menor medida, puentes salinos. La disposición de UF D y UF E, en el dímero antiparalelo, coincidió con la descrita para la hemocianina HdH1 de *Haliotis diversicolor* (Zhang et al. 2013), donde el segmento conector entre ambas discurre todo a lo largo y por encima de la UF E del otro protómero, aportando a su estabilización. En el sitio activo de PcH se verificó la presencia de aminoácidos aromáticos conservados, como en el caso de proteínas tirosinasas, conformando un escudo hidrofóbico directamente involucrado en el ingreso de sustratos al sitio activo (García-Borrón y Solano 2002).

En cuanto a la interacción entre dímeros, la cercanía de los elementos participantes con el sitio activo sugiere su participación en la transmisión del cambio conformacional asociado con el efecto cooperativo. Así, los sitios de contacto UF E – UF A; UF A – UF D; UF D – UF B se encuadran dentro de las interacciones identificadas y propuestas por Zhang et al. como intervinientes en la cooperatividad tras la unión del O₂, añadiéndose en este caso UF F – UF A. Estas interacciones son consideradas como un “Cluster de comunicación” debido a algunos residuos directamente asociados con otros del bolsillo de unión al O₂ (Zhang et al. 2013). El mecanismo propuesto implica la interacción de un bucle y una cadena β pertenecientes a UFs de dímeros adyacentes. Nuestro modelo de PcH muestra estas interacciones, a las que denominamos “Cluster de comunicación α ”, para distinguirlas de interacciones entre UF C y UF F de dímeros asimétricos provenientes de diferentes decámeros, que podrían constituir un nuevo Cluster de comunicación sin conexión aparente con el anterior, y que aquí denominamos “Cluster de comunicación β ”. La existencia de este segundo cluster de comunicación había sido sugerida por Zhang para HdH1, pero confirmado por primera vez en una estructura de hemocianina a partir de nuestro modelo de PcH.

Es sugestiva la presencia de oligosacáridos ubicados en su mayoría a lo largo de la interface entre dímeros, surco mayor del cilindro, posición que también podría implicarlos en el efecto cooperativo. En este escenario, la cooperatividad de PcH no sólo se debería a las interacciones que ocurren entre dímeros asimétricos dentro de un decámero, sino también entre dímeros de distintos decámeros y, en ambos casos, habría participación de oligosacáridos N-ligados, según sugiere su presencia en la proximidad de los sitios de contacto. Tales interacciones son las mismas descritas como contactos estabilizantes del decámero, por lo que los oligosacáridos involucrados pueden considerarse partícipes del alosterismo y estabilización de PcH. Este rol de los glicanos ya había sido descrito como una particularidad para hemocianinas de Cephalopoda (Gai et al. 2015).

En cuanto a su estabilidad térmica, PcH sufrió cambios conformacionales progresivos, permaneciendo relativamente estable hasta los 60 °C y sin llegar a desnaturalizarse completamente a los 80 °C, en similitud con lo observado previamente para hemocianinas de *Helix aspersa* y *H. lucorum* que cuentan con temperaturas de fusión (*T_m*) de 79,8 y 82,3 °C, respectivamente (Todinova et al. 2018; Idakieva et al. 2020). Asimismo, permaneció estable en un rango de pH más amplio que el reportado para la

hemocianina de *H. lucorum* (Idakieva et al. 2020). De este modo, PcH demostró una considerable estabilidad estructural, lo cual podría configurarse como una respuesta adaptativa adicional frente a las condiciones ambientales cambiantes. En el mismo sentido, se apreció una tendencia al aumento de la afinidad de PcH por el O₂ a bajas temperaturas, lo cual podría reflejar una adaptación fisiológica, especialmente durante la estación de bajas temperaturas, que conduce a un período de letargo o hibernación para el organismo.

Un hecho a destacar es que se encontraron lípidos asociados a la estructura de PcH, como podía sugerir su densidad promedio de 1,26 g/mL (valor que informa de una densidad menor a la de las proteínas puras en el gradiente de NaBr). Si bien se los detectó en proporción muy escasa, se hallaron lípidos neutros y polares, siendo preponderante la presencia de fosfolípidos. Esto difiere con lo reportado previamente para *P. canaliculata* (Garín y Pollero, 1995), pudiendo ser la alta concentración de PcH aquí empleada, uno de los factores que posibilitaron la detección lipídica. Se sugiere así un posible rol de las hemocianinas en el transporte de estos compuestos en hemolinfa de invertebrados, hecho hasta ahora sólo observado en arácnidos (Cunningham et al. 2007; Laino et al. 2011) y, dentro de los moluscos, en cefalópodos (Heras y Pollero 1990; 1992); si bien, con los datos obtenidos, tampoco puede descartarse un posible rol estructural. De este modo, se reporta por primera vez la asociación de lípidos con una hemocianina de gasterópodos, abriendo las puertas a futuras investigaciones respecto a la real participación de esta proteína en el transporte hemolinfático de lípidos.

Finalmente, la caracterización realizada en este capítulo sentó las bases necesarias para estudiar otros aspectos de PcH relacionados a su función en la inmunidad innata de invertebrados y su potencial aplicación biomédica y/o biotecnológica.

CAPÍTULO IV:

PARTICIPACIÓN DE LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata* EN LA INMUNIDAD INNATA

IV.A. INTRODUCCIÓN

El tradicional papel de las hemocianinas como pigmentos respiratorios ha sido ampliado en las últimas décadas debido a la acumulación de evidencias en torno a otros roles fisiológicos de estas proteínas, destacándose su participación en la respuesta inmune innata (Cerenius y Söderhäll, 2004; Coates et al. 2020).

Como miembros de la familia de proteínas de cobre tipo 3, en la que se incluyen tirosinasas y catecoloxidasas (Solomon et al. 1996), las hemocianinas cuentan con una actividad fenoloxidasa intrínseca, que se ha demostrado es inducible por diversos estímulos (Idakieva y col 2009; Baird et al. 2007; Decker and Jaenicke 2004), muchos asociados a componentes microbianos y/o generación de daño celular en un contexto de infección (Cerenius et al. 2010; Yao et al. 2019; Cerenius 2021). Así, se han recreado *in vitro* las condiciones que emularían una inducción de la actividad fenoloxidasa (Jiang et al. 2007; Coates y Nairn, 2014). Sin embargo, la mayor información proviene de estudios realizados con artrópodos, y pocas caracterizaciones se han centrado en hemocianinas de moluscos, a pesar de tratarse de proteínas análogas y con una complejidad estructural diferente (Salvato y Beltramini, 1990). Particularmente, las hemocianinas de moluscos poseen actividad difenoloxidasa, empleándose catecol y/o dopamina como sustratos oxidables, y reportándose inducción por tratamientos proteolíticos y/o agentes disruptores que dan cuenta de la necesidad de un cambio conformacional para aumentar su actividad (Salvato et al. 1998; Siddiqui et al. 2006; Hristova et al. 2008; Idakieva et al. 2009; Naresh et al. 2013; Raynova y col 2013).

Por otro lado, se postula que las hemocianinas nativas liberarían péptidos antimicrobianos (PAMs), por ataque proteolítico en respuesta a una infección lo que constituye otro mecanismo efector de la inmunidad innata (Coates y Decker, 2017). Si bien esta hipótesis no ha sido corroborada experimentalmente, se han descubierto numerosos PAMs en la secuencia de hemocianinas de invertebrados a través de dos estrategias de estudio general: (1) búsqueda de PAMs en hemolinfa, antes y/o después de un desafío inmunológico, mediante análisis de espectrometría de masas (Riciluca et al. 2012), y (2) predicción *in silico* empleando servidores entrenados con bases de datos de PAMs a partir de la secuencia completa de hemocianina (Zhuang et al. 2015). En este sentido, la confección de bases de datos de PAMs ha sido fundamental para el desarrollo de tales estrategias de búsqueda (Wang et al. 2009).

Hasta el momento, *Haliothis tuberculata* es la única especie de moluscos donde se han investigado PAMs derivados de hemocianina (Zhuang et al. 2015). Cabe destacar el hallazgo de PAMs circulantes en la hemolinfa de un miembro del género *Pomacea*, *P. poeyana*, aunque no se ha verificado que éstos deriven de una hemocianina precursora (González García et al. 2020).

Adicionalmente, la aglutinación es un mecanismo para la inmovilización de microorganismos que ha sido asociada a diversas proteínas hemolinfáticas, como hemocianinas portadoras de dominios tipo-Inmunoglobulina, localizados a repetición dentro de regiones expuestas de estas enormes proteínas (Zhang et al. 2004; 2006; 2017a; 2017b; Zhao et al. 2012). Nuevamente, la información disponible proviene mayoritariamente de estudios realizados en artrópodos, reportándose solamente el caso de una aglutinina de bajo peso molecular en hemolinfa de *Octopus maya* que

mostró similitud parcial con la secuencia de hemocianina de otro cefalópodo (Alpuche et al. 2010).

Por su parte, la inmunobiología de la familia Ampullariidae y, dentro de ella, de *P. canaliculata* como organismo modelo emergente, ha sido abordada más profundamente en la última década, caracterizándose en distinto grado sus mecanismos de respuesta humoral y celular (Rodríguez et al. 2022). Esto incluye la diversidad de hemocitos circulantes y su rol en la fagocitosis, agregación (o nodulación), secreción de enzimas líticas y producción de trampas extracelulares (Accorsi et al. 2012; Cueto et al. 2012; Boraldi et al. 2019); así como la detección de proteínas solubles con dominios tipo-C1q o tipo-inmunoglobulina que participarían del reconocimiento de patógenos (Boraldi et al. 2019; Gorbushin 2019).

En este contexto, en el presente estudio buscamos profundizar en el conocimiento de la participación de las hemocianinas de moluscos en la inmunidad innata. Para esto, apoyándonos en la información estructural generada para PcH (véase Cap. III), caracterizamos su actividad fenoloxidasa y evaluamos su potencial como macromolécula precursora de PAMs, así como su capacidad de aglutinar microorganismos.

IV.B. RESULTADOS

IV.B.1. ACTIVIDAD FENOLOXIDASA

IV.B.1.I. ACTIVIDAD INTRÍNSECA

El estudio de la actividad enzimática o-difenoloxidasa de Pch purificada se realizó empleando catecol y dopamina como sustratos.

Mientras que para la dopamina no se observó ninguna actividad medible, sí se encontró para el caso del catecol. En efecto, la oxidación a o-quinona arrojó valores de K_m de 50,5 mM; V_m de $3,64 \times 10^{-5} \text{mmoles} \cdot \text{min}^{-1}$ y k_{cat} por UF de $2,9 \text{min}^{-1}$ (Fig. IV-1).

El análisis de los parámetros cinéticos obtenidos para Pch indicó que ésta posee una actividad fenoloxidasa intrínseca débil, tal como se observa para el caso de otras hemocianinas de moluscos (Tabla IV-1).

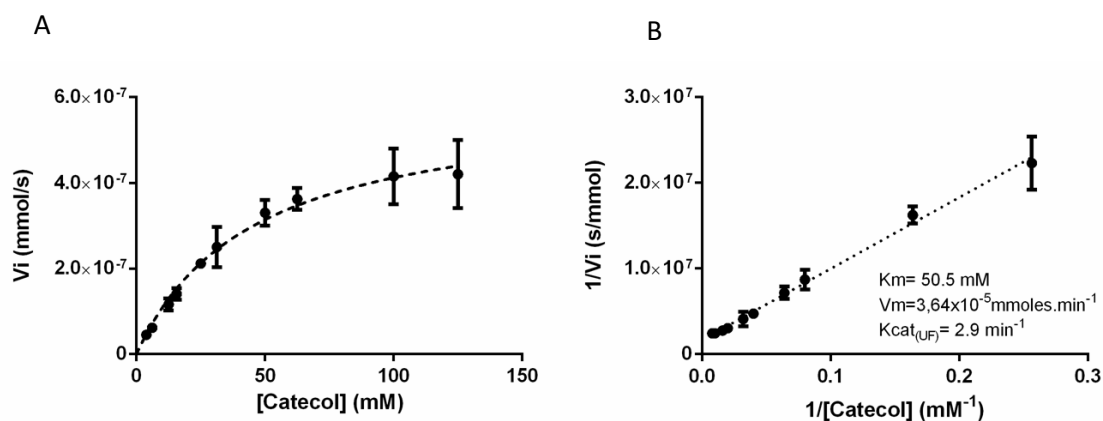


Figura IV-1: Caracterización cinética de la actividad fenoloxidasa intrínseca de Pch. (A) Curva de Michaelis-Menten empleando catecol como sustrato en presencia de Pch (3 g/L) a 30°C en buffer fosfato 100 mM, pH= 7,5. (B) Doble recíproca y parámetros cinéticos calculados. Los resultados representan el promedio \pm 1 DE de cinco determinaciones independientes.

Hemocianinas de Moluscos	Km (mM)	kcat (min ⁻¹)*	kcat/Km (M ⁻¹ min ⁻¹)	Referencia
<i>Pomacea canaliculata</i>	50.5	2.9	0.057	Presente trabajo
<i>Helix aspersa maxima</i>	11.8	1.1	0.093	(Raynova y col 2013)
<i>Helix pomatia</i>	3.1	0.2	0.071	(Siddiqui et al. 2006)
<i>Helix vulgaris</i>	2.9	4.5	1.566	(Hristova et al. 2008)
<i>Rapana venosa</i>	30.0	0.3	0.008	(Idakieva et al. 2009)
<i>Sepia officinalis</i>	3.8	10.0	2.631	(Siddiqui et al. 2006)
<i>Octopus vulgaris</i>	35.0	10.0	0.256	(Salvato et al. 1998)

Tabla IV-1: Parámetros cinéticos para la actividad fenoloxidasa intrínseca de hemocianinas de moluscos. La comparación consideró el empleo de catecol como sustrato. * kcat expresada por UF (sitio activo).

IV.B.1.II. INDUCCIÓN POR PROTEÓLISIS

Al someter a la PcH a diferentes tratamientos de proteólisis limitada, se observaron aumentos significativos en su actividad específica (AE). Las proteasas y sus relaciones enzima/PcH que mostraron incrementos en la actividad fueron: Tripsina 1/200 (p/p), Quimotripsina 1/5 (p/p) y Subtilisina 1/10 (p/p); deteniéndose la proteólisis con PMSF al cabo de 1 h; 1,5 h y 1 h, respectivamente. Al realizar la digestión durante tiempos y/o relaciones proteasa/PcH mayores, se observó una reducción de la actividad fenoloxidasa por debajo de los valores intrínsecos. La mayor inducción se observó para el tratamiento con subtilisina, llevando a un incremento del 54% de la AE. En el caso de los tratamientos con tripsina y quimotripsina, ambos resultaron en un incremento del 25% de la AE (**Fig. IV-2**).

La proteólisis de PcH fue confirmada mediante *PAGE* nativa (**Fig. IV-3A**) y la actividad fenoloxidasa detectada sobre el mismo gel mediante zimografía (**Fig. IV-3B**). Al indagar acerca de la naturaleza de esos productos de proteólisis de PcH por *SDS-PAGE*, se hallaron bandas de 50 kDa, tamaño compatible con lo que podrían ser UFs aisladas (**Fig. IV-3C**).

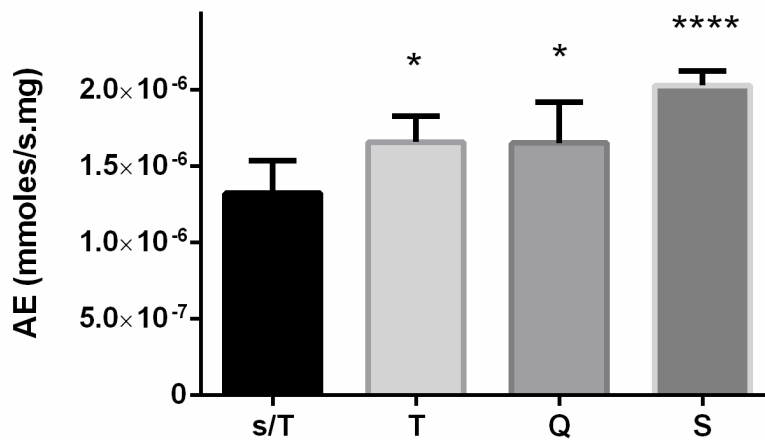


Fig. IV-2: Inducción de la actividad fenoloxidasa de Pch por proteólisis limitada. Actividad específica de Pch (3 g/L) a 30 °C determinada empleando catecol 100 mM como sustrato. s/T: Pch sin tratar; T: tripsina/Pch 1/200, 1h; Q: quimotripsina/Pch 1/5, 1,5h; S: subtilisina/Pch 1/10, 1h. Las barras representan el promedio \pm DE de 5 determinaciones independientes Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: * = $p < 0.05$, **** = $p < 1 \times 10^{-4}$

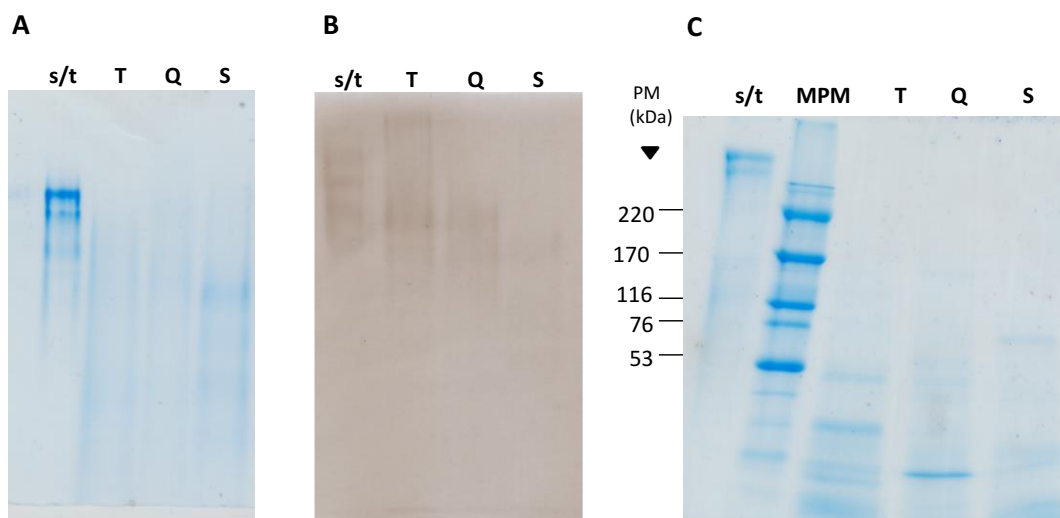


Fig. IV-3: Análisis electroforético de Pch luego del tratamiento proteolítico. (A) PAGE Nativa y (B) Zimograma del mismo gel mostrando actividad fenoloxidasa en los productos de proteólisis de Pch, empleando catecol 100 mM como sustrato. (C) SDS-PAGE de los productos de proteólisis. s/t: Pch sin tratar por proteasas; T: tratamiento tripsina/Pch 1/200 por 1h; Q: tratamiento quimotripsina/Pch 1/5 por 1,5 h; S: tratamiento subtilisina/Pch 1/10 por 1h. PM: peso molecular; MPM: Marcadores de Peso molecular.

IV.B.1.III. PREDICCIÓN Y MAPEO DE SITIOS DE ATAQUE PROTEOLÍTICO EN PcH

Para evaluar *in silico* la posibilidad de generar UFs aisladas mediante los tratamientos proteolíticos, se realizó un análisis de la secuencia proteica de los segmentos conectores entre UFs. Se predijo la presencia de potenciales sitios de corte para quimotripsina y tripsina en todos los segmentos inter-UF (conectores o *linkers*) de PcH. En la **Tabla IV-2** se puede observar que todos presentaron al menos un sitio de clivaje para ambas proteasas.

Estos sitios de clivaje fueron mapeados en el modelo de criomicroscopía electrónica (Cap. III) a fin de inferir su accesibilidad al ataque de las proteasas, encontrándose que la mayoría están enterrados en la estructura de la proteína, y ubicados en la cara luminal del cilindro. Los segmentos conectores entre UF F y UF G y entre UF G y UF H presentaron sitios de clivaje más accesibles que los demás. Sin embargo, debido a la disposición diferencial del mismo tipo de UF en cada subunidad de un dímero, ambos segmentos difirieron en su accesibilidad. Así, el segmento conector entre UF G1 y UF H1 se encontró cubierto por la UF G2 de la unidad asimétrica vecina, volviéndolo inaccesible para las proteasas. Por otro lado, el segmento conector entre UF G2 y UF H2 mostró seis sitios de clivaje que (a pesar de que una parte del segmento no se logra resolver en el mapa de densidad) estarían expuestos al lumen del cilindro, aumentando el número de sitios de clivaje a diez. Una situación similar ocurre con el segmento conector entre UF F1 y UF G1 que se encuentra oculto entre las regiones de UF G1, UF H1 y UF H2, mientras que el segmento conector entre UF F2 y UF G2 se observó expuesto, denotando el mayor número de sitios de clivaje entre las UFs. Los restantes segmentos conectores sólo presentaron uno o dos sitios de clivaje y, en el caso del segmento entre UF B y UF C no se observó ninguno.

Segmento Conector	Secuencia	Número de sitios	Posición (% Probabilidad)
UF A-B	AKGFTDPKPESEDVQSANVVIRKD VDTLTDEEVYELRQALSRLFQNDTS	T: 5	2 (100%) 22 (84.6%) 23 (100%) 37 (100%) 42 (100%)
		Q: 6	4 (83.8%) 28 (54%) 34 (86.3%) 36 (75.9%) 40 (62.5%) 43 (63.5%)
UF B-C	EGTTHEETGEHQELHVRSDVSSLTR EQVQSLREALQSLEDDTSI	T: 3	17 (100) 25 (87,4) 32 (100)
		Q:6	4 (83,8) 28 (54) 34 (86,3) 36 (75,9) 40 (62,5) 43 (63,5)
UF C-D	GSETKKGEIDKNIVASSHIRRNLDL SEGEVESLKSALRRMQDDGT	T: 8	5 (84,4) 6 (83,7) 11 (63,1) 20 (82,6) 21 (100) 35 (100) 39 (100) 40 (75,2)
		Q: 2	23 (54) 31 (75,9)
UF D-E	GEDNSQDQTGKTERRLRKSVTSLTI GERRSLVLALQSLEEDSSA	T: 7	11 (100) 14 (100) 15 (100) 18 (84,6) 19 (83.4%) 29 (100) 30 (75,3)
		Q: 3	26 (62,5) 34 (66,9) 38 (75,9)
UF E-F	KSRVTSIQELPPNRVRHEISHLDARA TMSLKAALRDLQKDG	T: 7	3 (100) 14 (100) 16 (100) 25 (100) 31 (100) 35 (91,8) 39 (100)
		Q: 4	16 (51) 24 (54) 32 (55,2) 34 (54,5)
UF F-G	AVGARTEEASYSVSGIGVRKNINTLT VAETESLKKALRAVQQQSG	T: 6	5 (100) 19 (100) 20 (100) 34 (82,6) 35 (87,5) 38 (95,7)
		Q: 3	28 (52,5) 30 (66,9) 34 (75,9)
UF G-H	GKGKTGSRAVAKEDPQPTKTKDVV RYEVSALSLEQVSNLRNALYKLQND DG	T: 9	2 (96,3) 4 (100) 8 (91,9) 12 (82) 19 (93,1) 21 (100) 25 (100) 40 (79,7) 45 (100)
		Q: 4	26 (86,3) 31 (62,5) 39 (75,9) 44 (100)

Tabla IV-2: Predicción *in silico* de sitios de clivaje para Pch. Se detallan los sitios de corte para las proteasas tripsina y quimotripsina en cada segmento conector entre UFs de Pch. Las secuencias de estos segmentos fueron inferidas empleando la herramienta *Conserved Domain Tool* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). T:Tripsina; Q: Quimotripsina.

IV.B.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAMs) DERIVADOS DE PcH

IV.B.2.I. IDENTIDAD DE LOS PAMs

A partir de la secuencia de PcH se predijo una serie de PAMs empleando el servidor *AntiBacterial Peptides* (AntiBP), de los cuáles los mejores puntuados se analizaron mediante el servidor *Antimicrobial Peptide Database* (APD-3), recabando sus características físicoquímicas de modo de afirmar o rechazar su condición de péptido antimicrobiano. La **Tabla IV-3** recopila las secuencias y características de los PAMs seleccionados.

Identificador	Secuencia	Carga Neta	GRAVY	Índice de Boman (kcal/mol)	PM (kDa)
GYC	GYPLCKDNGHTVAC	+ 0,25	-0,27	0,8	1534,73
GFC	GFPSLCTHEGRKVAC	+1,25	-0,09	1,31	1604,87
IH	IWQELQKKRGKTYDH	+ 2,25	-1,89	3,49	1930,19
DG	DISKAVEHLGKKLNG	+ 1,25	-0,59	1,62	1608,85
DT	DDGKRVACCVHGMAT	+ 0,25	-0,08	1,77	1562,81

Tabla IV-3: PAMs predichos *in silico* a partir de la secuencia de PcH. Los péptidos se obtuvieron mediante el servidor *Antibacterial Peptides* (AntiBP). Los valores de las propiedades físicoquímicas fueron obtenidos mediante el servidor *Antimicrobial Peptide Database* (APD-3).

IV.B.2.II. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PAMs

Los 5 PAMs predichos (**Tabla IV-3**) fueron sintetizados *de novo*, y su actividad antimicrobiana evaluada para bacterias Gram positivas (*Staphylococcus pseudintermedius*) y Gram negativas (*Escherichia coli*).

Los ensayos de difusión en agar revelaron la presencia de halos conspicuos para todos los PAMs cuando se ensayaron sobre bacterias Gram positivas. Para el caso de bacterias Gram negativas, únicamente el péptido DT presentó halo de inhibición (**Fig. IV-4**). No se observó actividad antimicrobiana para la PcH nativa o protelizada *in vitro* bajo las condiciones ensayadas, sugiriendo la necesidad de un mecanismo de clivaje gatillado por estímulos para obtener compuestos con actividad antimicrobiana (**Tabla Apéndice-3**).

Las determinaciones de concentración inhibitoria mínima (CIM) demostraron que todos los péptidos ensayados poseen actividad bacteriostática sobre Gram positivas, o sobre ambos tipos de bacterias en el caso de GYC y DG (**Tabla IV-4**). Debido a dificultades en su solubilidad, la obtención de CIM por método espectroscópico y/o citometría de flujo no pudo determinarse con precisión para algunos de los péptidos.

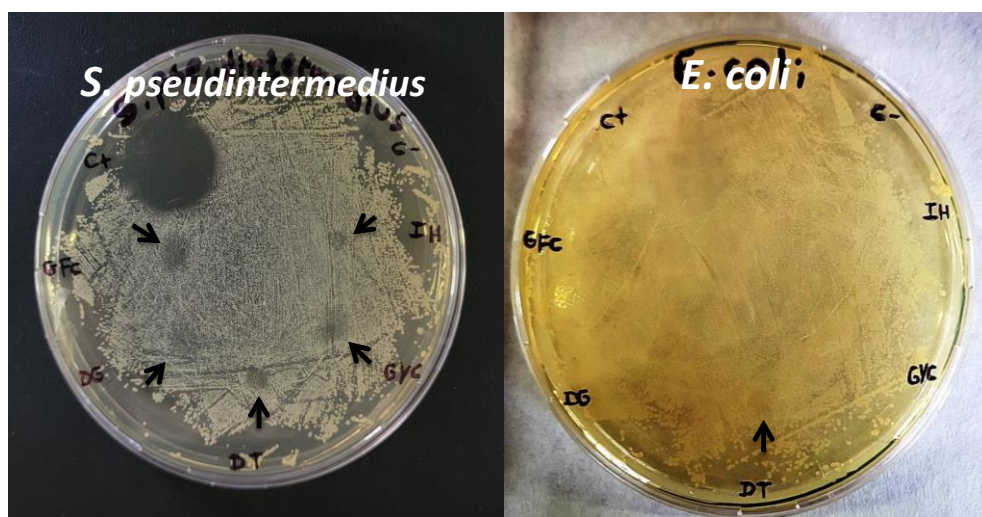


Figura IV-4: Actividad de los PAMs. Ensayos de difusión en agar de los PAMs IH, GYC, DT, DG y GFC contra bacterias Gram positivas (*S. pseudintermedius*) y Gram negativas (*E. coli*). Los halos de inhibición se indican con flechas negras. Penicilina-Estreptomicina se empleó como control positivo (C+).

IV.B.2.III. ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE LOS PAMs

Los ensayos de hemólisis sobre eritrocitos humanos permitieron comenzar a recabar información sobre la bioseguridad de los PAMs empleados. En las condiciones ensayadas, no se observó actividad hemolítica en ninguno de los casos (**Tabla IV-4**).

PAMs (Concentración)	Difusión en Agar		CIM (mM)		Hemólisis
	G+	G-	G+	G-	
<u>GYC</u> (50 mM)	✓	✗	3,12 [E]	12,50 [E]	✗
<u>GFC</u> (50 mM)	✓	✗	6,25 [E]	ND	✗
<u>IH</u> (38 mM)	✓	✗	ND	ND	✗
<u>DG</u> (39 mM)	✓	✗	9,75 [E]	9,75 [CF]	✗
<u>DI</u> (39 mM)	✓	✓	9,75 [CF]	ND	✗

Tabla IV-4: Caracterización de la actividad antimicrobiana y hemolítica de los PAMs empleados. Se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana para los péptidos en medio sólido y líquido. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima; G+: bacterias Gram positivas (*S. pseudintermedius*); G-: bacterias Gram negativas (*E. coli*); ND: no determinado; los métodos para la determinación de CIM fueron [E]: Espectrofotometría (a 620nm); [CF]: Citometría de flujo.

IV.B.2.IV. MODELADO MOLECULAR DE LOS PAMs Y SU UBICACION EN LA ESTRUCTURA DE Pch

Los modelos moleculares de los PAMs mediante el servidor PEP-FOLD mostraron una estructura α -hélice para GFC, IH, DG y DT (este último con una región terminal poco estructurada) y de hoja β -plegada para GYC (Fig. IV-5).

La localización de cada PAM en el modelo de Pch fue evaluada a nivel de las subunidades 1 y 2 del dímero de subunidades (véase Cap. III), lo que permitió valorar su accesibilidad desde el entorno acuoso de la proteína. De este modo: GYC se ubicó del lado interno del cilindro didecamérico, en la UF G, expuesto en la subunidad 1 y más oculto en la subunidad 2; GFC se halló en UF D, bien expuesto en la cara externa del cilindro para ambas subunidades; IH se ubicó en UF A, bien accesible tanto en la cara interna del cilindro para la subunidad 1 como en la externa para la subunidad 2; DG se halló en UF A, en la cara interna del cilindro, más expuesto en la subunidad 1 y más oculto en la subunidad 2; y DT se ubicó en UF A, bien expuesto en la cara externa del cilindro para ambas subunidades. (Fig. IV-6).

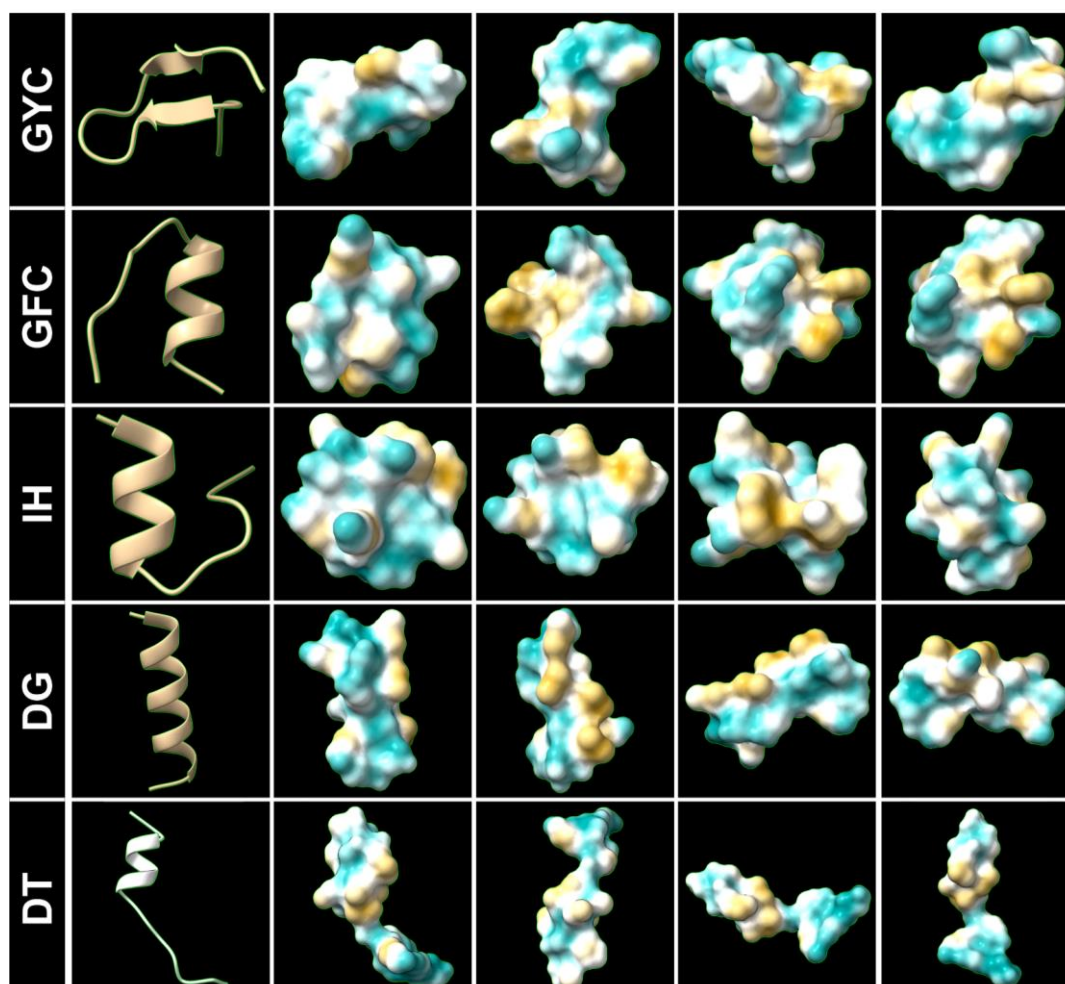


Figura IV-5: Modelos *ab initio* de los PAMs. Se representa la estructura secundaria (primera columna) y la diferencia de polaridad entre caras de cada PAM según la variación amarillo (hidrofóbico) -azul (hidrofílico) en la superficie de las diferentes vistas presentadas (columnas restantes).

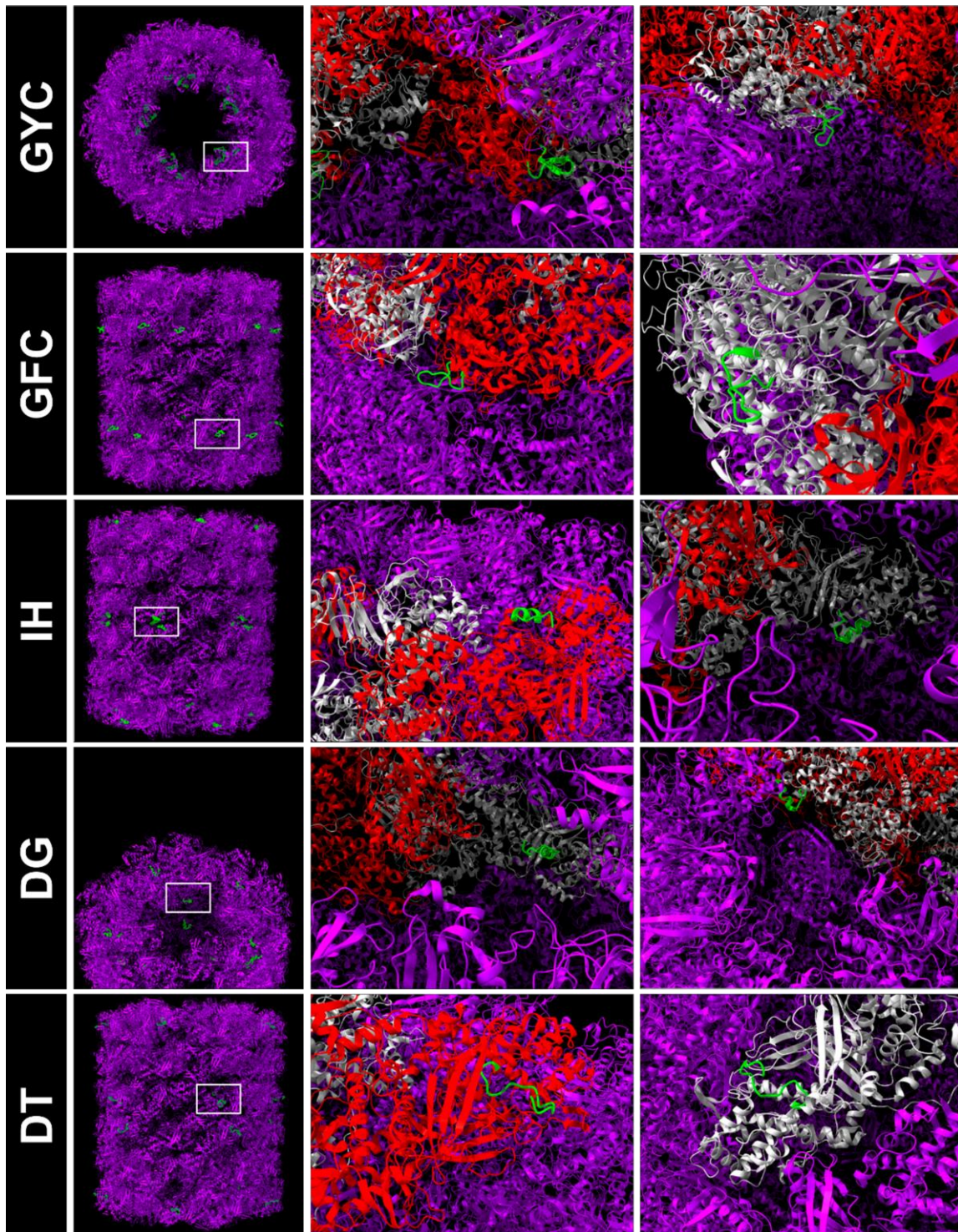


Figura IV-6: Mapeo de los PAMs empleados en el modelo de Pch. En cada fila, la estructura del PAM se resalta en verde sobre la estructura completa de Pch (violeta) y el dímero de subunidades al que pertenece (Subunidad 1: gris, Subunidad 2: rojo).

IV.B.3. ACTIVIDAD AGLUTINANTE DE PcH

IV.B.3.I. AGLUTINACIÓN DE BACTERIAS

El ensayo de actividad aglutinante de PcH se realizó sobre las mismas cepas bacterianas con las que se evaluó la actividad de los PAMs con resultados positivos en ambos casos. Se observó un efecto más pronunciado para *S. pseudintermedius*, mostrando actividad hasta una concentración de PcH de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el caso de los ensayos con *E. coli*, la actividad aglutinante se apreció hasta una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Fig. IV-7**).

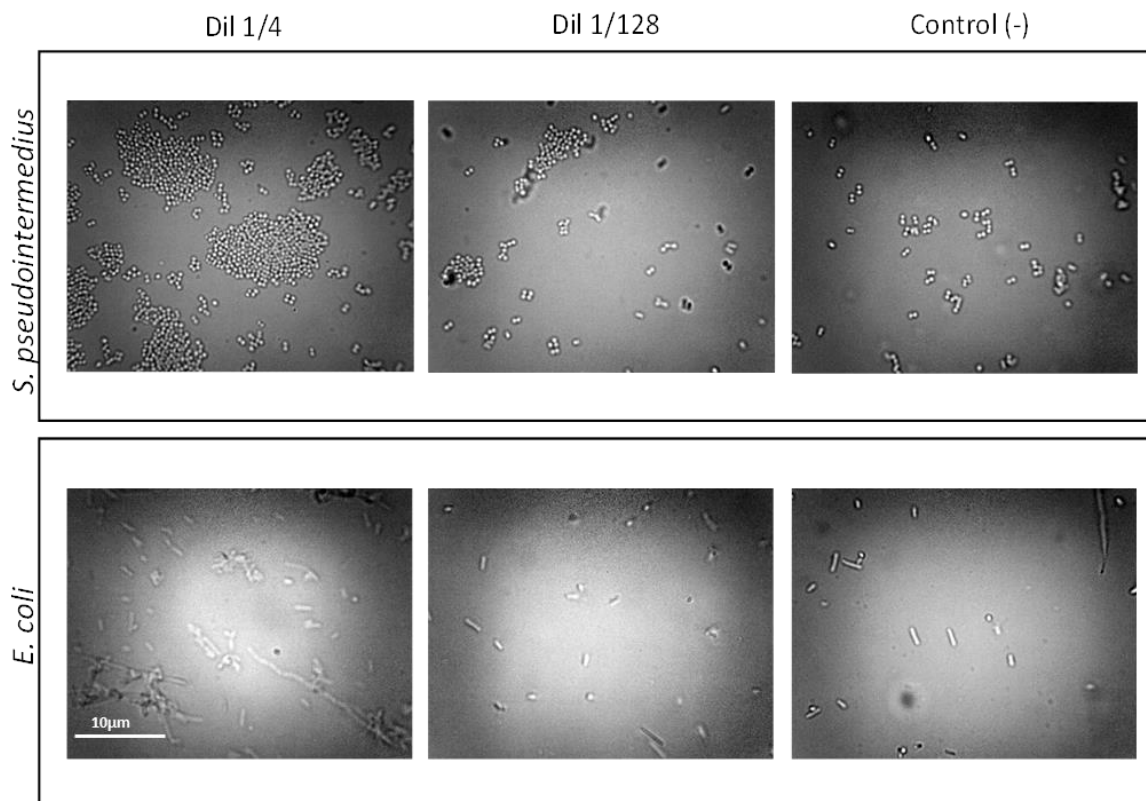


Figura IV-7: Aglutinación de bacterias por PcH. Imágenes de microscopía óptica de las incubaciones de ambos tipos de microorganismos con distintas diluciones de PcH. Como control negativo se empleó buffer Tris 20 mM, CaCl_2 20 mM y MgCl_2 20 mM, pH 7,4. Magnificación 100X.

IV.B.3.II. DOMINIOS TIPO-INMUNOGLOBULINA DE PcH

Una búsqueda *in silico* empleando el servidor InterPro permitió detectar un dominio tipo-Inmunoglobulina (Superfamilia CATH-Gen3D: 2.60.40.2570) en el extremo C-terminal de UF H para cada isoforma de PcH (**Fig. IV-8 A, B**). Este dominio está presente en hemocianinas de 10 especies de gasterópodos según la información

disponible en la base de datos CATH y se superpone en la secuencia proteica con el dominio tipo-cupredoxina C-terminal de las UFs H de hemocianinas de tipo KLH.

El mapeo de estos dominios en el modelo de PcH resuelto por criomicroscopía electrónica, permitió apreciar su ubicación y alto grado de exposición en las UF H (**Fig. IV-8A**). Esto permite especular con la presencia de sitios de interacción específicos, en ambos extremos de un cilindro didecamérico, capaces de participar en la formación de redes o agregados con sus potenciales blancos.

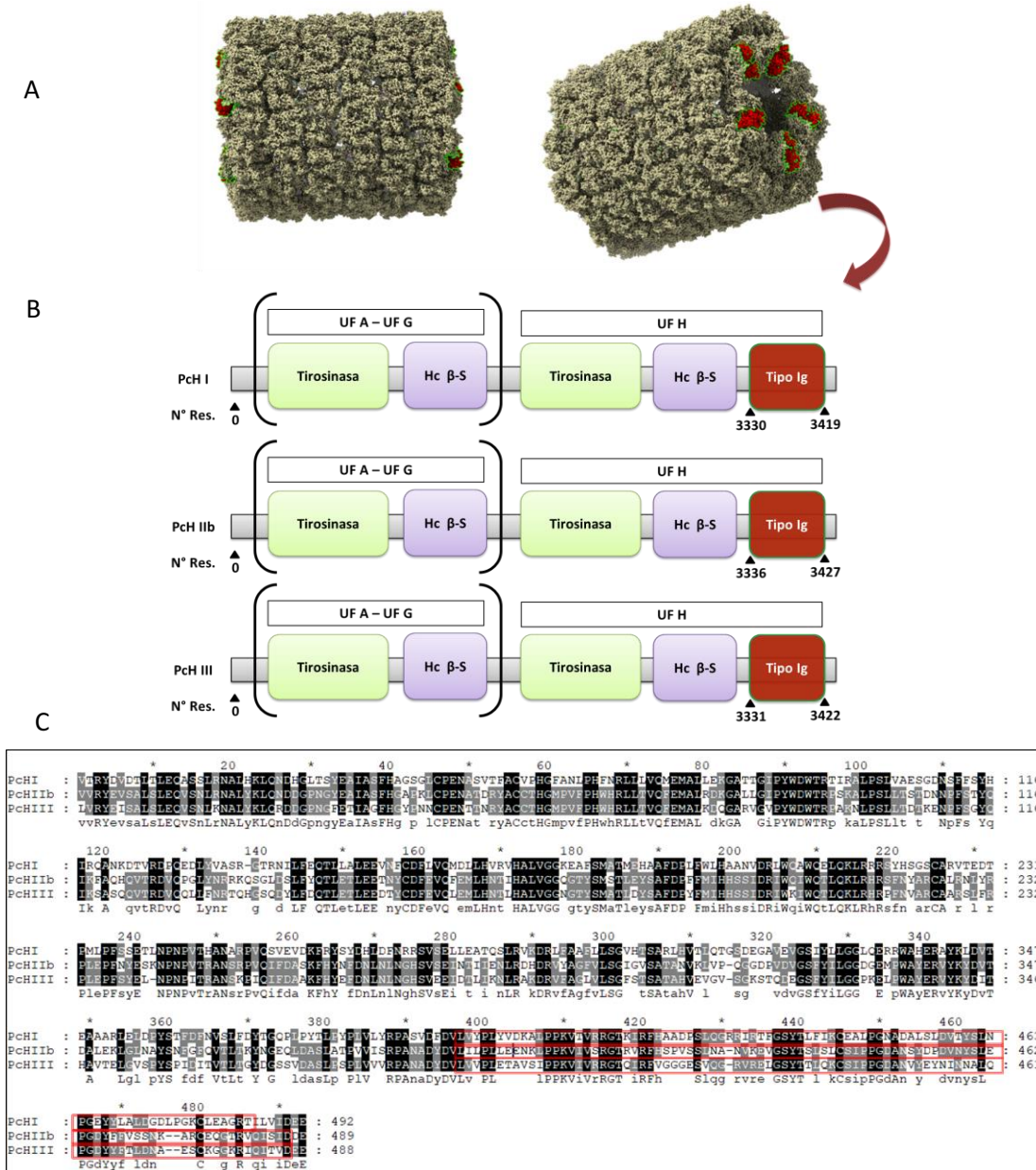


Fig. IV-8: Presencia de dominios tipo-Inmunoglobulina en PcH. (A) Ubicación del dominio tipo-Inmunoglobulina en el didecámero de PcH, observándose su disposición en los extremos; (B) el esquema representa la ubicación del dominio en la secuencia de isoformas de PcH y su posición terminal en UF H. HcβS=dominio β-sandwich hemocianina; Tipo Ig= dominio tipo-Inmunoglobulina. (C) Alineamiento de UFs H de las isoformas de PcH empleando MUSCLE y visualizado por GeneDoc; se recuadra en rojo el dominio tipo-Ig en el extremo C-terminal de las 3 secuencias. La cuarta línea en cada fila del alineamiento corresponde a la secuencia consenso.

IV.C. DISCUSIÓN

La inmunidad innata de invertebrados cuenta con una variedad de mecanismos efectores que actúan de manera concertada, y han favorecido la diversificación de grandes grupos como artrópodos y moluscos (Smith 2010), siendo la hemocianina una de las piezas integrantes de este repertorio defensivo. En este sentido, el presente trabajo comienza a dilucidar algunas de las funciones que Pch podría desempeñar en la inmunidad de *P. canaliculata*.

Así, se observó actividad o-difenoloxidasas en la proteína nativa con catecol como sustrato preferencial y no con dopamina, sustrato empleado por las hemocianinas de otras especies (Dolashki et al. 2011; Coates et al. 2020). Esto, entre otros factores, podría deberse a un sitio activo más estrecho en los dominios α -helicoidales de sus UFs, mínimas unidades que portan un sitio activo, lo cual restringiría el acceso de un sustrato más voluminoso.

El valor de Km obtenido se encuentra en el mismo orden de magnitud que el de las hemocianinas de otros moluscos como *Rapana venosa* y *Octopus vulgaris* (Idakieva et al. 2009; Salvato et al. 1998). Sin embargo, el número de recambio o kcat por UF de 2,9 min^{-1} se encuentra un orden por encima que en el caso de *R. venosa*, sugiriendo leves diferencias en la arquitectura y/o accesibilidad al sitio activo dicúprico.

Bajo ciertas condiciones, la proteólisis limitada de Pch con tripsina, quimotripsina y subtilisina desencadenó un aumento de la actividad específica fenoloxidasas, lo cual fue respaldado cualitativamente mediante el análisis del proteolizado por zimografía. El análisis electroforético de los productos de digestión obtenidos reveló la presencia de bandas de peso molecular en torno a los 50 kDa, compatibles con lo esperado para UFs aisladas. Un análisis *in silico* de los posibles sitios de clivaje para estas proteasas, demuestra la presencia de uno o más de estos sitios sobre los péptidos conectores de las UFs, apoyando así esta observación.

El resto de los sitios de corte predichos se localizaron en el núcleo estructural de las UFs, e incluso uno de ellos por detrás de una región glicosilada, dificultando el acceso de las proteasas. Sin embargo, la digestión proteolítica podría iniciarse a partir de los pocos sitios de clivaje accesibles, y luego desencadenar un efecto dominó en la accesibilidad a otros sitios originalmente menos accesibles.

La evidencia sugiere que el ataque proteolítico provocaría la relajación de la estructura proteica, volviendo más accesibles los sitios activos para catalizar la oxidación de fenoles, y explicaría la inducción enzimática observada experimentalmente.

En la misma línea, se observó que individuos de *Haliothis tuberculata* desafiados con virus presentaron una isoforma de hemocianina donde se apreciaba una reducción en las interacciones entre UFs, tanto al interior de un dímero asimétrico como entre varios de éstos, lo cual contribuiría a la conversión de la hemocianina nativa en una forma más relajada con una mayor actividad fenoloxidasas (Zhu et al. 2014; Yao et al. 2019).

A diferencia de la mayor actividad fenoloxidasas de hemocianinas de quelicerados, que carecen de otras tirosinasas (Terwilliger y Ryan 2006; Jaenicke et al. 2009; Coates et al. 2020), las hemocianinas de moluscos presentan una baja actividad fenoloxidasas. Esto podría verse compensado por su alta concentración en hemolinfa permitiendo desplegar una respuesta rápida y ubicua en los tejidos afectados por patógenos,

inducida por proteasas provenientes del tejido dañado o del propio microorganismo invasor.

Este remodelado proteolítico no sólo gatillaría un aumento en su actividad fenoloxidasa, sino que también podría estar asociado con la liberación de PAMs, sugiriendo un nuevo rol para PcH como precursora de éstos (Coates et al. 2020). El presente trabajo se inscribe en la estrategia de estudio seguida para la hemocianina de *H. tuberculata* (Zhuang et al. 2015), donde se combinó la disponibilidad de secuencias completas de PcH para predecir potenciales PAMs, junto con una alta resolución de un modelo estructural por criomicroscopía electrónica, para posibilitar un análisis de la asequibilidad de las regiones portadoras de PAMs frente un ataque proteolítico.

De esta manera los 5 candidatos a PAMs identificados en la secuencia de PcH, fueron estudiados *in silico* y luego sintetizados, confirmándose experimentalmente su actividad antimicrobiana. Todos se localizaron en posiciones accesibles en al menos una de las cadenas del dímero de subunidades de PcH, siendo plausible su escisión frente a un estímulo adecuado. Del análisis bioinformático de sus secuencias se determinó que los PAMs tienen anfipaticidad y carga neta positiva, propiedad característica de agentes disruptores de membranas celulares conteniendo lípidos de carga negativa (Kumar et al. 2018; Boman 2003). Los resultados son congruentes con la posibilidad de una liberación de PAMs luego de un ataque proteolítico a PcH, si bien la identificación de los aquí descritos no excluye un análisis más abarcativo, entendiendo que la escisión de la hemocianina no generaría un número acotado de PAMs sino más bien un repertorio amplio que podría actuar orquestadamente en un sitio de infección localizado. Cabe destacar que la ausencia de actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos es un primer indicio de la no toxicidad de estos PAMs, lo que cobra importancia en el contexto de la creciente problemática sanitaria por la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos, y la búsqueda de agentes terapéuticos alternativos (Medina y Pieper 2016).

Adicionalmente, PcH mostró actividad aglutinante sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, mecanismo hasta ahora sólo descrito para una hemocianina de moluscos cefalópodos (Alpuche et al. 2010). Esta aglutinación podría asociarse a la presencia de dominios tipo-Inmunoglobulina detectados *in silico* en la UF H de PcH. Ellos se encontrarían bien expuestos en los extremos del didecámero, posibilitando la interacción de múltiples sitios con sus potenciales antígenos (como los componentes de membranas y paredes bacterianas) facilitando la formación de redes o entramados que aglutinarían microorganismos. Tales dominios se superponen casi en totalidad con el dominio tipo-cupredoxina, cuya presencia ha sido hasta ahora sugerida como un relicto derivado de una tirosinasa ancestral, que participaría en la carga de los átomos de cobre al sitio activo (Jaenicke et al. 2010). Si bien serían necesarios estudios más profundos al respecto, el presente análisis nos permite reinterpretar la conservación de este dominio tipo-cupredoxina en hemocianinas de moluscos, no como relicto sino bajo la hipótesis de que presentaría un rol activo como aglutinante en la respuesta inmune frente a patógenos.

En suma, PcH es la primera hemocianina de Ampullariidae para la que se describe la posibilidad de participar en los tres mecanismos expuestos frente a un estímulo patológico local. Esto podría explicar su aparición en grandes concentraciones en los senos sanguíneos del riñón de *P. canaliculata*, una de las principales áreas de barrera inmunológica en la especie (Rodríguez et al. 2018).

De este modo, PcH se constituiría como una molécula efectora del sistema inmune que actuaría de manera concertada, primero aglutinando bacterias para, luego de un remodelado de su estructura, atacarlas *in situ* a través de la inducción de actividad fenoloxidasa y la liberación de PAMs, concentrando así múltiples mecanismos efectores de la inmunidad innata en una sola proteína. Esta capacidad de economizar recursos al diversificar los roles fisiológicos de la hemocianina refuerza la noción de estos pigmentos respiratorios como proteínas multifunción que, de corroborarse en grupos filogenéticamente cercanos, podría significar una ventaja adaptativa para las hemocianinas de tipo KLH.

CAPÍTULO V:

LA HEMOCIANINA DE *Pomacea canaliculata* COMO INMUNOESTIMULANTE

V.A. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas las inmunoterapias han adquirido un interés creciente, especialmente como tratamientos alternativos a la quimioterapia en el combate del cáncer. Entre las alternativas más exploradas se encuentra el empleo de citoquinas, vacunas celulares, anticuerpos monoclonales, terapias génicas e inmunoestimulantes específicos y no específicos (Abbott et al. 2019; Bergman 2019). En particular, el empleo de compuestos con propiedades inmunoestimulantes puede vencer el cuadro tolerogénico instaurado en el microentorno tumoral, y capacitar a las células efectoras del sistema inmune para cumplir su función más eficientemente, promoviendo así la destrucción de las células malignas (Bergman 2019; Hadden 1993). Tradicionalmente, el Bacilo de Calmette-Guerrin (BCG), empleado en otras instancias como vacuna antituberculosa, ha sido utilizado como inmunoestimulante no específico. Sin embargo, la aparición de efectos secundarios en los pacientes ha llevado a la búsqueda de otras opciones (Lamm, 2003).

En este contexto, las hemocianinas de moluscos han surgido como alternativas promisorias. Las propiedades inmunogénicas de estas proteínas han sido estudiadas desde 1970, tanto en modelos *in vitro* utilizando distintas líneas celulares, principalmente de células presentadoras de antígeno (CPAs), así como en modelos *in vivo* empleando animales de experimentación. Una serie de factores se han asociado con su inmunogenicidad, destacándose: su gran tamaño que permite un lento procesamiento y presentación sostenida por las CPAs, y su particular patrón de glicosilación que incluye componentes que recuerdan a los antígenos aberrantes presentes en células tumorales (Becker et al. 2014).

La hemocianina de la lapa californiana *Megathura crenulata* fue la primera en ser investigada en sus propiedades inmunogénicas, y actualmente es la única aprobada para su uso en terapias antitumorales contra el cáncer de vejiga superficial con recidivas (Curtis et al. 1970; 1971; Olsson et al. 1974). Al tratarse de una proteína con estructura oligomérica compleja y un patrón de glicosilación particular con características propias de moluscos, como residuos de fucosa, xilosa y/o hexosas metiladas (Staudacher 2021), no se ha logrado producir KLH de manera recombinante, debiendo purificarse de su fuente de origen animal. Como consecuencia de esto, el aumento en la demanda de KLH en los últimos años ha significado un impacto continuo sobre las poblaciones nativas de *M. crenulata* (Harris y Markl, 1999), generando la necesidad de buscar nuevas hemocianinas con características similares a KLH o mejoradas. Así, otras hemocianinas están siendo activamente estudiadas por su rol inmunoestimulante, destacando aquéllas de los gasterópodos *Fisurella latimarginata*, *Concholepas concholepas*, *Rapana venosa* y *Helix aspersa* (FLH, CCH, RtH y HaH, respectivamente), con resultados prometedores (Stoyanova et al. 2024; Arancibia et al. 2014; Arancibia et al. 2012; De Ioannes et al. 2004; Becker et al. 2009).

El presente capítulo se propone evaluar las propiedades inmunoestimulantes de la hemocianina de *Pomacea canaliculata*. Particularmente, se indaga sobre los cambios desencadenados en una línea celular de monocitos humanos THP-1, bien establecida como modelo para ensayos de respuesta inmune (Baxter et al. 2020), así como su efecto sobre la inmunidad humoral en un modelo murino de experimentación y el rol que el patrón de glicosilación de Pch podría desempeñar en tales efectos.

V.B. RESULTADOS

Las diferentes preparaciones de PcH utilizadas en los ensayos con células y animales no mostraron niveles detectables de LPS.

V.B.1. EFECTO DE PcH SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

El efecto de PcH sobre la viabilidad celular fue evaluado mediante ensayos de MTT. Los resultados revelaron que, en el rango de concentración utilizado, la proteína no afecta la viabilidad celular en el modelo de macrófagos derivado de monocitos humanos THP-1 empleado. En las diferentes condiciones de ensayo utilizadas, no se aprecian diferencias significativas en la generación de cristales de formazán, producto de la reducción del MTT por el metabolismo mitocondrial. Se muestran los resultados luego de 3 y 24 h de incubación con PcH (**Fig. V-1**).

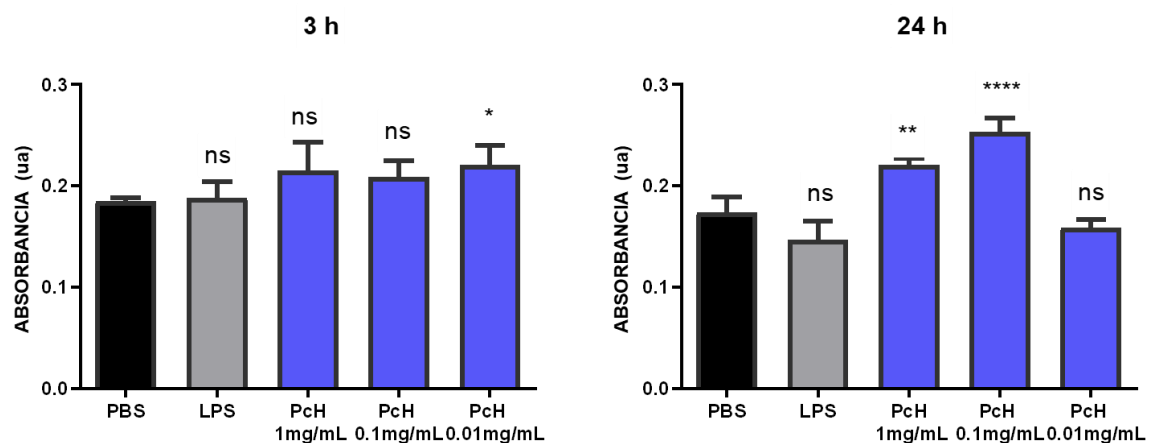


Figura V-1: Evaluación de la citotoxicidad de PcH sobre células THP-1. Viabilidad celular de macrófagos luego de 3 y 24h de exposición a 1; 0,1 y 0,01 mg/ml de PcH. Las barras representan la media \pm 1 DE de 5 determinaciones independientes para cada tratamiento. PBS: buffer fosfato salino; LPS: lipopolisacárido. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: *= $P < 0,05$; **= $P < 1 \times 10^{-3}$; ****= $P < 1 \times 10^{-4}$; ns=no significativo (con respecto a PBS).

V.B.2. EFECTO DE PcH SOBRE EL PERFIL DE CITOQUINAS SECRETADAS

V.B.2.I EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE PcH

La medición de las citoquinas TNF- α e IL-1 β por ELISA en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos, empleando las mismas condiciones del ensayo anterior, reveló un aumento significativo de ambas para los macrófagos tratados con PcH respecto al control (**Fig. V-2**).

Para los siguientes experimentos se seleccionó una concentración de PcH de 1mg/mL ya que fue la que produjo el mayor efecto sin ser citotóxica (véase subsección anterior).

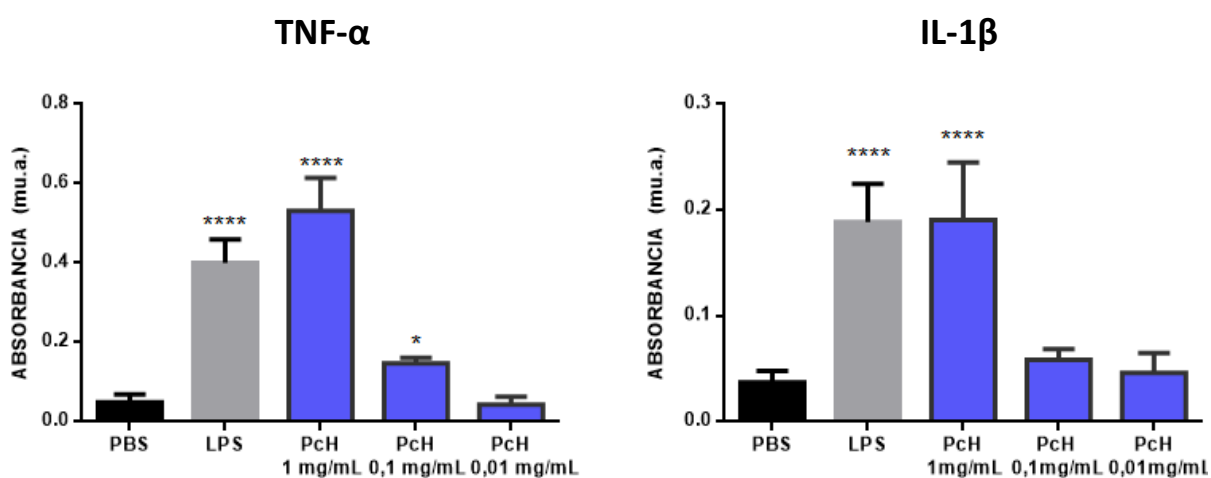


Fig. V-2: Perfil de secreción de citoquinas de macrófagos. Niveles de TNF- α e IL-1 β secretadas en respuesta a tratamientos de concentraciones crecientes de PcH. PBS y LPS como control negativo y positivo, respectivamente. Las barras representan la media \pm 1 DE de 5 determinaciones independientes para cada tratamiento. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: **** = $P < 1 \times 10^{-4}$; * = $P < 0,05$.

V.B.2.II. INFLUENCIA DE LA GLICOSILACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE

El aporte de la glicosilación de PcH sobre su efecto inmunoestimulante comenzó a indagarse mediante ELISA, evaluando las mismas citoquinas antes mencionadas. Al emplear PcH deglicosilada químicamente (ver sección II.D.2.1) se observó que el tratamiento provocó una disminución en la secreción de TNF- α e IL-1 β en comparación con la PcH nativa, incluso la secreción de IL-1 β no se diferenció de las células control. Resultados similares fueron observados cuando la proteína fue deglicosilada enzimáticamente empleando PNGasa F, con una reducción significativa de la secreción de TNF- α y una tendencia a disminuir la secreción de IL-1 β (**Fig. V-3**). La deglicosilación

de PcH pudo verificarse por la movilidad electroforética diferencial de la muestra tratada con respecto a una muestra nativa (**Fig. Apéndice-5**).

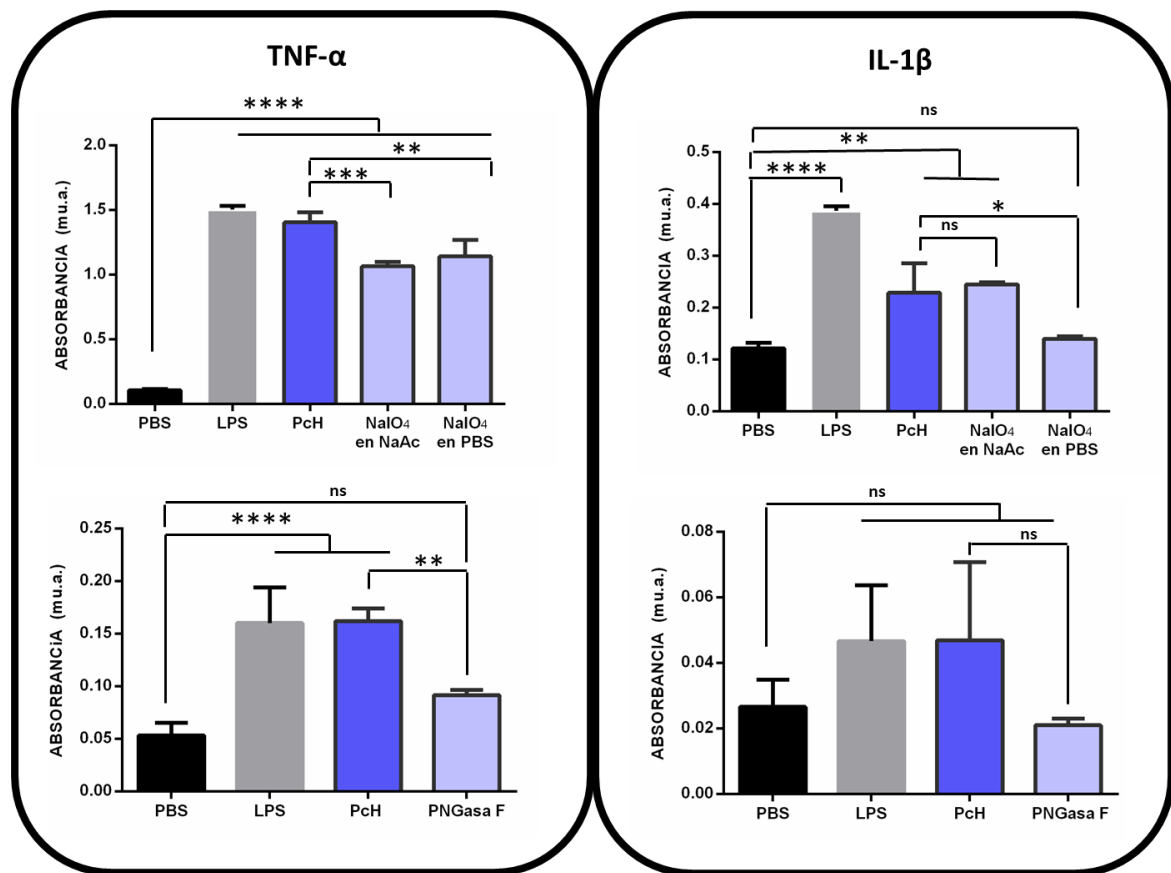


Figura V-3: Efecto de la deglicosilación de PcH sobre la secreción de citoquinas.

NaIO₄ en NaAc: PcH 1 mg/mL deglicosilada con NaIO₄ 15 mM en NaAc 0,1 M pH=5,5. NaIO₄ en PBS: PcH 1 mg/mL deglicosilada con NaIO₄ 15 mM en PBS pH=7,2. PNGasa F: PcH 1 mg/mL deglicosilada con PNGasa F 500 U/mL. Las barras representan la media \pm 1 DE de 5 determinaciones independientes para cada tratamiento. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*:

* = $P < 0,05$; ** = $P < 1 \times 10^{-2}$; *** = $P < 1 \times 10^{-3}$; **** = $P < 1 \times 10^{-5}$; ns= no significativo.

V.B.3. PATRÓN DE GLICOSILACIÓN ASOCIADO A LA INMUNOGENICIDAD

El contenido total de carbohidratos de PcH fue de 2,8% (p/p). El ensayo de *Lectin blotting* permitió inferir ciertas estructuras de oligosacáridos en el patrón de glicosilación de la proteína, de acuerdo a las especificidades de unión de cada lectina empleada (Goldstein y Hayes, 1978).

Así, la reacción marcadamente positiva para ConA y el patrón de N-glicosilación revelaron la presencia de abundantes glicanos con núcleo de trimanosidos. La unión de PSA y LCA se corresponde con oligosacáridos N-ligados conteniendo manosas α -ligadas. La presencia de galactósidos puede inferirse por la reacción positiva para DBA,

SBA y PNA; la primera resaltando la presencia de N-acetilgalactosamina (GalNAc) α -ligadas, mientras que la segunda indicaría residuos terminales de GalNAc y galactopiranosilos. Finalmente, PNA permite reconocer al disacárido terminal β -galactosil-(1 \rightarrow 3)-N-acetilgalactosamina, que sería compatible con la estructura no sustituida del llamado antígeno de Thomsen-Friedenreich o antígeno T (**Tabla V-1**).

Lectinas	Intensidad (u.a.q.)	Especificidad
ConA	+++	Glicanos con núcleo de trimanósidos y Man α -1-6[Man α 1-3]Man N-ligados a Asn
DBA	++	GalNAc α -ligadas
PNA	++	Preferencialmente a Antígeno T y otras estructuras terminales que contienen Gal-(β -1,3)-GalNAc
SBA	+	Residuos terminales α - y β -GalNAc y galactopiranosilos Oligosacáridos con GalNAc terminales α - o β -ligadas y, en menor extensión, residuos de galactosa
UEA-I	-	Residuos de fucos α -ligados, como en el caso de grupos sanguíneos ABO
WGA	-	GlcNAc, con unión preferencial por dímeros y trímeros de este monosacáridos
RCA-I	-	Residuos de Gal o GalNAc
ECL	+	Glicoproteínas de membrana y suero de mamíferos (la sustitución con de estas estructuras con ácido siálico parece impedir la unión de la lectina)
PSA	+++	Oligosacáridos conteniendo manosa α -ligada (muy similar a LCA)
PVL	++	Residuos terminales de β -GluNAc
LCA	+	Muy similar a PSA
JAC	-	Sólo oligosacáridos con enlace O-glicosídico, preferencialmente Gal-(β -1,3)-GalNAc
BSL	+	Residuos de α -GalNAc y α -Gal

Tabla V-1: Patrón de glicosilación de Pch. Las reacciones positivas para el ensayo de *Lectin blotting* se resaltan en verde. u.a.q.: Unidades arbitrarias de quimioluminiscencia. Man: manosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gal: galactosa.

V.B.4. INMUNOREACTIVIDAD

Mediante un ensayo de *Western blot* se demostró que existe una baja reactividad cruzada con las hemocianinas de gasterópodos marinos (**Fig. V-4**), sugiriendo así la presencia de epitopes en Pch que estarían ausentes o poco representados en el caso de CCH y FLH.

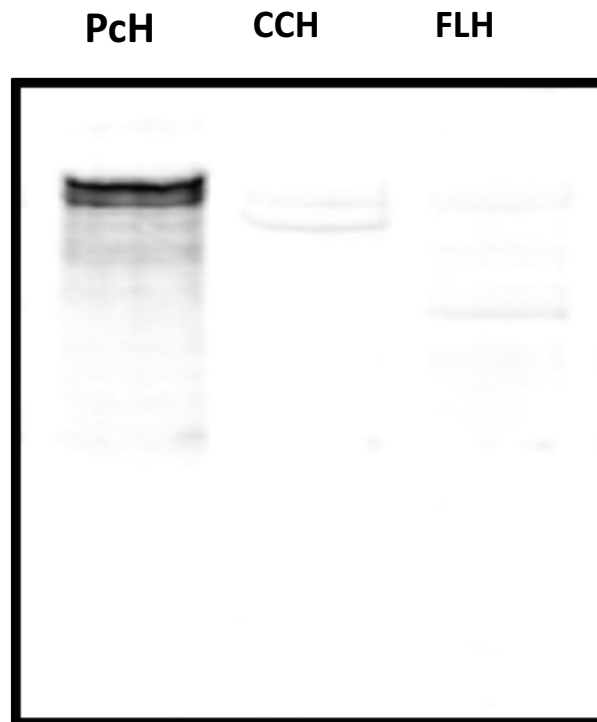


Figura V-4: Reconocimiento de epitopes de hemocianinas de gasterópodos. La posibilidad de reacción cruzada se evaluó empleando suero policlonal anti-Pch. CCH: hemocianina de *Concholepas concholepas*; FLH: hemocianina de *Fisurella latimarginata*.

V.B.5. EFECTO DE PcH SOBRE LA DIFERENCIACIÓN MONOCITO-MACRÓFAGO

V.B.5.I. ADHESIÓN CELULAR

Los monocitos THP-1 expuestos por 24 h a PcH sufrieron un cambio fenotípico de células en suspensión a células adherentes. Este proceso coincidió con el efecto de diferenciación por incubación con el control positivo PMA. La presencia de células adherentes o en suspensión se determinó empleando marcación nuclear con el fluoróforo Hoescht-33258 mediante un lector de placas (**Fig. V-5A**), y visualizaron en ambas condiciones por microscopia de fluorescencia (**Fig. V-5B**).

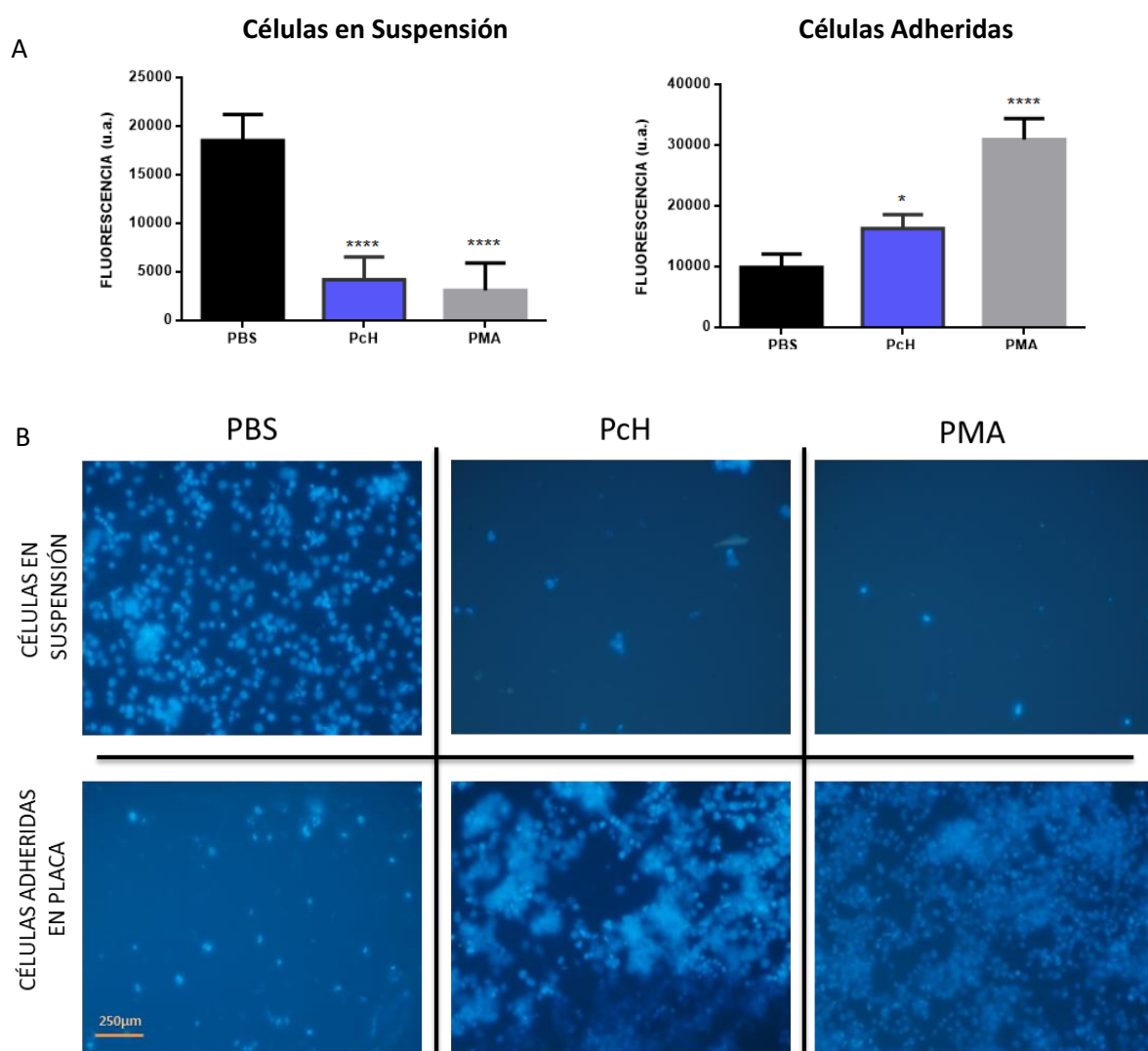


Figura V-5: Efectos de PcH sobre la adhesión celular en monocitos. Los monocitos THP-1 fueron expuestos a PcH 1mg/mL, PBS y PMA 5 ng/mL como control negativo y positivo de la diferenciación monocito-macrófago, respectivamente. (A) Intensidad de fluorescencia del agente intercalante Hoescht-33258. Las barras representan la media \pm 1 DE de 4 determinaciones independientes para cada tratamiento Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: ****= $P < 1 \times 10^{-4}$; *= $P < 0,05$. (B) Observación de células adheridas y no adheridas al microscopio de fluorescencia (magnificación 10X). PMA: forbol-12-miristato-13-acetato.

V.B.5.II. MORFOLOGÍA CELULAR

Los ensayos por citometría de flujo demostraron que, ante la exposición de monocitos THP-1 a PcH, la población celular sufría cambios morfológicos compatibles con un proceso de diferenciación a macrófago. Las regiones delimitadas en los gráficos de *FSC* vs *SSC* por comparación con un control negativo, revelaron la aparición de una subpoblación de mayor complejidad interna (asociada con biogénesis de organelas) evidenciada en el aumento del número de eventos (células) adquiridos en el parámetro *side scatter*; así como de una reducción en el tamaño, según da cuenta la adquisición de la mayoría de los eventos en una región con menores valores del parámetro *forward scatter*. Tales cambios, desencadenados por PcH, se condicen con el efecto de PMA como control positivo para esta diferenciación (**Fig. V-6**).

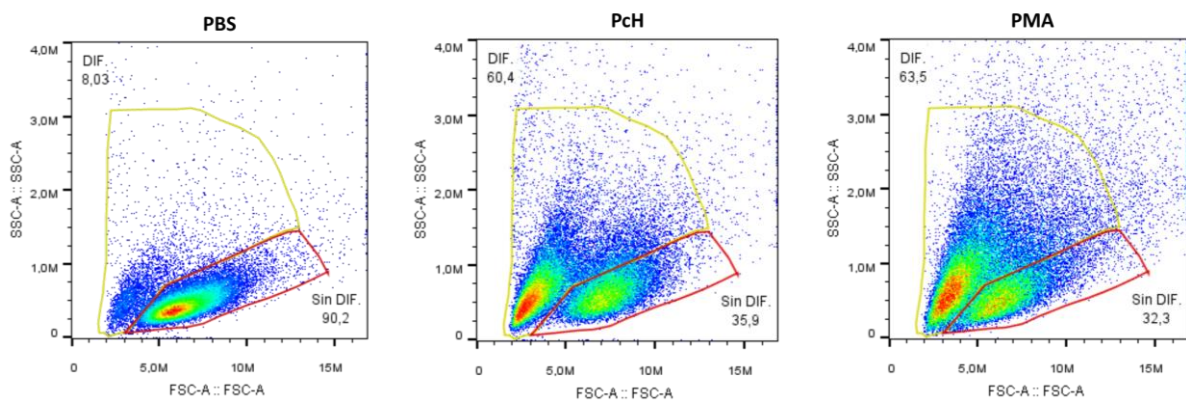


Figura V-6: Cambios morfológicos de los monocitos por exposición a PcH. Los gráficos son representativos de 3 muestras independientes. DIF: monocitos diferenciados; Sin DIF: monocitos sin diferenciar. *SSC*: *Side scatter* (medida de complejidad celular); *FSC*: *Forward scatter* (medida del tamaño celular).

V.B.5.III. METABOLISMO CELULAR

En respuesta a la exposición a PcH, la subpoblación de monocitos con una reducción de tamaño también presentó cambios metabólicos, evidenciados por reducción de la intensidad de fluorescencia para la sonda MitoTracker, con respecto a la subpoblación tratada sólo con PBS (**Fig. V-7A**).

Esta disminución en la intensidad de fluorescencia media de la sonda, asociada a una hiperpolarización de la membrana mitocondrial, indica un desvío hacia un fenotipo glucolítico que sería congruente con una diferenciación de monocito a macrófago tipo M1 (**Fig. V-7B**).

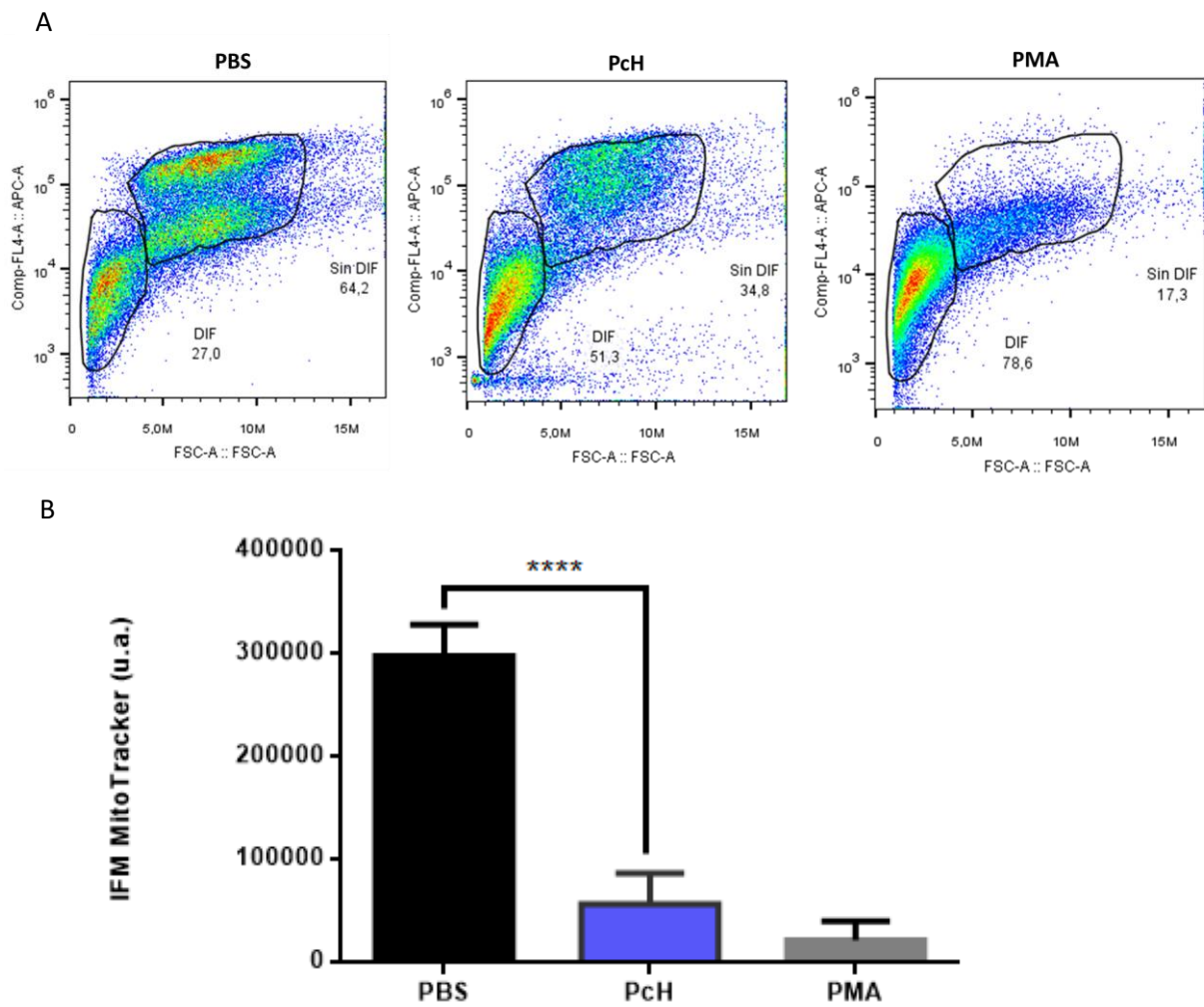


Figura V-7: Cambios metabólicos de los monocitos expuestos a PcH. (A) Fluorescencia de la sonda mitocondrial MitoTracker vs. *FSC* por efecto del tratamiento con PBS, PcH 1mg/mL y PMA. DIF=monocitos diferenciados; Sin DIF= monocitos sin diferenciar. Comp-FL4= Fluorescencia en el canal de emisión del MitoTracker; *FSC* = *Forward scatter* (medida del tamaño celular). (B) Intensidad de fluorescencia media (IFM) del MitoTracker. Las barras representan la media \pm 1 DE de 4 determinaciones independientes para cada tratamiento. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: ****= $P < 1 \times 10^{-4}$.

V.B.5.IV. EXPRESIÓN DEL MARCADOR PAN-MACRÓFAGO CD68

El análisis por *Western blot* reveló un aumento en la expresión del marcador panmacrófago CD68 para las células tratadas con PcH y con PMA como control positivo respecto al control negativo PBS. Las proporciones relativas se determinaron mediante densitometría de las bandas (**Fig. V-8**).

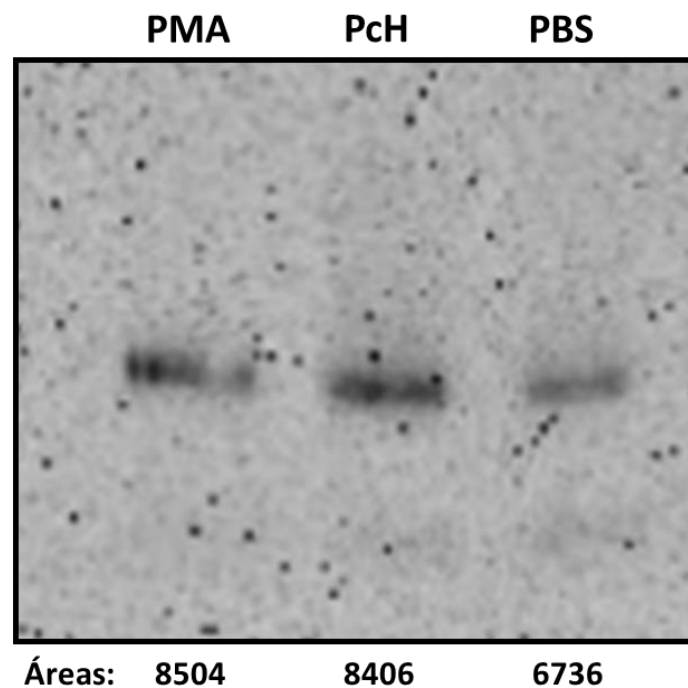


Figura V-8: Análisis de expresión de CD68 por Western Blot. La densitometría de las bandas inmunodetectadas permite convertirlas en picos de intensidad, cuyas áreas para cada tratamiento se muestran al pie de cada calle, expresados en cm².

V.B.5.V. EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN M1-M2

Luego de la exposición de monocitos THP-1 a PcH durante 36h se observó un aumento significativo en la expresión de dos marcadores de diferenciación a macrófagos tipo M1, éstos fueron CD80 y CD86 (**Fig. V-9**). No se evidenció ningún cambio en la expresión de los marcadores del tipo M2 ni de los restantes para ese mismo período, así como para ninguno de los marcadores estudiados tras incubaciones de 72 h.

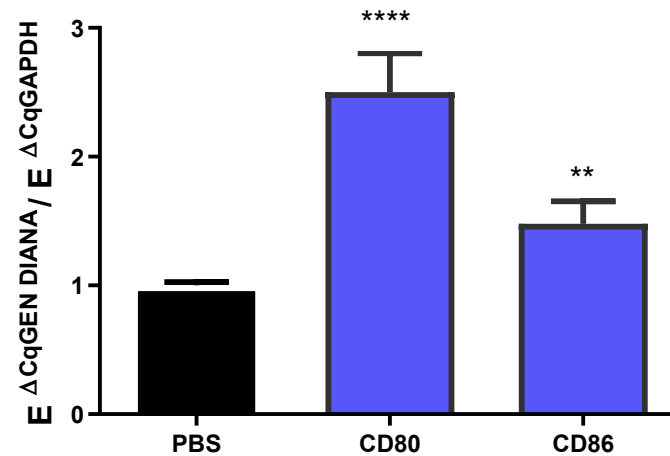


Figura V-9: Análisis de sobre-expresión génica de marcadores de diferenciación a macrófago M1. Los niveles de expresión se compararon por cuantificación relativa contra PBS como control negativo, empleando GAPDH como gen reportero. Las barras representan la media \pm 1 DE de 4 determinaciones independientes para cada tratamiento. Prueba de ANOVA y Tukey *post hoc*: ****= $P < 1 \times 10^{-3}$; **= $P < 1 \times 10^{-2}$.

V.B.6. RESPUESTA HUMORAL A Pch

Los títulos de IgG de los sueros de ratones que siguieron un esquema de inmunización idéntico con Pch y KLH, dieron cuenta de una respuesta humoral de nivel equivalente para ambas hemocianinas (**Fig. V-10**). La señal de IgG de los sueros de animales inmunizados con PBS fue indetectable en el rango de diluciones a las que se determinó el título de anticuerpos en los animales inmunizados.

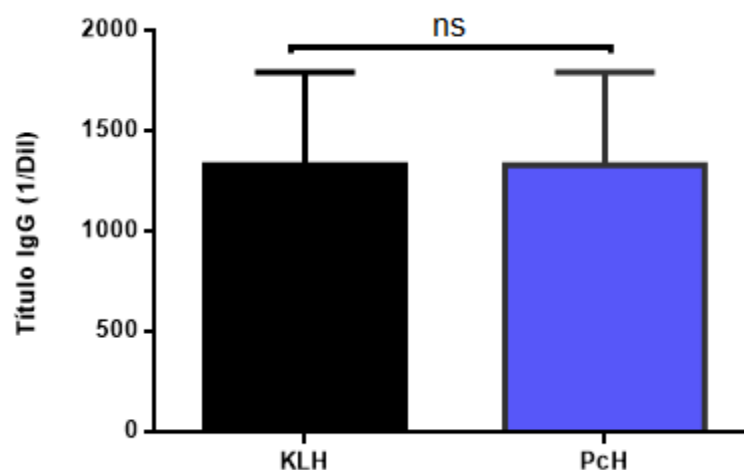


Figura V-10: Respuesta humoral de ratones inmunizados con Pch y KLH. El título de IgG en el suero de ratones inmunizados con Pch y KLH fue determinado por ELISA. Las barras representan el promedio \pm DE de 3 determinaciones independientes. Prueba de Mann-Whitney: ns= no significativo.

V.C. DISCUSIÓN

El estudio del efecto inmunogénico de PcH arrojó resultados positivos, ampliando el número de hemocianinas a considerar para su potencial aplicación.

Los ensayos *in vitro* sobre cultivos de la línea celular humana THP-1 evidenciaron que PcH es capaz de desencadenar sobre los macrófagos un perfil de secreción de citoquinas que se corresponde con una respuesta de tipo proinflamatoria.

En este sentido, la inmunogenicidad de las hemocianinas de moluscos ha sido en parte adjudicada a su peculiar glicosilación (Staudacher 2021; Kato et al. 2017; Siddiqui et al. 2007; Becker et al. 2009), lo cual es compatible con la disminución en la secreción de las dos citoquinas evaluadas, tanto TNF- α como IL-1 β , que se observó al replicar estos ensayos con PcH deglicosilada. Tal efecto redobla el interés por la caracterización de los oligosacáridos asociados.

El contenido de carbohidratos en PcH fue similar al de otras hemocianinas de gasterópodos, como CCH (Becker et al. 2009), aunque difirió en algunos aspectos de su patrón de glicosilación. En este sentido, PcH portaría oligosacáridos N-ligados del tipo alta manosa y estructuras de tipo híbrido, junto con otros del tipo complejo. El resultado positivo para la unión de las lectinas PNA y SBA indicaría la presencia de antígeno T (Gal- β 1,3-GalNAc), reconocido tradicionalmente como antígeno tumoral de expresión aberrante (Fu et al. 2016; Blum 1984). Este perfil de glicosilación de PcH con abundancia de N-glicanos fue similar al observado en KLH, la única hemocianina por el momento aprobada para uso terapéutico (Gatsogiannis y Markl, 2009).

Aunque más estudios son necesarios, la ausencia de reactividad cruzada de otras hemocianinas similares como FLH o CCH (De Ioannes et al. 2004; Gesheva et al. 2014), sumado a las particularidades halladas en el patrón de glicosilación de PcH, sugieren marcadas diferencias estructurales con otras hemocianinas de gasterópodos que podrían implicar sitios de reconocimiento, vías de transducción de señales y/o presentación antigénica diferenciales. En ese sentido, cabe recordar que el modelo de PcH por *CryoEM* reveló que la mayoría de los glicanos se encontraban bien expuestos en la superficie externa del didecámero siguiendo un patrón repetitivo, rasgo que podría facilitar el reconocimiento de PAMPs por las células efectoras del sistema inmune. Asimismo, la particular estabilidad de PcH frente a un rango amplio de pH podría promover un procesamiento más lento en los endosomas de CPAs durante la vía de presentación antigénica (véase Capítulo III), potenciando así su capacidad inmunogénica.

Los cambios fenotípicos observados luego de incubar monocitos THP-1 con PcH, incluyendo el aumento en la adhesión celular, una marcada modificación en la proporción de las subpoblaciones según la morfología observada por citometría de flujo y un aumento en la expresión del marcador panmacrófago CD68, son compatibles con una diferenciación celular a macrófagos (Baxter et al. 2020; Hoefert et al. 2015; Daigneault et al. 2010; Pulford et al. 1990). Cabe aclarar que, para los ensayos de adhesión celular, algunas células pudieron perderse durante los pasos de lavado, debido a un proceso de diferenciación más progresivo para el caso de PcH, lo que

impediría que todas las células muestren un fenotipo adherido final en el mismo tiempo que PMA.

Por los resultados expuestos, se observa que el efecto inmunogénico de PcH no se limitaría a la acción sobre macrófagos ya diferenciados, sino que sería incluso capaz de promover su diferenciación desde monocitos inmaduros.

Estos hallazgos alentaron a continuar indagando sobre el efecto inmunogénico de PcH sobre monocitos, en particular sobre su diferenciación. Así, se encontró un aumento en la expresión de los marcadores CD80 y CD86, indicadores de un fenotipo de macrófago M1 (Shapouri-Moghaddam et al. 2018), mientras que no se halló aumento de la expresión de los marcadores de macrófago M2 en las condiciones de incubación ensayadas. El fenotipo observado resultó ser menos dependiente del metabolismo oxidativo, sugiriendo también una diferenciación a macrófago M1, más dependiente de la vía glucolítica para sus requerimientos energéticos (Monteiro et al. 2020; O'Neill et al. 2016). En conjunto, estos resultados posicionan a PcH como un inmunoestimulante que direccionaría la diferenciación hacia un fenotipo de macrófago M1, típicamente asociado con una respuesta proinflamatoria. Finalmente, como una primera aproximación al estudio de la capacidad inmunoestimulante de la PcH *in vivo*, se evaluó la respuesta humoral en ratones de la cepa C57BL/6 observándose una potente respuesta, con un título de anticuerpos similar al obtenido con KLH.

En el contexto de la creciente demanda de KLH, que sólo se produce a partir de su fuente animal, los resultados aquí presentados dan sustento para la postulación de PcH como nuevo agente inmunoterapéutico. En efecto, ésta se extraería por un método no letal (exsanguinación) de un organismo dulceacuícola, fácil de criar y con un ciclo de vida corto que favorece el establecimiento y mantenimiento de colonias, cuya biología ha sido ampliamente estudiada y su genoma secuenciado (Rodríguez et al. 2022; Ip et al. 2018; Martín et al. 2017; Hayes et al. 2015; Heras et al. 2008; Estebenet y Cazzaniga, 1993). Además, PcH contaría con un método de purificación relativamente simple y fácilmente escalable, un modelo de su estructura proteica en alta resolución, y datos que muestran que posee una considerable estabilidad estructural en un amplio rango de pH y temperaturas facilitando su preservación, según hemos descripto previamente. En suma, estas características de PcH, algunas de ellas particulares entre las hemocianinas de moluscos, representan un escenario alentador para profundizar el estudio sobre su capacidad inmunoestimulante en vertebrados, evaluando potenciales aplicaciones biomédicas para esta hemocianina.

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo de Tesis Doctoral concluye, a modo de puntos destacados, que la hemocianina de *Pomacea canaliculata* (PcH):

- ❖ Puede obtenerse pura en grandes cantidades. Al menos dos de sus isoformas pueden separarse en base a sus propiedades fisicoquímicas.
- ❖ Presenta una estructura de tipo KLH, describiéndose en su modelo 3D nuevas interacciones estabilizadoras para este tipo de estructura. La posición conservada de sus glicanos va en línea con el rol sugerido en la estabilización estructural y efecto cooperativo para otras hemocianinas.
- ❖ Es estructuralmente estable frente a un amplio rango de pH y temperaturas, aunque su afinidad por el O₂ tiende a disminuir por encima de los 24 °C. Se verificó por primera vez la presencia de lípidos asociados a una hemocianina de gasterópodo.
- ❖ Posee una baja actividad o-difenoloxidasas intrínseca, con parámetros cinéticos similares a los de otras hemocianinas. La proteólisis limitada aumentaría esta actividad por una relajación/remodelado estructural que facilitaría la accesibilidad al sitio activo.
- ❖ Contiene en su estructura péptidos con actividad antimicrobiana accesibles para su liberación por ataque proteolítico.
- ❖ Cuenta con la capacidad de aglutinar bacterias, hecho que podría relacionarse con la presencia de dominios tipo-Inmunoglobulina orientados y expuestos hacia el exterior de su estructura.
- ❖ Tiene actividad inmunoestimulante en vertebrados, con un perfil de secreción de citoquinas del tipo proinflamatorio. Su patrón de glicosilación, similar al descrito para KLH, juega un papel importante en este efecto.
- ❖ Su inmunogenicidad incluye la capacidad de inducir *in vitro* la diferenciación monocito-macrófago y de establecer *in vivo* una respuesta humoral a niveles similares a KLH.

El presente trabajo ilustra la íntima relación que existe entre el conocimiento generado en el área de la biología estructural y aquél asociado al campo de la biología funcional. Esta interrelación permite tender puentes cada vez más estrechos entre la bioquímica de proteínas y la ecología o la inmunología, guiando en la formulación de hipótesis de trabajo, siempre interpretadas en el marco de un contexto evolutivo.

En este sentido, la caracterización bioquímica y estructural de Pch aquí presentada constituye los cimientos de posteriores estudios que permitirían mejorar la interpretación sobre el transporte de O₂ y las funciones accesorias propuestas para las hemocianinas de moluscos, así como avanzar hacia una caracterización más completa de las isoformas y su papel en la construcción del decámero.

Por otra parte, aquí se propone a Pch como proteína efectora multifunción en la inmunidad innata, siendo capaz de aglutinar microorganismos en un contexto de infección y, bajo un remodelado estructural por ataque proteolítico, actuar como fenoloxidasa y liberar PAMs.

Los aportes al conocimiento de la inmunidad innata podrían ampliarse mediante desafíos inmunológicos para evaluar la presencia de PAMs en hemolinfa y la expresión diferencial de isoformas de Pch.

En paralelo, se propone a Pch como nuevo agente inmunoestimulante, proveniente de una especie dulceacuícola fácilmente asequible, en contraste con las hemocianinas hasta ahora estudiadas que derivan de especies marinas con biodisponibilidad reducida. Los avances a futuro podrían indagar acerca de las rutas de transducción de señales y la determinación de la estructura de glicanos de Pch asociadas con su inmunogenicidad, así como una mayor profundización de su efecto en modelos *in vivo*.

El potencial de Pch como agente inmunoestimulante, así como el de sus PAMs derivados, recuerda la importancia de continuar explorando la diversidad biológica en búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Finalmente, cabe mencionar la interrelación de la variedad de resultados alcanzados en esta tesis, desde la caracterización estructural y funcional hasta la evaluación de la inmunogenicidad. En este punto, el límite entre el conocimiento básico y el aplicado parece volverse difuso, entendiéndolos como herramientas complementarias en el camino de la investigación y no como compartimentos estancos. Desde esta visión, ambos pueden nutrirse y apoyarse mutuamente, más que generar áreas de incumbencia excluyentes. Quizás sea éste uno de los desafíos más importantes que plantea la labor científica: cuestionar nuestros propios prejuicios acerca de la finalidad de nuestros proyectos y permitirse aprender lo mejor de cada área, empleándolo para aportar mayor dinamismo a nuestro trabajo y, en definitiva, contribuir a transformar la realidad en que vivimos.

APÉNDICE

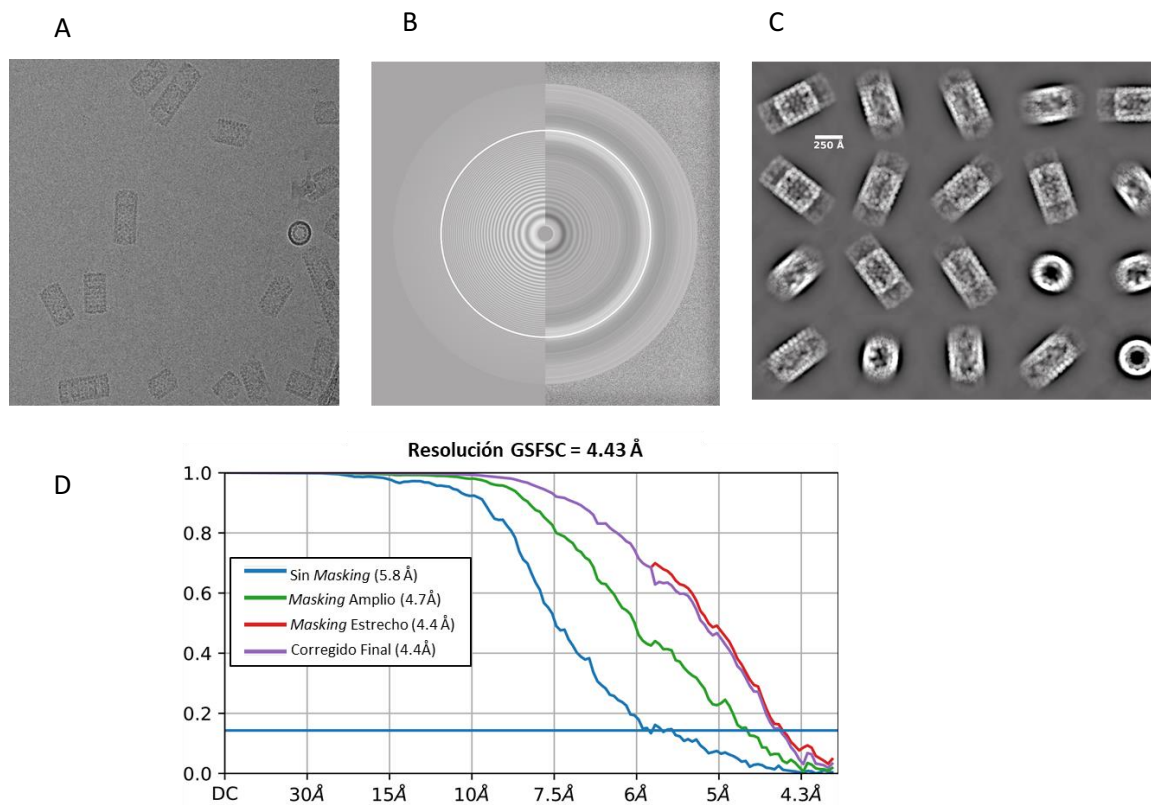


Figura Apéndice-1: Puntos destacados del análisis por CryoEM para PcH. (A) Imagen de PcH en distintas orientaciones. (B) Anillos de Thon mostrando una buena correspondencia entre la función de *CTF* obtenida a partir de la imagen y la función de *CTF* teórica calculada que se emplea para las correcciones posteriores. (C) Clasificación de vistas 2D. (D) Obtención de la resolución del mapa de densidad por *GSFSC*, empleando un proceso de refinamiento progresivo de la estructura a nivel local (*masking*) hasta llegar a una resolución final de 4.4 Å al alcanzar un valor umbral de 0,143. *CTF*: Función de transferencia de contraste; *GSFSC*: *Gold-Standard Fourier Shell Correlation*.

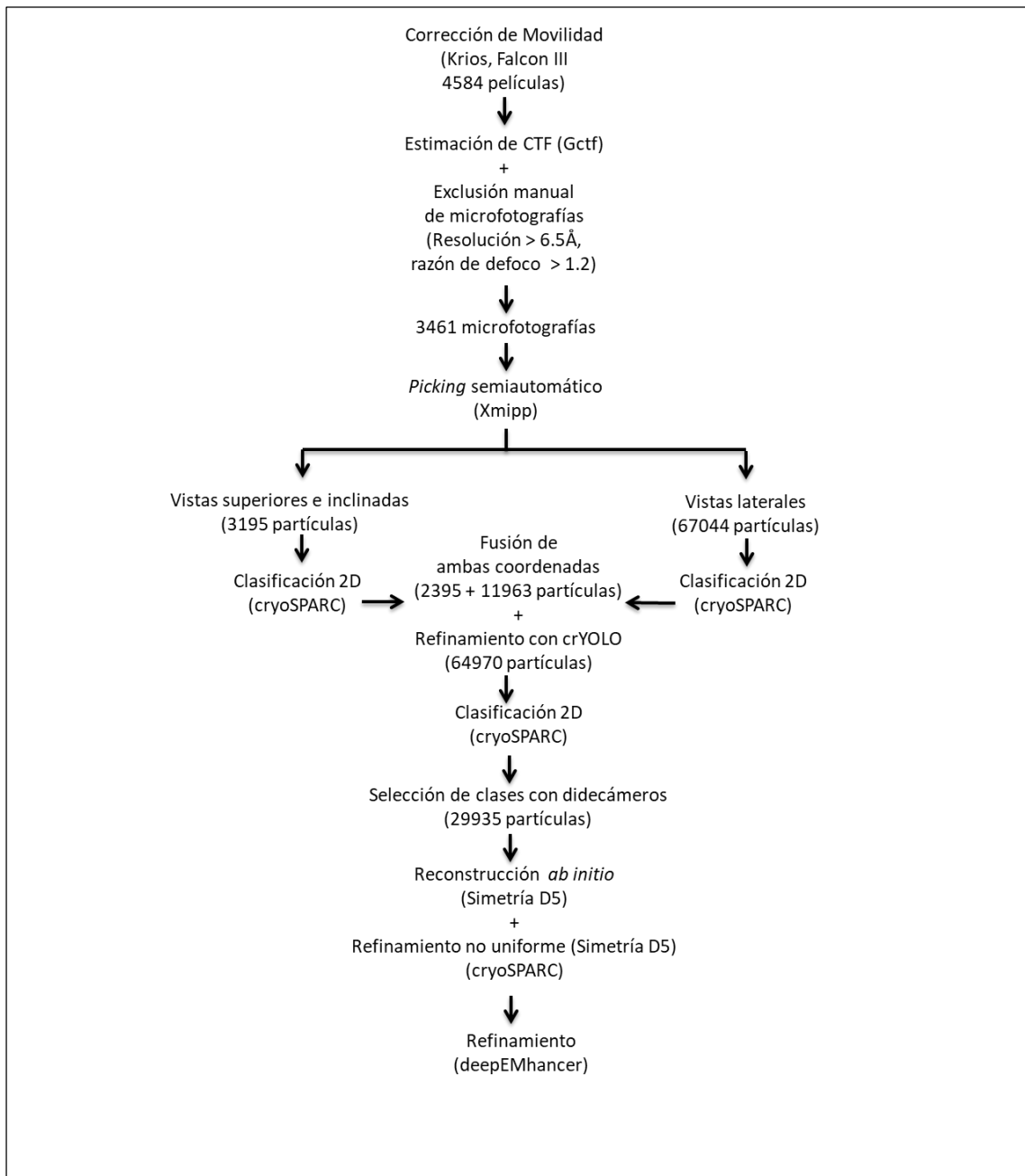


Figura Apéndice-2: Procesamiento de las imágenes de CryoEM. Detalle del flujo de trabajo que incluye el análisis por partícula única, reconstrucción 3D y refinamiento del modelo de Pch. CTF: función de transferencia de contraste.

Residuo	Predicción NetGlyc	Puntaje NetGlyc	Mapa Cadena 1	Mapa Cadena 2
Asn 393	✓	0,63	✓	✓
Asn 456	✓	0,56	✓	✓
Asn 1031	✓	0,50	X	X
Asn 1640	✓	0,54	✓	✓
Asn 1805	✓	0,51	X	X
Asn 2058	✓	0,54	✓	✓
Asn 2476	✓	0,59	✓	✓
Asn 2879	✓	0,49	✓	✓
Asn 2968	✓	0,41	X	X
Asn 3377	✓	0,46	X	X

Tabla Apéndice-1: Sitios de N-glicosilación de Pch. Se comparan los sitios predichos *in silico* y los observados en el mapa de densidad por *CryoEM* para ambas cadenas del dímero antiparalelo de Pch. No se incluyó en el análisis la porción de la secuencia correspondiente al péptido señal.

Par de UFs	Residuos en la interfaz	Área de interfaz (Å^2)	Puentes de hidrógeno	Puentes salinos
H1-H2	86	1215.3	3	3
D1-E2	74	1193.8	12	5
D2-E1	75	1161.9	10	0
C1-F2	70	1000.9	6	0
C2-F1	67	992.8	15	0
E1-E2	63	786	3	0
E2-F1	47	699.5	3	0
E1-F2	50	694.6	3	0
D1-G2	44	678.5	4	0
D2-G1	29	370.9	2	0
C2-H1	16	224.8	2	2
A2-H1	20	160.8	1	0

Tabla Apéndice-2: Interfaces de UFs. Características de las interfaces de UFs interactuantes provenientes de diferentes subunidades.

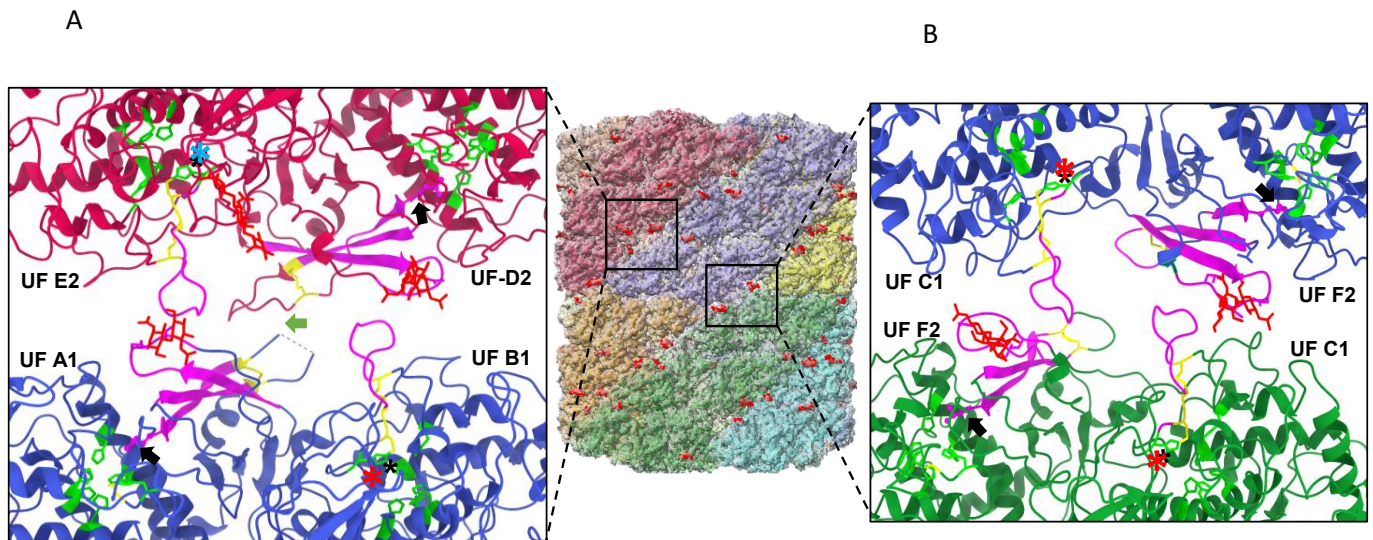


Figura Apéndice-3: Contactos de interfaz entre unidades asimétricas vecinas. Panel central: dímeros en diferentes colores y glicosilación representada por esferas rojas. Las regiones donde las interacciones ocurren, se destacan por rectángulos negros en el didecámero. Los contactos están siempre localizados a lo largo del surco mayor. Insertos: cambios conformacionales se transferirían de una UF a la otra, se resalta en color magenta los bucles y hojas β -plegadas interactuantes; las His formando parte del sitio activo se observan en verde y las Cys relevantes se marcan en amarillo; los oligosacáridos se representan como varillas rojas. (A) UF A, B, D y E participan de interacciones entre dímeros asimétricos (que estabilizan al decámero). UF E y UF B hacen contacto a través de un bucle en UF A y una cadena β en UF D, respectivamente. Adicionalmente, hay un contacto entre cadenas β de UF A y UF D. (B) Para la interacción entre decámeros (que estabilizan al didecámero), UF C1 contacta una cadena β en UF F2 vía un largo bucle, pero no hay comunicación entre cadenas β .

Tanto en las interacciones mostradas en (A) como en las de (B), el bucle se encuentra inmediatamente cercano a una Cys que forma un enlace tioéter con una His del sitio activo (marcada con un asterisco azul/rojo), y la cadena β alcanza el sitio activo a través de una Leu (flecha negra), residuos que serían responsables de la transferencia del cambio conformacional en respuesta a la unión del O_2 .

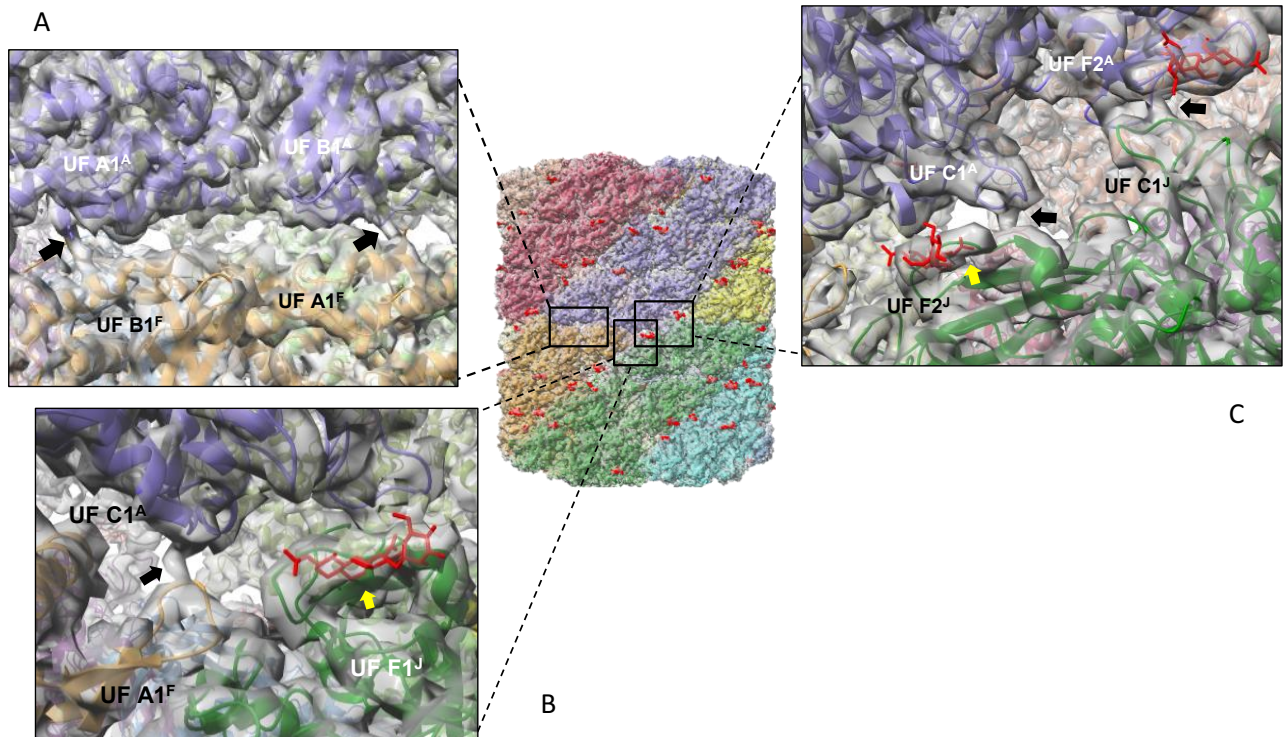


Figura Apéndice-4: Contactos en la interfaz del didecámero. Panel central: dímeros en diferentes colores y glicosilación representada por esferas rojas. Las regiones donde las interacciones ocurren, se destacan por rectángulos negros en el didecámero. Insertos: (A-C) las interacciones entre UFs de decámeros adyacentes aparecen como columnas (flechas negras), contactando ambos mapas (superficie gris). El superíndice de cada UF indica el dímero asimétrico al que pertenecen (habiendo un total de 10, llamados A-J, dentro de un cilindro didecamérico). En (B) y (C), los glicanos (varillas rojas con flecha amarilla) asociados con Asn 2477 están participando en la interacción entre UF C y UF A, y entre UF C y UF F, respectivamente.

Proteasa	Razón proteasa/proteína	Tiempo de incubación (h)	Difusión en agar	
			G+	G-
TRIPSINA	1/200	1	X	X
	1/200	2	X	X
	1/200	3	X	X
	1/200	24	X	X
	1/100	1	X	X
	1/100	2	X	X
	1/100	3	X	X
	1/100	24	X	X
QUIMOTRIPSINA	1/5	1	X	X
	1/5	2	X	X
	1/5	3	X	X
	1/5	24	X	X
	1/ 2.5	1	X	X
	1/ 2.5	2	X	X
	1/ 2.5	3	X	X
	1/ 2.5	24	X	X
SUBTILISINA	1/10	1	X	X
	1/10	2	X	X
	1/10	3	X	X
	1/10	24	X	X
	1/5	1	X	X
	1/5	2	X	X
	1/5	3	X	X
	1/5	24	X	X

Tabla Apéndice-3: Evaluación de actividad antimicrobiana de los fragmentos generados por proteólisis de Pch. Se detallan las relaciones proteasa/proteína y los tiempos de incubación indicados. G+: Gram-positivas; G-: Gram-negativas.

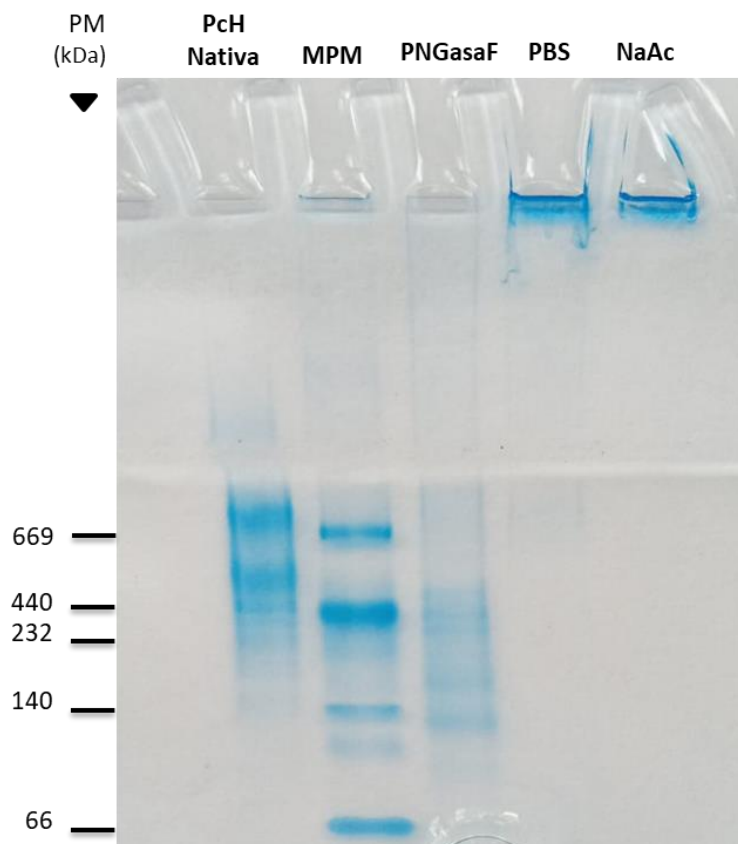


Figura Apéndice-5: Comprobación de la deglicosilación de Pch. Movilidad electroforética diferencial de muestras de Pch nativas y deglicosiladas en PAGE 5-12% Nativa. PM: peso molecular; MPM: marcador de peso molecular; PNGasa F: Pch tratada con PNGasa F 500 U/mL; PBS: Pch tratada con NaIO_4 15 mM en PBS pH=7,2; NaAc: Pch deglicosilada con NaIO_4 15 mM en NaAc 0,1 M pH=5,5.

CAPÍTULO VII:

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abbott M. y Ustoyev Y. (2019). Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy. *Seminars in oncology nursing*, 35(5), 150923.
- ❖ Ackman R.G., McLeod C.A. y Banerjee A.K. (1990). An overview of analyses by Chromarod-latroscan TLC-FID. *JPC-J Planar Chromat*, 3, 450-490.
- ❖ Accorsi A., Bucci L., de Eguileor M., Ottaviani E. y Malagoli D. (2013). Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Fish & shellfish immunology*, 34(5), 1260–1268.
- ❖ Adema C. M. (2015). Fibrinogen-Related Proteins (FREPs) in Mollusks. *Results and problems in cell differentiation*, 57, 111–129.
- ❖ Alpuche J., Pereyra A., Mendoza-Hernández G., Agundis C., Rosas C., y Zenteno E. (2010). Purification and partial characterization of an agglutinin from *Octopus maya* serum. *Comp. Biochem Phys B* 156(1):1–5.
- ❖ Altenhein, B., J. Markl, and B. Lieb. (2002). Gene structure and hemocyanin isoform HtH2 from the mollusc *Haliotis tuberculata* indicate early and late intron hot spots. *Gene*. 301:53-60.
- ❖ Andreev S.M., Giliazova A.V., Khaitov M.R., y Kozlov D.G. (2012). Anti-peptide antibodies specifically recognize the L1 protein of human papilloma virus type 31. *Bioorg Khim*. 38:667-675.
- ❖ Arancibia S., Del Campo M., Nova E., Salazar F., y Becker M.I. (2012). Enhanced structural stability of *Concholepas* hemocyanin increases its immunogenicity and maintains its non-specific immunostimulatory effects. *Eur J Immunol*. 42:688-699.
- ❖ Arancibia S., Espinoza C., Salazar F., Del Campo M., Tampe R., Zhong T. Y., De Ioannes P., Moltedo B., Ferreira J., Lavelle E. C., Manubens A., De Ioannes A. E., y Becker M. I. (2014). A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PloS one*, 9(1), e87240.
- ❖ Arzenšek D. (2010). Dynamic light scattering and application to proteins in solutions. *Seminario de la Universidad de Ljubljana, Facultad de Matemática y Física*.
- ❖ Baatarjav T., Kataoka K., Gilbert R.S., Terao Y., Fukui M., Goto M., Kawabata S., Yamamoto M., Fujihashi K., e Ito H.O. (2011). Mucosal immune features to phosphor-ylcholine by nasal Flt3 ligand cDNA-based vaccination. *Vaccine*. 29:5747-5757.
- ❖ Baird S., Kelly S. M., Price N. C., Jaenicke E., Meesters C., Nillius D., Decker, H. y Nairn J. (2007). Hemocyanin conformational changes associated with SDS-induced phenol oxidase activation. *Biochimica et biophysica acta*, 1774(11), 1380–1394.
- ❖ Barratt J., Chan D., Sandaradura I., Malik R., Spielman D., Lee R., Marriott D., Harkness J., Ellis J. y Stark D. (2016). *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. *Parasitology*, 143(9), pp.1087-1118.

- ❖ Barros R. M. F., Cruz-Hofling M. A., y Matsuura M. S. A. (1993). Functional and dissociation properties and structural organization of the hemocyanin of *Ampullaria canaliculata* (gastropoda, mollusca). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105(B), 725–730.
- ❖ Baxter E. W., Graham A. E., Re N. A., Carr I. M., Robinson J. I., Mackie S. L., y Morgan A. W. (2020). Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M (IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *Journal of immunological methods*, 478, 112721.
- ❖ Becker M. I., Arancibia S., Salazar F., Del Campo M., y De Ioannes A. (2014). Mollusk Hemocyanins as Natural Immunostimulants in Biomedical Applications. En: Duc, G. H. T. (ed.). *Immune Response Activation* (págs. 46-72). InTech.
- ❖ Becker M.I., Fuentes A., Del Campo M., Manubens A., Nova E., Oliva H., Faunes F., Valenzuela M.A., Campos-Vallette M., Aliaga A., Ferreira J., De Ioannes A.E., De Ioannes P. y Moltedo B. (2009). Immunodominant role of CCHA subunit of *Concholepas* hemocyanin is associated with unique biochemical properties. *Int Immunopharmacol.* 9:330-339.
- ❖ Benitez-Ribas D., Adema G. J., Winkels G., Klasen I. S., Punt C. J., Figdor C. G. y de Vries I. J. (2006). Plasmacytoid dendritic cells of melanoma patients present exogenous proteins to CD4+ T cells after Fc gamma RII-mediated uptake. *The Journal of experimental medicine*, 203(7), 1629–1635.
- ❖ Bergman P. J. (2019). Cancer Immunotherapies. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 49(5), 881–902.
- ❖ Bernatis, J.L. y Warren, G.L. (2014). Effectiveness of a hand removal program for management of nonindigenous apple snails in an urban pond. *Southeastern Naturalist* 13: 607-618.
- ❖ Blum M. D. (1984). T-antigen and bladder cancer. *Urology*, 24(3), 300.
- ❖ Boman H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*, 254(3), 197–215.
- ❖ Boraldi F., Lofaro F. D., Accorsi A., Ross E. y Malagoli D. (2019). Toward the Molecular Deciphering of *Pomacea canaliculata* Immunity: First Proteomic Analysis of Circulating Hemocytes. *Proteomics*, 19(4), e1800314.
- ❖ Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- ❖ Carlsson N.O.L., Brönmark C. y Hansson L.A. (2004). Invading herbivory: the golden apple snail alters ecosystem functioning in Asian wetlands. *Ecology* 85: 1575-1580.
- ❖ Cerenius L. y Söderhäll K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198: 116-126.
- ❖ Cerenius L. y Söderhäll K. (2021). Immune properties of invertebrate phenoloxidases. *Developmental and comparative immunology*, 122, 104098.

- ❖ Cerenius L., Kawabata S., Lee B.L., Nonaka M., Soderhall K. (2010). Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci* 35(10):575–583.
- ❖ Cheesman DF. (1958). Ovorubin, a chromoprotein from the eggs of the gastropod mollusk *Pomacea canaliculata*. *Proc R Soc Lond [Biol]* 149:571–587.
- ❖ Coates C.J., Costa-Paiva E.M. (2020). Multifunctional Roles of Hemocyanins. En: Hoeger U. y Harris J. (eds.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (págs 223-250). Subcellular Biochemistry, vol 94. Springer, Cham.
- ❖ Coates C. J., y Nairn J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Developmental and comparative immunology*, 45(1), 43–55.
- ❖ Coates C.J. y Decker H. (2017). Immunological properties of oxygen-transport proteins: hemoglobin, hemocyanin and hemerythrin. *Cell Mol Life Sci* 74(2):293–317.
- ❖ Consejo Nacional de Investigaciones. Comité para la actualización de la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio. (2011). *Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio* (8va edición). Washington DC, EEUU.
- ❖ Cooper T.G. (2007). *The Tools of Biochemistry* (2da edición). New York: Wiley & Sons, Inc.
- ❖ Correoso Rodriguez M., Espinosa E., Coello Rodriguez M. (2017) *Pomacea canaliculata* in Ecuador: a recent pest with multiple implications (págs. 275-291). En: Joshi R.C., Cowie R.H., y Sebastian L.S. (eds.). *Biology and management of invasive apple snails* (págs. 241-256). Philippine Rice Research Institute. PhilRice. Maligaya, Science City of Muñoz, Nueva Ecija 3119, Filipinas.
- ❖ Cossarizza A., Chang H. D., Radbruch A., Acs A., Adam D., Adam-Klages S., Agace W. W., Aghaeepour N., Akdis M., Allez M., Almeida L. N., Alvisi G., Anderson G., Andrä I., Annunziato F., Anselmo A., Bacher P., Baldari C. T., Bari S., Barnaba V., ... Zychlinsky A. (2019). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *European journal of immunology*, 49 (10), 1457–1973.
- ❖ Cowie R.H., Hayes K.A., Strong E.E. y Thiengo S.C. (2017) Non-native apple snails: systematics, distribution, invasion history and reasons for introduction. En: Joshi R.C., Cowie R.H., y Sebastian L.S. (eds). *Biology and management of invasive apple snails* (págs. 3-32). Philippine Rice Research Institute. PhilRice. Maligaya, Science City of Muñoz, Nueva Ecija 3119, Filipinas.
- ❖ Cowie RH. (2002). Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts, and management. En Baker G.M. (ed.). *Molluscs as Crop Pests* (págs. 145–92). CABI. Wallingford, Reino Unido.
- ❖ Cueto J. A., Vega I. A., y Castro-Vazquez A. (2013). Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish & shellfish immunology*, 34(2), 443–453.
- ❖ Cuff M. E., Miller K. I., van Holde K. E., y Hendrickson, W. A. (1998). Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *Journal of molecular biology*, 278(4), 855–870.

- ❖ Cunningham M., Garcia F., y Pollero R. J. (2007). Arachnid lipoproteins: comparative aspects. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 146(1-2), 79–87.
- ❖ Cunningham M., Laino A., Romero S., Fernando Garcia C. (2020). En: Hoeger U. y Harris J. (eds.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (págs. 219-231). *Subcellular Biochemistry*, vol 94. Springer, Cham.
- ❖ Curtis J.E., Hersh E.M., Butler W.T. y Rossen R.D. (1971). Antigen dose in the human immune response. Dose-relationships in the human immune response to Key- hole limpet hemocyanin. *J Lab Clin Med*. 78:61-69.
- ❖ Curtis J.E., Hersh E.M., Harris J.E., McBride C., y Freireich E.J. (1970). The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. *Clin Exp Immunol*. 6:473-491.
- ❖ Cyboran-Mikołajczyk S., Solarska-Ściuk K., Mieszala K., Glatzel-Plucińska N., Matczak K., y Kleszczyńska, H. (2019). The Impact of O-Glycosylation on Cyanidin Interaction with RBCs and HMEC-1 Cells-Structure-Activity Relationships. *International journal of molecular sciences*, 20(8), 1928.
- ❖ Daigneault M., Preston J. A., Marriott H. M., Whyte M. K., y Dockrell D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLoS one*, 5(1), e8668.
- ❖ Damborenea C., Brusa F., y Negrete L (2017). Symbionts and diseases associated with invasive apple snails. En: Joshi R.C., Cowie R.H., y Sebastian L.S. (eds.). *Biology and management of invasive apple snails* (págs. 241-256). Philippine Rice Research Institute. PhilRice. Maligaya, Science City of Muñoz, Nueva Ecija 3119, Filipinas.
- ❖ De Ioannes P., Moltedo B., Oliva H., Pacheco R., Faunes F., De Ioannes A.E., y Becker M.I. (2004). Hemocyanin of the molluscan *Concholepas concholepas* exhibits an unusual heterodecameric array of subunits. *J Biol Chem*. 279:26134-26142.
- ❖ De Jong-Brink M., Boer H. y Joosse J. (1983). Mollusca. En: Adiyodi K, Adiyodi R, (eds.). *Reproductive Biology of Invertebrates* (págs. 297–355). New York: Wiley & Sons, Inc.
- ❖ Decker H. y Jaenicke E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Developmental and comparative immunology*, 28(7-8), 673–687.
- ❖ Decker H., Schweikardt T., Nillius D., Salzbrunn U., Jaenicke E., Tuczec F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398(1):183–191.
- ❖ Del Campo M., Arancibia S., Nova E., Salazar F., Gonzalez A., Moltedo B., De Ioannes P., Ferreira J., Manubens A., y Becker M.I. (2011). Hemocyanins as immunostimulants. *Rev Med Chil*. 139:236-246.
- ❖ Destoumieux-Garzon D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachere E. (2001). Crustacean immunity antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem* 276(50):47070–47077.

- ❖ Deutscher M.P. (1990). General methods for handling proteins and enzymes. En: Deutscher M.P. (ed.) *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*. Academic Press. New York.
- ❖ 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. Res.* 345: 2361–2367.
- ❖ Dolashki A., Voelter W. y Dolashka P. (2011). Phenoloxidase activity of intact and chemically modified functional unit RvH1: a from molluscan *Rapana venosa* hemocyanin. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 160(1), 1–7
- ❖ Dong Y., Taylor H. E. y Dimopoulos G. (2006). AgDscam, a hypervariable immunoglobulin domain-containing receptor of the *Anopheles gambiae* innate immune system. *PLoS biology*, 4(7), e229.
- ❖ Dorosko S.M., Ayres S.L. y Connor R.I. (2008). Induction of HIV-1 MPR (649-684)-specific IgA and IgG antibodies in caprine colostrum using a peptide-based vaccine. *Vaccine*. 26:5416-5422.
- ❖ Dreon, M. S., Frassa, M. V., Ceolín, M., Ituarte, S., Qiu, J.-W., Sun, J., Fernández P.E., Heras, H. (2013). Novel Animal Defenses against Predation: A Snail Egg Neurotoxin Combining Lectin and Pore-Forming Chains That Resembles Plant Defense and Bacteria Attack Toxins. *PLoS ONE*, 8(5).
- ❖ Dreon, M. S., Schinella, G., Heras, H., & Pollero, R. J. (2004). Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of ovorubin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 422(1).
- ❖ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- ❖ Duñach M., Sabés M. y Padrós E. (1983). Fourth-derivative spectrophotometry analysis of tryptophan environment in proteins. Application to melittin, cytochrome c and bacteriorhodopsin. *European journal of biochemistry*, 134(1), 123–128.
- ❖ Echan, L. A., & Speicher, D. W. (2002). Protein detection in gels using fixation. *Current protocols in protein science*, 10, 10.5.1–10.5.18.
- ❖ Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., y Cowtan K. (2010). Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 4), 486–501.
- ❖ Escobar A., Lopez M., Serrano A., Ramirez M., Perez C., Aguirre A., Gonzalez R., Alfaro J., Larrondo M., Fodor M., Ferrada C., y Salazar-Onfray F. (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol*. 142:555-568.
- ❖ Estebenet, A. L., & Cazzaniga, N. J. (1993). Egg variability and the reproductive strategy of *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullaridae). *APEX*, 8(4), 129–138.

- ❖ Folch J., Lees M. y Stanley G.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226(1), 497-509.
- ❖ Franck J. (2006). Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies: visualization of biological molecules in their Native state (2da edición). New York: Oxford University Press, Inc.
- ❖ Freshney IR (2000). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques*, (4ta edición) Wiley-Liss: New York, Estados Unidos.
- ❖ Fu C., Zhao H., Wang Y., Cai H., Xiao Y., Zeng Y., y Chen H. (2016). Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen. *HLA*, 88(6), 275–286.
- ❖ Fujieda N., Yabuta S., Ikeda T., Oyama T., Muraki N., Kurisu G., e Itoh S. (2013). Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *J. Biol. Chem.* 288, 22128–22140.
- ❖ Gai Z., Matsuno A., Kato K., Kato S., Khan M., Shimizu T., Yoshioka T., Kato Y., Kishimura H., Kannno G., Miyabe Y., Terada T., Tanaka Y., Yao M. (2015). Crystal structure of the 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å resolution. *Structure* 23:2204–2212.
- ❖ Galonic D.P. y Gin D.Y. (2007). Chemical glycosylation in the synthesis of glycoconjugate antitumour vaccines. *Nature*. 446:1000-1007.
- ❖ García-Borrón J. C. y Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment cell research*, 15(3), 162–173.
- ❖ García-Borrón J. C., y Solano F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment cell research*, 15(3), 162–173.
- ❖ Garín C. F. y Pollero R. J. (1995). Isolation and characterization of a low density lipoprotein fraction from plasma of the aquatic snail *Ampullaria canaliculata*. *Comp. Biochem. Physiol*, B 111, 147–150.
- ❖ Garín CF., Heras H., PolleroRJ. (1996). Lipoprotein of the egg perivitellin fluid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). *J ExpZool* 276:307–314.
- ❖ Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., y Bairoch A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: Walker J.M. (ed.) *The Proteomics Protocols Handbook*, (págs. 571–607). Humana Press.
- ❖ Gatsogiannis C., Hofnagel O., Markl J. y Raunser S. (2015). Structure of mega-hemocyanin reveals protein origami in snails. *Structure* 23(1):93–103.
- ❖ Gatsogiannis C., Markl J. (2009) Keyhole limpet hemocyanin: 9-A CryoEM structure and molecular model of the KLH1 didecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. *J Mol Biol* 385(3):963–983.
- ❖ Gatsogiannis C., Moeller A., Depoix F., Meissner U., Markl J. (2007). *Nautilus pompilius* Hemocyanin: 9 Å Cryo-EM structure and molecular model reveal the subunit pathway and the interfaces between the 70 functional units. *J Mol Biol* 374(2):465–486.

- ❖ Gebauer W., Harris J.R., Geisthardt G., y Markl J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin type 2 (KLH2): detection and immunolocalization of a labile functional unit h. *J Struct Biol.* 128:280-286.
- ❖ Genova-Kalou P., Dundarova D., Idakieva K., Mohmmmed A., Dundarov S., and Argirova R. (2008). Anti-herpes effect of hemocyanin derived from the mollusk *Rapana thomasiana*. *Z Naturforsch C.* 63:429-434.
- ❖ Gesheva V., Chausheva S., Mihaylova N., Manoylov I., Doumanova L., Idakieva K., y Tchorbanov A. (2014). Anti-cancer properties of gastropodan hemocyanins in murine model of colon carcinoma. *BMC immunology*, 15, 34.
- ❖ Gesheva V., Idakieva K., Kerekov N., Nikolova K., Mihaylova N., Doumanova L., Tchorbanov A. (2011). Marine gastropod hemocyanins as adjuvants of non-conjugated bacterial and viral proteins. *Fish Shellfish Immunol.* 30: 135–142.
- ❖ Geyer H., Wuhrer M., Resemann A., Geyer R. (2005). Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.* 280: 40731–40748.
- ❖ Gilewski T.A., Ragupathi G., Dickler M., Powell S., Bhuta S., Panageas K., Koganty R.R., Chin-Eng J., Hudis C., Norton L., Houghton A.N., y Livingston P.O. (2007). Immunization of high-risk breast cancer patients with clustered sTn-KLH conjugate plus the immunologic adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res.* 13:2977-2985.
- ❖ Goldstein I. J., y Hayes C. E. (1978). The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 35, 127–340.
- ❖ González García M., Rodríguez A., Alba A., Vázquez A. A., Morales Vicente F. E., Pérez-Erviti J., Spellerberg B., Stenger S., Grieshober M., Conzelmann C., Münch J., Raber H., Kubiczek D., Rosenau F., Wiese S., Ständker L., y Otero-González A. (2020). New Antibacterial Peptides from the Freshwater Mollusk *Pomacea poeyana* (Pilsbry, 1927). *Biomolecules*, 10(11), 1473.
- ❖ Gorbushin A. M. (2019). Derivatives of the lectin complement pathway in Lophotrochozoa. *Developmental and comparative immunology*, 94, 35–58.
- ❖ Grossmann J.G., Ali S.A., Abbasi A., Zaidi Z.H., Stoeva S., Voelter W., Hasnain S.S. (2000). Low-resolution molecular structures of isolated functional units from arthropodan and molluscan hemocyanin. *Biophys J* 78(2):977–981.
- ❖ Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski L.D.S., Silva-Pereira I. y Kyaw C.M. (2013). Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front. Microbiol* 2013;4:353.
- ❖ Hadden J. W. (1993). Immunostimulants. *Immunology today*, 14(6), 275–280.
- ❖ Hall M., van Heusden M.C., Soderhall K. (1995). Identification of the major lipoproteins in crayfish hemolymph as proteins involved in immune recognition and clotting. *Biochem Biophys Res Commun* 216(3):939–946.
- ❖ Hall R.L. y Wood E.J. (1976). The carbohydrate content of gastropod haemocyanins. *Biochem. Soc. Trans.* 4: 307–309.

- ❖ Harris J.R., Markl J. (1999) Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 1999; 30: 597–623.
- ❖ Harris J.R., Meissner U., Gebauer W., Markl J. (2004). 3D reconstruction of the hemocyanin subunit dimer from the chiton *Acanthochiton fascicularis*. *Micron* 35(1–2):23–26.
- ❖ Hayes, K. A., Burks, R. L., Castro-Vazquez, A., Darby, P. C., Heras, H., Martín, P. R., ... Cowie, R. H. (2015). Insights from an integrated view of the biology of apple snails (caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* (Vol. 58).
- ❖ Hayes, K.A., Cowie, R.H., Thiengo, S.C. & Strong, E.E. (2012). Comparing apples with apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Zoological Journal of the Linnean Society* 166: 723-753.
- ❖ Heras H, Garín CF, and Pollero RJ. (1998). Biochemical composition and energy sources during embryo development and in early juveniles of the snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Zool.* 280:375– 83.
- ❖ Heras H. y Pollero R.J. (1990). Occurrence of plasma lipoproteins in octopods. Partial characterization and interorgan transport of lipids. *J Exp Mar Biol Ecol* 140:29–38.}
- ❖ Heras H. y Pollero R.J. (1992). Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. *Biochim Biophys Acta* 1125:245–550.
- ❖ Heras, H., Frassa, M. V., Fernández, P. E., Galosi, C. M., Gimeno, E. J., y Dreon, M. S. (2008). First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon*, 52(3), 481–488.
- ❖ Heras, H. (2014) ¿Por qué hay huevos que nadie quiere comer? *Ciencia Hoy*, 23 (137), 40-48.
- ❖ Hill R.W., Wyse G.A., Anderson M. (2012). *Animal Physiology* (3° edición). Massachusetts, EEUU: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- ❖ Horgan F.G., Stuart A.M. y Kudavidanage E.P. (2014). Impact of invasive apple snails on the functioning and services of natural and managed wetlands. *Acta Oecologica* 54: 90-100.
- ❖ Hoefert S., Hoefert C. S., Albert M., Munz A., Grimm M., Northoff H., Reinert S., y Alexander D. (2015). Zoledronate but not denosumab suppresses macrophagic differentiation of THP-1 cells. An aetiologic model of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Clinical oral investigations*, 19(6), 1307–1318.
- ❖ Hrafnkelsdottir K., Valgeirsson J., Bjarnadottir S., Olafsdottir S., Olafsdottir K., S.T. Hedinsdottir, Magnúsdottir E.V., y Gizurarson S. (2007). Immunization prevents DDT buildup in mouse tissues. *Int Immunopharmacol.* 7:1179-1184.
- ❖ Hristova R., Dolashki A., Voelter W., Stevanovic S., y Dolashka-Angelova P. (2008). o-Diphenol oxidase activity of molluscan hemocyanins. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 149(3), 439–446.
- ❖ Idakieva K., Siddiqui N.I., Meersman F., De Maeyer M., Chakarska I., Gielens C. (2009). Influence of limited proteolysis, detergent treatment and lyophilization on the

- phenoloxidase activity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Int J Biol Macromol.* 45(2):181–87.
- ❖ Idakieva K., Todinova S., Dolashki A., Velkova L., Raynova Y. y Dolashka P. (2020). Biophysical characterization of the structural stability of Helix lucorum hemocyanin. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 18–28.
 - ❖ Ip J. C. H., Mu H., Chen Q., Sun J., Ituarte S., Heras H., Van Bocxlaer B., Ganmanee M., Huang X., y Qiu J. W. (2018). AmpuBase: a transcriptome database for eight species of apple snails (Gastropoda: Ampullariidae). *BMC genomics*, 19(1), 179.
 - ❖ Ituarte, S., Brola, T. R., Dreon, M. S., Sun, J., Qiu, J. W., & Heras, H. (2019). Non-digestible proteins and protease inhibitors: Implications for defense of the colored eggs of the freshwater apple snail *Pomacea canaliculata*. *Canadian Journal of Zoology*, 97(6), 558–566.
 - ❖ Jaenicke E., Büchler K., Markl J., Decker H., Barends T.R.M. (2010) Cupredoxin-like domains in haemocyanins. *Biochem J* 426(3):373–378
 - ❖ Jaenicke R. (1999). Stability and folding of domain proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 71(2):155–241.
 - ❖ Jiang N., Tan N. S., Ho B., y Ding J. L. (2007). Respiratory protein-generated reactive oxygen species as an antimicrobial strategy. *Nature immunology*, 8(10), 1114–1122.
 - ❖ Jiang X., Zheng P., Chen, J., Soto, I., Haubrock, P. y Ji, L. (2022). Global economic costs and knowledge gaps of invasive gastropods. *Ecological Indicators*. 145, 109614.
 - ❖ Jiménez J. M., Salazar M. L., Arancibia S., Villar J., Salazar F., Brown G. D., Lavelle E. C., Martínez-Pomares L., Ortiz-Quintero J., Lavandero S., Manubens A., y Becker M. I. (2019). TLR4, but Neither Dectin-1 nor Dectin-2, Participates in the Mollusk Hemocyanin-Induced Proinflammatory Effects in Antigen-Presenting Cells From Mammals. *Frontiers in immunology*, 10, 1136.
 - ❖ Karkhanis Y. D., Zeltner J. Y., Jackson J. J. y Carlo D. J. (1978). A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Analytical biochemistry*, 85(2), 595–601.
 - ❖ Kato S., Matsui T., Gatsogiannis C., Tanaka Y. (2017). Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology. *Biophysical Reviews*; 2017;1878.
 - ❖ Kato S., Matsui T., Tanaka Y. (2020). Molluscan Hemocyanins. En: Hoeger U. y Harris J. (eds.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (págs 195-218). *Subcellular Biochemistry*, vol 94. Springer, Cham.
 - ❖ Kiraly J., Vareckova E., Mucha V. y Kostolansky F. (2011). Evaluation of anti-influenza efficiency of polyclonal IgG antibodies specific to the ectodomain of M2 protein of influenza A virus by passive immunization of mice. *Acta Virol.* 55:261-265.
 - ❖ Kumar P., Kizhakkedathu J. N., y Straus S. K. (2018). Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
 - ❖ Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

- ❖ Laino A., Cunningham M.L., Heras H., Garcia F. (2011). In vitro lipid transfer between lipoproteins and midgut-diverticula in the spider *Polybetes pythagoricus*. *CompBiochem Physiol* 160(4):181–186.
- ❖ Lamm D.L. (2003). Intravesical therapy for superficial bladder cancer: slow but steady progress. *J Clin Oncol*. 21:4259-4260.
- ❖ Lamm D.L., Reyna J.A., y Reichert D.F. (1981). Keyhole-limpet hemocyanin and immune ribonucleic acid immunotherapy of murine transitional cell carcinoma. *Urol Res*. 9:227-230.
- ❖ Lata S., Sharma B. K. y Raghava G. P. S. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC Bioinformatics*, 8, 1–10.
- ❖ Lee S.Y., Lee B.L., Soderhall K. (2003). Processing of an antibacterial peptide from hemocyanin of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem* 278(10):7927–7933.
- ❖ Lieb B., Altenhein, B., y Markl, J. (2000). The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*). *The Journal of biological chemistry*, 275(8), 5675–5681.
- ❖ Lieb B., Boisguérin V., Gebauer W., y Markl, J. (2004). cDNA sequence, protein structure, and evolution of the single hemocyanin from *Aplysia californica*, an opisthobranch gastropod. *Journal of molecular evolution*, 59(4), 536–545.
- ❖ Lieb B., Gebauer W., Gatsogiannis C., Depoix F., Hellmann N., Harasewych M.G., Strong E.E., Markl J. (2010). Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a ~550 kDa polypeptide. *Frontiers in zoology* 7:14.
- ❖ Litman G. W., Rast J. P. y Fugmann S. D. (2010). The origins of vertebrate adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology*, 10(8), 543–553.
- ❖ Loker E. S., Adema C. M., Zhang S. M., y Kepler T. B. (2004). Invertebrate immune systems-not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological reviews*, 198, 10–24.
- ❖ Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Poorter M. (2000) 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. *Invasive Species Specialist Group (ISSG) Auckland, New Zeland: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN)*.
- ❖ Lv, S., Zhang Y., Chen S. R., Wang L. B., Fang W., Chen F., Jiang J. Y., Li Y. L., Du Z. W. y Zhou X. N. (2009). Human Angiostrongyliasis Outbreak in Dali, China. *PLoS.Negl.Trop. Dis.* 3(9):e520.
- ❖ Lv, S., Zhang, Y., Steinmann, P., Yang, G. J., Yang, K., Zhou, X. N., & Utzinger, J. (2011). The emergence of angiostrongyliasis in the People's Republic of China: The interplay between invasive snails, climate change and transmission dynamics. *Freshwater Biology*, 56(4), 717–734.

- ❖ Margolis J. y Wrigley C.W. (1975). Improvement of pore gradient electrophoresis by increasing the degree of cross-linking at high acrylamide concentration. *J. Chromatogr*, 106 (1), 204-209.
- ❖ Markl J. (2013). Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et biophysica acta*, 1834(9), 1840–1852.
- ❖ Martín P. R., Seuffert M. E., Tamburi N. E., Burela S. y Saveanu L. (2017). Behaviour and ecology of *Pomacea canaliculata* from Southern Pampas (Argentina). En: Joshi R.C., Cowie R.H., y Sebastian L.S. (eds.). *Biology and management of invasive apple snails* (págs. 241-256). Philippine Rice Research Institute. PhilRice. Maligaya, Science City of Muñoz, Nueva Ecija 3119, Filipinas.
- ❖ Matsuzaki K. (1999). Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self–defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462(15):1–10.
- ❖ Matsuzaki K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta BBA Biomembr.* 2009; 1788:1687–1692.
- ❖ McFadden D.W., Riggs D.R., Jackson B.J., y Vona-Davis L. (2003). Keyhole limpet hemocyanin, a novel immune stimulant with promising anticancer activity in Barrett's esophageal adenocarcinoma. *Am J Surg.* 186:552-555.
- ❖ Medina E., y Pieper D. H. (2016). Tackling Threats and Future Problems of Multidrug-Resistant Bacteria. *Current topics in microbiology and immunology*, 398, 3–33.
- ❖ Mochida, O. (1991) Spread of Freshwater *Pomacea* Snails (Pilidae, Mollusca) from Argentina to Asia. *Micronesica Suppl.* 3: 51-62.
- ❖ Moltedo B., Faunes F., Haussmann D., De loannes P., De loannes A. E., Puente J., y Becker M. I. (2006). Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *The Journal of urology*, 176(6 Pt 1), 2690–2695.
- ❖ Moltedo B., Faunes F., Haussmann D., De loannes P., De loannes A.E., Puente J., y Becker M.I. (2006). Immunotherapeutic effect of *Concholepas* hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *J Urol.* 176:2690-2695.
- ❖ Monteiro L. B., Davanzo G. G., de Aguiar C. F., y Moraes-Vieira P. M. M. (2020). Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX*, 7, 100938.
- ❖ Morales A., Eidinger D., y Bruce A.W. (1976). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 116:180-183.
- ❖ Murphy K.; Weaver C. (2017). *Janeway's Immunobiology* (9na edición). New York, NY, EEUU: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC.
- ❖ Musselli C., Livingston P.O., Ragupathi G. (2001). Keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines against cancer: the Memorial Sloan Kettering experience. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127 (suppl 2): R20-6.

- ❖ Naresh K. N., Krupanidhi S., y Rajan S. S. (2013). Purification, spectroscopic characterization and o-diphenoloxidase activity of hemocyanin from a freshwater gastropod: *Pila globosa*. *The protein journal*, 32(5), 327–336.
- ❖ Neelapu S.S., Kwak L.W. (2007). Vaccine therapy for B-cell lymphomas: next-generation strategies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007: 243-9.
- ❖ Nelson E.L., Li X., Hsu F.J., Kwak L.W., Levy R., Clayberger C., y Krensky A.M. (1996). Tumor-specific, cytotoxic T-lymphocyte response after idiotype vaccination for B-cell, non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 88:580-589.
- ❖ Nelson, D. L., Cox, M. M. (2018). Principios de bioquímica Lehninger. España: Ediciones Omega, S.A.
- ❖ Nguyen L.T., Haney E.F., Vogel H.J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol* 29:464–472.
- ❖ Nozaki Y. (1990). Determination of tryptophan, tyrosine, and phenylalanine by second derivative spectrophotometry. *Archives of biochemistry and biophysics*, 277(2), 324–333.
- ❖ Nseyo U.O. y Lamm D.L., (1997). Immunotherapy of bladder cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 13, 342–349.
- ❖ Oellermann M., Lieb B., Pörtner H. O., Semmens J. M. y Mark F. C. (2015). Blue blood on ice: modulated blood oxygen transport facilitates cold compensation and eurythermy in an Antarctic octopod. *Frontiers in zoology*, 12, 6.
- ❖ Oellermann M., Pörtner H. O., & Mark F. C. (2014). Simultaneous high-resolution pH and spectrophotometric recordings of oxygen binding in blood microvolumes. *The Journal of experimental biology*, 217(Pt 9), 1430–1436.
- ❖ Olsson C.A., Chute R., Rao C.N. (1974). Immunologic reduction of bladder cancer recurrence rate. *J. Urol.* 111, 173–176.
- ❖ O'Neill L. A., Kishton R. J., y Rathmell J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature reviews. Immunology*, 16(9), 553–565.
- ❖ Orlova E. V., Dube P., Harris J. R., Beckman E., Zemlin F., Markl J., van Heel M. (1997). Structure of keyhole limpet hemocyanin type 1 (KLH1) at 15 Å resolution by electron cryomicroscopy and angular reconstitution. *J. Mol. Biol.* 271: 417–437.
- ❖ Orr J., Adamson G.L., y Lindgren F.T. (1990). Preparative Ultracentrifugation and Analytic Ultracentrifugation of Plasma Lipoproteins. En: Perkins E.G. (ed.). *Analyses of fats, oils, and lipoproteins* (págs. 525–554). AOCS press. Champaign, Illinois.
- ❖ Pasqualetto G., Mack A., Lewis E., Cooper R., Holland A., Borucu U., Mantell J., Davies T., Weckener M., Clare D., Green T., Kille P., Muhlholz A., y Young M. T. (2023). CryoEM structure and AlphaFold molecular modelling of a novel molluscan hemocyanin. *PLoS one*, 18(6), e0287294.
- ❖ Peng Y., Zhang Y., Mitchell W.J. y Zhang G. (2012). Development of a lipopolysaccharide-targeted peptide mimic vaccine against Q fever. *J Immunol.* 189:4909-4920.

- ❖ Perbandt M., Guthöhrlein E. W., Rypniewski W., Idakieva K., Stoeva S., Voelter W., Genov N., y Betzel C. (2003). The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry*, 42(21), 6341–6346.
- ❖ Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M., Meng E. C. y Ferrin T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- ❖ Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- ❖ Presicce P., Taddeo A., Conti A., Villa M.L., Della Bella S. (2008). Keyhole limpet hemocyanin induces the activation and maturation of human dendritic cells through the involvement of mannose receptor. *Mol Immunol.* (2008) 45:1136– 45.
- ❖ Pulford K. A., Sipos A., Cordell J. L., Stross W. P., y Mason D. Y. (1990). Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *International immunology*, 2(10), 973–980.
- ❖ Punjani A., Zhang H. y Fleet D. J. (2020). Non-uniform refinement: adaptive regularization improves single-particle cryo-EM reconstruction. *Nature methods*, 17(12), 1214–1221.
- ❖ Ragupathi G., Livingston P.O., Hood C., Gathuru J., Krown S.E., Chapman P.B., Wolchok J.D., Williams L.J., Oldfield R.C., y Hwu W.J. (2003). Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lac- tone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res.* 9:5214-5220.
- ❖ Raynova Y., Doumanova L., Idakieva K.N. (2013). Phenoloxidase activity of *Helix aspersa maxima* (garden snail, gastropod) hemocyanin. *Protein J.* 32(8):609–18.
- ❖ Rehm P., Pick C., Borner J., Markl J., y Burmester T. (2012). The diversity and evolution of chelicerate hemocyanins. *BMC Evol Biol* 12(1):19.
- ❖ Reichardt V.L., Okada C.Y., Liso A., Benike C.J., Stockerl-Goldstein K.E., Engelman E.G., Blume K.G., Levy R. (1999). Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma—a feasibility study. *Blood*, 93, 2411–2419.
- ❖ Reyes D., Salazar L., Espinoza E., Pereda C., Castellon E., Valdevenito R., Huidobro C., Becker M. I., Lladser A., Lopez M.N. y Salazar-Onfray F. (2013). Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br J Cancer.* 109:1488-1497
- ❖ Riciluca K.C. y Silva P.I. (2012). Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Results Immunol* 2:66–71.
- ❖ Riggs D.R., Jackson B., Vona-Davis L., y McFadden D. (2002). In vitro anticancer effects of a novel immunostimulant: keyhole limpet hemocyanin. *J Surg Res.* 108:279-284.

- ❖ Riggs D.R., Jackson B.J., Vona-Davis L., Nigam A., y McFadden D.W. (2005). In vitro effects of keyhole limpet hemocyanin in breast and pancreatic cancer in regards to cell growth, cytokine production, and apoptosis. *Am J Surg.* 189:680-684.
- ❖ Rivera Pérez C., y N.Y. Hernández Saavedra (2021). Compuestos bioactivos derivados de moluscos marinos. *Recursos Naturales y Sociedad.* Vol. 7 (2): 61-84.
- ❖ Rizvi I., Riggs D.R., Jackson B.J., y McFadden D.W. (2007). Keyhole limpet hemocyanin: an effective adjunct against melanoma in vivo. *Am J Surg.* 194:628-632.
- ❖ Rodriguez C., Prieto G. I., Vega I. A., Castro-Vazquez A. (2019). Functional and evolutionary perspectives on gill structures of an obligate air-breathing, aquatic snail. *PeerJ.* 7 e7342.
- ❖ Rodriguez C., Prieto G. I., Vega I. A., y Castro-Vazquez, A. (2018). Assessment of the kidney and lung as immune barriers and hematopoietic sites in the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. *PeerJ,* 6, e5789.
- ❖ Rodriguez C., Vega I. A., y Castro-Vazquez A. (2022). A Dissenters' View on AppleSnail Immunobiology. *Frontiers in immunology,* 13, 879122.
- ❖ Romero S. M., Laino A., Sanchís F. A., Arrighetti, F.; Cunningham, M. y Garcia, C. F. (2018). First study on lipid dynamics during the female reproductive cycle of polybetes pythagoricus (Araneae: Sparassidae). *Canadian Journal of Zoology;* 96 (8), 1-2018
- ❖ Royer C. A., Weber G., Daly T. J., y Matthews K. S. (1986). Dissociation of the lactose repressor protein tetramer using high hydrostatic pressure. *Biochemistry,* 25(25), 8308–8315.
- ❖ Royer W. E. Jr, Sharma H., Strand K., Knapp J. E., y Bhyravbhatla B. (2006). *Lumbricus* erythrocrurin at 3.5 Å resolution: architecture of a megadalton respiratory complex. *Structure,* 14(7), 1167–1177.
- ❖ Sabbatini P.J., Ragupathi G., Hood C., Aghajanian C.A., Juretzka M., Iasonos A., Hensley M.L., Spassova M.K., Ouerfelli O., Spriggs D.R., Tew W.P., Konner J., Clausen H., Abu Rustum N., Dansihfsky S.J. y Livingston P.O. (2007). Pilot study of a heptavalent vaccine-keyhole limpet hemocyanin conjugate plus QS21 in patients with epithelial ovarian, fallopian tube, or peritoneal cancer. *Clin Cancer Res.* 13:4170-4177.
- ❖ Salazar M. L., Jiménez J. M., Villar J., Rivera M., Báez M., Manubens A. y Becker M. I. (2019). N-Glycosylation of mollusk hemocyanins contributes to their structural stability and immunomodulatory properties in mammals. *The Journal of biological chemistry,* 294(51), 19546–19564.
- ❖ Salvato B. y Beltramini M. (1990). Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of binuclear copper active site. *Life Chem Rep* 8:1–47
- ❖ Salvato B., Santamaria M., Beltramini M., Alzuet G. y Casella L. (1998). The enzymatic properties of *Octopus vulgaris* hemocyanin: o-diphenol oxidase activity. *Biochemistry,* 37(40), 14065–14077.
- ❖ Schäfer G. G., Grebe L. J., Schinkel R., y Lieb B. (2021). The Evolution of Hemocyanin Genes in Caenogastropoda: Gene Duplications and Intron Accumulation in Highly Diverse Gastropods. *Journal of molecular evolution,* 89(9-10), 639–655.

- ❖ Schäfer G. G., Pedrini-Martha V., Schnegg R., Dallinger R., Jackson D. J. y Lieb B. (2019). Hemocyanin genes as indicators of habitat shifts in Panpulmonata? *Molecular phylogenetics and evolution*, 130, 99–103.
- ❖ Schenkman E., y Lamm D.L. (2004). Superficial bladder cancer therapy. *Scientific-World Journal*. 4 Suppl 1:387-399.
- ❖ Seuffert, M. E., & Martín, P. R. (2010). Dependence on aerial respiration and its influence on microdistribution in the invasive freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biological Invasions*, 12(6), 1695–1708.
- ❖ Shapouri-Moghaddam A., Mohammadian S., Vazini H., Taghadosi M., Esmaili S. A., Mardani F., Seifi B., Mohammadi A., Afshari J. T., y Sahebkar A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cellular physiology*, 233(9), 6425–6440.
- ❖ Shen S., Zhang F., Zeng S., Tian Y., Chai X., Gee S., Hammock B.D. y Zheng J. (2009). Development of enantioselective polyclonal antibodies to detect styrene oxide protein adducts. *Anal Chem* 2009; 81: 2668-77.
- ❖ Shen Y., Maupetit J., Derreumaux P. y Tufféry P. (2014). Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(10), 4745–4758.
- ❖ Siddiqui N. I., Idakieva K., Demarsin B., Doumanova L., Compennolle F., y Gielens C. (2007). Involvement of glycan chains in the antigenicity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochemical and biophysical research communications*, 361(3), 705–711.
- ❖ Siddiqui N.I., Akosung R.F., Gielens C. (2006). Location of intrinsic and inducible phenoloxidase activity in molluscan hemocyanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348(3):1138–44.
- ❖ Smith V.J. (2010). Immunology of Invertebrates: *Cellular. Encyclopedia of life sciences (ELS)*, Chichester.
- ❖ Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. (1996). Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* 96(7):2563–2606.
- ❖ Somasundar P., Riggs D.R., Jackson B.J., y McFadden D.W. (2005). Inhibition of melanoma growth by hemocyanin occurs via early apoptotic pathways. *Am J Surg*. 190:713-716.
- ❖ Staudacher E. (2021). Mollusc N-glycosylation: Structures, Functions and Perspectives. *Biomolecules*, 11(12), 1820.
- ❖ Steinman, R.M., y Banchereau J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 449:419-426.
- ❖ Stoeva S., Schutz J., Gebauer W., Hundsdorfer T., Manz C., Markl J., Voelter W. (1999). Primary structure and unusual carbohydrate moiety of functional unit 2-c of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *Biochem Biophys Acta* 1435(1–2):94–109.
- ❖ Stoyanova E., Mihaylova N., Ralchev N., Bradyanova S., Manoylov I., Raynova Y., Idakieva K., Tchorbanov A. (2024). Immunotherapeutic Potential of Mollusk Hemocyanins in Murine Model of Melanoma. *Marine drugs*, 22(5), 220.

- ❖ Su Q.P., Wen D.Z., Yang Q., Zhang Y.H., Liu C. y Wang L. (2007). Comparison of phage pVIII and KLH as vector in inducing the production of cytokines in C57BL/6J mice. *Vaccine*. 25:970-975.
- ❖ Sugumaran M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment cell research*, 15(1), 2–9.
- ❖ Suleria H. A., Masci P. P., Gobe G. C., y Osborne S. A. (2017). Therapeutic potential of abalone and status of bioactive molecules: A comprehensive review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(8), 1742–1748.
- ❖ Sun J., Mu H., Ip J. C. H., Li R., Xu T., Accorsi A., Sánchez Alvarado A., Ross E., Lan Y., Sun Y., Castro-Vazquez A., Vega I. A., Heras H., Ituarte S., Van Bocxlaer B., Hayes K. A., Cowie R. H., Zhao Z., Zhang Y., Qian P. Y., y Qiu J. W. (2019). Signatures of Divergence, Invasiveness, and Terrestrialization Revealed by Four Apple Snail Genomes. *Molecular biology and evolution*, 36(7), 1507–1520.
- ❖ Swerdlow R.D., Ebert R.F., Lee P., Bonaventura C. y Miller K.I. (1996). Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 113:537-548.
- ❖ Swerdlow R.D., Ratliff T.L., La Regina M., Ritchey J.K., Ebert R.F. (1994). Immunotherapy with keyhole limpet hemocyanin: efficacy and safety in the MB-49 intravesical murine bladder tumor model. *J. Urol*. 151, 1718–1722.
- ❖ Tanaka Y., Kato S., Stabrin M., Raunse S., Matsui T., Christos G. (2019). Cryo-EM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin. *IUCr* 6:426–437.
- ❖ Tang H., Zhang J., Shi K., Aihara H. y Du G. (2019). Insight into subtilisin E-S7 cleavage pattern based on crystal structure and hydrolysates peptide analysis. *Biochemical and biophysical research communications*, 512(3), 623–628.
- ❖ Tchorbanov A., Idakieva K., Mihaylova N., Doumanova L. (2008). Modulation of the immune response using *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1033-8.
- ❖ Teo, S. (2001) Evaluation of different duck varieties for the control of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in transplanted and direct seeded rice. *Crop Protection* 20: 599-604.
- ❖ Terwilliger N.B., Ryan M.C. (2006). Functional and phylogenetic analyses of phenoloxidases from brachyuran (*Cancer magister*) and branchiopod (*Artemia franciscana*, *Triops longicaudatus*) crustaceans. *Biol Bull* 210(1):38–50.
- ❖ Terwilliger N.H. (1998). Functional Adaptations of Oxygen-Transport Proteins. *The Journal of Experimental Biology*, 201, 1085–1098.
- ❖ Theilacker C., Coleman F.T., Mueschenborn S., Llosa N., Grout M., y Pier G.B. (2003). Construction and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide-alginate conjugate vaccine. *Infect Immun*. 71:3875-3884.
- ❖ Thonig A., Oellermann M., Lieb B., Mark F. (2014). A new haemocyanin in cuttlefish (*Sepia officinalis*) eggs: sequence analysis and relevance during ontogeny. *Evodevo*:6.

- ❖ Todinova S., Raynova Y. e Idakieva K. (2018). Calorimetric Study of *Helix aspersa* Maxima Hemocyanin Isoforms. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2018, 8450792.
- ❖ Torres H. N. (1983). *Bioquímica general*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: El Ateneo.
- ❖ Unanue E. R., Cerottini J. C. (1970). The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.* 131: 711–725.
- ❖ Vavricka C.J., Han Q., Mehere P., Ding H., Christensen B.M., Li J. (2014). Tyrosine metabolic enzymes from insects and mammals: a comparative perspective. *Insect Sci* 21(1):13–19.
- ❖ Villar J., Salazar M. L., Jiménez J. M., Campo M. D., Manubens A., Gleisner M. A., Ávalos I., Salazar-Onfray F., Salazar F., Mitchell D. A., Alshahrani M. Y., Martínez-Pomares L., y Becker M. I. (2021). C-type lectin receptors MR and DC-SIGN are involved in recognition of hemocyanins, shaping their immunostimulatory effects on human dendritic cells. *European journal of immunology*, 51(7), 1715–1731.
- ❖ Wang G., Li X. y Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093.
- ❖ Wang G.; Li X.; Wang Z. (2009). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res.* 37, D933–D937.
- ❖ Watson F. L., Püttmann-Holgado R., Thomas F., Lamar D. L., Hughes M., Kondo M., Rebel V. I. y Schmucker D. (2005). Extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742), 1874–1878.
- ❖ Weigle, W.O. (1964). Immunochemical properties of hemocyanin. *Immunochemistry* 1, 295–302.
- ❖ Williams C. J., Headd J. J., Moriarty N. W., Prisant M. G., Videau L. L., Deis L. N., Verma V., Keedy D. A., Hintze B. J., Chen V. B., Jain S., Lewis S. M., Arendall W. B., 3ro, Snoeyink J., Adams P. D., Lovell S. C., Richardson J. S. y Richardson D. C. (2018). MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 27(1), 293–315.
- ❖ Wirguin I., Suturkova-Milosević L., Briani C., Latov N. (1995). Keyhole limpet hemocyanin contains Gal(β1–3)-GalNAc determinants that are cross-reactive with the T antigen. *Cancer Immunol. Immunother.* 40: 307–310.
- ❖ Wojda I., Cytryńska M., Zdybicka-Barabas A., Kordaczuk J. (2020). Insect Defense Proteins and Peptides. En: Hoeger U. y Harris J. (eds.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (págs.81-121). *Subcellular Biochemistry*, vol 94. Springer, Cham.
- ❖ Wong P.K., Kwong K.L. y Qiu J.W. (2009). Complex interactions among fish, snails and macrophytes: implications for biological control of an invasive snail. *Biological Invasions* 11: 2223-2232.
- ❖ Wu Q., Patocka J., Kuca K. (2018). Insect antimicrobial peptides, a minireview. *Toxins* 10:461.

- ❖ Yao T., Zhao M. M., He J., Han T., Peng W., Zhang H., Wang J. Y. y Jiang J. Z. (2019). Gene expression and phenoloxidase activities of hemocyanin isoforms in response to pathogen infections in abalone *Haliotis diversicolor*. *International journal of biological macromolecules*, 129, 538–551.
- ❖ Yasuda K., y Ushio H. (2016). Keyhole limpet hemocyanin induces innate immunity via Syk and Erk phosphorylation. *EXCLI journal*, 15, 474–481.
- ❖ Zanjani N.T., Sairi F., Marshall G., Saksena M.M., Valtchev P., Gomes V.G., Cunningham M.L., and Dehghani F. (2013). Formulation of abalone hemocyanin with high antiviral activity and stability. *Eur J Pharm Sci*. 53:77-85.
- ❖ Zatta P. (1981). Protein-lipid interactions in *Carcinus maenas* (crustacea) hemocyanin. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 69(4), 731-735.
- ❖ Zeis B. (2020) Hemoglobin in Arthropods—Daphnia as a Model. En: Hoeger U. y Harris J. (eds.). *Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins* (págs. 163-194). Subcellular Biochemistry, vol 94. Springer, Cham.
- ❖ Zhang Q., Dai X., Cong Y., Zhang J., Chen D.H., Dougherty M.T., Wang J., Ludtke S.J., SchmidMF, Chiu W. (2013). Cryo-EM structure of a molluscan hemocyanin suggests its allosteric mechanism. *Structure* 21(4):604–613.
- ❖ Zhang S. M., Adema C. M., Kepler T. B. y Loker E. S. (2004). Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate. *Science* (New York, N.Y.), 305(5681), 251–254.
- ❖ Zhang Y. L., Peng B., Li H., Yan F., Wu H. K., Zhao X. L., Lin X. M., Min S. Y., Gao Y. Y., Wang S. Y., Li Y. Y., y Peng X. X. (2017a). C-terminal domain of hemocyanin, a major antimicrobial protein from *Litopenaeus vannamei*: structural homology with immunoglobulins and molecular diversity. *Front Immunol* 8:611.
- ❖ Zhang Y., Wang S., Peng X. (2004). Identification of a type of human IgG-like protein in shrimp *Penaeus vannamei* by mass spectrometry. *J Exp Mar Biol Ecol* 301(1):39–54.
- ❖ Zhang Y., Wang S., Xu A., Chen J., Lin B., y Peng X. (2006). Affinity proteomic Approach for identification of an IgA-like protein in *Litopenaeus vannamei* and study on its Agglutination characterization. *J Proteome Res* 5(4):815–821.
- ❖ Zhang Z., Wang F., Chen C., Zheng Z., Aweya J. J., y Zhang Y. (2017b). Glycosylation of hemocyanin in *Litopenaeus vannamei* is an antibacterial response feature. *Immunol Lett* 192:42–47.
- ❖ Zhao X., Guo L., Zhang Y., Liu Y., Zhang X., Lun J., Chen J., y Li Y. (2012). SNPs of hemocyanin C-terminal fragment in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *FEBS Lett* 586(4):403–410.
- ❖ Zhong T. Y., Arancibia S., Born R., Tampe R., Villar J., Del Campo M., Manubens A., y Becker M. I. (2016). Hemocyanins Stimulate Innate Immunity by Inducing Different Temporal Patterns of Proinflammatory Cytokine Expression in Macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 196(11), 4650–4662.
- ❖ Zhu H., Zhuang J., Feng H., Liang R., Wang J., Xie L. y Zhu P. (2014). Cryo-EM structure of isomeric molluscan hemocyanin triggered by viral infection. *PLoS one*, 9(6), e98766.

- ❖ Zhuang J., Coates C. J., Zhu H., Zhu P., Wu Z., y Xie L. (2015). Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Developmental and Comparative Immunology*, 49(1), 96–102.
- ❖ Zielinski S., Sartoris F. J., y Pörtner H. O. (2001). Temperature effects on hemocyanin oxygen binding in an antarctic cephalopod. *The Biological bulletin*, 200(1), 67–76.